



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS *AVIAN INFLUENZA*
SUBTIPE H5N1 DI PETERNAKAN TRADISIONAL
KECAMATAN GUNUNGPATI SEMARANG**

Skripsi

disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sain

Oleh

Angga Ari Wibowo

4450405037

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

2011

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 Di Peternakan Tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang” disusun berdasarkan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan telah disebutkan teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka di bagian akhir skripsi ini. Menurut sepengetahuan penulis skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.

Semarang, 19 Januari 2011

Angga Ari Wibowo
NIM. 4450405037

PENGESAHAN

Skripsi dengan judul:

Isolasi dan Identifikasi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 Di Peternakan
Tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang.

disusun oleh:

nama : Angga Ari Wibowo

NIM : 4450405037

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi Fakultas Matematika
dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang pada tanggal 19
Januari 2011.

Panitia

Ketua

Sekretaris

Dr. Kasmadi Imam S, M. Si
NIP. 195111151979031001

Dra. Aditya Marianti, M.Si
NIP. 196702071993032001

Ketua Penguji

Ir. Tuti Widianti, M. Biomed
NIP. 195102071979032001

Anggota Penguji/
Pembimbing Utama

Anggota\
Pembimbing Pendamping

Dr. drh. R. Susanti, MP
NIP. 196903231997032001

dr. Nugrahaningsih W.H, M. Si
NIP. 196907091998032001

ABSTRAK

Wibowo, Angga A. 2011. Isolasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Di Peternakan Tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang. Rancangan Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. DR. drh. R. Susanti, M.P dan dr. Nugrahaningsih, M.Kes.

Avian Influenza (AI) atau yang lebih dikenal dengan flu burung disebabkan oleh virus *influenza* yang bermutasi menjadi patogen. AI muncul di Indonesia sekitar pertengahan tahun 2003 menyebabkan kematian ayam di wilayah Jawa dan Kalimantan. Sampai tahun 2005 angka kematian mencapai 10 juta ekor.

Penelitian tentang isolasi dan identifikasi VAI subtipe H5N1 perlu dilakukan untuk mengetahui keberadaan virus tersebut, khususnya di kecamatan Gunungpati. Desain penelitian adalah eksploratif dengan pengumpulan sampel usap kloaka secara acak di lima kelurahan di kecamatan Gunungpati. Sampel usap kloaka ditumbuhkan pada telur ayam berembrio SPF, kemudian diisolasi RNA-nya dilanjutkan dengan identifikasi subtipe virus AI menggunakan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan primer pendeteksi gen H5 dan N1. Hasil positif apabila visualisasi hasil elektroforesis dari produk PCR menunjukkan pita-pita spesifik panjang 219 bp untuk H5 dan 131 bp untuk gen N1nya.

Limapuluh sampel usap kloaka yang diisolasi dari lima kelurahan di Gunungpati, delapan isolat positif VAI dan enam diantaranya positif H5N1 dengan angka prevalensi 12%. Isolat positif berasal dari 2 spesies itik (16,67%), 2 dari entok (11,76%) dan 2 dari angsa (18,18%). Dari lima kelurahan yang dilakukan pengambilan sampel, tiga kelurahan ditemukan positif VAI H5N1 masing-masing kelurahan Sekaran (6,67%), Kalisegoro (16,67%) dan Pakintelan (15,78%). Unggas-unggas air di peternakan unggas tradisional berpotensi sebagai penularan VAI, khususnya subtipe H5N1.

Kata kunci: virus *avian influenza*, RT-PCR, peternakan tradisional, Gunungpati

KATA PENGANTAR

Segala puji penulis haturkan kepada Allah SWT, yang telah memberikan nikmat yang tidak terhingga, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “Isolasi dan Identifikasi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 Di Peternakan Tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang” sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Srata 1 (S1).

Dalam penulisan tugas akhir ini, tidak lepas dari kerja sama dan bantuan semua pihak, oleh karena itu dengan kerendahan hati, penulis menyampaikan rasa terima kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan studi di Universitas Negeri Semarang.
2. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah membantu proses perijinan dalam penyusunan skripsi ini.
3. Ketua Jurusan Biologi yang telah memberikan ijin dan fasilitas dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Dosen pembimbing, Dr. drh. R. Susanti, M.P., atas arahan dan bimbingannya dalam memberikan segala sesuatu yang berkaitan dengan penelitian ini dan selesainya skripsi ini.
5. dr. Nugrahaningsih W.H, M.Kes atas bimbingan, motivasi dan pengarahan sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
6. Dosen wali dan dosen penguji, Ir. Tuti Widianti, M. Biomed. atas saran, motivasi dan pengarahan yang diberikan.
7. Bapak, Ibu, dan keluarga yang selalu memberikan kasih sayang, dorongan dan motivasi yang tiada henti
8. Sahabat-sahabat terbaikku atas dorongan dan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
9. Biologi '05, teman-teman Green Community, dan semua teman-teman di jurusan Biologi atas dukungan dan kebersamaannya.

10. Staf Laboratorium Kesehatan Masyarakat dan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor yang telah mengizinkan dan memberi tempat serta fasilitas untuk penelitian ini.
11. Peternak unggas di Kecamatan Gunungpati yang telah membantu penelitian ini.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penyusunan skripsi ini.

Semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Semarang, 19 Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	ii
PENGESAHAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Penegasan Istilah	5
D. Tujuan Penelitian.....	5
E. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Virus Avian Influenza (VAI).....	6
1. Struktur dan Karakteristik VAI	6
2. Gejala dan Patogenesitas VAI.....	8
3. Protein Haemagglutinin (HA) dan Neuramidase (NA).....	9
4. Siklus Hidup VAI.....	12
B. Penyebaran VAI	13
1. Epidemiologi VAI.....	13
2. Telaah VAI di Indonesia	15
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Desain Penelitian.....	19
B. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	19
C. Populasi dan Sampel.....	19

D. Alat dan Bahan Penelitian	20
E. Prosedur Penelitian.....	21
1. Pengumpulan Sampel.....	22
2. Propagasi Virus pada telur ayam berembrio SPF (<i>Specific Pathogen Free</i>).....	22
3. Uji Hemaglutinasi (HA)	22
4. Isolasi RNA	23
5. Identifikasi Subtipe Virus Avian Influenza (AI).....	24
6. Elektroforesis hasil RT-PCR pada gel Agarose 2%	25
F. Data dan Analisis Data	26
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian.....	27
B. Pembahasan	31
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	
A. Simpulan.....	39
B. Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN-LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Gambaran Lokus Genomik yang Berhubungan dengan Meningkatkan Patogenik HPAIV H5N1 Pada Mamalia.....	8
2. Beberapa Contoh Primer Untuk Mendeteksi VAI H5N1	12
3. Alat dan Bahan yang Digunakan Dalam Penelitian.....	20
4. Sekuen Basa Primer Untuk Mengamplifikasi Gen H5 dan N1 serta Besaran Produk yang Diharapkan.....	25
5. Sampel Usap Kloaka Di Kecamatan Gunungpati Berdasarkan Jenis Unggas	27
6. Hasil Uji HA Inokulum Isolat Kecamatan Gunungpati	28
7. Data Hasil RT-PCR Sampel, Isolat Kecamatan Gunungpati.....	30
8. Jumlah dan Prevalensi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 yang Diisolasi dari Unggas di Peternakan Tradisional Kecamatan Gunungpati.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Virus Avian Influenza.....	7
2. Pertukaran gen HA dari dua virus berbeda (<i>genome reassortment</i>).....	10
3. Urutan kode sekuen nukleotida untuk gen hemagglutinin (HA) isolat A/Indonesia/TLL003/2006(H5N1)	11
4. Urutan kode sekuen nukleotida untuk gen neuramidase (NA) isolat A/chicken/Indonesia/11/2003(H5N1)	11
5. Siklus Replikasi Virus Influenza.....	13
6. Tingkatan biosekuriti menurut teknik beternak & masyarakat melepas unggasnya secara bebas	17
7. Alur kerja penelitian isolasi dan identifikasi H5N1	21
8. Hasil uji titer HA dalam mikroplate.....	23
9. Elektroforegram untuk deteksi gen H5	29
10. Elektroforegram untuk deteksi gen N1	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data dan Peta Kelurahan di Kecamatan Gunungpati	45
2. Data Peternak dan Jumlah Ternak yang Diambil Sampel, Di Kecamatan Gunungpati.....	46
3. Pengumpulan Sampel Beserta Polling Usap Kloaka Unggas Isolat Kecamatan Gunungpati.....	47
4. Data Pengamatan Pada Telur Ayam Berembrio SPF.....	49
5. Angka Prevalensi VAI H5N1 Kecamatan Gunungpati.....	50
6. Pembuatan Bahan-bahan Penelitian	51
7. Dokumentasi Penelitian.....	53

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Dalam kehidupan sehari-hari, manusia tidak luput dari masalah kesehatan. Pola hidup adalah salah satu penyebab timbulnya masalah kesehatan. Pola hidup teratur akan mengarah pada kesehatan yang optimal, tetapi pola hidup tidak teratur akan mengakibatkan buruknya kesehatan (Imelda *et al.* 2006).

