

TESIS

GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN OTAK DAN PARU-PARU MENCIT YANG DIINFEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1 CLADE 2.1 DAN CLADE 2.3



Oleh :

LINTANG KHRISNA MUTTI
NIM 061142010

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN OTAK DAN
PARU-PARU MENCIT YANG DIINFEKSI
VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1
CLADE 2.1. DAN CLADE 2.3**

TESIS

untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Penyakit Kesehatan Masyarakat dan Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Surabaya

LINTANG KHRISNA MUTTL drh
NIM. 061142010

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

Dengan ini saya menyatakan bahwa Tesis berjudul :

**GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN OTAK DAN
PARU-PARU MENCIT YANG DIINFEKSI
VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1
CLADE 2.1. DAN CLADE 2.3**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 23 September 2013



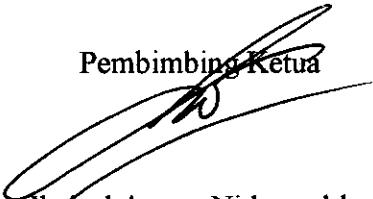
LINTANG KHRISNA MUTTL drh
NIM 061142010

LEMBAR PENGESAHAN

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL : 23 September 2013**

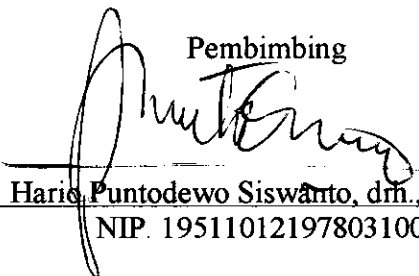
Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., M.S.
NIP. 195803081984031003

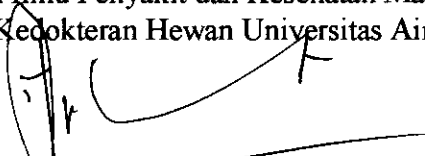
Pembimbing



Dr. Haris Puntodewo Siswanto, drh., M.App.SC.
NIP. 195110121978031003

Mengetahui :

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



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

Hasil Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 23 September 2013

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., MS.

Anggota : 1. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS.

2. Dr. Hario Puntodewo Siswanto, drh., M.App.SC.

3. Dr. Thomas V. Widyatno., drh., MSi.

4. Dr. Nove Hidayati, drh., M.Kes.

Surabaya, 23 September 2013
Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan Nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang segala puja dan puji syukur penulis panjatkan kehadirat-Nya Yang Maha Tinggi, serta sholawat serta salam penulis haturkan kepada Rasulullah SAW, keluarga dan sahabat – sahabatnya. Atas segala rahmat dan hidayah Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tesis yang merupakan syarat kelulusan dengan judul **GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN OTAK DAN PARU-PARU MENCIT YANG DIINFEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1 CLADE 2.1. DAN CLADE 2.3**

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D atas kesempatan dan fasilitas untuk studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terima kasih yang tidak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada kedua pembimbing selama menempuh pendidikan pasca sarjana, Dr. Chairul A. Nidom, drh, M.S. dan Dr. Hario Puntodewo Siswanto, drh., M.App.SC atas bimbingan, dorongan serta saran yang telah diberikan sampai penelitian ini selesai. Semoga Allah 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., M.Sc.; Dr. Thomas Widyatno, drh., MSi.; Dr. Nove Hidayati, drh, M.Kes. selaku dosen penguji penelitian yang dengan ikhlas meluangkan waktu serta dengan sabar menguji dan membimbing, memberikan masukan, serta motivasi yang tiada hentinya sampai dengan selesainya penyusunan tesis ini. Semoga Allah SWT membalasnya dengan limpahan Rahmat.

Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada ketua *Avian Influenza-zoonosis Research Center* (AIRC) Universitas Airlangga, Dr. Chairul Anwar Nidom, drh.,MS beserta seluruh tim kerja Dr. Kadek Rahmawati, drh.,MKes, drh.Kholik, Reviany V. Nidom,Apt.,MFarm, drh. Nanik, drh Ire, Muh. Yusuf Alamudi, SSi,MKes, mas Surip, Alfian S.Fam, drh. Fidi dan drh. Elsa.

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

Terima kasih kepada ayahanda Hariyono dan Ibunda Kristina Ida Agustin atas cinta, dukungan tak terhingga dan doa yang tiada henti demi keberhasilan putrinya, didikan dan nasihat beliau selalu menjadi kekuatan tersendiri yang membantu penulis meraih keberhasilan. Ucapan terimakasih saja tak cukup untuk membalas semua pengorbanan yang telah beliau berikan.

Semoga Allah membalasnya dengan cinta, pahala, rahmat dan barokah yang melimpah.

Kepada kakakku Yogie Candra Bhumi yang telah memberikan cinta, doa dan dukungan yang melimpah. Gelar Megister ini merupakan pembangkit semangat untuk meraih keberhasilan yang lebih tinggi. Untuk mas Puguh Eko Rianto, terimakasih atas cinta, dukungan, bantuan, pengertian dan dorongan semangat untuk meraih cita-cita yang tinggi.

Seluruh keluarga besar yang telah turut memberikan dukungan moril, materiil maupun spirituil.

Para sahabat selama berpendidikan di Universitas Airlangga. drh. Rahmalia Dwi; Ardhani Hargi FP; Dewi Aliffiana, S.IAN.; Anisa Laksmi, S.IAN. terima kasih telah mengisi cawan hidupku selama lima tahun lebih.

Bapak dan ibu kost serta teman-teman kost yang telah memberikan semangat selama pendidikan.

Kepada rekan-rekan kantor Lancar Arpa Perkasa - Biru Cipta Komunikasi (Mas Andro Rohmana Putra, Mas M. Israrully Budiman., Mas M. Syaiful Ramadhana, Mas Bambang Waluyo, Mas Dimas, Ricky, Hassan, Dadu) yang telah membantu memberikan dukungan moril, sprituil serta materiil untuk dapat menyelesaikan program study S2 Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner di FKH Universitas Airlangga.

Semua sahabat-sahabat, FKH 2007 , serta teman-teman S2 Program Studi IPKMV, Vaksinologi, Biologi Reproduksi dan Agribisnis Veteriner

serta seluruh tenaga kependidikan FKH UA dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini, penulis ucapkan terima kasih.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini 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, 23 September 2013

Penulis

RINGKASAN

GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN OTAK DAN PARU-PARU MENCIT YANG DIINFEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1 CLADE 2.1. DAN CLADE 2.3

RINGKASAN

Penyakit Flu Burung atau *Avian influenza* dikenal sebagai *fowl plague* pertama kali ditemukan di Itali pada tahun 1878 sebagai penyakit yang menjangkiti unggas. *Avian influenza* (AI) merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus *influenza* tipe A dari family *orthomyxoviridae*. Saat ini virus Influenza A yang banyak dibahas adalah virus Avian Influenza (H5N1), virus flu pademic 2009 (H1N1) dan juga flu musiman (H3N2) karena dapat menyebabkan pandemi influenza. Virus AI sub tipe H5N1 sangat patogen yang dapat menyerang ternak unggas (burung, bebek, dan ayam) di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi, dan manusia) (Nidom,2004;Webster and Hulse,2004).

Penularan influenza melalui air (*water-borne*) pada bebek telah ditemukan di danau 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). Penyakit Flu Burung sudah endemis di Indonesia. Selama ini telah diidentifikasi secara molekular bahwa penyebab utama penyakit ini pada unggas dan manusia adalah adalah virus H5N1 Clade 2.1.1 Clade 2.1.2 dan Clade 2.1.3 . Namun secara mendadak, pada akhir

2012, terjadi kematian pada itik dengan jumlah yang tinggi di Jawa Tengah, Jawa Timur dan Jawa Barat. Agen penyebab kematian pada itik ini selanjutnya diidentifikasi sebagai virus H5N1 *Clade* 2.3.2 yang selama ini belum pernah ada di Indonesia. Penyebaran relatif sangat cepat. Sampai akhir Januari 2013 virus telah menyebar di tiga belas Provinsi di Indonesia dan secara akumulatif telah mengakibatkan kematian lebih dari 260 ribu ekor itik.

Pemeriksaan molekuler terhadap Virus AI H5N1 *Clade* 2.3 menunjukkan adanya delapan gen berbeda dengan virus AI H5N1 *Clade* 2.1, artinya virus ini bukan hasil mutasi virus AI H5N1 yang sudah ada di Indonesia, melainkan merupakan introduksi virus baru. Dibandingkan dengan virus sebelumnya, virus AI H5N1 *clade* 2.3 ini sejauh ini dilaporkan hanya menyebabkan banyak kematian pada itik, meskipun mempunyai patogenisitas yang tinggi dan berpotensi menular pada manusia. Selama ini virus H5N1 *clade* 2.1. merupakan virus yang dapat menyebar ke seluruh organ dalam tubuh manusia dan selama ini manusia yang terinfeksi virus Flu Burung dan menjadi fatal disebabkan oleh kegagalan fungsi organ (*multiorgan failure*). Sementara itu belum ada informasi kajian tentang pengaruh virus AI H5N1 *clade* 2.3 mamalia. Oleh karena itu perlu diteliti lebih lanjut, perubahan patologi anatomi pada organ mamalia yang terinfeksi oleh virus AI H5N1 *clade* 2.3.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.1 dan *clade* 2.3 dalam menginfeksi target organ mencit berdasarkan gejala klinis yang terlihat pada unggas, ayam dan itik.

Hasil dari penelitian ini adalah berupa kerusakan secara mikroskopis yang terlihat pada jaringan organ otak dan paru-paru mencit yang diakibatkan oleh infeksi virus AI subtype H5N1 clade 2.1 dan 2.3 pada mencit. Hal ini bisa disebabkan kedua clade virus AI tersebut memiliki reseptor yang sama terhadap mencit sehingga mampu menimbulkan kerusakan pada organ tubuh. Hasil ini dapat disimpulkan bahwa virus AI subtype H5N1 Clade 2.1 dan Clade 2.3 memiliki potensi menular pada mencit dan kemungkinan juga manusia.

SUMMARY

HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF THE MICE BRAIN AND LUNGS INFECTED by AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 CLADE 2.1 AND CLADE 2.3

SUMMARY

Avian influenza, refers to be known as fowl plague, was first discovered in Italy in 1878 as the disease that infects poultry. Avian influenza (AI) is a zoonotic disease caused by type A influenza viruses of the family Orthomyxoviridae. Influenza A viruses often discussed recently are the Avian Influenza virus (H5N1), 2009 pandemic flu virus (H1N1), and seasonal flu (H3N2) as it can cause the influenza pandemic. AI subtype H5N1 virus is highly pathogenic to attack poultry (birds, ducks, and chickens) in the whole of Southeast Asia and unexpectedly occurs transmission from birds to mammals (cats, pigs, and humans) (Raharjo and Nidom,2004;Webster and Hulse,2004).

The influenza transmission through the water (water - borne) in ducks has been found in the lake of several countries as in Seberia, Canada, and Alaska. Influenza virus will replicate in colonic epithelial cells in duck with no clinical symptoms but excrete the virus in feces (Kida,1980;Soda,2009). Avian Influenza disease has been endemic in Indonesia. This far, H5N1 Clade 2.1.1, 2.1.2, and 2.1.3 have been identified as the molecular and the cause of major disease in poultry and humans. At the end of 2012, the virus had caused death in ducks with the highest number in Central Java, East Java, and West Java. Agent caused death in ducks was

further identified as AI subtype H5N1 Clade 2.3 viruses that have never existed in Indonesia and relatively spread very quickly. As of the end of January 2013 the virus has spread in thirteen provinces in Indonesia and cumulatively have resulted in the deaths of more than 260 thousand ducks.

The molecular examination of the AI subtype H5N1 Clade 2.3 virus shows eight different genes from AI subtype H5N1 Clade 2.1 virus which means the virus is not the result of mutations in the AI subtype H5N1 virus that has occurred in Indonesia but is a new virus introduction. Being compared with the previous virus, the AI subtype H5N1 clade 2.3 virus has been reported as the causes of the deaths in ducks, although it has a high pathogenicity and potentially infectious to humans. During this time the AI subtype H5N1 clade 2.1 virus is a virus that can spread and infect to all organs in the human body then become fatal due to multi-organ failure. Meanwhile, there are not any information yet about the study of AI subtype H5N1 virus clade 2.3 effect in mammals. Therefore, it needs any further investigation on anatomic pathology changes in organs of mammals which are infected by AI H5N1 clade 2.3 virus.

This study aims to describe the AI subtype H5N1 clade 2.1 and clade 2.3 viruses in the target organs of infected mice based on clinical symptoms seen in birds, chickens and ducks.

The results of this study are in the form of microscopic damage seen on brain tissues and of mice lungs tissues which are caused by infection with AI subtype H5N1 clade 2.1 and 2.3 viruses in mice. This could be due to those two of AI subtype

H5N1 clade viruses have the same receptors on mice that can cause damage to the organs. It can be summed up that the results of the AI subtype H5N1 Clade 2.1 and Clade 2.3 viruses have the infectious potential in mice and possibly in humans as well.

THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF THE MICE BRAIN AND LUNGS INFECTED by AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 CLADE 2.1 AND CLADE 2.3

Lintang Khrisna Mutti, drh

ABSTRACT

Since 2003, highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses have caused outbreaks among poultries in Indonesia every year and produced the highest number of human victims worldwide. Phylogenetic analysis of the H5N1 avian influenza virus genes revealed that all virus belonged to clade 2.1. At the end of 2012, the virus had suddenly caused death in ducks with the highest number in Central Java, East Java, and West Java. Based on the same analysis of the duck isolated virus genes revealed that the viruses belonged to clade 2.3.

This study aims to determine comparison between AI H5N1 Clade 2.1 and Clade 2.3 viruses in attacking the target organ of each clade, based on clinical symptoms seen in birds. This study was performed with both viruses infect mice as representative of mammals.

This research was divided into three steps; the first step infected 15 mice with AI subtype H5N1 clade 2.1 and clade 2.3 viruses for animal models, the second step observed the mice for fifteen days, the third step collected sample of AI subtype H5N1 clade 2.1 and clade 2.3 histopatology changes analysis. The Histopathological changes was analyzed from mice brain and lungs tissues with HE method.

The results of this study were provided in the form of microscopic damage seen on mice of their brain tissues and organs of lungs tissues caused by infection with AI subtype H5N1 clade 2.1 and clade 2.3 viruses. This could be due to those two of AI subtype H5N1 clade viruses have the same receptors on mice that can cause damage to the organs of mammals. It can be summed up that the results of the AI subtype H5N1 Clade 2.1 and Clade 2.3 viruses have the infectious potential in mice and possibly in humans as well.

Keyword: AI subtype H5N1, clade 2.1, clade 2.3, histopathological changes.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PRASARAT GELAR.....	ii
PERNYATAAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	x
SUMMARY	xiii
ABSTRACT.....	xvi
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTARTABEL	xx
DAFTAR GAMBAR	xxi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xxii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Mencit (<i>MusMusculus</i>).....	6
2.2. Virus <i>Avian Influenza</i>	7
2.2.1. Etiologi dan Morfologi Virus <i>Avian Influenza</i>	7
2.2.2. Sifat Virus <i>Avian Influenza</i>	9

2.2.3.	Patogenesis	10
2.2.4.	Penularan	12
2.2.5.	Diagnosi	12
2.3.	Karakter Virus H5N1 Clade 2.1 dan Clade 2.3	13
2.4.	Tinjauan Tentang Otak	16
2.4.1.	Anatomi Dan Fisiologi Otak	16
2.5.	Tinjauan Tentang Paru-Paru	18
2.5.1.	Anatomi Paru-Paru	18
2.5.2.	Volume dan Kapasitas Fungsi Paru-Paru	20
2.5.2.1.	Volume Paru	21
2.5.2.2.	Kapasitas Fungsi Paru	21
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	23
3.1	Kerangka konseptual penelitian	23
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN	26
4.1	Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.2.	Materi Penelitian	26
4.2.1.	Alat dan Bahan Penelitian	26
4.3.	Variabel penelitian	27
4.3.1.	Variabel Bebas	27
4.3.2.	Variabel tergantung	27
4.3.3.	Variabel Kendali	27
4.3.4.	Definisi Operasional Variabel	27
4.4.	Populasi dan Sampel	28
4.4.1.	Populasi	28
4.4.2.	Sampel	28
4.5.	Metode dan Prosedur Penelitian	29
4.5.1.	Penghitungan Virus	29
4.5.2.	Teknik Infeksi Virus pada Mencit	30
4.5.3.	Penanganan Sampel di Laboratorium	30
4.5.3.1.	Preparasi Organ	30
4.5.3.1.1.	Proses Jaringan	31
4.5.3.1.2.	Pewarnaan Histopatologi Paru-Paru dan Otak Mencit dengan Hematoxilin-Eosin	32
4.5.3.1.3.	Pemeriksaan Histologis	33
4.6.	Kerangka Operasional	35

4.7.	Pengolahan Data	36
BAB 5 HASIL PENELITIAN		37
5.1.	Otak	37
5.1.1.	Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologi Otak Mencit	37
5.1.2.	Hasil Analisis Statistik Histopatologi Otak Mencit	42
5.2.	Paru-Paru	44
5.2.1.	Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologi Paru-Paru Mencit	44
5.2.2.	Hasil Analisis Statistik Histopatologi Paru-Paru Mencit	47
BAB 6 PEMBAHASAN		50
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		55
7.1.	Kesimpulan	55
7.2.	Saran	55
DAFTAR PUSTAKA		56
LAMPIRAN		60