Lingkungan sekitar juga berpengaruh terhadap kesehatan seseorang. Lingkungan sehat akan mendukung kehidupan yang sehat pula. Lingkungan buruk atau kumuh akan mendatangkan berbagai hal buruk, salah satunya adalah wabah penyakit. Lingkungan yang kumuh, tidak kondusif dan tidak terawat akan menimbulkan berbagai penyakit. Penyakit tersebut dapat berupa wabah pandemi sehingga akan menimbulkan keresahan bagi warga masyarakatnya. Berbagai contoh lingkungan yang rawan dengan berbagai penyakit adalah pasar, rumah susun, peternakan, dan kawasan industri. Semua tempat tersebut merupakan tempat dimana berkumpul banyak orang dengan kehidupan yang sulit untuk diatur, sehingga kesadaran terhadap lingkungan sangat kurang (Imelda *et al.* 2006).

Salah satu wabah penyakit di dunia sekarang ini adalah wabah flu burung (*Avian Influenza*). Wabah flu burung disebabkan oleh virus *influenza* yang bermutasi menjadi patogen. Wabah flu burung pertama kali dilaporkan pada tahun 1878 sebagai wabah yang menjangkiti berbagai ayam dan burung di negara Italia. Di Indonesia, wabah ini muncul sekitar pertengahan tahun 2003 menyebabkan kematian ayam di wilayah Jawa dan Kalimantan. Sampai tahun 2005 angka kematian mencapai 10 juta ekor. Pada tahun 2005-2009, tercatat kasus flu burung semakin berkurang. Hal tersebut memberi sedikit kelegaan warga masyarakat di Indonesia, khususnya para peternak (Kamps *et al.* 2007).

Setelah masyarakat Indonesia dikejutkan dengan munculnya kasus flu burung yang menyerang manusia pada bulan Juli 2005, sejak saat itu masyarakat

semakin takut untuk keluar rumah, apalagi bersentuhan langsung dengan unggas. Berbagai tindakan dilakukan oleh pemerintah untuk meminimalisir wabah flu burung. Upaya-upaya tersebut diantaranya adalah menyemprot asap (*fogging*) di wilayah yang dimungkinkan sebagai daerah rawan virus yaitu area peternakan, rumah dan pasar. Pemberian vaksin pada ternak juga dilakukan untuk mencegah infeksi virus tersebut. Berbagai penyuluhan kepada warga masyarakat dilakukan untuk mengetahui bagaimana menanggulangi wabah flu burung ini.

Jumlah kasus flu burung selama lima tahun terakhir menunjukkan bahwa Indonesia menempati peringkat tertinggi dengan total 143 kasus dengan 122 kematian (WHO 2010). Sampai saat ini, semua wabah virus *Highly Pathogen Avian Influenza Virus* (HPAIV) disebabkan virus influenza A dari sub tipe H5 dan H7 (WHO 2004).

Unggas air, ordo Anseriformes (itik, entok, angsa) dan Charadriiformes (burung camar dan dara laut) merupakan inang alami dari semua sub tipe virus influenza A, sehingga memiliki kemungkinan besar menjadi reservoir (penampung) virus influenza A. Semua unggas termasuk unggas domestik (ayam, kalkun, puyuh) adalah spesies yang rentan terinfeksi. Virus berada dalam keadaan setimbang dan tidak menunjukkan gejala klinis ketika berada pada inang alaminya. Antara hospes dan virus terjadi toleransi yang seimbang dimana replikasi virus secara efisien dan tidak menimbulkan penyakit. Virus bereplikasi pada saluran pencernaan unggas, sehingga ekskresi virus bersama feses dapat ditransmisikan ke unggas atau mamalia lain melalui *fecal-oral* (Sturn-Ramirez *et al.* 2004).

Salah satu potensi penularan virus avian dari unggas air ke manusia adalah dengan sistem pengembalaan unggas tradisional. Sistem penggembalaan unggas air secara bebas tanpa dikandangkan akan memudahkan pertukaran inang sehingga terjadi mutasi. Hal tersebut akan memperbesar potensi timbulnya infeksi virus *Avian Influenza* khususnya sub tipe H5N1 yang dikenal memiliki patogenesis tinggi (Susanti *et al.*, 2007).

Hasil penelitian menunjukkan seroprevalensi VAI pada unggas air (itik, entok dan angsa) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan seroprevalensi pada

ayam kampung. Hal tersebut semakin nyata terlihat pada sampling pemeriksaan terhadap itik di daerah sangat tercemar (FKH IPB 2006). Penelitian di daerah yang berpotensi besar sebagai sumber penularan VAI di Jawa Barat menunjukkan bahwa angka prevalensi kejadian infeksi VAI sebesar 6,67 % pada angsa, 4,85% pada itik, dan pada entok 5,48% (Susanti *et al.* 2008).

Pemeliharaan itik sistem *backyard* menunjukkan angka prevalensi tinggi (47%) dibandingkan dengan itik yang digembalakan di ladang pertanian (45,9%), dan unggas yang dipelihara pada kandang terbuka (23,5%). Sebanyak 10.000 ekor itik yang dipelihara dalam kandang tertutup dengan tingkat biosekuriti tinggi, tidak ada satupun yang terinfeksi VAI H5N1 (Songserm *et al.* 2006). Populasi penduduk yang tinggi dan sebagian penduduk memelihara unggas tanpa dikandangan (berkeliaran di pekarangan rumah) tersebut akan mempertinggi angka frekuensi kontak antara manusia dan unggas. Kebanyakan penduduk pedesaan melakukan kegiatan sampingan beternak unggas untuk menambah pendapatan keluarga dan sumber makanan (Budiraharjo *et al.* 2009).

Masalah penting yang dikhawatirkan para ahli di dunia adalah dugaan tentang kemungkinan munculnya subtype baru virus influenza yang mampu menular dari manusia ke manusia. Hal tersebut berdasar bahwa virus AI subtype H5N1 dapat menular dari unggas ke manusia sehingga kemungkinan penularan dari manusia ke manusia juga dapat terjadi akibat mutasi dari virus tersebut (Asmara, 2007).

Selain mengakibatkan korban jiwa, wabah flu burung juga berdampak pada sentra ekonomi. Wabah flu burung sangat merugikan peternak, industri perunggasan dan para pedagang (Saptana *et al.* 2005). Pasar-pasar yang terkena kasus VAI berasal dari peternak-peternak tradisional yang berada tidak jauh dari wilayah tersebut, walaupun ada juga yang berasal dari luar daerah (Antara 2009).

Kasus VAI Indonesia khususnya di Jawa Tengah muncul pertama kali di kabupaten Pekalongan dan Purbalingga pada tahun 2003. Kemudian menyebar sampai dengan kabupaten Semarang sendiri pada bulan September di tahun yang sama. Laporan kasus VAI di kabupaten Semarang datang dari peternak burung puyuh di kecamatan Susuhan, Semarang selatan. Menyusul di kecamatan Beji,

Bregas, Getasan dan sekitarnya ikut terjangkiti wabah VAI dengan kematian ternak mencapai puluhan ribu ekor (Saptana *et al.* 2005).

Pemerintah menetapkan Kejadian Luar Biasa (KLB) di Semarang ketika menerima laporan adanya suspek flu burung pada manusia yaitu Dewi Sartika 15 tahun warga Genuk Semarang. Suspek dinyatakan positif AI berdasar hasil uji laboratorium Litbang Departemen Kesehatan. Kronologis dari suspek tersebut adalah bersentuhan dengan unggas secara langsung. Setelah kejadian tersebut Pemerintah Kota Semarang langsung mengambil kebijakan memusnahkan semua unggas pada radius tertentu dari rumah korban (Nonik *et al.* 2008).

Daerah pedesaan dengan topografi perbukitan, menjadikan kebanyakan perekonomian penduduknya berasal dari bertani dan beternak. Alasan lain peternak memelihara unggas adalah untuk menambah penghasilan dikarenakan mudahnya merawat unggas-unggas tersebut. Termasuk di dalamnya adalah kecamatan Gunungpati yang memiliki ciri-ciri yang sama.

Berdasarkan observasi dan survey pendahuluan di peternakan kecamatan Gunungpati terlihat masih banyak terdapat kandang peternakan yang letaknya berdekatan dengan perumahan penduduk hanya berjarak sekitar kurang atau sama dengan 10 meter. Kebanyakan kandang-kandang tersebut terlihat kurang terawat dan tidak terjaga kebersihannya. Meskipun pemerintah telah menegaskan sedini mungkin untuk mencegah penularan flu burung melalui berbagai media, namun kesadaran masyarakat untuk memelihara unggas secara benar (membuat kandang, membersihkan dan mengubur kotoran, memakai pakaian yang aman “topi, sepatu, dan sarung tangan”) masih rendah (Arsyad 2008).