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Kerusakan jaringan yang dinilai.....	33
Tabel 4.2. Kriteria Skoring organ paru-paru dan otak.....	34
Tabel. 5.1 Hasil pengamatan histopatologi otak mencit pada hewan uji perlakuan infeksi virus <i>Avian Influenza</i> H5N1.....	43
Tabel 5.2. Hasil pengamatan histopatologi otak mencit pada hewan uji perlakuan infeksi virus <i>Avian Influenza</i> H5N1.....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Mencit (<i>Mus Musculus</i>)	5
Gambar 2.2. Spesies yang dapat terinfeksi Virus <i>Influenza</i>	6
Gambar 2.3. Morfologi virus <i>Avian Influenza</i>	7
Gambar 2.4. Otak Mencit secara umum	12
Gambar 2.5. Paru-paru Normal Mencit	14
Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	25
Gambar 5.1. Histopatologi jaringan otak mencit yang mengalami encephalitis	38
Gambar 5.2. Tanda panah menunjukkan adanya perivaskular cuffing	39
Gambar 5.3. Tanda panah menunjukkan adanya perdarahan	40
Gambar 5.4. Tanda panah menunjukkan adanya nekrosis fokal	41
Gambar 5.5. Tanda panah menunjukkan adanya degenerasi neuron	42
Gambar 5.6. Pneumonia interstitialis disertai dengan perdarahan massif	45
Gambar 5.7. Tanda panah menunjukkan pneumonia interstitialis	46
Gambar 5.8. Tanda panah menunjukan peribronchiolitis	47

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

AI	: <i>Avian Influenza</i>
AIRC	: <i>Avian Influenza Research Centre</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
BSL3	: <i>Biosafety Level3</i>
CSF	: <i>Cerebro Spinal Fluid</i>
EID ₅₀	: <i>Egg Infectious Dose₅₀</i>
ERV	: <i>Expiratory Reserve Volume</i>
FRC	: <i>Functional Residual Capacity</i>
HPAI	: <i>Highly pathogenic Avian Influenza</i>
IC	: <i>Inspiratory Capacity</i>
IRV	: <i>Inspiratory Reserve Volume</i>
LPAI	: <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>
M	: <i>Matrix</i>
Mm	: <i>Mili meter</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>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
RV	: <i>Residual Volume</i>
SPF	: <i>Specific Pathogen Free</i>
TLC	: <i>Total Lung Capacity</i>
TV	: <i>Tidal Volume</i>

VC : *Vital Capacity*
WHO : *World Health Organization*
 μ l : mikroliter
 μ m : Mikrometer

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit Flu Burung atau *Avian Influenza* atau dikenal sebagai *fowl plague* pertama kali ditemukan di Itali pada tahun 1878 sebagai penyakit yang menjangkiti unggas (Werner, 2006). *Avian influenza* merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus *influenza* tipe A dari famili *orthomyxoviridae*. Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 sangat patogen yang dapat menyerang ternak unggas (burung, bebek, dan ayam) di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi, dan manusia) (Raharjo dan Nidom, 2004; Webster and Hulse, 2004).

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).

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. Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 sangat patogen yang dapat menyerang ternak unggas (burung, bebek, dan ayam) di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi, dan manusia) (Raharjo dan Nidom, 2004; Webster and Hulse, 2004).

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).

Sampai dengan Juli tahun 2012, telah dilaporkan kasus Avian Influenza Sebanyak 607 orang yang terjangkit Avian Influenza dengan jumlah kematian sebesar 358 orang di 15 negara. Sementara di Indonesia sampai dengan Juli 2012 telah terjadi kasus sebanyak 191 orang dengan kematian sebesar 159 orang, dan 8 dari kematian tersebut terjadi di tahun 2012. Kasus H5N1 pertama terjadi pada tanggal 9 Januari 2009 di Bogor, sementara kasus terakhir ditemukan tanggal 24 Juli 2012 di Yogyakarta. (WHO,2012).

Penularan Influenza melalui air (*water-borne*) pada itik telah ditemukan pada danau di beberapa negara di Seberia, Kanada, dan Alaska. Virus Influenza akan melakukan replikasi di sel epitel kolon pada itik dengan tidak menunjukkan gejala klinis tetapi mengeluarkan virus melalui feses (Kida,1980; Soda,2009).

Penyakit Flu Burung sudah endemis di Indonesia. Selama ini telah diidentifikasi secara molekular bahwa penyebab utama penyakit ini pada unggas dan manusia adalah virus H5N1 Clade 2.1.1 Clade 2.1.2 dan Clade 2.1.3. Namun secara mendadak, pada akhir 2012, terjadi kematian pada itik dengan jumlah yang tinggi di Jawa Tengah, Jawa Timur dan Jawa Barat. Agen penyebab kematian pada itik ini selanjutnya diidentifikasi sebagai virus H5N1 Clade 2.3.2 yang selama ini belum pernah ada di Indonesia. Penyebaran relatif sangat cepat. Sampai akhir Januari 2013 virus telah menyebar di tiga belas

Provinsi di Indonesia dan secara akumulatif telah mengakibatkan kematian lebih dari 260 ribu ekor itik.

Pemeriksaan Biologi Molekuler terhadap Virus H5N1 Clade 2.3.2 menunjukkan adanya delapan gen berbeda dengan virus H5N1 Clade 2.1.1, Clade 2.1.2 dan Clade 2.1.3, artinya virus ini bukan hasil mutasi virus H5N1 yang sudah ada di Indonesia, melainkan merupakan introduksi virus baru. Antara virus H5N1 Clade 2.3.2 dengan virus sebelumnya sama-sama sangat mematikan terhadap unggas dan berpotensi dapat menular kepada manusia. Perbedaannya adalah Virus H5N1 Clade 2.3.2 sejauh ini dilaporkan hanya menyebabkan banyak kematian pada itik.

Selama ini virus H5N1 clade 2.1. merupakan virus yang bersifat dapat menyebar ke seluruh organ dalam tubuh manusia, sehingga virus bisa ditemukan dalam organ tubuh. Selama ini manusia yang terinfeksi virus Flu Burung menjadi fatal dikarenakan oleh kegagalan fungsi organ (*multiorgan failure*). Sementara itu belum ada informasi kajian tentang virus H5N1 clade 2.3, merusak organ penting pada mamalia, oleh karena itu perlu diteliti lebih lanjut, perubahan patologi anatomi pada organ mamalia yang terinfeksi oleh virus H5N1 clade 2.3.

1.2 Rumusan Masalah

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

- Apakah Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 clade 2.1 dan clade 2.3 mempunyai perbedaan target organ dalam bereplikasi untuk menyebabkan perubahan histopatologi organ otak mencit?
- Apakah terdapat perbedaan target organ Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 clade 2.1 dan clade 2.3 dalam bereplikasi untuk menyebabkan perubahan histopatologi organ paru-paru mencit?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk melaksanakan studi tentang adanya pengaruh Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 2.3. pada organ mencit.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan target organ antara virus Avian Influenza sub tipe H5N1 clade 2.1 dan clade 2.3 dalam bereplikasi untuk menyebabkan perubahan anatomi organ pada mencit

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang kemampuan virus *Avian Influenza subtype* H5N1 dalam menyebabkan sakit pada mencit sehingga dapat dijadikan dasar untuk penelitian virus *Avian Influenza* pada mamalia selanjutnya termasuk potensi terhadap penularan pada manusia

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepada masyarakat luas tentang potensi Virus Avian Influenza clade 2.3 menginfeksi pada mamalia berdasarkan kerusakan yang terjadi pada organ paru-paru dan otak.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit (*Mus Musculus*)

Mencit yang memiliki nama latin *Mus Musculus* adalah anggota dari *Muridae*. Taksonomi mencit adalah seperti di bawah ini :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Upafamil	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

(Sumber : IUCN,2007)

Hewan ini diduga sebagai mamalia terbanyak kedua di dunia, setelah manusia. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang hidup liar di hutan barangkali lebih sedikit daripada yang tinggal di perkotaan. Mencit adalah binatang asli Asia, India, dan Eropa Barat. Jenis ini sekarang ditemukan di seluruh dunia karena pengenalan oleh manusia. Mencit peliharaan memiliki periode kegiatan selama siang dan malam.



Gambar. 2.1. Mencit (*Mus Musculus*). (CIRM Research, 2013)

Mencit memiliki masa hidup atau umur antara 1.5 – 3 tahun dengan berat rata-rata dewasa 25 -40 g, rata-rata suhu normal pada mencit adalah 33 - 34° C. Bagian perut dibagi menjadi bagian nonglandular proksimal dan bagian distal kelenjar. Kedua bagian yang terlalu berbeda. Ini mirip dengan perut kuda. Paru-paru kiri terdiri dari satu lobus, sedangkan paru kanan terdiri dari empat lobus. Bedding harus dilakukan dua kali seminggu dengan pemberian alas gergaji kayu agar penyerapan urin baik. Mencit harus diberi makan pelleted komersial tikus atau hewan pengerat. Makanan asupan sekitar 20g/100g BB / hari; asupan air sekitar 15 ml/100g BB / hari. (*IUCN Red List of Threatened Species*.2007)

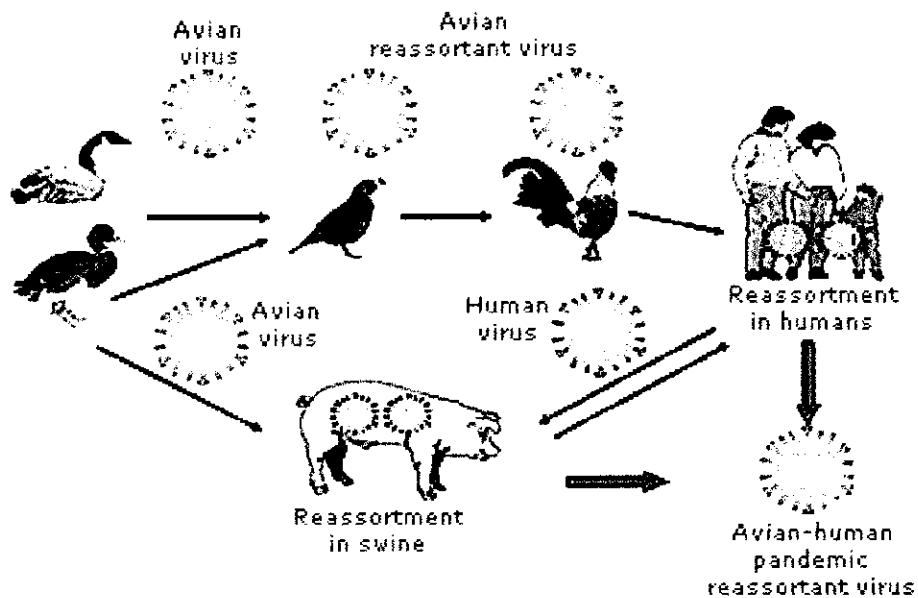
2.2. Virus Avian Influenza

2.2.1 Etiologi dan Morfologi Virus Avian Influenza

Virus *Avian Influenza* dikelompokkan dalam family *Orthomyxoviridae* ini terdapat tiga tipe, yaitu tipe A, B dan C. Virus yang menyerang unggas, termasuk

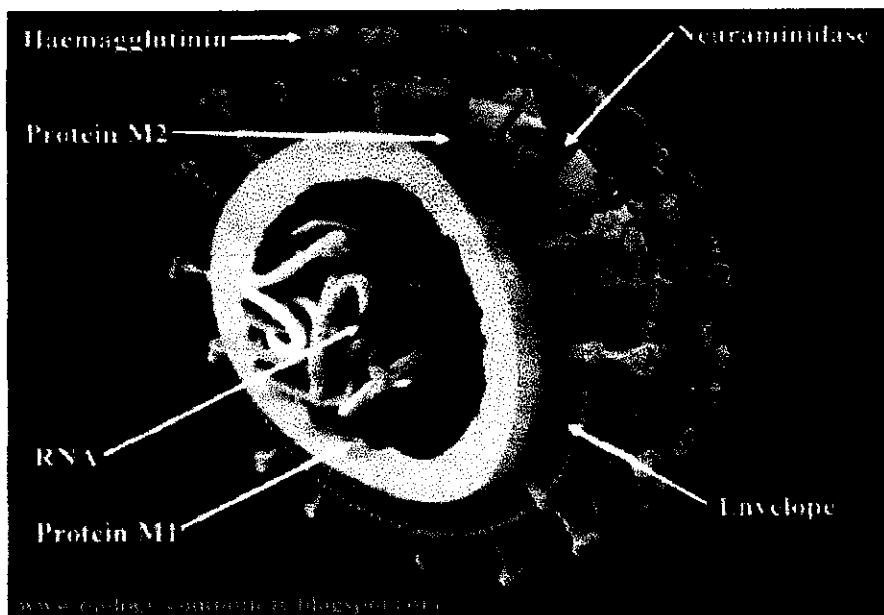
ayam, adalah tipe A. Virus tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia. Namun belakangan ini virus tipe A juga ditemukan pada manusia, babi, dan kuda (Fadilah dkk.,2007).

Virus *influenza* A ditemukan pada ayam, babi, kalkun, bebek, menthok, angsa, burung, ikan paus dan manusia. Virus B ditemukan pada manusia sedangkan virus *influenza* C ditemukan pada manusia dan babi. (Nidom,2005).



Gambar 2.2 Spesies yang dapat terinfeksi Virus *Influenza* (CDC, 2006)

Bentuk virus *Influenza* adalah pleomorfik, ovoid, filament dengan ukuran diameter 80-120 nm. Virus ini memiliki *envelope* dan memiliki genom ss RNA bersegmen sehingga dapat terjadi *genetic reassortment* (Raharjo dan Nidom, 2004) dan memiliki struktur antigen permukaan seperti *hemagglutinin* (HA), *neurominidase* (NA), matriks protein dan *mukleoprotein* (NP) (Nidom, 2005).



Gambar 2.3. Morfologi virus *Avian Influenza* (www.biology-community.blogspot.com)

Virus *influenza* A merupakan virus RNA dengan genom yang terdiri dari delapan gen RNA dan menghasilkan sepuluh protein. Kedelapan fragmen gen ini terbagi menjadi dua bagian yaitu gen eksternal dan gen internal. Gen eksternal terdiri dari gen *hemagglutinin* (HA) dan gen *neuraminidase* (NA) yaitu bersifat antigenik dan berfungsi dalam perlekatan pada sel *hospes* (Harimoto dan Kawaoka,2001; Halder dan Werner,2006).

2.2.2 Sifat Virus *Avian Influenza*

Virus *influenza* persisten dan infeksiif di dalam air, pada suhu 0°C selama lebih dari 30 hari dan suhu 28°C selama 26-30 hari (FAO,2004 ; CFSPH,2007). Virus *Avian influenza* menjadi inaktif pada suhu 56°C minimum selama 1 jam, suhu 60°C selama 3 menit, radiasi ion dan pH rendah (pH 2) (CFSPH,2007). Virus *influenza* rentan terhadap beberapa desinfektan seperti detergen, sodium

hipoklorit, etanol 70%, aldehid (formalin, glutaraldehid, formaldehid), fenol, iodium dan larutan lemak, dan tetap stabil pada pH antara 5.5-8 (Martin et al, 2006 ; CFSPH, 2007).

Virus *Avian Influenza* terlindungi oleh bahan organik yang ada di dalam kandang seperti tinja dan darah. Virus *Avian Influenza* masih tetap infeksius dalam fase selama 30 – 35 hari pada temperatur 4°C selama tujuh hari pada temperatur 20°C. Virus *Avian Influenza* yang bersifat infeksius dapat diisolasi dari cairan kotoran ayam selama 105 hari setelah depopulasi ayam pada saat terjadinya wabah *Avian Influenza*. Virus *Avian Influenza* dapat bertahan lama dengan kondisi lembab dan dingin serta dapat diisolasi dari air danau atau air kolam yang terletak di daerah yang banyak dihuni oleh unggas air (Tabbu, 2000).

2.2.3 Patogenesis

Proses terjadinya infeksi virus *avian influenza* terjadi secara inhalasi yaitu menghirup atau ingesti. Infeksi H5N1 dimulai ketika virus memasuki sel hospes setelah terjadi spikes virion dengan reseptor spesifik yang ada dipermukaan sel hospesnya. Virion akan menyusup ke sitoplasma sel dan akan mengintegrasikan materi genetiknya di dalam inti sel hospesnya, dan dengan menggunakan mesin genetik dari sel hospesnya, virus dapat bereplikasi membentuk virion-virion baru, dan virion ini dapat menginfeksi kembali sel-sel disekitarnya (Peiris et al., 2004).

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

(Raharjo dan Nidom, 2004). Virus HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) bersifat tropisme untuk berkembang biak pada alat pernafasan, pencernaan, sistem saraf dan peredaran darah sehingga mampu menyerang dan merusak semua organ tubuh. Salah satu tanda *Highly Pathogenic Avian Influenza* adalah tingkat kematian yang sangat tinggi, yaitu mencapai 100%. Kematian akibat *Highly Pathogenic Avian Influenza* berlangsung cepat dan didahului dengan gejala pernafasan atau kadang tanpa gejala. Virus yang bersifat HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) seperti H5 dan H7 mudah mengalami mutasi dan keganasannya ditentukan oleh waktu, tempat dan inang yang terinfeksi (Martin, V *et al.*, 2006).

Tahap pertama infeksi Virus *Avian Influenza* terjadi secara inhalasi. Pada tahap kedua virion masuk ke submukosa melalui kapiler, kemudian virus mengalami replikasi di dalam sel endotel dan menyebar melalui sistem peredaran darah atau sistem limfatik untuk selanjutnya menginfeksi sel organ visceral, otak dan kulit. Tahap ketiga pathogenesis penyakit *Avian Influenza* yaitu replika virus yang biasanya terbatas pada saluran pernafasan atau pencernaan. (Peiris *et al.*, 2004). Kerusakan yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza H5NI* ini berasal diantara satu dari tiga proses berikut, diantaranya adalah proses perbanyakan virus secara langsung dalam sel, efek secara langsung dari produksi mediator seluler seperti sitokin, iskemik (suplai darah yang tidak mencukupi) akibat adanya bekuan darah (thrombus) dalam jantung atau pembuluh darah. (Radji, 2006).

2.2.4. Penularan

Menurut Nadesui (2005), penularan melalui inhalasi dapat terjadi apabila manusia menghirup udara yang mengandung virus ke dalam saluran pernafasan. Virus ditularkan melalui kontak langsung dari unggas yang terinfeksi dengan unggas yang peka. Unggas yang terinfeksi mengeluarkan cairan yang berasal dari hidung, mulut, mata (konjunktiva), dan kloaka (feses).

Transmisi virus *Avian Influenza* sub tipe H5 yang menyerang peternakan terjadi melalui mekanisme : a). Transmisi langsung dari sekresi feses dan sekresi saluran respirasi burung yang terinfeksi; b). Telur yang terkontaminasi virus dalam incubator dan pecah dapat menginfeksi anak ayam yang sehat; c). Peralatan kandang yaitu tempat telur ayam, truk pengangkut pakan, pakaian dan sepatu dari pekerja; d). Tempat air minum ternak yang terkontaminasi; e). Tempat sampah (CDC,2006).

2.2.5. Diagnosis

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

2.3. Karakter Virus H5N1 Clade 2.1 dan Clade 2.3

Sejak tahun 2003, virus HPAI telah menyebabkan wabah pada unggas di Indonesia setiap tahun, menghasilkan jumlah tertinggi korban manusia di seluruh dunia. Namun, sedikit yang diketahui tentang virus influenza H5N1 yang telah beredar di dunia dalam beberapa tahun terakhir. Oleh karena itu kami melakukan penelitian surveilans dan isolasi delapan virus H5N1 dari ayam. Analisis kekerabatan gen hemagglutinin dan neuraminidase dari H5N1 mengungkapkan bahwa delapan virus merupakan clade 2.1. Namun, atas dasar perbedaan nukleotida, virus ini dapat dibagi menjadi dua kelompok. Virus lain yang terkait genetik dengan kedua kelompok virus tersebut merupakan isolat Indonesia, menunjukkan bahwa isolat baru telah berkembang di Indonesia. Di antara virus ini, dua virus yang berbeda beredar di pulau Kalimantan selama musim yang sama tahun 2010. Data kami mengungkapkan evolusi lanjutan dari virus H5N1 di Indonesia. HPAI H5N1 virus A menyebar pada unggas domestik di Asia, Eropa, dan Negara-negara Afrika semenjak muncul pada angsa di Republik Rakyat Cina pada tahun 1996. Meskipun sebagian besar penyakit di negara-negara ini telah berhasil dikendalikan atau diberantas dengan pemusnahan populasi unggas, influenza H5N1 tetap enzootic di Indonesia, Mesir, dan China. Di Indonesia, wabah pertama flu H5N1 dilaporkan pada bulan November 2003, dan sekarang virus menyebar ke 32 dari 33 provinsi di Indonesia. Di Indonesia, 182 kasus infeksi pada manusia telah dilaporkan dengan 150 kematian. Ini merupakan jumlah tertinggi dengan *fatality rate* (80%) dari semua yang terkena. Sebagai bagian dari program pengendalian virus, Indonesia memperkenalkan kampanye

vaksinasi pada bulan Agustus 2004. Vaksin diberikan kepada berbagai jenis unggas termasuk ayam, ayam pedaging, bebek, dan burung puyuh. Kebijakan untuk mengendalikan dan mencegah flu burung di Indonesia perlu ditinjau dan segera diperbaiki. Namun, informasi tentang virus influenza H5N1 beredar di Indonesia tidak tersedia di publik yang dapat diakses. Hanya lima isolat Indonesia yang telah terdaftar dalam database tersebut sejak 2009. (Nidom CA *et al*,2012).

Gejala pada unggas dapat diketahui dari jengger, pial dan kulit yang tidak ditumbuhi bulu berwarna biru keunguan, terjadi pembengkakan di sekitar kepala dan muka, terdapat cairan yang keluar melalui hidung dan mata, perdarahan subkutan, perdarahan titik (*ptechie*) pada daerah dada, kaki, dan telapak kaki, batuk, bersin, ngorok dan diare. Kematian pada ayam biasanya terjadi 24 jam setelah timbul gejala dengan tingkat kematian yang tinggi. Sedangkan pada kalkun, kematian dapat terjadi 2 -3 hari setelah timbulnya gejala. (Depkes,2007; Soejoedono dan Handharyani,2005).

Selama ini kita memang meyakini bahwa itik hanya bertindak sebagai reservoir (tempat berkembang dan pembawa) virus AI. Artinya itik bisa tahan terhadap virus AI tanpa menjadi sakit, tetapi justru itik membawa dan menyebarkan virus AI kemana-mana, termasuk ke ayam. Selain itu, replikasi (perbanyak diri) virus AI pada itik terutama terjadi di dalam saluran pencernaan. Keadaan ini sangat menguntungkan virus AI, sebab jangkauan antibodi terhadap virus sangat rendah sehingga virus akan terus hidup di saluran pencernaan dan terus berevolusi. Karena bereplikasi di saluran pencernaan itulah,

maka konsentrasi virus paling tinggi ada di feses. Hal ini pula yang menyebabkan penularan virus AI pada lingkungan di sekitar itik tergantung dari tingkat pencemaran sumber air atau lingkungan oleh feses. Untuk bisa memunculkan gejala klinis hingga kematian pada itik, dibutuhkan virus tangkai AI yang lebih tinggi dibanding virus yang menyerang ayam. Oleh sebab itu, jika virus AI dapat menimbulkan kematian pada itik dalam jumlah besar, seperti yang banyak diberitakan saat ini, maka bisa kita asumsikan bahwa virus AI yang menyerang itik memiliki tingkat keganasan yang lebih tinggi dibanding virus AI yang selama ini bersirkulasi.

Gejala klinis pada itik yang sekarang ditemukan berbeda dengan yang muncul pada ayam. Pada ayam lebih nyata terjadi perdarahan di kaki dan dari patologi anatomi juga memperlihatkan perdarahan di organ dalam. Sedangkan pada itik, serangan lebih nyata terjadi pada sistem saraf yaitu leher terpuntir (tortikolis), lumpuh, berputar-putar, kejang, inkoordinasi, bingung, mata putih dan mati mendadak. Gejala klinis dan perubahan patologi anatomi tersebut mirip dan mengarah ke Marek serta ND. Dari bedah bangkai akan ditemukan otak menjadi keputihan dan ada *green spot* (bentukan titik berwarna hijau). Kemudian dari hasil identifikasi karakteristik genetik oleh BBVet Wates serta tim ahli lainnya seperti BBPMSOH (Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan), PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) serta BPPV (Balai Penyelidikan Penyakit Veteriner) Bukittinggi pada tanggal 3 Desember 2012, telah ditemukan virus AI sub tipe H5N1 yang memiliki kelompok gen (clade) baru yakni 2.3 pada itik. Virus ini berbeda dengan clade lama 2.1 yang selama ini beredar dan menyerang unggas

di Indonesia, Isolat H5N1 yang diperoleh dari itik-itik tersebut memiliki tingkat homologi sebesar 97-98% dengan virus-virus H5N1 clade 2.3. Sebaliknya, jika dibandingkan dengan virus-virus dari clade 2.1 tingkat homologinya lebih rendah, yaitu sekitar 90%.

2.4. Tinjauan Tentang Otak

2.4.1. Anatomi Dan Fisiologi Otak

Sistem saraf pada umumnya terbagi menjadi dua, yaitu sistem saraf tepi dan sistem saraf pusat. Sistem saraf tepi (*Peripheral Nervous Sistem*) adalah semua serabut saraf yang berada di luar otak atau sumsum tulang belakang. Sedangkan sistem saraf pusat (*Central Nervous Sistem*) adalah bagian yang mengatur kerja saraf tepi yang berada di otak, batang otak, dan sumsum tulang belakang. Otak itu sendiri terbagi menjadi dua bagian besar, yaitu otak besar (*cerebrum*) dan otak kecil (*cerebellum*) (Beatty, 2001).

Didalam kepala, otak dibungkus oleh tiga selaput (*meningan*). Yang paling luar adalah selaput otak keras atau *dura mater*, yang mempunyai perlekatan erat dengan tulang tengkorak. Dilapisan bawahnya terdapat selaput otak lunak, yang terdiri dari lapisan arachnoid dan lapisan piamater. Lapisan piamater melekat sangat erat dan mengikuti setiap lekukan permukaan otak seperti stocking. Antara dua lapisan tersebut terdapat lapisan subarachnoid (*subarachnoid space*) yang mengandung cairan otak (*cerebrospinal fluid, CSF*) (Chusid, 1990)

CSF dihasilkan melalui proses yang terjadi di empat rongga yang terdapat di dalam otak (*brain ventricle*). Dua yang pertama terletak di otak besar kiri dan

kanan (*lateral ventricle*) kemudian dialirkan ke rongga tengah (*third ventricle*), melalui saluran *sylvian duct* menuju rongga lain di batang otak (*fourth ventricle*). Rongga terakhir ini juga menghasilkan CSF yang selanjutnya dialirkan melalui 2 pasang lubang keluar, dari rongga ini menuju lapisan *subarachnoid*. (Chusid,1990)

Pada jaringan tempat proses ini berlangsung terdapat juga mekanisme penyaringan yang menghalangi masuknya bakteri dan protein dengan molekul besar yang terdapat dalam darah yang memasuki bagian dalam otak. Kemampuan ini dinamakan *blood brain barrier* yang membantu mencegah infeksi otak. (Chusid,1990). Pada dasarnya, sistem saraf menghimpun rangsangan dari lingkungan, mengubah rangsangan-rangsangan menjadi impuls saraf dan meneruskan impuls ini ke saraf penerima sehingga terjadi korelasi yang terorganisasi dengan baik, dan disini impuls-impuls diteruskan menuju organ-organ efektor yang memberikan jawaban (respon) yang tepat. Fungsi-fungsi ini dilaksanakan oleh sel-sel penyokong neuroglia dan bagian ekstraseluler, membentuk jala-jala komunikasi yang terintegrasi (Singgih,2003).



Gambar 2.4. Otak Mencit secara umum
(dikutip dari gambar biology online, 2008)

2.5. Tinjauan Tentang Paru-Paru

2.5.1. Anatomi Paru-Paru

Paru-paru adalah dua organ yang berbentuk seperti bunga karang besar yang terletak di dalam torak pada sisi lain jantung dan pembuluh darah besar. Paru-paru memanjang mulai dari dari akar leher menuju diagfragma dan secara kasar berbentuk kerucut dengan puncak di sebelah atas dan alas di sebelah bawah. Diantara paru-paru *mediastinum*, yang dengan sempurna memisahkan satu sisi rongga torasik sternum di sebelah depan. Di dalam mediastinum terdapat jantung, dan pembuluh darah besar, trakea dan esofagus, dustuk torasik dan kelenjar timus. Paru-paru dibagi menjadi lobus-lobus. Paru-paru sebelah kiri mempunyai dua lobus, yang dipisahkan oleh belahan yang miring. Lobus superior terletak di atas dan di depan lobus inferior yang berbentuk kerucut. Paru-paru sebelah kanan mempunyai tiga lobus. Lobus bagian bawah dipisahkan oleh fisura oblik dengan

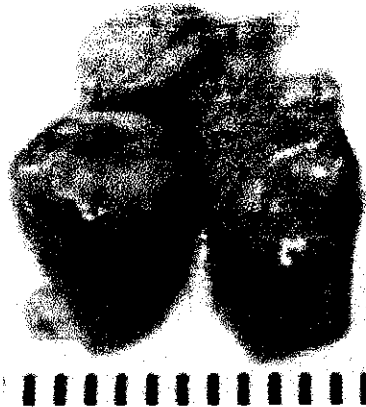
posisi yang sama terhadap lobus inferior kiri. Sisa paru lainnya dipisahkan oleh suatu fisura horisontal menjadi lobus atas dan lobus tengah. Setiap lobus selanjutnya dibagi menjadi segmen-segmen yang disebut bronko-pulmoner, mereka dipisahkan satu sama lain oleh sebuah dinding jaringan koneknif, masing-masing satu arteri dan satu vena. Masing-masing segmen juga dibagi menjadi unit-unit yang disebut lobulus.

Cabang utama bronkus kanan dan kiri bercabang lagi menjadi *bronkus lobaris* dan kemudian *bronkus segmentalis*. Percabangan ini berjalan terus menjadi bronkus yang ukurannya semakin kecil sampai akhirnya menjadi bronkiolus terminalis, yaitu saluran udara terkecil yang tidak mengandung alveoli (kantong udara). Bronkiolus tidak diperkuat oleh cincin tulang rawan, tetapi disusun oleh muskulus, fibrosa dan jaringan elastis yang dihubungkan dengan kuboit epitelium. Bronkiolus terminalis bercabang secara berulang untuk membentuk saluran yang disebut duktus alveolar. Di sinilah kantong alveolar dan alveoli terbuka. Alveoli dikelilingi suatu jaringan kapiler. Darah yang mengalami deoksigenasi memasuki jaringan kapiler arteri pulmoner dan darah yang mengandung oksigen meninggalkan alveoli untuk memasuki vena pulmoner. Di jaringan pipa kapiler ini berlangsung pertukaran gas antara udara di dalam alveoli dan darah di dalam pembuluh darah.

Menurut Rahajoe dkk, (1994) fungsi utama paru adalah sebagai alat pernapasan yaitu melakukan pertukaran udara (ventilasi), yang bertujuan menghirup masuknya udara dari atmosfer kedalam paru-paru (inspirasi) dan mengeluarkan udara dari alveolar ke luar tubuh (ekspirasi) (18). Fungsi

pernapasan ada dua yaitu sebagai pertukaran gas dan. Pengaturan keseimbangan asam basa(13). Pernapasan dapat berarti pengangkutan oksigen (O₂) ke sel dan pengangkutan CO₂ dari sel kembali ke atmosfer.

Normal mouse lung



Gambar 2.5. Paru-paru Normal Mencit (gambar Biology Online, 2008)

Pleura adalah suatu membran serosa yang mengelilingi paru-paru. Pleura disusun oleh sel-sel epitel datar pada dasar membran dan memiliki dua lapisan. Pleura viseral melekat kuat pada paru-paru, melapisi permukaan paruparu dan masuk ke dalam fisura inter-lobus. Pada akar paru, lapisan visceral direfleksikan kembali menjadi lapisan parietalis yang menghubungkan dinding dada dan membungkus lapisan diafragma superior. Kedua lapisan pleura tersebut bersentuhan. Dinding yang satu dengan dinding lainnya hanya dipisahkan oleh satu film cair yang memungkinkan mereka menggelinding satu sama lain tanpa terjadi gesekan. Ruang yang terdapat di antara lapisan ini disebut rongga pleura.

2.4.2. Volume dan Kapasitas Fungsi Paru-Paru

Volume paru dan kapasitas fungsi paru merupakan gambaran fungsi ventilasi sistem pernapasan. Dengan mengetahui besarnya volume dan kapasitas

fungsi paru dapat diketahui besarnya kapasitas ventilasi maupun ada tidaknya kelainan fungsi paru.

2.5.2.1. Volume Paru

Volume paru akan berubah-ubah saat pernapasan berlangsung. Saat inspirasi akan mengembang dan saat ekspirasi akan mengempis. Pada keadaan normal, pernapasan terjadi secara pasif dan berlangsung tanpa disadari. Beberapa parameter yang menggambarkan volume paru adalah :

- a. Volume tidal (*Tidal Volume = TV*), adalah volume udara paru-paru yang masuk dan keluar paru-paru pada pernapasan biasa.
- b. Volume Cadangan Inspirasi (*Inspiratory Reserve Volume = IRV*), volume udara yang masih dapat dihirup kedalam paru-paru sesudah inspirasi biasa.
- c. Volume Cadangan Ekspirasi (*Expiratory Reserve Volume = ERV*), adalah volume udara yang masih dapat dikeluarkan dari paru-paru sesudah ekspirasi biasa.
- d. Volume Residu (*Residual Volume = RV*), udara yang masih tersisa didalam paru-paru sesudah ekspirasi. *TV*, *IRV*, *ERV* dapat langsung diukur dengan spirometer, sedangkan $RV = TLC - VC$.

2.5.2.2. Kapasitas Fungsi Paru-paru

Kapasitas paru-paru merupakan jumlah oksigen yang dapat dimasukkan kedalam tubuh secara maksimal . Jumlah oksigen yang dapat dimasukkan ke dalam paru-paru ditentukan oleh kemampuan kembang kempisnya sistem pernapasan. Semakin baik kerja sistem pernapasan berarti volume oksigen yang

diperoleh semakin banyak. Yang termasuk pemeriksaan kapasitas fungsi paru-paru adalah :

- a. Kapasitas Inspirasi (*Inspiratory Capacity = IC*), adalah volume udara yang masuk paru-paru setelah inspirasi maksimal atau sama dengan volume cadangan inspirasi ditambah volume tidal ($IC = IRV + TV$).
- b. Kapasitas Vital (*Vital Capacity = VC*), volume udara yang dapat dikeluarkan melalui ekspirasi maksimal setelah sebelumnya melakukan inspirasi maksimal. Kapasitas vital besarnya sama dengan volume inspirasi cadangan ditambah volume tidal ($VC = IRV + ERV + TV$).
- c. Kapasitas Paru-Paru Total (*Total Lung Capacity = TLC*), adalah kapasitas vital ditambah volume sisa ($TLC = VC + RV$ atau $TLC = IC + ERV + RV$).
- d. Kapasitas Residu Fungsional (*Functional Residual Capacity = FRC*), adalah volume ekspirasi cadangan ditambah volume sisa ($FRC = ERV + RV$).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

3.1 Kerangka konseptual penelitian

Merebaknya wabah AI yang sangat patogenik/HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) di Indonesia dimulai pada tahun 2003 dengan gejala klinis pada ayam berupa kematian mendadak dalam waktu singkat, *ptechiae* (bintik-bintik perdarahan) pada subkutan dan perdarahan pada bagian tubuh yang tidak berbulu (Damayanti *et al.*, 2004). Penyebabnya ialah virus AI subtype H5N1. Menurut klasifikasi WHO, semua virus H5N1 yang selama ini diisolasi dari unggas di Indonesia termasuk dalam clade 2.1. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa infeksi virus H5N1 clade 2.1 pada ayam *layer*, *broiler* maupun ayam kampung bersifat sangat patogen dan mampu menyebabkan unggas mati secara mendadak dalam jumlah besar tanpa gejala klinis apapun sebelumnya. Sedangkan itik dan unggas air lainnya relatif lebih tahan terhadap infeksi virus AI clade 2.1 ini (Wibawa *et al.*, 2012).