Dari teori dan fakta-fakta di lapangan, peternakan di kecamatan Gunungpati masih menggunakan sistem tradisional sehingga berpotensi terinfeksi VAI. Berdasarkan hal tersebut penulis bermaksud melakukan penelitian yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 di Peternakan Tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang”.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan keterangan di atas, rumusan masalah yang dikaji adalah apakah unggas-unggas di peternakan tradisional kecamatan Gunungpati terinfeksi virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1.

C. Penegasan Istilah

1. Virus AI sub tipe H5N1 : Merupakan virus *avian influenza* tipe A dengan sub tipe hemagglutinin (HA) 5 dan neuraminidase (NA) 1 (Kamps *et al.* 2007).
2. Peternakan tradisional : Peternakan tanpa pemeliharaan secara intensif, atau dengan melepas unggasnya secara bebas, perkandangan yang seadanya dengan jumlah unggas yang terbatas, pakan berasal dari sisa dapur, tidak mengenal penanganan kesehatan sama sekali (Hasnudi *et al.* 2004).

D. Tujuan Penelitian

Mengisolasi dan mengidentifikasi virus *avian influenza* sub tipe H5N1 di peternakan tradisional kecamatan Gunungpati.

E. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai data dasar untuk mengetahui ada atau tidaknya virus *avian invluenza* (flu burung) sub tipe H5N1 di peternakan-peternakan tradisional Kecamatan Gunungpati Semarang sehingga dapat dijadikan sebagai tindakan preventif kasus flu burung di Semarang.

Penelitian ini juga akan dijadikan acuan para peternak tradisional bahwa metode pencampuran jenis unggas atau melepasliarkan unggasnya dapat berpotensi menimbulkan penyakit bagi unggas, bahkan dapat membahayakan pemiliknya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Virus Avian Influenza (VAI)

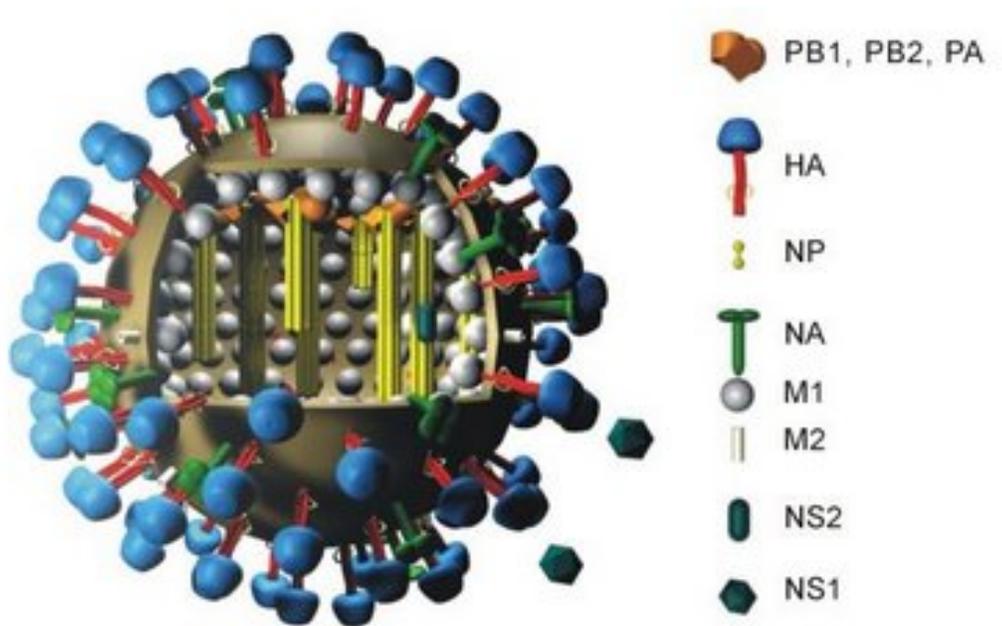
1. Struktur dan Karakteristik VAI

Avian Influenza (AI) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Virus influenza A, termasuk famili Orthomyxoviridae, mempunyai material genetik berupa RNA berpolaritas negatif, dengan diameter 120 nm dan strukturnya berfilamen (Gambar 1). Selain tipe A, virus influenza juga memiliki 2 tipe lain yaitu B dan C. Tipe A menyerang unggas dan manusia, tipe B hanya menyerang manusia dan tipe C menyerang babi dan manusia. Tipe A mudah bermutasi dan sangat patogen, sedang influenza B dan C hanya dapat menimbulkan sakit ringan dan tidak menyebabkan epidemik (Nidom, 2005).

Virus influenza tipe A diklasifikasikan menjadi beberapa subtipe berdasarkan pada dua jenis glikoprotein permukaan yaitu Haemagglutinin (HA) dan Neuramidase (NA). Semua subtipe virus influenza A dapat ditemukan pada unggas air atau unggas yang telah didomestikasi, tetapi hanya beberapa subtipe yang dapat ditemukan di mamalia atau manusia (Dharmayanti 2005).

Virus influenza berdiameter 80-120 nm dan bentuknya bersifat *pleomorphic*. Berbentuk bundar atau bulat panjang berselubung, genom tersusun dari 8 segmen rangkaian tunggal RNA berpolaritas negatif (Gambar 1) (Kamps *et al.* 2007).

Virus AI memiliki sifat antara lain mudah mengalami mutasi atau modifikasi genetik, dapat mengaglutinasi sel darah merah ayam, virus mudah mati diluar tubuh ayam (tidak stabil di lingkungan luar), mudah mati oleh berbagai desinfektan, berpotensi menular pada manusia, dan menyebabkan kematian (TDC 2007).



Gambar 1. Struktur Virus Avian Influenza (Kamps *et al.* 2007).

Virus influenza tipe A secara natural dapat menginfeksi unggas dan manusia. Virus ini dibagi menjadi berbagai sub tipe berdasar analisis serologis dan genetik hemagglutinin (HA) dan neuroamidase (NA) (Lee *et al.* 2001). Sampai saat ini ada 16 sub tipe HA (H1-H16) dan 9 sub tipe NA (N1-N9) (Russel dan Webster 2005). Semua sub tipe HA dan NA ditemukan pada unggas air, dan hanya 3 sub tipe HA (H1-H3) dan 2 sub tipe NA (N1 dan N2) ditemukan pada manusia (Hoffman *et al.* 2001). Dilaporkan bahwa sub tipe H5 dan H7 yang sangat virulen pada unggas dan berpotensi sebagai penyebab pandemik (Russel & Webster 2005).

Sejumlah penanda genetik terlibat pada patogenitas virus avian influenza, memberi efek yang bermacam-macam dengan tempat mutasi yang berbeda pula (Tabel 1).

Tabel 1. Gambaran lokus genomik yang berhubungan dengan peningkatan patogenik HPAIV H5N1 pada mamalia.

Protein Gen	Mutasi	Efek
HA	Tempat pembelahan <i>Polybasic endoproteolytic</i>	Beguna untuk diseminasi sistemik dan replikasi (unggas, mamalia)
NA	Penghilangan 19-25 aa pada bagian batang	Tumbuh beradaptasi di ayam dan kalkun
PB2	627K	Peningkatan replikasi sistemik di tikus
	701N	Peningkatan patogenik di tikus
PB-1	13P,678N	Peningkatan aktifitas polimerase; bermanfaat untuk proses adaptasi
NP	319K	RNA binding; bagian dari kompleks transcriptase; transportasi vRNA antara nukleus/ sitoplasma
NS-1	92E	Memudahkan melepaskan diri dari respon imun alami, menurunkan pembersihan virus pada babi.

Sumber: influenza report (Kamps *et al.* 2007)

2. Gejala dan Patogenesitas VAI

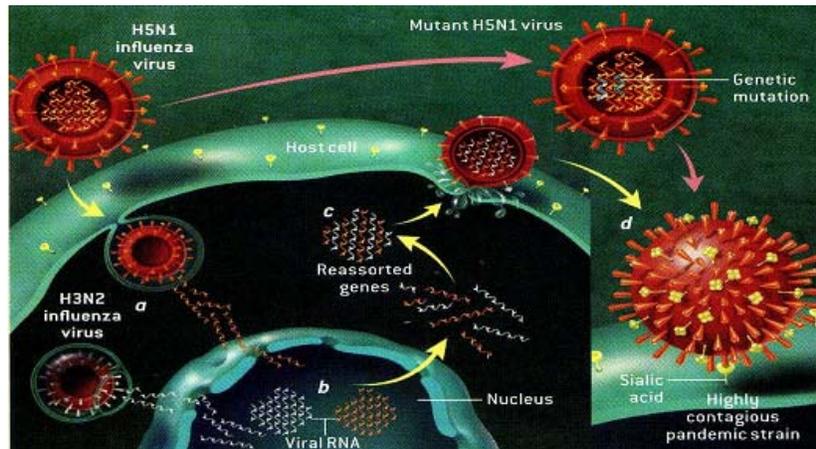
Masa inkubasi virus AI pada unggas berkisar antara beberapa jam sampai dengan tiga hari. Masa inkubasi tergantung dosis virus, rute kontak dan spesies unggas yang terserang. Gejala klinis AI ditemukan dalam dua bentuk, yaitu bentuk akut dan bentuk ringan. Bentuk akut ditandai dengan proses penyakit yang cepat disertai mortalitas yang tinggi, gangguan pernafasan, diare dan pendarahan jaringan subkutan. Pada bentuk akut ini dapat menyebabkan kematian mendadak tanpa adanya gejala tertentu (Asmara, 2007).