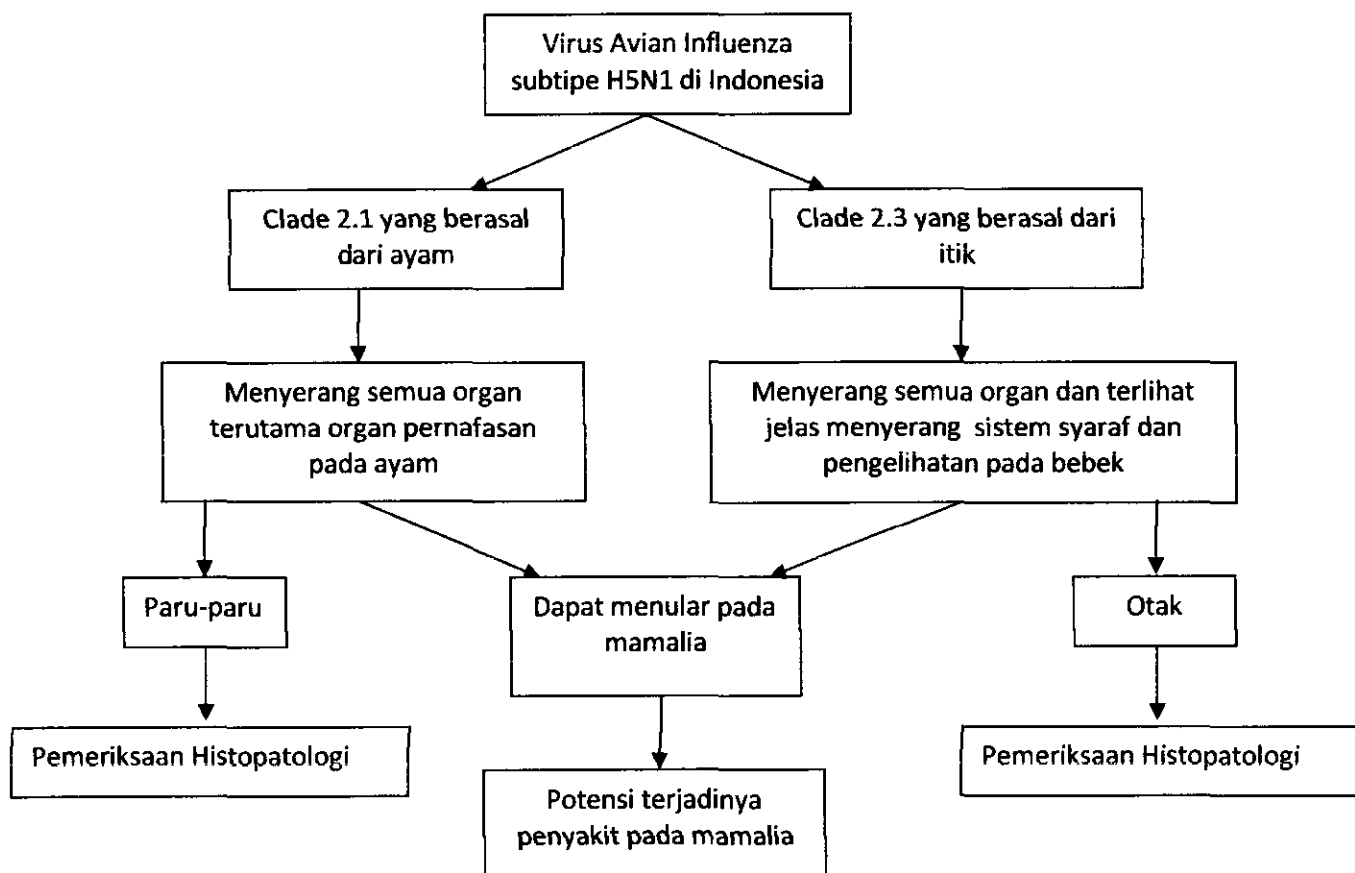
Selama ini kita memang meyakini bahwa itik hanya bertindak sebagai reservoir (tempat berkembang dan pembawa) virus AI. Artinya itik bisa tahan terhadap virus AI tanpa menjadi sakit, tetapi justru itik membawa dan menyebarkan virus AI kemana-mana, termasuk ke ayam. Selain itu, replikasi (perbanyak diri) virus AI pada itik terutama terjadi di dalam saluran pencernaan. Keadaan ini sangat menguntungkan virus AI, sebab jangkauan antibodi terhadap virus sangat rendah sehingga virus akan terus hidup di saluran pencernaan dan terus berevolusi. Karena bereplikasi di saluran pencernaan itulah, maka konsentrasi virus paling tinggi ada di feses. Hal ini pula yang menyebabkan

penularan virus AI pada lingkungan di sekitar itik tergantung dari tingkat pencemaran sumber air atau lingkungan oleh feses. Untuk bisa memunculkan gejala klinis hingga kematian pada itik, dibutuhkan virus tantang AI yang lebih tinggi dibanding virus yang menyerang ayam. Oleh sebab itu, jika virus AI dapat menimbulkan kematian pada itik dalam jumlah besar, seperti yang banyak diberitakan saat ini, maka bisa kita asumsikan bahwa virus AI yang menyerang itik memiliki tingkat keganasan yang lebih tinggi dibanding virus AI yang selama ini bersirkulasi.

Virus H5N1 yang predominan ditemukan sejak tahun 2005 sampai saat ini berasal dari clade 2.1.3 (2.1.3.1, 2.1.3.2, dan 2.1.3.3). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi virus-virus H5N1 clade 2.1 pada golongan ayam (*gallinaceous*) seperti ayam layer, ayam broiler, ayam kampung bersifat sangat pathogen, menyebabkan sakit perakut dan kematian dalam jumlah tinggi, sedangkan itik dan unggas air lainnya relatif lebih tahan terhadap infeksi virus-virus ini (Bingham *et al.*, 2009 ; Swayne, 2007; Wibawa *et al.*, 2012).

Pada pemeriksaan secara klinis terhadap itik yang sakit, terlihat bahwa itik yang sakit menunjukkan gejala klinis syaraf seperti tortikolis, tremor, kesulitan berdiri, kehilangan keseimbangan saat berjalan dan pada kasus parah disertai kematian. Hasil bedah bangkai tidak ditemukan perubahan yang spesifik kecuali adanya kornea mata yang keputihan baik unilateral maupun bilateral, garis-garis keputihan pada otot jantung yang bervariasi dari ringan sampai berat serta adanya kongesti pada pembuluh darah dan malasea (nekrosis) pada otak dengan variasi dari ringan sampai berat.

Pemeriksaan histopatologis menunjukkan adanya infiltrasi limfosit dalam jumlah yang tinggi pada otot jantung. Pada otak terjadi peradangan akut multifocal nekrosis dan pada kasus yang lebih kronis terjadi infiltrasi limfosit pada otak yang diikuti oleh adanya peradangan perivaskular cuffing ringan sampai berat (Bingham *et al.*,2009; Wibawa *et al.*,2012).



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODA

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Avian Influenza Research Centre (AIRC) Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini berlangsung selama dua bulan, dimulai pada bulan Juni 2013 sampai dengan Juli 2013.

Virus yang digunakan adalah Virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.1 dan clade 2.3 yang diisolasi dari lapangan.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah *gloves*, masker, *vacum pipet*, *trey*, *ependorf tube 1.5 ml*, *conical 30ml*, *inkubator 37 °C*, *yellow tips*, *blue tips*, , micropipette (25µl, 50µl, 100µl, 1000µl), *freezer -80 °C* (untuk penyimpanan virus), isoflurant sebagai anestesi inhalasi, timbangan, thermometer, peralatan bedah (gunting bedah, scapel, mata scapel, pinset chirurgis, pinset anatomis), baju khusus BSL 3, *Tissue Slicer* (Mikrotom, Penangas air,), *object glass*, *cover glass*, *microscope*.

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini antara lain adalah, Alkohol 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% , *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Formalin 10%, Xilen, Xilol I, Xilol II, Parafin, Virus *Avian Influenza* clade 2.1 *A/chicken/Indonesia/UAC1787T/2012* dan Virus *Avian Influenza* clade 2.3 *A/duck/Indonesia/UADM78/2012*, kedua virus tersebut berasal dari lapangan yang diperbanyak di laboratorium AIRC Universitas Airlangga Surabaya.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.1 *A/chicken/Indonesia/UAC1787T/2012* dan *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 *A/duck/Indonesia/UADM78/2012*.

4.3.2. Variabel Tergantung

- a) Pemeriksaan histopatologi organ otak mencit akibat infeksi virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1.
- b) Pemeriksaan histopatologi organ paru-paru mencit akibat infeksi virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1.

4.3.3. Variabel Kendali

- a) Jenis hewan coba, umur, berat badan, pakan
- b) Pemeliharaan hewan coba
- c) Cara pemberian dan dosis perlakuan

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

1. Pemeriksaan histopatologi organ otak mencit akibat infeksi virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1 adalah menginfeksi virus pada saluran pernafasan pada mencit. Dilakukan pemeriksaan kerusakan organ otak mencit secara mikroskopis kemudian di analisa kerusakan dan besarnya kerusakan yang ditimbulkan oleh virus tersebut.
2. Pemeriksaan histopatologi organ paru-paru mencit akibat infeksi virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1 adalah menginfeksi

virus pada saluran pernafasan pada mencit. Dilakukan pemeriksaan kerusakan organ paru-paru mencit secara mikroskopis kemudian di analisa kerusakan dan besarnya kerusakan yang ditimbulkan oleh virus tersebut.

4.4. Populasi dan Sampel

4.4.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit sebagai unit hewan coba laboratorium. Kriteria yang dipakai dalam penelitian adalah mencit yang berumur 2–3 bulan dengan berat badan 20-25 gram dalam keadaan sehat dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain. Mencit diadaptasikan.

4.4.2. Sampel

Sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini organ paru-paru dan otak dari 15 ekor mencit yang diberi perlakuan dengan rincian sebagai berikut ini: digunakan sebanyak 5 ekor mencit sebagai kelompok kontrol negatif (K-) hanya diberikan PBS steril; 5 ekor mencit sebagai kelompok perlakuan yang diinfeksi dengan virus *Avian Influenza* clade 2.1 *A/chicken/Indonesia/UAC1787T/2012*; 5 ekor mencit sebagai kelompok perlakuan yang diinfeksi dengan Virus *Avian Influenza* clade 2.3 *A/duck/Indonesia/UADM78/2012*. Kemudian dipelihara selama 15 hari.

4.5. Metode dan Prosedur Penelitian

4.5.1. Pengenceran Virus

Virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Avian Influenza clade 2.1 A/chicken/Indonesia/UAC1787T/2012* dan *Avian Influenza clade 2.3 A/duck/Indonesia/UADM78/2012*. Sebelum melakukan infeksi virus pada mencit sebagai hewan coba, untuk masing-masing virus dibuat pengenceran menjadi 10^3EID_{50} . Stok virus AI *clade 2.1 A/chicken/Indonesia/UAC1787T/2012* yang digunakan memiliki titer $7,9.10^{17}\text{EID}_{50}$. Cara membuat pengenceran adalah memasukkan 450 μl PBS kedalam setiap eppendorf kemudian pada eppendorf pertama dengan label $7,9.10^{16}\text{EID}_{50}$ dimasukkan sebanyak 50 μl dari stok virus dan dicampurkan sampai merata, kemudian diambil sebanyak 50 μl dari eppendorf $7,9.10^{16}\text{EID}_{50}$ lalu dimasukkan kedalam *eppendorf* dengan label $7,9.10^{15}\text{EID}_{50}$, kemudian dicampurkan. Begitu seterusnya sampai pada *eppendorf* dengan label $7,9.10^6\text{EID}_{50}$. Mengambil 100 μl dari *eppendorf* dengan label $7,9.10^6\text{EID}_{50}$, kemudian dimasukkan ke dalam *eppendorf* yang berisi 700 μl PBS yang diberi label 10^6EID_{50} . Selanjutnya diambil sebanyak 50 μl dari *eppendorf* 10^6EID_{50} lalu dimasukkan kedalam *eppendorf* dengan label 10^5EID_{50} , kemudian dicampurkan. Begitu seterusnya sampai pada *eppendorf* dengan label 10^3EID_{50} .

Hal yang sama digunakan untuk mengencerkan virus *Avian Influenza clade 2.3 A/duck/Indonesia/UADM78/2012*. Virus siap untuk digunakan dalam proses infeksi.

4.5.2. Teknik Infeksi Virus pada Mencit

Mencit yang akan di uji dikelompokkan dalam kandang kelompok. Setiap kelompok terdiri atas 5 ekor mencit untuk perlakuan dan 5 ekor mencit untuk kontrol.

Sebelum dilakukan infeksi virus, mencit dianestesi terlebih dahulu dengan isofluran inhalasi. Infeksi pada mencit dilakukan dengan memegang bagian ekor dari mencit, kulit bagian tengkuk dan bagian ekor kemudian dilakukan infeksi virus secara intranasal. Suspensi virus yang telah diencerkan menjadi 10^3EID_{50} diinfeksi ke mencit secara intranasal sebanyak 50 μl per ekor mencit dan diinfeksi ke lima ekor mencit untuk masing-masing jenis virus, kemudian untuk kelompok kontrol diberikan PBS steril sebanyak 50 μl per ekor mencit. Semua perlakuan dilakukan dengan teknik yang steril di dalam *Bio Safety Cabinet* (BSC). Mencit yang sudah diinfeksi, kemudian dipelihara dan diamati selama 15 hari. Mencit diamati dan diberi makan dan minum setiap 24 jam untuk mengetahui keadaan mencit yang telah diinfeksi, apabila ada yang mati segera dilakukan pembedahan dan diambil organ paru-paru dan otak dari setiap mencit yang diinfeksi maupun yang tidak diinfeksi dan dimasukkan pada formalin dengan konsentrasi 10%. Pada hari ke 15, apabila ada yang masih hidup dilakukan eutanasia kemudian dibedah untuk diambil organ paru-paru serta otaknya.

4.5.3. Penanganan Sampel di Laboratorium

4.5.3.1. Preparasi Organ

Pada akhir pengamatan dilakukan nekropsi terhadap hewan uji. Analisis histology dilakukan terhadap organ paru-paru dan otak mencit untuk mengetahui

keadaan histology serta tingkat keparahannya. Proses pembuatan preparat H&E meliputi proses jaringan dan pewarnaan H&E.

4.5.3.1.1. Proses Jaringan

Untuk menghindari kerusakan jaringan oleh enzim-enzim (autolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik, potongan organ harus diperlakukan dengan tepat dan memadai sesegera mungkin setelah dikeluarkan dari tubuh hewan uji. Oleh karena itu dilakukan perendaman jaringan di dalam zat-zat kimia tertentu untuk sedapat mungkin memelihara sifat-sifat morfologik dan kimia jaringan, yang disebut proses fiksasi (Junqueira dan Canerio,1980 ;Afrianto,2006). Fiksatif yang digunakan untuk penelitian ini adalah formalin 10%. Selanjutnya masing-masing organ tersebut dipotong kira-kira setebal 3-5 mm.

Agar diperoleh potongan yang tipis, jaringan yang akan diamati dipotong dengan melihat melalui mikroskop optic, maka setelah proses fiksasi, jaringan harus mengalami proses *embedding*, yaitu proses infiltrasi suatu jaringan dengan suatu zat yang dapat member konsistensi yang kuat agar dapat dilakukan pemotongan dengan menggunakan mikrotom. Zat-zat yang dapat digunakan antara lain gelatin, seloidin, paraffin, resin atau bahan liat lainnya (Junqueira dan Canerio,1980; Afrianto,2006). Pada penelitian ini jaringan dilakukan proses *embedding* dengan menggunakan Parafin.

Proses *embedding* atau impregnasi jaringan biasanya di dahului dengan proses dehidrasi dan penjernihan (Junqueira dan Canerio,1980; Afrianto,2006). Dehidrasi dilakukan melalui perendaman jaringan dalam serangkaian campuran

etanol dan air yang makin lama makin pekat (etanol 80% sampai 100%). Etanol kemudian digantikan dengan pelarut lemak, yaitu xilen. Peresapan xilen dalam jaringan menyebabkan jaringan menjadi transparan atau jernih. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam paraffin yang dicairkan diatas penangas dengan suhu 58°C sampai dengan 60°C. pemanasan menyebabkan pelarut menguap dan ruangan yang tertinggal terisi oleh paraffin. Blok paraffin kecil yang mengandung paraffin tersebut kemudian diiris (*sectioning*) dengan pisau baja mikrotom menjadi setebal 5-7µm. potongan tersebut dimasukkan ke dalam air hangat dan dipindahkan pada *object glass*. (Afrianto,2006)

4.5.3.1.2. Pewarnaan Histopatologi Paru-Paru dan Otak Mencit dengan Hematoxilin-Eosin.

Jaringan paru-paru dan otak mencit difiksasi dengan buffer formalin 10%. Selanjutnya dilakukan proses pewarnaan menggunakan hematoksin dan eosin. Pewarnaan diawali dengan perendaman gelas obyek ke dalam xilol I dan xilol II masing-masing selama 2 menit, dilanjutkan perendaman dalam alkohol absolut (96%), 95%, 90%, 80%, 70%, dan 50% masing-masing selama 2 menit. Setelah itu, obyek dibilas dengan akuades selama 2 menit. Kemudian obyek dimasukkan ke dalam pewarna hematoksin selama 7 menit dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kelebihan zat warna yang tidak diserap. Obyek direndam kembali dalam pewarna eosin selama 3 menit dan dicuci kembali dengan akuades. Preparat jaringan kemudian direndam dalam alkohol 50%, 70%, 85%, 90%, 95%, 96%, xilol I, xilol II masing-masing selama 2 menit.

4.5.3.1.3. Pemeriksaan Histologi

Pengamatan histopatologi dilakukan secara deskriptif (kualitatif) dan scoring (kuantitatif) yang diamati pada 5 lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali (10x obyektif dan 10x okuler), 400 kali (40x obyektif dan 10x okuler), serta 1000 kali (100x obyektif dan 10x okuler), dilakukan pengamatan pada 5 (lima) ulangan dari masing-masing organ dan masing-masing perlakuan (P1, P2, K). Organ yang diamati adalah paru-paru mencit dan otak mencit. Perubahan gambaran histopatologi ditentukan dengan melakukan scoring pada sel yang mengalami kerusakan dan kerusakan jaringan pada setiap lapang pandang.

Tabel 4.1. Kerusakan jaringan yang dinilai

Paru-Paru	Otak
Perdarahan	Encephalitis
Kongesti	Perivaskula cuffing
Peribronchiolitis	Perdarahan
Pneumonia Interstitialis	Nekrosis
	Degenerasi Neuron

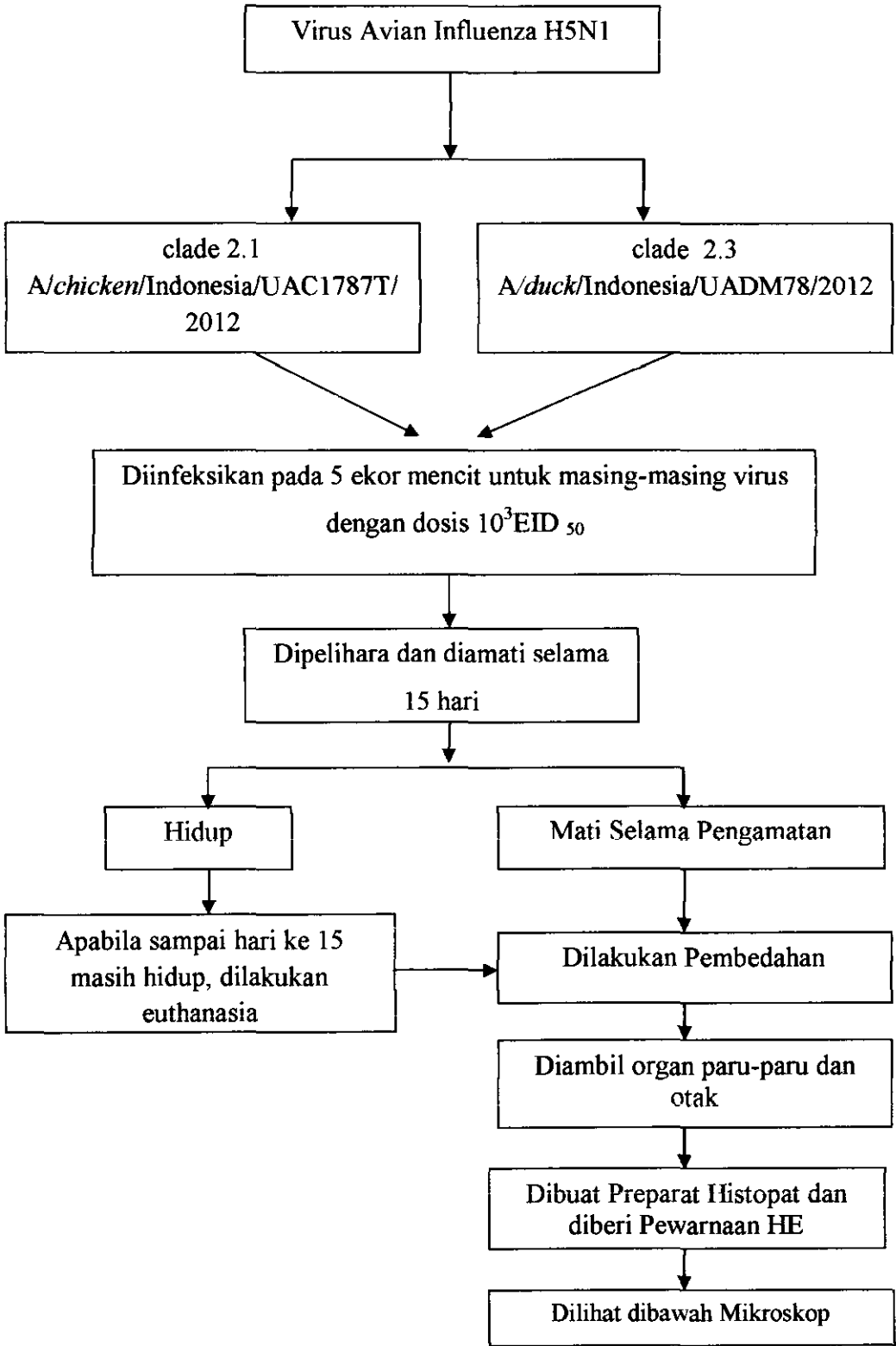
Data yang digunakan adalah data kualitatif diperoleh dalam bentuk foto histopatologi organ dan data kuantitatif diperoleh dalam bentuk scoring lesion yang terjadi pada organ paru-paru dan otak mencit. Adapun kriteria scoring dituliskan dalam tabel 4.2.

Tabel 4.2. Kriteria Skoring organ paru-paru dan otak.

Skor	Keterangan
0	Normal
1	Ringan
2	Agak Berat
3	Berat
4	Sangat Berat

Penilaian kriteria skoring untuk organ paru-paru dan otak mencit adalah nilai 0 (normal) didapat dari tidak adanya kerusakan pada sel maupun jaringan organ, nilai 1 (ringan) adalah dilihat dari adanya kerusakan <25%, nilai 2 (agak berat) didapat dari adanya kerusakan antara 25%-50%, nilai 3 (berat) didapatkan dari adanya kerusakan yang dilihat sebesar antara 50%-75%, sedangkan untuk skor 4 (sangat berat) apabila didapatkan kerusakan sel ataupun kerusakan jaringan sebesar >75%. Nilai skor tersebut diterapkan pada setiap lapang pandang yg diamati kemudian dirata-rata untuk setiap ulangnya agar didapatkan nilai median pada uji statistiknya.

4.6. Kerangka Operasional



4.7. Pengolahan Data

Data yang diperoleh pada masing-masing perlakuan, hasil pengamatan mikroskopis adalah perubahan gambaran histopatologi paru-paru dan otak mencit (*Mus Musculus*) disajikan dalam bentuk foto. Nilai hasil scoring (kualitatif) perubahan histopatologi dari organ paru-paru dan otak, kemudian diolah dengan analisa statistika non parametik, menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, apabila hasil dari analisis menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) maka uji analisis dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

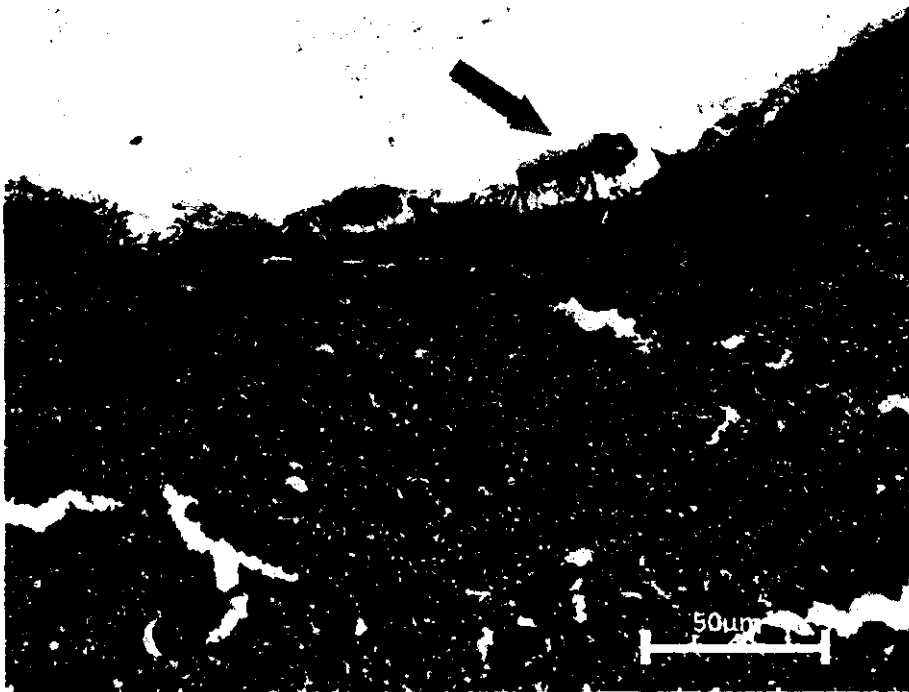
BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1. Otak

5.1.1. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologi Otak Mencit

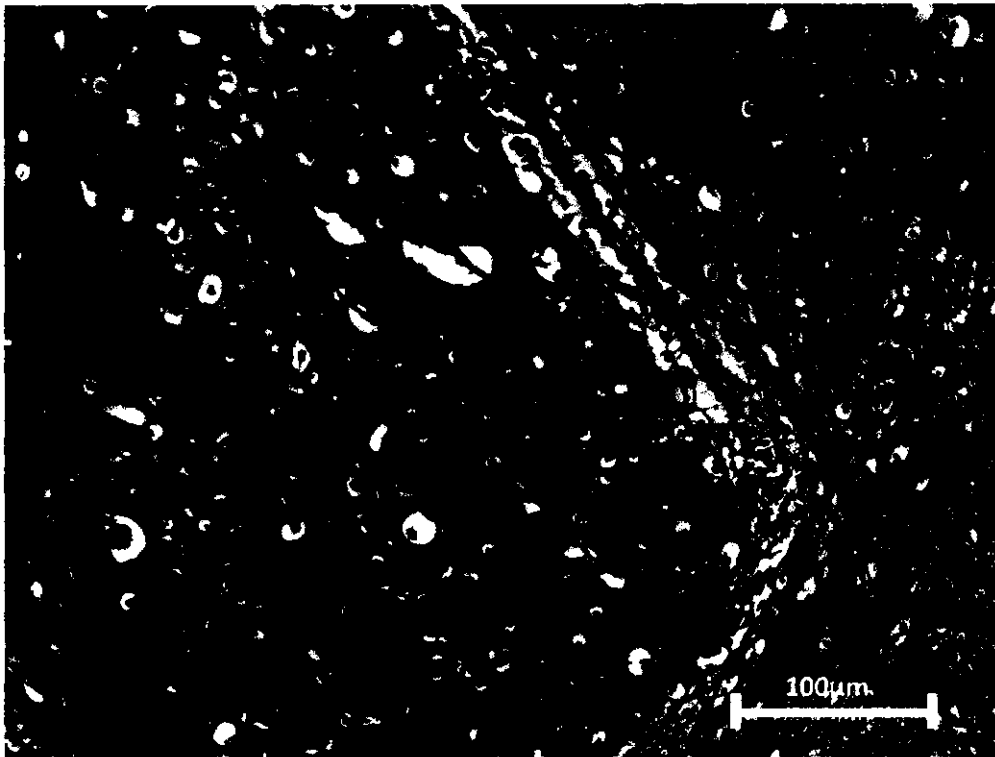
Hasil penelitian yang dilakukan terhadap mencit (*Mus musculus*) yang terbagi dalam 3 (tiga) perlakuan, yaitu : P1, P2, dan K, dapat diketahui bahwa secara makroskopis tidak terjadi perubahan pada otak yang diberi perlakuan. Adapun pada gambaran histopatologi otak mencit yang diinfeksi menunjukkan perubahan yang bervariasi. Perubahan tersebut terlihat adanya gambaran histopatologi seperti, Encephalitis, Perivaskular Cuffing, Perdarahan, Nekrosis, dan Degenerasi Neuron. Adapun pada otak mencit yang tidak diinfeksi menunjukkan keadaan yang relatif normal.

Pada kelompok perlakuan (P1) yang diinfeksi dengan virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 dengan kelompok perlakuan (P2) yang diinfeksi dengan virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.1 menunjukkan adanya kerusakan berupa radang pada sel otak yang bernilai sama, ditunjukkan oleh gambar berikut :



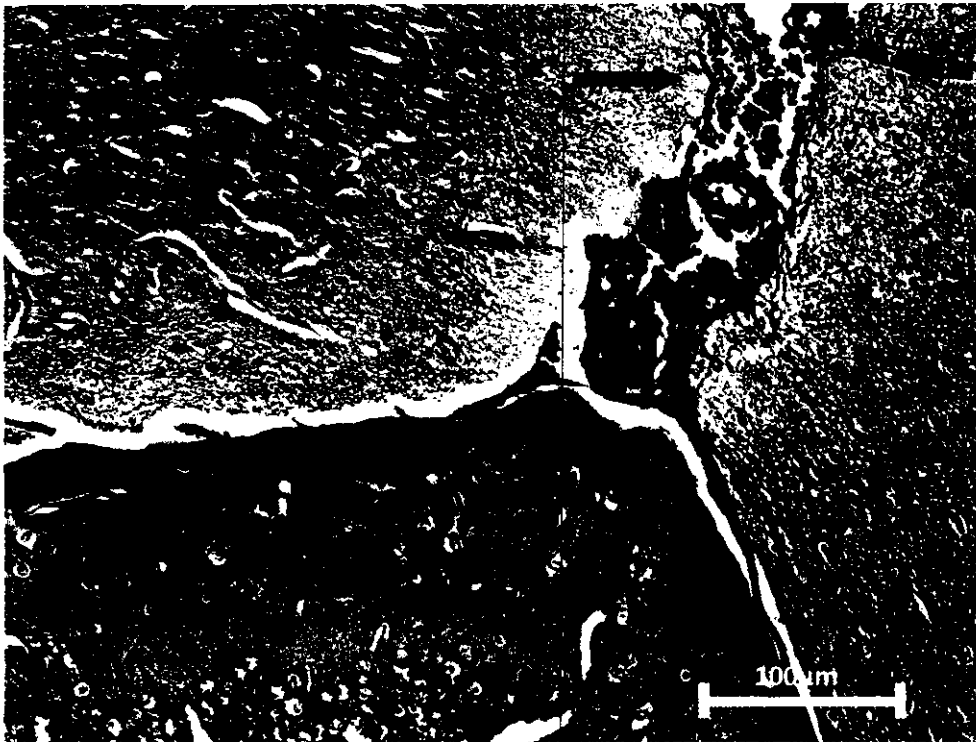
Gambar 5.1. Histopatologi jaringan otak mencit yang mengalami encephalitis yang ditandai dengan banyaknya sel radang.(Pewarnaan HE; Perbesaran 400x).