Menurut Kamps *et al.* (2007), virus avian influenza berdasar daya patogenesitasnya digolongkan menjadi dua.

- a. Pertama adalah *Low Pathogenic Avian Influenza Virus* (LPAIV), (Virus influenza unggas berpatogenisitas rendah) dengan ciri lesi bervariasi tergantung dari jenis virus, spesies, dan usia hospes. LPAIV biasanya hanya menyebabkan gejala ringan misalnya ditandai dengan bulu kasar atau produksi telur menurun bahkan kadang tidak terdeteksi sama sekali. Contohnya pada berbagai unggas seperti kalkun terjadi trakheitis dan sinusitis meskipun bakteri sekunder juga dapat berperan. Pada ayam, sebagian besar terlihat menimbulkan gejala ringan pada saluran pernapasan dan organ reproduktif pada unggas petelur (Kamps *et al.* 2007).
- b. Kedua, yang sangat patogen, *High Pathogenic Avian Influenza Virus* (HPAIV), bercirikan terjadi patologi yang sangat menyolok. HPAIV ditandai dengan proses penyakit yang cepat disertai mortalitas tinggi, gangguan pernafasan, lakrimasi yang berlebihan, edema di daerah muka dan kepala, pendarahan jaringan subkutan dan kebiruan pada daerah muka, jengger, pial, dada, tungkai dan telapak kaki (Asmara 2007). Angka kesakitan maupun kematian dapat mencapai 90% - 100% (Akoso 2006).

3. Protein Haemagglutinin (HA) dan Neuramidase (NA)

Haemagglutinin adalah suatu glikoprotein mengandung *glycosylation* dengan berat molekul kira-kira mendekati 76.000. HA meregangkan membran lemak menjadi lebih besar, yang mengandung sekurang-kurangnya lima domain antigenik, yang disajikan pada permukaan terluar virus. Mutasi yang menonjol di tempat antigenik menurunkan atau menghambat ikatan antibodi-antibodi penawar (*neutralising antibody*), dengan demikian memudahkan virus menyebar ke populasi yang tidak punya kekebalan yang disebut *antigen drift* (perpindahan antigen). Selain itu juga dapat terjadi *antigenic shift* (pergantian antigen) atau *genome reassortment* (perubahan gen) yang muncul ketika HA ditukar dalam virus (Gambar 2). Hal ini dapat terjadi ketika sel terinfeksi oleh 2 virus influenza berbeda dan terjadi pertukaran segmen genom ketika replikasi (Kamps *et al.* 2007).



Gambar 2. Pertukaran gen HA dari dua virus berbeda (*genome reassortment*) (Whittaker 2001).

Fenomena *genome reassortment* ini sering terjadi pada burung-burung air, terutama bebek. Burung-burung air jarang menunjukkan gejala setelah infeksi dikarenakan burung air berperan sebagai *hospes reservoir* atau *carrier* (pembawa) (Kamps *et al.* 2007).

Neuramidase, adalah suatu glikoprotein yang menonjol pada permukaan virus. NA membentuk struktur tetramerik dengan berat molekul rata-rata 220.000. NA berfungsi seperti enzim, yaitu memecah asam sialik dari glikoprotein dan glikolipid di permukaan sel, dan diperlukan virus dalam menembus lapisan musin epitel pernapasan (Kamps *et al.* 2007). Fungsi NA lain adalah melepaskan partikel virus yang sudah selesai replikasi di dalam sel, mencegah virion yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor (Asmara 2007).

Beberapa sekuen gen untuk mengkode gen HA dan NA telah ditemukan oleh peneliti AI di dunia. Pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) telah dipaparkan nukleotida-nukleotida genom berbagai subtype virus AI yang salah satunya adalah H5N1. Berikut adalah salah satu genom dari VAI asal Indonesia yang telah diketahui sekuen nukleotida yang didalamnya terdapat

urutan gen yang mengkode protein HA (Gambar 3) dan NA (Gambar 4) untuk sub tipe H5N1 (NCBI 2010).

```

1 atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
61 attggttacc atgcaaacaa ttcaacagag cagggtgaca caatcatgga aaagaacggt
121 actggttacac atgcccaga cactactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcatcta
181 gatggagtga agcctcta atttaaaagat ttagttag ctggatggct cctcgggaac
241 ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggctt acatagtgga gaaggccaat
301 ccaaccaatg acctctgta cccagggagt ttcaacgact atgaagaact gaaacacct
361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt caaatcatcc ccaaaagtcc ttggtccgat
421 catgaagcct catcaggagt gagctcagca tgtccatacc tgggaagtcc ctcccttttt
481 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaaaagctac
541 aataatacca accaagaaga tcttttggt ctgtggggaa ttcaccacc taatgatgag
601 gcagagcaga caaggctata tcaaaaccca accacctata tttccattgg gacatcaaca
661 ctaaacccaga gattgggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaaagtga
721 aggatggagt tcttctggac aattttaaaa cctaagtatg cagtcaact cgagagtaat
781 ggaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaatgtgca agaaagggga ctcagcaat
841 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgt aacaccaagt gtcaaaactc aatgggggag
901 ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa
961 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca acagggctca gaaatagccc tcaaaagagag
1021 agcagaagaa aaaagagagg actatttggg gctatagcag gttttataga gggagatgag
1081 cagggtatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactca
1201 atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaaattaa tagcttagaa
1261 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt ttctagatgt ttggacttat
1321 aatgccgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat
1381 gttaagaacc tctacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatagcaa ggagctgggt
1441 aacggttgtt tcgagttcta tcacaatgt gataatgaat gatggaag tataagaaac
1501 gaaacgtaca actatccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaaagaga ggaataaagt
1561 ggggtaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc aacagtggag
1621 agttccctag cactggcaat catgatagct ggtctatctt tatggatgag ctccaatgga
1681 tcggttacagt gcagaatttg catttaa

```

Gambar 3. Urutan kode sekuen nukleotida untuk gen hemagglutinin (HA) isolat A/Indonesia/TLL003/2006(H5N1); (NCBI 2010).

```

1 agttcaaaat gaatccaat cagaagataa taaccattgg atcaatctgt atggtaattg
61 gaatagtttag cttaatgtta caaattggga acatgatctc aatattgggtc agtcattcaa
121 ttcagacagg gaatcaacac caagctgaat caattagcaa tactaacctt ctactgaga
181 aagctgctgc ttcaataaca ttagcgggca attcatctct ttgccccatt agaggatggg
241 ctgtacacag taaggacaac agtataagaa tcgggtccaa gggggatgag tttgttatta
301 gagagccgtt catctcatgc tcccacttgg aatgcagaac tttctttttg actcagggag
361 ccttgctgaa tgacaagcac tccaacggga ctgtcaaaga cagaagccct cacagaacat
421 tgatgagttg tcctgtgggt gaggtccct cccatataa ctcaaggttt gagtctgttg
481 cttggtcagc aagtgcctgc catgatggca ccagtgggt gacaattgga atttctggc
541 cagacaatgg ggctgtggct gtattgaaat acaatggcat aataacagac actatcaaga
601 gttggaggaa caacatactg agaactcaag agtctgaatg tgcatgtgta aatggctctt
661 gctttactgt aatgactgat ggaccaagta atgggcaggc atcatataag atcttcaaaa
721 tggaaaaagg gaaagtgggt aaatcagtcg aattggatgc tcctaattat cactatgagg
781 agtgctcctg ttatcctgat gccggcgaaa tcacatgtgt gtgcagggat aattggcatg
841 gctcaaatag gccatgggta tctttcaatc aaaaattgga gtatcaataa ggatataat
901 gcagtggagt tttcgggagc aatccacgcc ccaatgatg aacaggtagt tgggtccga
961 gtccccctaa cggggcatat ggggtaaaag ggttttcatt taaatacggc aatgggtttt
1021 ggatcgggag aacccaaaagc actaattcca ggagcggctt tgaatgatt tgggatccaa
1081 atgggtggac tggaacggac agtagctttt cgggtgaaaca agatatagta gcaataactg
1141 atgggtcagg atatagcggg agttttgtcc agcatccaga actgacagga ttgattgca
1201 taagaccttg tttctgggtt gagttaatca gagggcgccc caaagagagc acaatttga
1261 ctagtgggag cagcatatct tttgtgggtg taaatagtga cactgtgagt tgggtctggc
1321 cagacgggtg tgagttgcca ttcaccattg acaagtagtt tgttcaaaaa act

```

Gambar 4. Urutan kode sekuen nukleotida untuk gen neuramidase (NA) isolat A/chicken/Indonesia/11/2003(H5N1); (NCBI 2010).