Adanya perubahan berupa perivaskular cuffing hanya terjadi pada beberapa ulangan yang mendapat perlakuan P1 dan P2, akan tetapi tidak pada semua ulangan dari setiap perlakuan tersebut. Untuk perlakuan kontrol negatif sama sekali tidak ditemukan adanya perivaskular cuffing. Gambaran Perifaskular cuffing yang ditemukan adalah sebagai berikut :



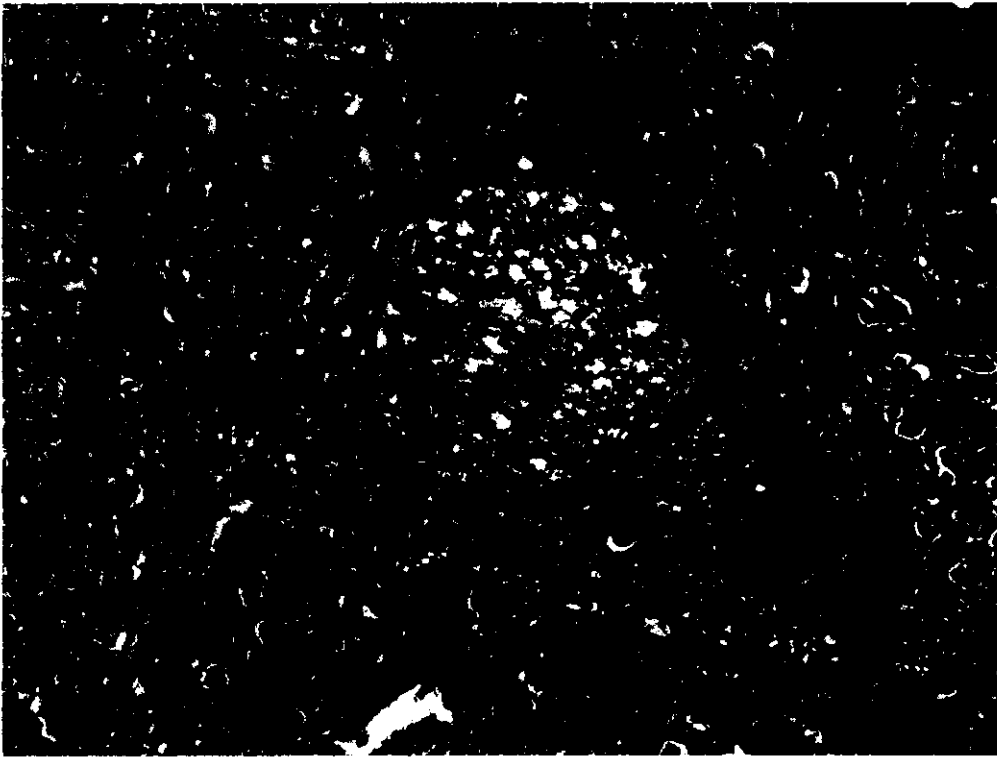
Gambar 5.2. Tanda panah menunjukkan adanya perivaskular cuffing yang ditandai dengan adanya akumulasi limposit disekitar vaskularisasi otak. (Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x)

Pada perlakuan P2 yang diinfeksi dengan virus H5N1 clade 2.1 menunjukkan adanya perubahan patologi jaringan otak berupa perdarahan yang lebih signifikan dibandingkan dengan perubahan patologi berupa perdarahan pada perlakuan P1 yang diinfeksi dengan virus H5N1 clade 2.3. Sedangkan pada kelompok K yang merupakan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya perubahan patologi berupa perdarahan. Gambaran perdarahan yang tampak, adalah sebagai berikut :



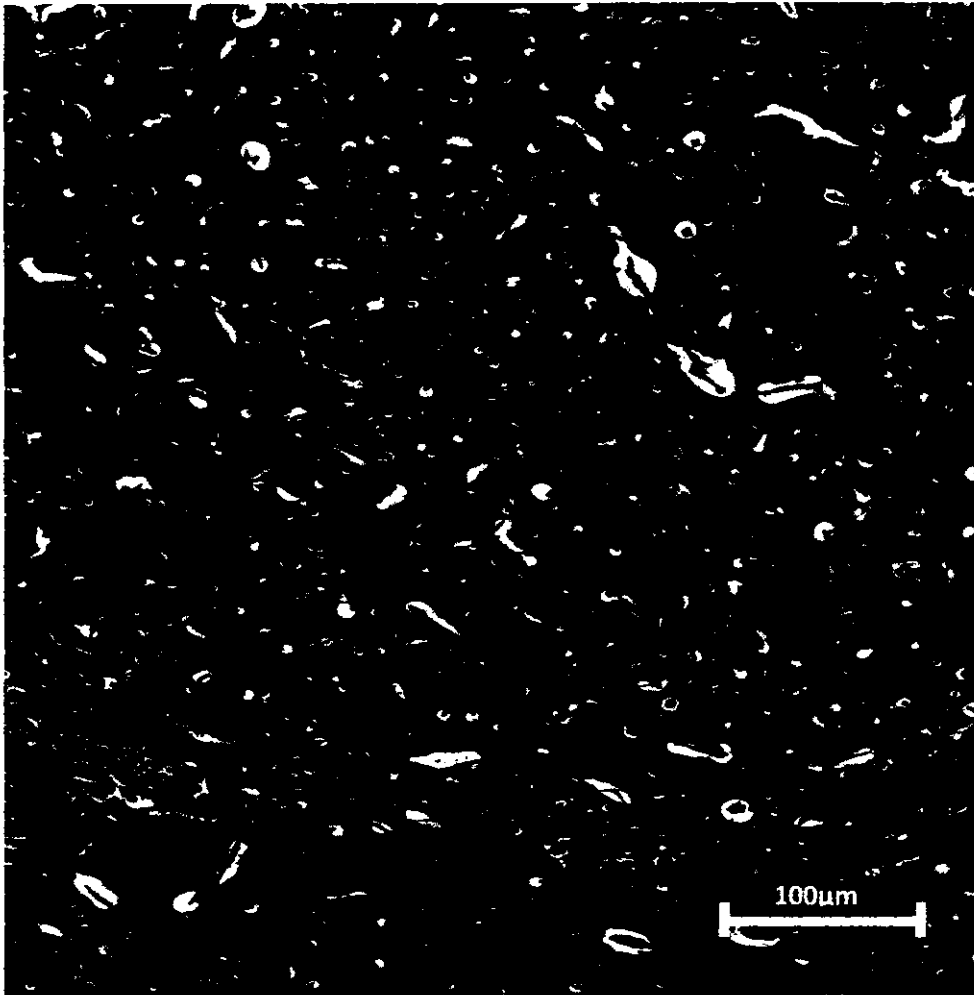
Gambar 5.3. Tanda panah menunjukkan adanya perdarahan yang ditandai dengan adanya infiltrasi eritrosit keluar dari pembuluh darah dan terlihat pada jaringan otak. (Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x).

Kerusakan berupa nekrosis sel otak mencit sangat jelas terlihat pada jaringan otak yang diinfeksi dengan virus H5N1 clade 2.1 (P2) apabila dibandingkan dengan jaringan otak mencit yang diinfeksi dengan virus H5N1 clade 2.3 (P1). Gambaran patologi berupa nekrosis sel otak mencit adalah sebagai berikut :



Gambar 5.4. Tanda panah menunjukkan adanya nekrosis fokal yang ditandai dengan kerusakan sel otak menciit secara fokal.(Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x).

Perubahan histopatologi yang sangat terlihat dari semua perubahan histopatologi yang terjadi pada jaringan otak menciit kelompok P1 dan kelompok P2 adalah adanya degenerasi neuron yang terjadi secara meluas di setiap lapangan pandang yang diamati. Sedangkan pada kelompok kontrol tidak menunjukkan adanya degenerasi neuron. Gambaran adanya perubahan berupa degenerasi neuron yang terlihat adalah sebagai berikut :



Gambar 5.5. Tanda panah menunjukkan adanya degenerasi neuron yang ditandai dengan sel-sel neuron yang membesar dan kehilangan sitoplasma serta inti dari sel tersebut memadat. (Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x)

5.1.2. Hasil Analisis Statistik Histopatologi Otak Mencit

Hasil evaluasi histopatologi otak mencit yang diinfeksi dengan virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 (P1) dan virus H5N1 clade 2.1 (P2) secara mikroskopis menunjukkan adanya perubahan histopatologi seperti : Encephalitis, Perivaskular Cuffing, Perdarahan, Nekrosis, dan Degenerasi Neuron. Adapun pada kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan PBS steril (K) tidak menunjukkan perubahan histopatologi yang menunjukkan adanya infeksi virus.

Tabel. 5.1 Hasil pengamatan histopatologi otak mencit pada hewan uji perlakuan infeksi virus *Avian Influenza* H5N1

			Encephalitis	Perivaskular. Cur fing	Perdarahan	Nekrosis	Degenerasi. Neu ron
Perlakuan	P1	1	1.60	.00	1.40	.60	2.20
		2	1.60	.00	1.40	2.00	2.40
		3	1.80	.80	1.80	.80	2.40
		4	1.20	.00	1.20	.80	2.00
		5	1.00	.00	1.60	1.60	2.20
	Total	N	5	5	5	5	5
		Median	1.6000	.0000	1.4000	.8000	2.2000
	P2	1	2.00	.00	.80	1.20	2.40
		2	.00	.00	1.00	2.00	2.20
		3	1.00	.00	1.80	1.80	2.20
		4	1.60	.60	1.60	2.20	2.40
		5	2.00	.80	2.20	2.20	2.40
	Total	N	5	5	5	5	5
		Median	1.6000	.0000	1.6000	2.0000	2.4000
	K	1	.00	.00	.00	.00	.00
		2	.00	.00	.00	.00	.80
		3	.00	.00	.00	.00	.00
		4	.00	.00	.00	.00	.80
5		.00	.00	.00	.00	.00	
Total	N	5	5	5	5	5	
	Median	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	
Total	N	15	15	15	15	15	
	Median	1.0000	.0000	1.2000	.8000	2.2000	

Keterangan : P1 : Organ otak dari mencit yang diinfeksi dengan virus H5N1 2.3 A/*duck*/Indonesia/UADM78/2012.

**P2 : Organ otak dari mencit yang diinfeksi dengan virus
H5N1 2.1 A/chicken/Indonesia/UAC1787T/2012**

K : Organ otak dari mencit yang diinfeksi dengan PBS Steril (sebagai control negatif)

N : Ulangan

Data tersebut diatas merupakan hasil dari pengamatan lebih dari satu orang untuk menghilangkan sifat subyektif dari hasil penelitian ini dan dilakukan skoring untuk masing-masing lapang pandang. Melakukan pengamatan pada lima lapang pandang untuk setiap ulangan perlakuan kemudian dirata-rata untuk memperoleh nilai median dari setiap perlakuan maupun nilai median untuk keseluruhan perlakuan.

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan mikroskopis dengan kerusakan encephalitis, perdarahan, nekrosis, dan degenerasi neuron menunjukkan pada kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan P2 ($P > 0,05$). Sedangkan pada kelompok P1 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok K ($P < 0,05$) dan kelompok P2 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok K ($P < 0,05$). Ketiga kelompok perlakuan tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Pada pemeriksaan histopatologi yang menunjukkan adanya perubahan perivaskular cuffing, pada ketiga kelompok tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

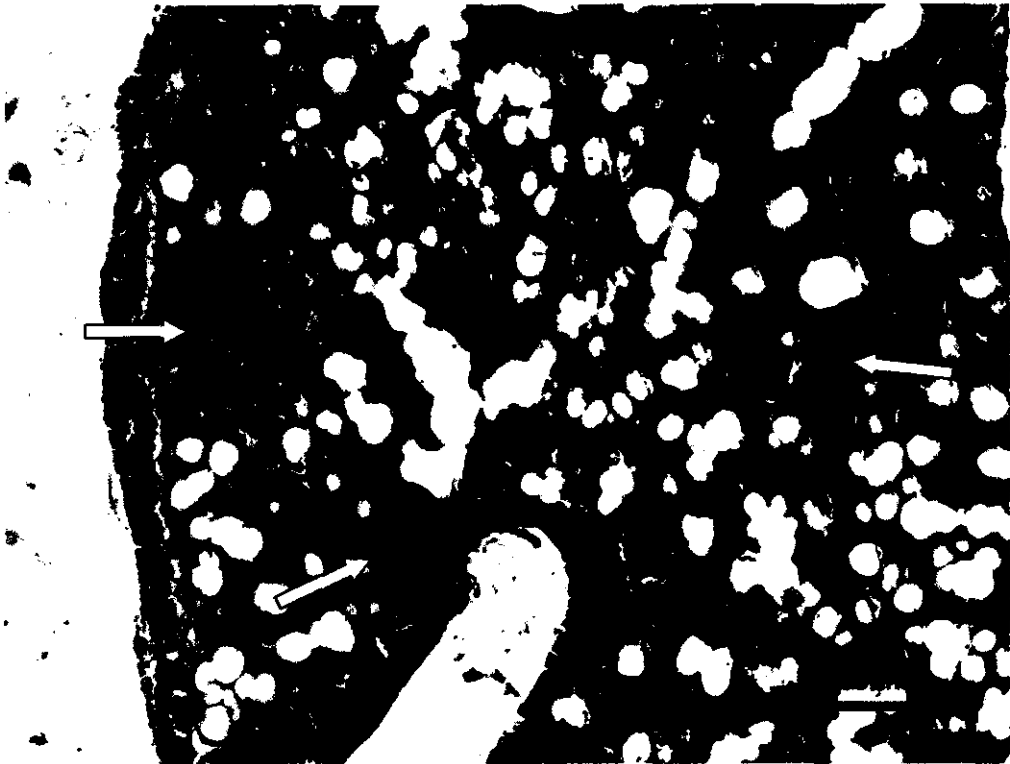
5.2. Paru-Paru

5.2.1. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Histopatologi Paru-Paru Mencit

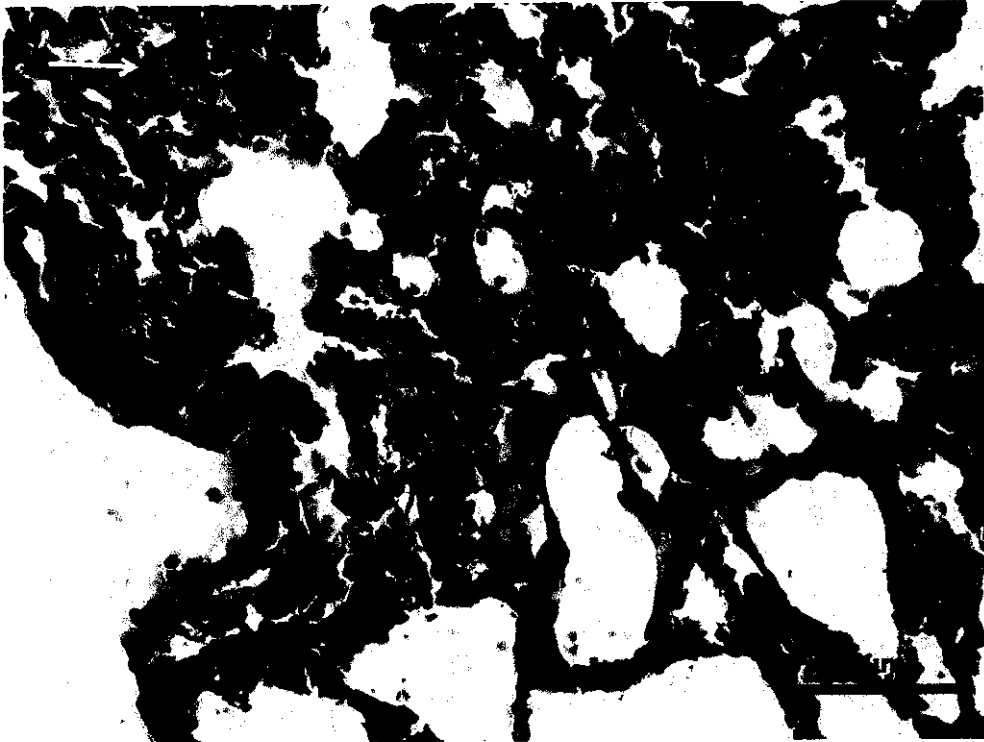
Hasil evaluasi terhadap pemeriksaan mikroskopis sampel paru-paru mencit yang diinfeksi dengan virus *Avian Influenza* H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1 menunjukkan adanya perubahan yang bervariasi berupa perdarahan, kongesti, peribronchiolitis dan pneumonia interstitialis. Sedangkan untuk kelompok kontrol

negatif yang mendapat perlakuan diberikan PBS steril tidak menunjukkan adanya perubahan histopatologis yang signifikan.

Gambaran perubahan histopatologi berupa pneumonia interstitialis yang disertai dengan perdarahan masif pada jaringan paru-paru terlihat lebih banyak terjadi pada mencit yang diberikan perlakuan (P1). Sedangkan pada perlakuan kontrol (K) tidak menunjukkan adanya perubahan yang mengarah pada kerusakan yang dikarenakan adanya infeksi virus. Gambaran yang terlihat adalah sebagai berikut :

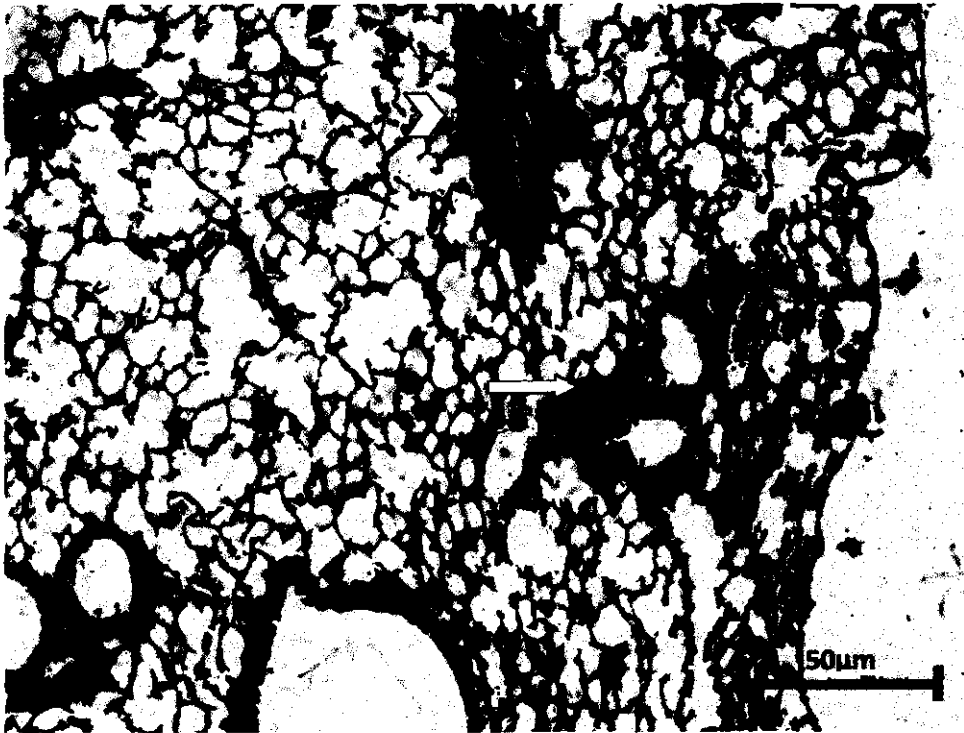


Gambar 5.6. Pneumonia interstitialis disertai dengan perdarahan massif, ditandai dengan terlihat adanya sel-sel radang, akumulasi eritrosit dan cairan pada hamper seluruh rongga alveoli dari paru-paru mencit yang diinfeksi virus *Avian Influenza* H5N1. (Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x)



Gambar 5.7. Tanda panah menunjukkan pneumonia interstitialis yang ditunjukkan dengan adanya akumulasi sel radang dan cairan pada rongga alveoli paru-paru mencit. (Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x)

Kerusakan histopatologi yang terlihat secara mikroskopis berupa kongesti sama-sama terlihat jelas pada kelompok perlakuan P1 dan P2. Sedangkan perubahan histopatologis berupa peribronchiolitis lebih banyak terlihat pada kelompok perlakuan P1 daripada kelompok perlakuan P2 dan kontrol negatif. Adapun gambaran yang terlihat adalah sebagai berikut :



Gambar 5.8. Tanda panah menunjukan peribronchiolitis yang ditandai dengan adanya penebalan dinding lumen bronchiolus disertai dengan banyaknya sel radang yang terlihat di sekitar bronchioles. Kepala anak panah menunjukkan adanya kongesti, yang ditandai dengan adanya akumulasi eritrosit yang terlihat penuh pada lumen pembuluh darah. (Pewarnaan HE ; Perbesaran 400x).