Dalam mendeteksi VAI subtiping khusus seperti H5N1 dibutuhkan juga primer spesifik untuk mendeteksi sekuen nukleotida target agar teramplifikasi (Tabel 2). Para peneliti mendesain primer umumnya setelah sekuen genom VAI diketahui secara keseluruhan dari isolat yang berasal dari temuan di lapangan (WHO 2005).

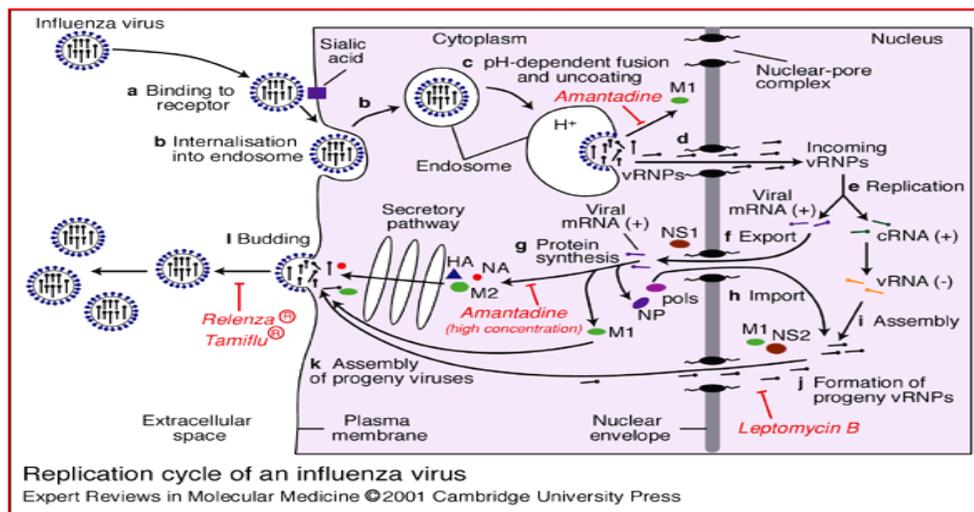
Tabel 2. Beberapa Contoh Primer Untuk Mendeteksi VAI H5N1

Gen Target	Sekuen primer	Panjang basa	Sumber
H5	CU-H5F: 5'GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA'3 CU-H5R: 5'CCACTTATTTCTCTCTGTTTAG'3	189	Payungporn <i>et al.</i> 2004
H5	H5-155f ACACATGCYCARGACATACT H5-699r CTYTGRTTYAGTGTTGATGT	500-600	Dharmayanti <i>et al.</i> 2001
H5	H5-1 : 5'GCCATTCCACAACATACACCC'3 H5-3 : 5'CTCCCCTGCTCATTGCTATG'3	219	WHO 2005
N1	CU-N1F: 5'GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC'3 CU- N1R:5'TGATAGTGTCTGTTATTATG CC'3	131	Payungporn <i>et al.</i> 2004
N1	N1-1:TTGCTTGGTCGGCAAGTGC N1-2:CCAGTCCACCCATTGGATCC	616	Wright <i>et al.</i> 1995

4. Siklus Hidup VAI

Siklus hidup VAI dengan cara melakukan replikasi. Berdasar gambar 5 dijelaskan bagaimana VAI mulai menginfeksi sel inangnya hingga terbantu kembali virus yang baru. Bentuk utuh virus influenza atau virion akan menempel di permukaan sel inang dengan bantuan haemaglutinin dan neuraminidase. Haemaglutinin membantu proses penempelan dan neuramidase membantu penetrasi virus ke dalam sitoplasma sel inang. Virion menempel pada sel inang melalui interaksi antara hemaglutinin dengan reseptor asam sialik di permukaan sel inang tersebut. (a) Virus menempel pada reseptor permukaan dari sel host dan (b) masuk endosom melalui endositosis. (c) Terjadi peleburan dan penguraian, dengan pH yang sesuai, menghasilkan (d) melepas genom virus (dalam

ribonukleoproteins; vRNPs) dalam sitoplasma. Lalu vRNPs masuk ke dalam nukleus untuk (e) replikasi. (f) *Positive-sense viral messenger RNAs* (mRNAs) dikeluarkan dari nucleus menuju sitoplasma untuk (g) sintesis protein. (h) beberapa protein juga telah masuk dalam nucleus untuk melengkapi replikasi viral RNA dan (i) membentuk vRNP, yang juga berlangsung di nukleus. (j) akhir dari infeksi, vRNPs terbentuk dan keluar dari nukleus, dan (k) bakal virus terbentuk dan (l) membentuk tunas dari membran plasma (Whittaker 2001).



Gambar 5. Siklus replikasi virus influenza (Whittaker 2001)

B. Penyebaran VAI

1. Epidemiologi VAI

Unggas air merupakan hospes alami dari virus AI. Hewan tersebut merupakan hewan produktif karena dapat menghasilkan uang apabila dipelihara atau ditenakkan (Arsyad 2008). Selain unggas air, ayam merupakan hewan yang juga banyak ditenakkan. Spesies unggas ini yang paling rentan terhadap patologi virus AI, hingga menyebabkan banyak kematian. Virus H5N1 sangat patogen pada ayam dan manusia. Sementara kasus klinis dan kematian pada unggas air (itik, entok dan angsa) tidak tampak secara signifikan. Salah satu reservoir yang patut diperhitungkan adalah peran unggas air sebagai sumber penularan virus AI (Hulse-Post *et al.* 2005). Tingginya populasi unggas air diikuti tingginya tingkat

kematian unggas dan manusia akibat H5N1 memperkuat dugaan bahwa unggas air berperan sebagai reservoir virus H5N1. Sistem penggembalaan unggas air secara bebas juga turut memperbesar potensi unggas air sebagai sumber penularan virus avian influenza khususnya strain H5N1 (Susanti *et al.* 2007).

VAI dapat menyebar dengan cepat diantara populasi unggas dalam satu peternakan dan menimbulkan kematian yang sangat cepat dan tinggi, bahkan menyebar antar peternakan dari suatu daerah ke daerah lain. Penyakit ini juga dapat menyerang manusia melalui udara yang tercemar oleh virus tersebut, yang berasal dari sekret atau tinja unggas yang menderita flu burung tersebut (Akoso 2006).

Transmisi virus dari unggas air ke unggas darat dapat terjadi dua arah. Contohnya VAI H9N2 yang awalnya berasal dari unggas air ditransmisikan ke unggas darat dan mengalami rearsorsi. Virus dari unggas darat ini ditransmisikan kembali ke unggas air dan mengalami rearsorsi kembali membentuk varian baru yang berpotensi untuk menginfeksi manusia secara langsung (Li *et al.* 2003).

Sejak tahun 1959 sampai akhir tahun 2003, dilaporkan hanya terjadi 24 wabah virus influenza pada ternak unggas di seluruh dunia. Kebanyakan wabah tersebut terbatas secara geografis pada daerah tertentu, dan tidak satupun dari wabah-wabah tersebut angkanya mendekati wabah H5N1 di Asia tahun 2004. Faktor utama penyebaran virus HPAI adalah perdagangan unggas hidup dan produknya serta melalui mobilitas manusia (wisatawan dan pengunjung) (WHO 2004).

Pertengahan Desember 2003 sampai awal Februari 2004, wabah yang disebabkan oleh virus HPAI H5N1 garis Asia dilaporkan telah menyerang unggas di Korea Selatan, Vietnam, Jepang, Thailand, Kamboja, Laos, Indonesia dan Cina (Maines *et al.* 2005; OIE 2005). Kejadian wabah yang serentak di banyak negara oleh virus HPAI H5N1 belum pernah terjadi sebelumnya. Pada bulan April 2005, untuk pertama kalinya, VAI H5N1 dapat mematikan unggas liar dalam skala besar (Zhou *et al.* 2006). Tahun 2004 sampai akhir 2009, wabah VAI H5N1 berjumlah 468 kasus dengan angka kematian 282 orang. Kasus di Indonesia

menempati urutan tertinggi di dunia yaitu 162 kasus dengan kematian berjumlah 134 orang (WHO 2010).

2. Telaah VAI di Indonesia

Salah satu alasan utama mengapa Indonesia lebih rawan terjangkit flu burung dibanding negara lain di dunia adalah gaya hidup. Banyak keluarga dan peternak unggas tinggal begitu dekat dengan unggas mereka. Unggas-unggas tersebut dapat bebas berkeliaran di halaman, kebun, di bawah rumah dan di jalanan (Imelda *et al.* 2006).

Departemen Kesehatan RI dan Departemen Pertanian RI telah melakukan tindakan perlindungan kepada manusia agar tidak tertular penyakit flu burung. Kondisi di Indonesia sampai saat ini sudah mencapai tingkat waspada virus flu burung. Bertambahnya penderita flu burung yang dirawat di RSPI Prof. Dr Sulianti Saroso menjadikan flu burung dinyatakan sebagai kejadian luar biasa (KLB) nasional. Negara-negara maju sudah memiliki sistem regulasi yang kuat untuk melindungi warga negaranya agar tidak tertular penyakit bersumber binatang (*zoonosis*), termasuk flu burung (Suryadi & Kusnanto, 2007).

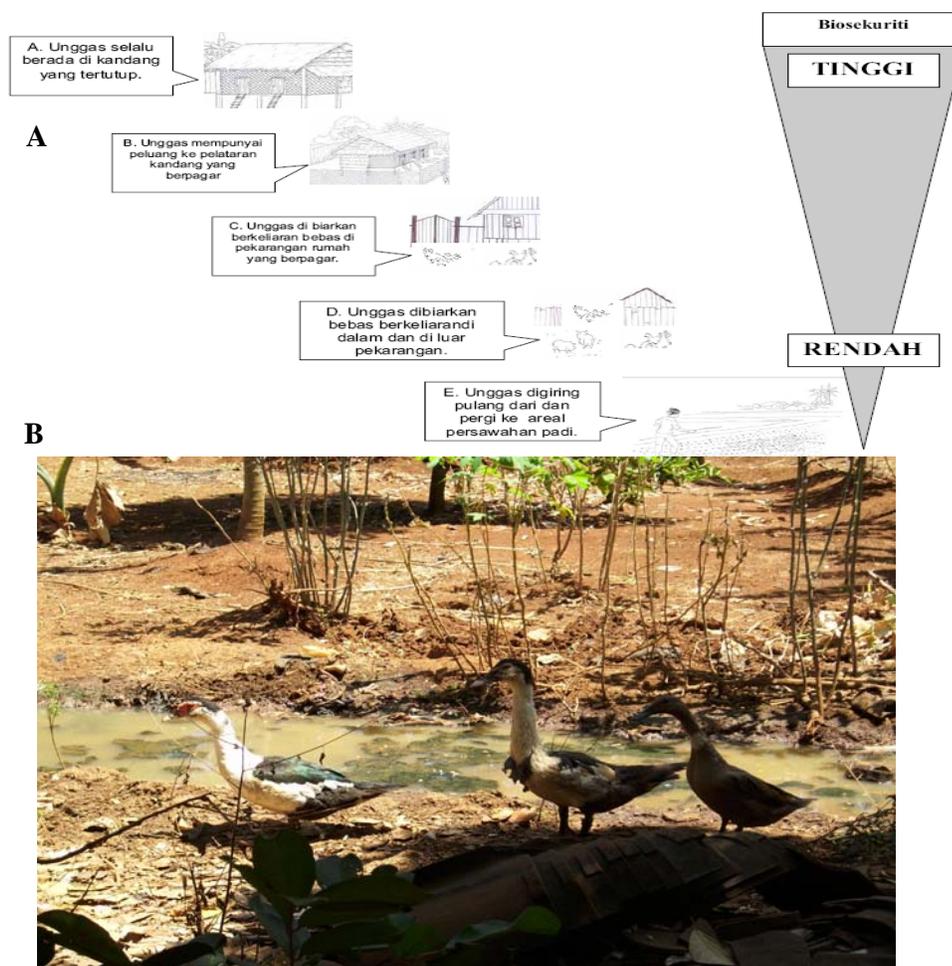
KLB di Semarang terjadi pada tanggal 12 November 2008 dengan dikeluarkannya hasil pemeriksaan uji laboratorium Litbang Departemen Kesehatan (Depkes) RI atas tiga sampel darah yang diambil dari hidung dan tenggorokan Dewi Sartika, wanita berusia 15 tahun saat menjadi pasien suspect flu burung yang akhirnya meninggal dunia. Dewi Sartika dinyatakan positif terjangkiti virus H5N1 atau virus avian influenza (AI). Dia meninggal dunia setelah mendapat perawatan intensif selama empat hari di ruang ICU khusus untuk pasien flu burung atau ruang isolasi Rumah Sakit (RS) Dokter Kariadi Semarang (Nonik *et al.* 2008).

Menurut Tim Medis AI RS Dokter Kariadi, korban menunjukkan gejala flu burung dengan ditandai demam mencapai 39 derajat celsius dan gangguan pernafasan progresif. Selain itu, ternyata juga memiliki riwayat kontak dengan unggas. Sebagai tindak lanjut, kemarin dilakukan pemusnahan unggas di sekitar

rumah korban. Wilayah yang berada dalam radius tertentu dari tempat tinggal korban terus dipantau secara serius oleh instansi terkait Pemerintah Kota Semarang dan menutup tempat pemotongan ayam yang ada di dekat tempat tinggal korban (Nonik *et al.* 2008).

Kronologis wabah AI di Kabupaten Semarang dan di Kabupaten Klaten : (a) Kasus di Kabupaten Semarang laporan pertama datang dari peternak burung puyuh di Desa Timpik, Kecamatan Susuhan, Semarang bagian Selatan pada bulan September 2003, bahwa dari 7500 ekor burung puyuh usahaternaknya secara mendadak 4000 – 5000 ekor mati secara mendadak, sedangkan di Kabupaten Klaten meskipun yang terkena awal adalah peternak burung puyuh, namun inisiasi melaporkan dari peternak ayam ras petelur di Desa Krakitan, Kecamatan Bayat; (b) Kemudian untuk Kabupaten Semarang diantisipasi penanganan di laboratorium tipe C di Kab. Ungaran, hasil diagnosa mendekati ND, sedangkan peternak di Klaten langsung membawa sampel ternak ke laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan di UGM, hasil diagnosa menyimpulkan penyakit AI, namun pemda belum berani mengumumkan; (c) Kemudian di wilayah Semarang menyusul kejadian yang hampir sama di Desa Beji, terdapat 8000 ekor dan kurang lebih 5000 ekor mati mendadak, dilakukan diagnosa, hasil mendekati ND; (d) Terdapat laporan lagi, bahwa usaha ternak ayam broiler di Desa Bregas Lor, dan Desa Pagersari, Kecamatan Bregas, Kabupaten Semarang terdapat usahaternak secara kelompok dengan populasi 15.000 ekor dan 6000 ekor mati secara mendadak, hasil diagnosa tetap dekat ke PVND; (e) Pada bulan Oktober akhir 2003 pada usahaternak ayam petelur skala besar, Desa Wates, Kecamatan Getasan dari populasi 40.000 ekor, pada awalnya ada 4000 ekor yang mati mendadak; (f) Pada bulan November, kejadian yang hampir sama menimpa Bp. Harun Efendi dari populasi ayam petelur 40.400 terdapat 2.3700 ekor yang mati secara mendadak; (g) Selanjutnya Dinas Peternakan dan Perikanan Kab. Semarang mendatangkan sendiri Tim Khusus dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Wates, Yogyakarta dengan membawa 7 ekor ayam hidup, 3 minggu kemudian diperoleh hasil penyebab kematian adalah AI; (h) Dari hasil tersebut ditetapkan Kab. Semarang sudah terinfeksi AI dan dinyatakan sebagai daerah endemik AI (Saptana *et al.* 2005).

Biosekuriti merupakan cara untuk menghindari kontak antara hewan dan mikroorganisme, salah satunya dari infeksi VAI. Prinsip-prinsip biosekuriti dapat diterapkan pada unit produksi ternak skala besar dan pemeliharaan pekarangan atau unit produksi ternak skala kecil. Salah satu cara adalah pada model perkandangannya (Gambar 6). Biosekuriti paling tinggi adalah dengan tipe perkandangan yang tertutup tanpa melepas unggasnya keluar, sedangkan tingkat terendah adalah dengan menggembalakan unggas ke areal persawahan (FAO 2005).



Angga 2009

Gambar 6. Tingkatan biosekuriti menurut teknik beternak (FAO 2005) (A); Masyarakat melepas unggasnya secara bebas (B).

Untuk melindungi diri dari flu burung secara efektif, bersama tetangga, pengusaha unggas dan seluruh desa harus bekerja sama untuk menjaga agar unggas-unggas dan virus ini tidak menyebar. Setiap kasus unggas yang mati harus segera dilaporkan kepada aparat agar dapat segera mengidentifikasi flu burung dan membantu masyarakat untuk melindungi diri dan unggasnya (Imelda *et al.*2006).

Kecamatan Gunungpati merupakan suatu wilayah yang sebagian besar terdiri atas pedesaan. Topografi berbukit-bukit, disertai curah hujan yang cukup tinggi sehingga kelembaban udara juga cukup tinggi. Sebagian besar masyarakat masih kolot, dan belum mementingkan kebersihan lingkungan. Kebanyakan tipe peternakan unggas adalah tipe peternakan tradisional yang secara bebas melepasliarkan unggasnya ke sekitar rumah. Berdasarkan tingkat biosekuritinya (Gambar 6) tipe peternakan tersebut masih rendah.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi. Tahap-tahap penelitian sesuai dengan protokol yang telah ada dan telah diketahui keberhasilannya. Data-data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di dua tempat yaitu:

1. Pengumpulan Sampel : Kelurahan di kecamatan Gunungpati.
2. Analisis Laboratorium : Laboratorium Kesehatan Masyarakat dan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Waktu penelitian dilaksanakan selama 6 bulan.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah unggas yang terdapat pada peternak tradisional di desa/kelurahan kecamatan Gunungpati.

2. Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan sistem *purposive sampling*. Lima puluh sampel diambil secara acak dari unggas sehat, belum divaksin dari peternak di kelurahan Kalisegoro, Ngijo, Pakintelan, Patemon, Sekaran, kecamatan Gunungpati. Enam belas kelurahan di kecamatan Gunungpati dengan jumlah Kepala Keluarga (KK) sekitar 6 ribu peternak dan 40 ribu ekor unggas (BPS 2009). Lima kelurahan tersebut dipilih karena kondisi lingkungan yang masih pedesaan dengan jarak antar rumah yang sangat dekat, disertai banyaknya penduduk yang merupakan pendatang (mahasiswa) yang kurang adaptif dengan lingkungan kecamatan Gunungpati, sehingga akan rentan membawa ataupun terserang penyakit. Sampel yang jumlahnya terbatas dikarenakan terkendala dana.

D. Alat dan Bahan Penelitian

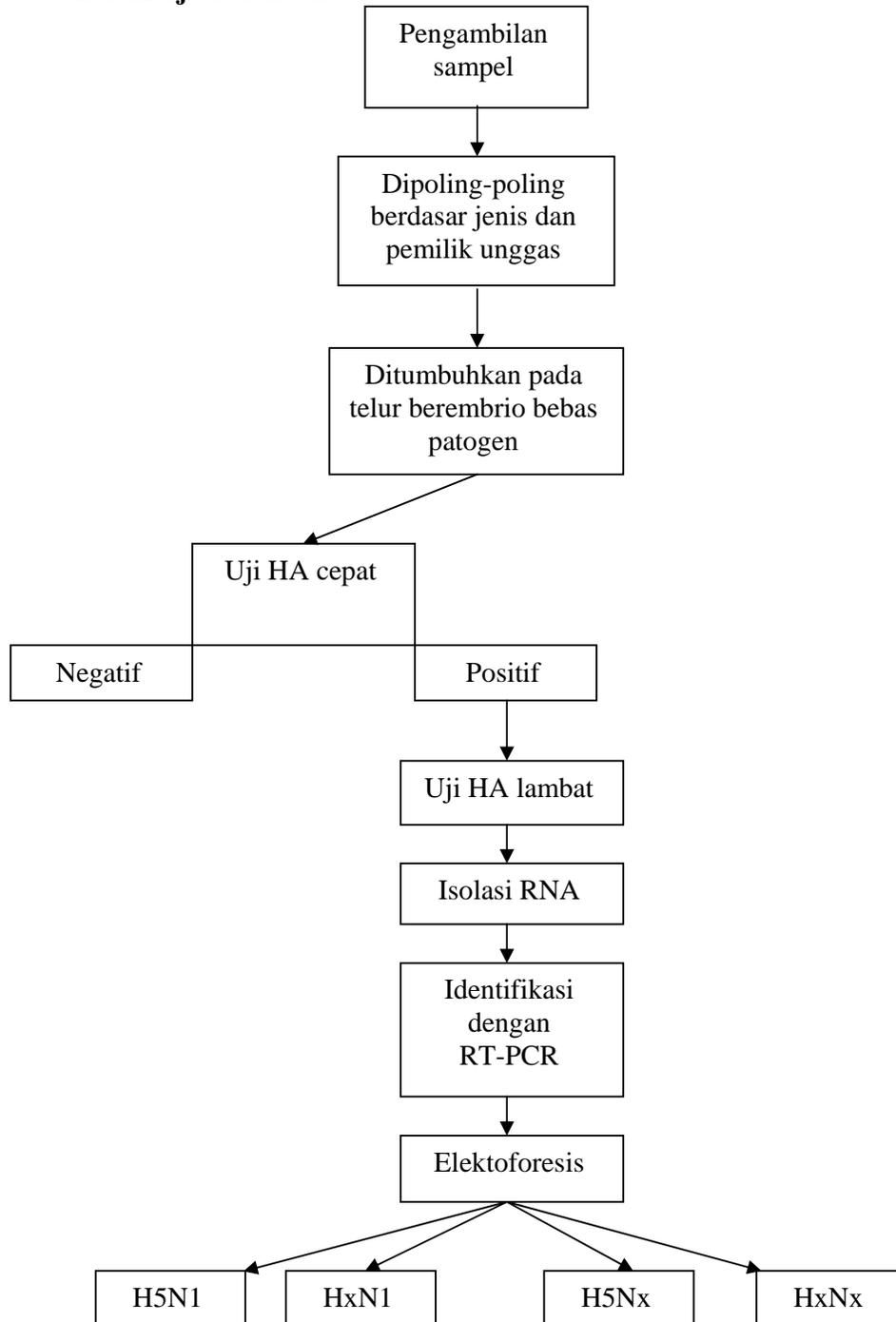
Didalam melakukan penelitian ini, dibutuhkan alat beserta bahan-bahan yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian:

Uraian	Alat	Bahan
1. Pengambilan sampel swab kloaka	<i>Cotton swab</i> , sarung tangan, masker, <i>cool box</i> , <i>ice pack</i> , gunting, alat tulis, label	Media <i>Phospat Buffer Saline</i> (PBS) gliserol (Lampiran 4)
2. Propagasi virus pada telur ayam berembrio SPF	<i>Egg puncher</i> , <i>sput</i> 1 ml, mikropipet (Finnipipet), tip, alat <i>candling</i> , pinset, sarung tangan, masker, LAF cabinet, <i>Incubator</i> , kapas steril	Telur TAB steril, Penstrep
3. Uji HA	<i>Mikroplate V bottom</i> (Nunc), tube endorf, rak tube, mikropipet (Finnipipet), tip, objek glass, pinset, kertas tisu, LAF, sarung tangan, masker	Sel Darah Merah Ayam (SDM) 5%, 0,5% (Lampiran 4)
4. Isolasi RNA	Sentrifus, tube endorf, rak tube, vorteks, mikropipet (Finnipipet), tip, LAF cabinet, sarung tangan, masker	<i>Trizol LS Reagent</i> (Invitrogen), kloroform, isopropanol, etanol 70% dalam DPEC, <i>ultrapure H₂O</i> (Invitrogen)
5. Amplifikasi DNA	Alat PCR (Gene Amp [®] PCR System), tube endorf 1,5 ml & 0,2 ml, mikropipet (Finnipipet), tip, rak tube, sarung tangan, masker	Kit Superscrip III RT/Platinum Taq Mix), primer H5-1 (Invitrogen), primer H5-3 (Invitrogen), primer N1-F (Invitrogen), primer N1-R (Invitrogen), RNase <i>free DW</i> (Invitrogen)
6. Elektroforesis Gel Agarose 2%	Alat Elektroforesis (Mupid X, Japan), timbangan analisis, <i>microwave</i> , <i>parafilm</i> , mikropipet (Finnipipet)	Agarose bubuk (Invitrogen), TBE 1x, EtBr (<i>Ethidium Bromida</i>), <i>loading dye</i> (Sigma), <i>marker 1kb DNA ladder</i> (Invitrogen)

E. Prosedur Penelitian

Alur Kerja Penelitian:



Gambar 7. Alur kerja penelitian isolasi dan identifikasi H5N1

1. Pengumpulan Sampel

Lokasi Pengambilan Sampel adalah wilayah Kecamatan Gunungpati, yaitu di desa Kalisegoro, Ngijo, Pakintelan, Patemon, dan Sekaran.

Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan mengusap *cottonswab* pada bagian dalam kloaka unggas sedalam ± 2 cm. Hasil olesan *cottonswab* dimasukkan ke dalam tabung tube ependorf yang berisi media transport PBS gliserol (WHO 2002). Sampel diberi label, kemudian dimasukkan ke dalam kotak es dalam perjalanan, lalu disimpan dalam freezer ketika sampai tujuan. Sampel tersebut akan diidentifikasi jenis virusnya.

2. Propagasi Virus pada telur ayam berembrio SPF (*Specific Pathogen Free*)

Sampel usap kloaka ditumbuhkan pada telur ayam yang berembrio SPF umur 9 hari. Setiap 1-4 sampel usap kloaka dipolling berdasar jenis unggas dan pemilik. Inokulum dibuat dengan mencampur sampel usap kloaka dengan media PBS 10 μ l dengan kandungan 2×10^6 U/L penisilin dan 200 mg/L streptomisin. Inokulum diinokulasikan pada ruang alantois TAB SPF setelah 3 menit inkubasi. Setelah inokulasi, telur diinkubasi suhu 37°C , dan diamati setiap hari selama 4 hari, hingga di hari ke-4 dipanen semua alantoisnya. Telur yang embrionya rusak atau mati sebelum 4 hari dan embrio yang hidup sampai 4 hari diuji cairan alantoisnya menggunakan sel darah merah (SDM) dengan uji hemaglutinasi (HA) (WHO, 2002).

3. Uji Hemaglutinasi (HA)

Uji HA ada 2 jenis, yaitu uji HA cepat dan lambat. Uji HA cepat dilakukan dengan mencampur masing-masing 100 μ l alantois telur dengan 200 μ l media 5% sel darah merah ayam. Hasil positif ditunjukkan adanya penggumpalan darah. Sampel positif selanjutnya diuji dengan uji HA lambat untuk mengetahui titer HA virus.