5.2.2. Hasil Analisis Statistik Histopatologi Paru-Paru Mencit

Dari hasil penelitian yang dilakukan pada mencit terbagi menjadi 3 (tiga) perlakuan (P1, P2, K), dilihat pada pengamatan mikroskopis dari masing-masing perlakuan terdapat perubahan gambaran histopatologi seperti, perdarahan, kongesti, peribronchiolitis dan pneumonia interstitialis.

Data yang diperoleh dari penelitian tentang pengaruh kerusakan histopatologi organ akibat virus *Avian Influenza* H5N1 dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil pengamatan histopatologi otak mencit pada hewan uji perlakuan infeksi virus *Avian Influenza* H5N1.

			Perdarahan	Kongesti	Peribronchiolitis	Pn. Interstitialis
Perlakuan	P1	1	2.20	2.00	2.20	1.00
		2	3.40	4.00	2.20	2.80
		3	1.40	3.00	1.20	1.00
		4	.80	1.20	1.40	.00
		5	1.60	1.60	2.40	3.00
	Total	N	5	5	5	5
		Median	1.6000	2.0000	2.2000	1.0000
	P2	1	1.80	2.00	1.60	.20
		2	.60	1.60	.80	.00
		3	1.40	2.20	1.60	1.00
		4	1.40	2.00	1.80	.80
		5	1.40	2.60	1.80	1.00
	Total	N	5	5	5	5
		Median	1.4000	2.0000	1.6000	.8000
	K	1	.40	1.00	1.20	.00
		2	.60	1.20	1.20	.00
		3	.80	1.40	.60	.00
		4	1.00	1.60	.80	.00
		5	.60	1.60	1.00	.00
	Total	N	5	5	5	5
		Median	.6000	1.4000	1.0000	.0000
	Total	N	15	15	15	15
		Median	1.4000	1.6000	1.4000	.2000

Keterangan : P1 : Organ paru-paru dari mencit yang diinfeksi dengan virus H5N1 2.3 A/*duck*/Indonesia/UADM78/2012.

P2 : Organ paru-paru dari mencit yang diinfeksi dengan virus H5N1 2.1 A/*chicken*/Indonesia/UAC1787T/2012

K : Organ paru-paru dari mencit yang diinfeksi dengan PBS Steril (sebagai control negatif)

N : Ulangan

Data tersebut diatas merupakan hasil dari pengamatan lebih dari satu orang untuk menghilangkan sifat subyektif dari hasil penelitian ini dan dilakukan skoring untuk masing-masing lapang pandang. Melakukan pengamatan pada lima lapang pandang untuk setiap ulangan perlakuan kemudian dirata-rata untuk memperoleh nilai median dari setiap perlakuan maupun nilai median untuk keseluruhan perlakuan.

Berdasarkan data yang diperoleh diolah dengan uji statistic *Kruskal-Wallis*, didapatkan dari hasil pemeriksaan mikroskopis dengan kerusakan perdarahan dan pneumonia interstitialis menunjukkan pada kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan P2 ($P > 0,05$). Sedangkan pada kelompok P1 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok K ($P < 0,05$) dan kelompok P2 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok K ($P < 0,05$). Ketiga kelompok perlakuan tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Hasil pemeriksaan histopatologi yang menunjukkan adanya perubahan peribronchiolitis menunjukkan pada kelompok P1 tidak berbeda nyata dengan P2 ($P > 0,05$). Sedangkan pada kelompok P1 menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok K ($P < 0,05$) dan kelompok P2 menunjukkan perbedaan yang tidak nyata dengan kelompok K ($P > 0,05$). Ketiga kelompok perlakuan tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Pada pemeriksaan histopatologi yang menunjukkan adanya perubahan Kongesti, pada ketiga kelompok tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Otak

Berdasarkan hasil penelitian gambaran histopatologi otak mencit bagian lobus frontalis yang diinfeksi virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1, menunjukkan adanya perubahan patologi berupa Encephalitis, Perivaskular Cuffing, Perdarahan, Nekrosis, dan Degenerasi Neuron. Sedangkan pada pemeriksaan paru-paru mencit yang diberikan perlakuan sama, menunjukkan adanya perubahan patologi berupa perdarahan, kongesti, peribronchiolitis dan pneumonia interstitialis.

Otak mempunyai sejumlah sifat anatomis dan fisiologis yang sangat mempengaruhi keadaan klinis penyakit otak itu terjadi. Kebanyakan sifat-sifat khusus ini bisa bersifat dilematis, yang memberikan perlindungan terhadap suatu serangan penyakit, sebaliknya memungkinkan otak itu lebih mudah terserang oleh penyebab lainnya. Daerah yang berbeda dalam otak mempunyai fungsi yang berbeda sehingga menimbulkan kerusakan yang berbeda pula pada daerah tertentu. Lokalisasi inilah yang memberikan perbedaan yang sangat penting antara otak dan jaringan tubuh lainnya yang menimbulkan sejumlah konsekuensi. Konsekuensi patologis yang paling penting sebagai akibat dari adanya lokalisasi fungsi ini adalah, kerusakan setempat yang kecil didalam otak dapat menimbulkan gangguan fungsi secara selektif dan hebat, misalnya fungsi motorik pada lobus frontalis. Jaringan otak sangat peka pada kerusakan local yang kecil, yang tidak dijumpai pada organ lain seperti hati dan paru-paru. (Robbins dan kumar, 1995)

Jaringan otak terdiri dari neuron-neuron yang tertanam didalam kerangka jaringan penyokong khusus dari sel-sel glia yaitu astrosit, oligodendrosit, sel ependim dan microglia. Pada penelitian ini peneliti tidak membahas kerusakan yang melibatkan jaringan penyokong khusus, hal tersebut dikarenakan tidak terjadi perubahan patologi yang begitu jelas. Untuk itu hanya dikhususkan perubahan yang terjadi pada sel neuron.

Bentuk khas dari neuron adalah sel pyramidal kortikal yang mempunyai inti yang besar dengan kromatin yang jernih seperti air serta anak inti yang mencolok. Sitoplasmanya berisi gumpalan retikulum endoplasmik yang mempunyai permukaan kasar mengikat secara kuat pewarnaan dasar hemaktosilin (HE). Badan sel mengeluarkan banyak dendrite dan sebuah axon yang berhubungan dengan neuron pada tempat-tempat yang disebut sinaps dan memungkinkan otak mempunyai fungsi penghantar yang unik. Neuron juga mempunyai bentuk dan ukuran yang bervariasi mulai dari sel granular kecil sampai sel Beltz yang berukuran besar pada korteks motorik pada bagian lobus frontalis. Neuron seringkali mengalami beberapa macam jenis degenerasi, kebanyakan ada hubungannya dengan penyakit-penyakit infeksius misalnya agen virus. (Robbins dan Kumar,1995).

Hasil pengamatan histopatologi seperti pada hasil gambar 5.5 terlihat sel neuron mengalami cedera namun tidak terjadi kematian sel. Keadaan tersebut menunjukkan perubahan-perubahan morfologis yang mudah dikenali. Secara potensial perubahan ini bersifat *reversible* yang disebut dengan perubahan degenerative yang cenderung melibatkan sitoplasma sel, sedangkan inti sel

(nucleus) mempertahankan integritasnya selama sel tidak mengalami cedera letal. Walaupun banyaknya agen yang menimbulkan cedera sel tidak terbatas, namun bentuk morfologis cedera sangat terbatas. Pada saat rangsangan yang menimbulkan cedera dihentikan, maka sel akan kembali pada keadaan sehat seperti sebelumnya. Sebaliknya kerusakan ini dapat berlanjut kearah ke kematian sel jika pengaruh yang berbahaya ini tidak diatasi. Kematian sel tersebut disebut sebagai proses nekrosis, bilamana suatu sel atau sekelompok sel dalam hospes yang hidup diketahui mati. Nekrosis sendiri merupakan kematian sel lokal yang dapat menyebabkan lisis sel (Price dan Wilson, 1988)

Umumnya perubahan-perubahan lisis terjadi dalam jaringan yang nekrotik dapat melibatkan sitoplasma, tetapi inti sel yang paling jelas menunjukkan perubahan kematian sel. Inti sel yang mati menyusut, batas-batasnya tidak teratur dan berwarna gelap. Proses ini dinamakan piknosis dan intinya disebut piknotik. Kemungkinan lain inti dapat hancur sambil meninggalkan pecahan-pecahan zat kromatin yang tersebar didalam sel, proses ini disebut karioreksis. Pada akhirnya, beberapa keadaan inti sel yang mati kehilangan kemampuan untuk diwarnai dan menghilang begitu saja, proses ini disebut kariolisis. (Price dan Wilson, 1988).

Infeksi virus pada otak hampir selalu merupakan penyebaran agen penyebab dari suatu tempat diluar tulang tengkorak yang dapat atau tidak dapat menghasilkan penyakit. Infeksi otak diikuti dengan beberapa reaksi peradangan pada selaput otak, sehingga pada cairan cerebrospinal terdapat sel radang, biasanya limfosit. Perubahan histologi yang sangat khas oleh karena infeksi virus

adalah tersebar sel-sel mononukleus (limfosit, sel plasma, dan makrofag) umumnya berada disekitar pembuluh darah. (Robbins dan Kumar, 1995).

6.2. Paru-paru

Jika dikaitkan dengan gejala klinis yang ada, khususnya pada itik yang terinfeksi virus H5N1 subclade 2.3.2 menunjukkan adanya kejang-kejang (tortikolis), yang berbeda tatkala itik terinfeksi oleh subclade 2.1.3, sementara perubahan kerusakan sel otak tidak berbeda nyata. Salah satunya, kemungkinan gejala tortikolis bukan bersumber pada kerusakan di otak, melainkan pada bagian lain dari susunan syaraf pusat lainnya.

Pneumonia interstitialis merupakan salah satu tipe dari pneumonia (Lopez, 1995). Pneumonia interstitialis kronik merupakan akibat dari kerusakan persisten pada interstitial alveolar, septum alveolar, dan pada dinding alveolar akibat dari proses peradangan (Dungworth 1993; Lopez 1995; Dijk 2007). Patogenesis pneumonia interstitialis adalah kerusakan difusadan menyeluruh atau kerusakan sebagian septum alveolar. Kerusakan dapat menyebar secara luas pada seluruh paru-paru, namun sering terjadi pada daerah dorso kaudal yang disebabkan oleh blood borne (Dungworth, 1993). Menurut Lopez (1995), pneumonia interstitialis terjadi oleh penyebab aerogen pada kerusakan kapiler epithelium alveolar (pneumonia tipe I dan II) dan oleh penyebab hematogen pada kerusakan alveolar. Penyebab aerogen terjadi melalui inhalasi gas toksik, asap toksik, metabolic toksik, pelepasan radikal bebas, dan infeksi virus pernafasan.

Pneumonia interstitialis ditunjukkan dengan adanya predominan eksudatif

dan respon proliferasi pada dinding alveolar. Bila kerusakan alveolar terjadi secara persisten, proliferasi dan lesion infiltrasi pada pneumonia interstitial akut dapat berubah menjadi kronis yang ditunjukkan dengan fibrosis alveolar, akumulasi sel radang dan hyperplasia pneumosit tipe II persisten (Dungworth,1993).

Menurut Kusumawidjaja (1996), keadaan klinik yang menyertai kongesti antara lain shock yang menyebabkan insufisiensi sirkulasi darah dan anoksia sistemik. Anoksia sistemik menyebabkan kerusakan pada susunan saraf pusat. Secara mikroskopis kongesti tampak sebagai dilatasi (pelebaran) kapiler pada septum alveolus. Adanya kongesti maka pembuluh darah akan melebar dan menekan daerah sekitarnya sehingga kongesti selalu mengganggu fungsi pernafasan normal yang merupakan factor predisposisi terjadinya bronchopneumonia. (Kusumawidjaja, 1996). Akibat dari kongesti, lumen bronkiolus menjadi sempit sehingga terjadi obstruksi udara. Bronkiolus memiliki dinding yang tipis dan diameter lumen yang kecil sehingga lebih rentan terhadap efek patologis yang terjadi pada parenkhim alveolar sekitarnya. (Dungworth,1993).

Kongesti berat pada pembuluh darah akan menimbulkan perdarahan yang ditandai dengan lepasnya eritrosit dari pembuluh darah ke jaringan sekitarnya. Pada perdarahan paru-paru, alveolus akan terisi oleh darah yang keluar dari pembuluhnya. (Damjanov,2000).

Penebalan dinding bronkus dan bronkiolus terjadi akibat hipertrofi kelenjar mucus. (Price dan Wilson,1992).

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan yaitu

1. Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1 menimbulkan kerusakan secara nyata ($p < 0,05$) pada organ otak dan paru dari mencit yang diinfeksi virus dibanding dengan mencit yang tidak diinfeksi.
2. Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 clade 2.3 dan clade 2.1 tidak ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dalam menimbulkan kerusakan pada organ otak dan paru dari mencit yang diinfeksi virus.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang gambaran histopatologi dengan menggunakan metode imunohistokimia pada seluruh susunan syaraf pusat (otak dan sumsum tulang belakang).
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 clade 2.1 dan clade 2.3 pada mamalia yang lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, y. 2006. Efek Antiproliferasil Ekstrak daun Benalu Nangka(*Macrosolen cochinchinensis* (Lour) van Tiegh.) Terhadap Sel Tumor Paru Pada Mencit Jantan Post Inisiasi Benzo pirena. Skripsi, fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Akoso, B. T. 2006. Waspada Flu Burung Penyakit Menular Pada Hewan dan Manusia. Kanisius. Yogyakarta
- Angi A. H. dkk., 2009. Kemampuan Netralisasi Antibodi Spesifik Avian Influenza H5 Terhadap Beberapa Virus H5N1 Isolat Lapang. Forum Pascasarjana Vol. 32 No. 1 Januari 2009 : 55-66
- (Bappenas) Badan Perencanaa Pembangunan Nasional. 2005. Strategi Nasional Kesiagaan Menghadapi Pandemi *Avian Infuenza*. Rencana Strategis 2006-2008. Bappenas. Hal 9-22.
- Beard, C. W. 2004. *Avian Influenza*. <http://www.vet.uga.edu/VPP/greybook/FAD/aka.htm>. (02 April 2010)
- Bingham, J., Green, D. J., Lowther, S., Klippel, J., Burggraaf, S., Anderson, D. E., Wibawa, H., Hoa, D. M., Long, N. T., Vu, P. P., Middleton, D. J. & Daniels, P. W. 2009. Infection studies with two highly pathogenic avian influenza strains (Vietnamese and Indonesian) in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*), with particular reference to clinical disease, tissue tropism and viral shedding. *Avian Pathol* 38(4): 267-278.
- Biologi Online, 2008 Aging and Gen Expresion in The Brain.
- CDC, 2006. Avian Influenza A Virus Infections of Human. <http://.cdc.gov/flu/Avian/profesional/protect-guid.htm>
- Chusid, J., G. 1990. Neurosnstomi Korelatif dan Neurologi Fungsional. Gadjah Mada University Press.
- Damjanov I. 2000. Buku Teks dan Atlas Berwarna Histopatologi. . Himawan M, Widya Medika. Jakarta.
- Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Wiyono, A., Indriani, R., dan Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode reverse transcripatese polymerase chain reaction RT-PCR. JITV. 9. 2 : 136-142
- Depkes. 2007. Waspada Flu Burung. www.depkes.go.id. (01 April 2010).
- Depkes, R.I. 2009. Update Situasi Flu Burung di Indonesia. <http://www.sobatsehat.com2010/01/06/Update-situasi-fluburung-di-indonesia>. (6 Mei 2010)

- Dimmock, N.J. 1984. Mechanisms of Neutralization of Animal Viruses. *Journal of General Virology* 65, 1015-1022.
- Dungworth DL. 1993. The Respiratory Sistem. Di dalam : Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, editor. Pathologi of Domestic Animals. Ed \$. San Diego.
- Fadilah, R., Iswandari., A. Polana, 2007. Beternak Unggas Bebas Flu Burung. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Feriyawati, L. 2006. Anatomi Sistem Saraf dan Peranannya Dalam regulasi Kontraksi Otot Rangka. Paper. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- Garman, E, Laver G. 2004. Controlling Avian Influenza by inhibiting the virus's neuraminidase. *Curr Drug Targets*.5: 119-36.
- Harder TC. And Werner O., 2006. Avian Influenza. N. Engl. J. Med.
- Harimoto, T., Kawaoka, Y. 2001. Pandemic Threat Posed By Avian *Avian Influenza A* Viruses. Clin Microbiol. Rev. 14: 129-149.
- Junqueira,L.C and Carnerio, J. 1990, Histologi dasar, Edisi 3, diterjemahkan oleh Adji Darma, EGC Penerbit Buku kedokteran, Jakarta.
- Lopez A. 1995. Respiratory sistem. Thomson's Special Veterinary Pathology. St.Louis. Mosby.
- Mandel, B. 1978. Neutralization of animal viruse. *Advances in Virus Research* 23,205-268.
- Matrosovich, M.N., Matrosovich TYT, Gray T, RobertsNA, Klenk HD. 2004. Neuraminidase is important for the initiation of *Avian Influenza* virus infection in human airway epithelium. J Virol. 78; 12665-7.
- Martin, V., Forman, A., Lubroth, J. 2006. Preparing For Highly Pathogenic Avian *Avian influenza*. Food and Organitation of The United Nation Collaboration with World Organitation For Animal Health Rome.
- Nidom, C.A. 2005. Analisis Molekular Genoma Virus Avian *Avian Influenza* H5N1 di Indonesia (Dissertation). Universitas Airlangga Surabaya.
- Nidom, C.A., Yamada S. Nidom R.V., Rahmawati K.,Alamudi M.Y., Kholik., Indrasari S., Hayati R.S. 2012. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010
- (OIE) Office International *des* Epizooties. 2002. Highly Pathogenic Avian *Avian Influenza* .22April
- (OIE) Office International *des* Epizooties 2005. Manual of Diagnosis Test and Vaccines for Terrestrial Animals. (08 April 2010)

- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, W., Dundly, J., Leomard, F. C. *Veterinary Microbiology and Mikrobial Disease* by Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company.
- Radji, M. 2006. *Avian Influenza A (H5N1) : Patogenesis, Pencegahan, Pengendalian, dan Penyebaran pada Manusia*. Majalah Ilmu Kefarmasian Vol III : 55-65
- Raharjo, Y. dan Nidom, C. A. 2004. *Avian Influenza; Pencegahan, Pengendalian, dan Pemberantasannya*. Hasil Infestigasi Kasus di Lapangan GITA Pustaka. Jakarta.
- Singgih, S. A., 2003. *Sistem saraf sebagai Sistem Pengendali Tubuh*. Departemen ilmu Faal, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Soejoedono, R. D., dan Handharyani, E. 2005. *Flu Burung*. Penebar Swadaya. Jakarta. 1-9.
- Suarez, D.L., Perdue, M., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J. and Swayne, D. 1998. Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Humans and Chicken from Hongkong. *J. Virol.* 72:6678-88.
- Swayne, D.E., John CR, Jackwood WM, Reed MW. 1998. *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Fourth Edition. 255-265.
- Tabbu, C. R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya : Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral Volume I*. Kasinius. Yogyakarta.
- Uyeki, T. M., 2008. Global Epidemiology of Human Infections with Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Viruses. *Jour. Respiriology* 2008, 13 : S2 – S9.
- Wagner, R, Matrosovich M, Klenk HD. 2002. Funcional Balance between Haemagglutinin and Neuraminidase in *Avian Influenza Virus* Infections. *Rev Med Virol*; 12: 159-66
- Watowich, S.J., Skehel JJ, Willey DC. 1994. Cristal Structures of *Avian Influenza* virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. *Structure* 1994; 2: 719-31
- Webster RG and Hulse DJ, 2004. Microbial Adaption and change : *Avian Infleunza* Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23 (2), 453-465.
- Whittaker, G. R. 2001. *Intercelullar Trafficking of Influenza Virus : Clinical Implications for Molecular Medicine*. Cambridge University Press.
- WHO, 2004. *WHO Manual om Animal Influenza Diagnostic and Surveillance*.
- Wibawa, H., Bingham, J., Nuradji, H., Lowther, S., Payne, J., Harper, J., Wong, F., Lunt, R., Junaidi, A., Middleton, D. & Meers, J. 2012. *The pathobiology*

of two Indonesian H5N1 avian influenza viruses representing different clade 2.1 sublineages in chickens and ducks *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. In Press.

Wibowo, H. 2006. ND Dini, *Avian Influenza*, Vaksin dan Vaksinasi. Infovet. Jakarta. Edisi 149 November 2006 : 60.

LAMPIRAN

Lampiran 1.

Prosedur Pembuatan Sediaan Histopatologi Organ

Pembuatan sediaan Histopatologi ini sesuai dengan prosedur yang dilakukan di laboratorium patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dengan cara sebagai berikut :

a. Fiksasi dan Pencucian

Bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme jaringan, mematikan kuman, menjadikan jaringan lebih keras, sehingga lebih mudah untuk dipotong.

Cara kerja :

- Setelah diseksi, jaringan diambil dan dimasukkan ke dalam formalin 10% sekurang-kurangnya 24 jam. (dilakukan didalam *Animal BSL-3*)
- Jaringan dipotong dengan ketebalan 0,5cm.
- Kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 30 menit,

b. Dehidrasi dan Clearing

Bertujuan untuk menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Cara kerja :

Jaringan yang telah dicuci dengan air, dimasukkan kedalam reagen dengan urutan alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, II, masing-masing 30 menit.

c. Infiltrasi

Bertujuan untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin yang akan mengisi ruang antar sel dan dalam sel, sehingga jaringan lebih tahan lama dalam pemotongan.

Cara kerja :

- Jaringan dimasukkan ke dalam parafin I yang masih cair.
- Dimasukkan kedalam oven pada suhu 60°C selama 30 menit.
- Pindahkan ke paraffin II yang masih cair.
- Pindahkan kedalam oven dengan suhu 60°C selama 30 menit.

d. Pembuatan Blok Paraffin

Bertujuan memberikan konsistensi padat pada jaringan, sehingga jaringan mudah dipotong.

Cara kerja :

- Disiapkan beberapa cetakan besi yang diolesi dengan gliserin supaya nantinya paraffin tidak melekat pada besi.
- Besi cetakan diisi paraffin yang masih cair.
- Organ dimasukkan ke dalam cetakan, tunggu sampai paraffin mengeras.

e. Pengirisan dengan Mikrotom

Proses ini dilakukan untuk mendapatkan irisan jaringan dengan ketebalan $5\mu\text{m}$ agar dapat dilihat dibawah mikroskop. Blok paraffin yang telah mengeras dengan organ didalamnya selanjutnya dipotong dengan menggunakan mikrotom. Mikrotom dibersihkan terlebih dahulu kemudian dibersihkan dengan kertas tissue pada relnya hingga bersih. Mata pisau dipasang pada gagang pisau, kemudian dipasang pada mikrotom. Blok sediaan dipasang pada mikrotom, diatur tinggi rendahnya permukaan horizontal, sudut permukaan organ diatur dengan arah potongan pisau harus membentuk 45° dan tebal potongan diatur $3\mu\text{m}$ untuk organ yang keras ketebalannya $5\mu\text{m}$.

Pemotongan diambil secara acak, tiap kali 10 kali pemotongan diambil satu ketebalan $5\text{--}7\mu\text{m}$, kemudian jaringan otak dicelupkan ke dalam air hangat dengan suhu $20^\circ\text{C}\text{--}30^\circ\text{C}$ agar mengembang dengan baik. Jaringan hati kemudian diletakkan pada obyek glass yang telah diolesi putih telur, selanjutnya dikeringkan diatas hot plate dengan suhu 60°C .

f. Pewarnaan

Terdapat dua macam pewarnaan jaringan pada pewarnaan histopatologi, yaitu pewarnaan umum dan pewarnaan khusus.

Pewarnaan umum yaitu pewarnaan dengan Hematoxylin Eosin (H.E), yang mewarnai inti sel dan sitoplasma dengan Eosin dengan pewarnaan khusus yang dilakukan untuk mengidentifikasi atau membantu diagnosa yang tidak dapat dilakukan dengan pewarnaan umum.

Tujuan dilakukan pewarnaan untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Pewarnaan jaringan dengan H.E dapat terlihat bagian-bagian selnya, inti sel berwarna biru sedangkan sitoplasma berwarna merah.

Komposisi zat warna H.E :

Hematoxylin	2,5 g
Absolut Alkohol	25 ml
Potasium Aluminium	50 g
Mercuric oxide	1,25 ml
Glacial acetic acid	20 ml
Water	500 ml

Obyek glass dengan sayatan jaringan diatasnya diwarnai dengan H>E dengan metode Harris. Pertama-tama obyek glass dimasukkan kedalam xylol I selama 3 menit dalam tempat khusus dan selama 1 menit ke dalam xylol II, kemudian berurutan dimasukkan kedalam alkohol absolut I, II, alkohol 96%, 95%, 80%, 70% dan air masing-masing selama 1 menit. Selanjutnya secara berurutan dimasukkan kedalam zat warna Hematoxylin selama 5-10 menit, air kran selama 3-5 menit, alkohol asam sebanyak 3-10 kali pencelupan, air kran sebanyak 4 kali aquades secukupnya, zat warna eosin selama 5 menit dan dimasukkan lagi ke dalam aquades secukupnya, lalu secara berurutan dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama 30 menit, alkohol 80% selama 30 detik, alkohol 95% selama 1 menit, alkohol 96% selama 1 menit, alkohol absolut I, II selama 1 menit, Xylol I, II selama 2 menit. Setelah itu obyek

glass dengan sayatan jaringan diatasnya dibersihkan dari sisa pewarnaan dan dibiarkan mengering.

g. Mounting

Suatu penutupan obyek glass dengan penutup yang sebelumnya telah diolesi dengan canada balsem.

h. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dari perbesaran lemah ke perbesaran kuat yaitu 100X, 400X, dan 1000X.

Lampiran 2.

Hasil analisis statistik kerusakan organ otak mencit

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Encephalitis * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Perivaskular.Cuffing * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Perdarahan * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Nekrosis * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Degenerasi.Neuron * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		Encephalitis	Perivaskular.Cuffi ng	Perdarahan	Nekrosis	Degenerasi.Neuro n
P1	1	1.60	.00	1.40	.60	2.20
	2	1.60	.00	1.40	2.00	2.40
	3	1.80	.80	1.80	.80	2.40
	4	1.20	.00	1.20	.80	2.00
	5	1.00	.00	1.60	1.60	2.20
	N	5	5	5	5	5
	Total Median	1.6000 1.6000	.0000 .0000	1.4000 1.4000	.8000 .8000	2.2000 2.2000
P2	1	2.00	.00	.80	1.20	2.40
	2	.00	.00	1.00	2.00	2.20
	3	1.00	.00	1.80	1.80	2.20
	4	1.60	.60	1.60	2.20	2.40
	5	2.00	.80	2.20	2.20	2.40
	N	5	5	5	5	5
	Total Median	1.6000 1.6000	.0000 .0000	1.6000 1.6000	2.0000 2.0000	2.4000 2.4000
K	1	.00	.00	.00	.00	.00
	2	.00	.00	.00	.00	.80
	3	.00	.00	.00	.00	.00
	4	.00	.00	.00	.00	.80
	5	.00	.00	.00	.00	.00

		N	5	5	5	5	5
Total		Median	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000
Total	N		15	15	15	15	15
	Median		1.0000	.0000	1.2000	.8000	2.2000

a. Limited to first 100 cases.

1. Encephalitis

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Encephalitis	P1	5	10.30
	P2	5	10.20
	K	5	3.50
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Encephalitis
Chi-Square	8.195
df	2
Asymp. Sig.	.017

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Encephalitis	P1	5	5.30	26.50
	P2	5	5.70	28.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Encephalitis
Mann-Whitney U	11.500
Wilcoxon W	26.500
Z	-.213
Asymp. Sig. (2-tailed)	.831
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.841 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Encephalitis	P1	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	Encephalitis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.795
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Encephalitis	P2	5	7.50	37.50
	K	5	3.50	17.50
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Encephalitis
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.362
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

2. Perivaskular Cuffing

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Perivaskular Cuffing	P1	5	8.10
	P2	5	9.40
	K	5	6.50
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Perivaskular Cuffing
Chi-Square	2.164
df	2
Asymp. Sig.	.339

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Perlakuan

3. Perdarahan

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Perdarahan	P1	5	10.40
	P2	5	10.60
	K	5	3.00
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Perdarahan
Chi-Square	9.782
df	2
Asymp. Sig.	.008

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Perdarahan	P1	5	5.40	27.00
	P2	5	5.60	28.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Perdarahan
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	27.000
Z	-.105
Asymp. Sig. (2-tailed)	.916
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Perdarahan	P1	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

	Perdarahan
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.795
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Perdarahan	P2	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

	Perdarahan
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.785
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

4. Nekrosis

Kruskal-Wallis Test

	Perlakuan	N	Mean Rank
Nekrosis	P1	5	8.70
	P2	5	12.30
	K	5	3.00
	Total	15	

	Nekrosis
Chi-Square	11.466
df	2
Asymp. Sig.	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Nekrosis	P1	5	3.70	18.50
	P2	5	7.30	36.50
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Nekrosis
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	18.500
Z	-1.897
Asymp. Sig. (2-tailed)	.058
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Nekrosis	P1	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Nekrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.795
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Nekrosis	P2	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Nekrosis
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.795
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

5. Degenerasi Neuron

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Degenerasi.Neuron	P1	5	9.80
	P2	5	11.20
	K	5	3.00
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Degenerasi.Neuron
Chi-Square	10.261
df	2
Asymp. Sig.	.006

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Degenerasi.Neuron	P1	5	4.80	24.00
	P2	5	6.20	31.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Degenerasi.Neuron
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.808
Asymp. Sig. (2-tailed)	.419
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Degenerasi.Neuron	P1	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Degenerasi.Neuro n
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.668
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Degenerasi.Neuron	P2	5	8.00	40.00
	K	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Degenerasi.Neuro n
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.694
Asymp. Sig. (2-tailed)	.007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Lampiran 3..

Hasil analisis statistik kerusakan organ paru-paru mencit

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Perdarahan * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Kongesti * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Peribronchiolitis * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%
Pn.Interstitialis * Perlakuan	15	100.0%	0	0.0%	15	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

			Perdarahan	Kongesti	Peribronchiolitis	Pn.Interstitialis
P1	1		2.20	2.00	2.20	1.00
	2		3.40	4.00	2.20	2.80
	3		1.40	3.00	1.20	1.00
	4		.80	1.20	1.40	.00
	5		1.60	1.60	2.40	3.00
	Total	N	5	5	5	5
		Median	1.6000	2.0000	2.2000	1.0000
	1		1.80	2.00	1.60	.20
	2		.60	1.60	.80	.00
	3		1.40	2.20	1.60	1.00
Perlakuan	P2	4	1.40	2.00	1.80	.80
		5	1.40	2.60	1.80	1.00
	Total	N	5	5	5	5
		Median	1.4000	2.0000	1.6000	.8000
	1		.40	1.00	1.20	.00
K	2		.60	1.20	1.20	.00
	3		.80	1.40	.60	.00
	4		1.00	1.60	.80	.00
	5		.60	1.60	1.00	.00

	Total	N	5	5	5	5
		Median	.6000	1.4000	1.0000	.0000
Total		N	15	15	15	15
		Median	1.4000	1.6000	1.4000	.2000

a. Limited to first 100 cases.

1.Perdarahan

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Perdarahan	P1	5	11.20
	P2	5	8.90
	K	5	3.90
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Perdarahan
Chi-Square	7.157
df	2
Asymp. Sig.	.028

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Perdarahan	P1	5	6.50	32.50
	P2	5	4.50	22.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Perdarahan
Mann-Whitney U	7.500
Wilcoxon W	22.500
Z	-1.078
Asymp. Sig. (2-tailed)	.281
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P1	5	7.70	38.50
Perdarahan	K	5	3.30	16.50
	Total	10		

Test Statistics^a

	Perdarahan
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.312
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	P2	5	7.40	37.00
Perdarahan	K	5	3.60	18.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	Perdarahan
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	18.000
Z	-2.034
Asymp. Sig. (2-tailed)	.042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

2. Kongesti

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Kongesti	P1	5	9.60
	P2	5	10.30
	K	5	4.10
	Total	15	

Test Statistics^{a,b}

	Kongesti
Chi-Square	5.924
df	2
Asymp. Sig.	.052

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Perlakuan

3. Peribronchiolitis

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Peribronchiolitis	P1	5	11.20
	P2	5	8.90
	K	5	3.90
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Peribronchiolitis
Chi-Square	7.066
df	2
Asymp. Sig.	.029

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Peribronchiolitis	P1	5	6.40	32.00
	P2	5	4.60	23.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Peribronchiolitis
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-.949
Asymp. Sig. (2-tailed)	.343
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Peribronchiolitis	P1	5	7.80	39.00
	K	5	3.20	16.00
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Peribronchiolitis
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-2.440
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Peribronchiolitis	P2	5	7.30	36.50
	K	5	3.70	18.50
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Peribronchiolitis
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	18.500
Z	-1.903
Asymp. Sig. (2-tailed)	.057
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

4. Pneumonia Interstitialis

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Pn. Interstitialis	P1	5	11.20
	P2	5	8.80
	K	5	4.00
	Total	15	

Test Statistics ^{a,b}	
	Pn. Interstitialis
Chi-Square	7.618
df	2
Asymp. Sig.	.022

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Pn. Interstitialis	P1	5	6.70	33.50
	P2	5	4.30	21.50
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Pn. Interstitialis
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	21.500
Z	-1.297
Asymp. Sig. (2-tailed)	.195
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Pn. Interstitialis	P1	5	7.50	37.50
	K	5	3.50	17.50
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Pn. Interstitialis
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.362
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Pn. Interstitialis	P2	5	7.50	37.50
	K	5	3.50	17.50
	Total	10		

Test Statistics ^a	
	Pn. Interstitialis
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.362
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.