Uji HA lambat dilakukan dengan menggunakan alat *microplate U bottom* (Nunc) sesuai dengan standar yang berlaku. *Mikroplate* diisi dengan 25 μ l

PBS pH 7,2 pada sumur ke- 1-12. Cairan alantois diambil dari telur sebanyak 25 μ l, dimasukkan ke dalam sumur sesuai nomor sampel uji. Cairan alantois diencerkan bertingkat kelipatan dua dengan PBS, kemudian ditambahkan 25 μ l suspensi SDM ayam 0,5% ke dalam seluruh sumur. Tahap terakhir dilakukan pengocokan *microplate* dengan menggoyang-goyangkannya, lalu diinkubasi pada suhu ruang sekitar 30 menit. Pembacaan sampel uji dapat dilakukan jika SDM sumur kontrol telah teraglutinasi di dasar sumur. Sampel dinyatakan positif apabila SDM pada sumur sampel mengalami aglutinasi. Titer HA dihitung berdasarkan pengenceran tertinggi alantois yang dapat mengaglutinasi SDM (Gambar 8; WHO, 2002)

No.	Hasil Uji	Gambar
1.	Titer 2 ¹	
2.	Titer 2 ² dst.	
Keterangan: S: Sampel; K: Kontrol		

Gambar 8. Hasil Uji Titer HA Dalam Mikroplate

4. Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan *Trizol*[®] *LS Reagent* (Invitrogen) sesuai petunjuk. Sebanyak 250 μ l cairan alantois dan 750 μ l *Trizol* dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml, dicampur hingga homogen. Setelah inkubasi 5 menit pada suhu kamar/ ruang, ditambahkan 200 μ l kloroform, dikocok dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Lalu disentrifus dengan kecepatan 12000 g selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil dan dimasukkan ke tabung 1,5 ml yang baru. Ditambahkan isopropanol 500 μ l lalu dihomogenisasi. Setelah diinkubasi 10 menit suhu

kamar, larutan disentrifus 12000 g, 4 °C selama 15 menit. Kali ini supernatan yang dibuang menyisakan pelet. Endapan pelet dicuci dengan 1000 µl etanol 70% (dalam H₂O *diethylpirocarbonat* (DEPC)). Larutan divorteks selama beberapa menit, kemudian disentrifus 12000 g, 4 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang, pelet RNA dikeringkan pada suhu ruang selama 15 – 20 menit. Setelah kering, disuspensi kembali dengan 30 µl H₂O bebas nuklease (*ultrapure* H₂O). Larutan RNA disimpan pada suhu -20 °C sebagai stok RNA hingga dilakukan langkah berikutnya.

5. Identifikasi Subtipe Virus Avian Influenza (AI)

Identifikasi subtipe virus AI dilakukan dengan menggunakan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *Reverse transcription* adalah pembuatan *copy DNA* (cDNA) yang sifatnya komplementer dengan RNA virus, dengan enzim *reverse transcriptase*. PCR adalah metode alternatif untuk mengidentifikasi virus AI, walaupun genom virus hanya berjumlah sedikit (WHO 2002; Payungporn *et al.* 2004; OIE 2005). RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *SuperscriptTM III One-Step RT-PCR sistem* untuk isolat yang positif uji haemaglutinasi. Reaksi PCR dibuat sebanyak 20 µl dengan komposisi 10 µl 2x *reaction mix*, 1 µl *primer forward* (10 µM), 1 µl *primer reverse* (10 µM), 0,5 µl *Superscript III RT/Platinum Taq Mix*, 2 µl sampel RNA dan *ultrapure* H₂O 5,5 µl (sampai volume 20 µl). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen H5 dan N1 seperti yang tertera pada Tabel 4. Program RT-PCR adalah *reverse transcription* 45 °C selama 60 menit, *predenaturasi* 95 °C selama 5 menit, siklus terdiri dari *denaturasi* 95 °C 30 detik, *annealing* 55 °C 30 detik, *ekstensi* 72 °C 40 detik sebanyak 35 siklus, *post ekstensi* 72 °C selama 10 menit (Payungporn *et al.* 2004; WHO 2005). Untuk identifikasi subtipe virus, setiap isolat diamplifikasi dengan primer H5 dan N1 (Tabel 4). Adanya pita DNA spesifik hasil PCR diidentifikasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2%.

Tabel 4. Sekuen basa primer untuk mengamplifikasi gen H5 dan N1 serta besaran produk yang diharapkan.

Primer	Sekuen Basa	Fragmen Gen	Produk (bp)
1 ^a	H5-1 : 5'GCCATTCCACAACATACACCC'3 H5-3 : 5'CTCCCCTGCTCATTGCTATG'3	H5 (basa 915-1133)	219
2 ^b	CU-N1F : 5'GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC'3 CU-N1R : 5'TGATAGTGTCTGTTATTATGCC'3	N1 (basa 479-609)	131

^aWHO (2005), ^bPayungporn *et al.* (2004)

Kemungkinan hasil akan menunjukkan perbedaan pada masing-masing sampel. Ada empat subtype yang kemungkinan ada pada hasil RT-PCR. Primer diatas hanya spesifik untuk menentukan subtype H5N1 sehingga ada berbagai kemungkinan subtype VAI tersebut yaitu :

- H5N1: apabila pada gel Agarose positif terdapat pita H5 dan N1
- HxN1: apabila pada gel Agarose negatif H5, tetapi positif N1
- H5Nx: apabila pada gel Agarose positif H5, negatif N1
- HxNx: apabila pada gel Agarose negatif H5 dan N1.

6. Elektroforesis hasil RT-PCR pada gel Agarose 2%

DNA hasil RT-PCR yang diperoleh, kemudian dianalisa dengan teknik elektroforesis menggunakan *ultrapureTM agarose* (Invitrogen) 2%. Sebanyak 1,4 g agarose dilarutkan ke dalam 70 ml *Tris Buffer EDTA* (TBE) 1x, kemudian dipanaskan dalam *microwave* sampai larutan menjadi jernih. Setelah didinginkan pada suhu kamar sampai hangat-hangat kuku, kemudian dimasukkan 3 µl *ethidium bromide* (10mg/ml;Invitrogen) dan dicampur sampai homogen. Larutan agarose kemudian dituang ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir, dan dibiarkan sampai membeku. Setelah membeku, gel dimasukkan dalam bak elektroforesis (Mupid-x, Japan) yang telah diisi larutan buffer TBE 1x sampai gel terendam. Sebanyak 10 µl produk PCR dicampur dengan 2 µl *loading dye* (Sigma) kemudian dimasukkan ke dalam

sumur-sumur pada gel. *Running* dilakukan pada 100 volt selama 35 menit. Setelah *running* selesai, keberadaan pita-pita DNA produk PCR diamati di atas *UV transiluminator* (Vilber Lourmart, France). Hasil yang positif ditunjukkan adanya pita spesifik berwarna jingga pada gel agarose (Payungporn *et al.* 2004).

F. Data dan Analisis Data

Data hasil isolasi dan identifikasi virus avian influenza subtipe H5N1 dianalisis secara deskriptif.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Sebanyak 50 sampel usap kloaka unggas (ayam, itik, entok, dan angsa) diambil dari peternak tradisional di lima kelurahan dari 16 kelurahan di wilayah kecamatan Gunungpati Semarang (Lampiran 1). Setiap peternak diambil sampel rata-rata 2-4 ekor pada satu jenis unggas, sesuai dengan jenis unggas yang dimiliki peternak. Sampel usap kloaka berdasar jenis unggas di kecamatan Gunungpati terdiri dari 10 ekor ayam, 12 ekor itik, 17 ekor entok dan 11 ekor angsa (Tabel 5). Kemudian dilakukan polling sesuai dengan jenis unggas dan pemilik ternak menjadi 30 sampel (Lampiran 2). Pengambilan sampel tidak merata pada setiap kelurahan dikarenakan perbedaan jumlah semua unggas yang dimiliki tiap peternak pada tiap kelurahan dan jumlah sampel yang terbatas.

Tabel 5. Sampel usap kloaka di Kecamatan Gunungpati berdasarkan jenis unggas.

Kelurahan	Jenis Unggas				Jumlah
	Ayam	Itik	Entok	Angsa	
Kalisegoro	4	5	2	1	12
Ngijo	-	-	-	2	2
Pakintelan	1	5	5	8	19
Patemon	-	-	2	-	2
Sekaran	5	2	8	-	15
Jumlah	10	12	17	11	50

Setiap inokulum dipropagasi pada telur ayam berembrio SPF selama 4 hari. Rata-rata perkembangan virus berlangsung selama 2-4 hari setelah inokulasi (Kamps *et al.* 2007). Cairan alantois yang dipanen setelah hari ke-4 inokulasi, selanjutnya diuji HA cepat dan lambat yang hasilnya ditampilkan pada Tabel 6.

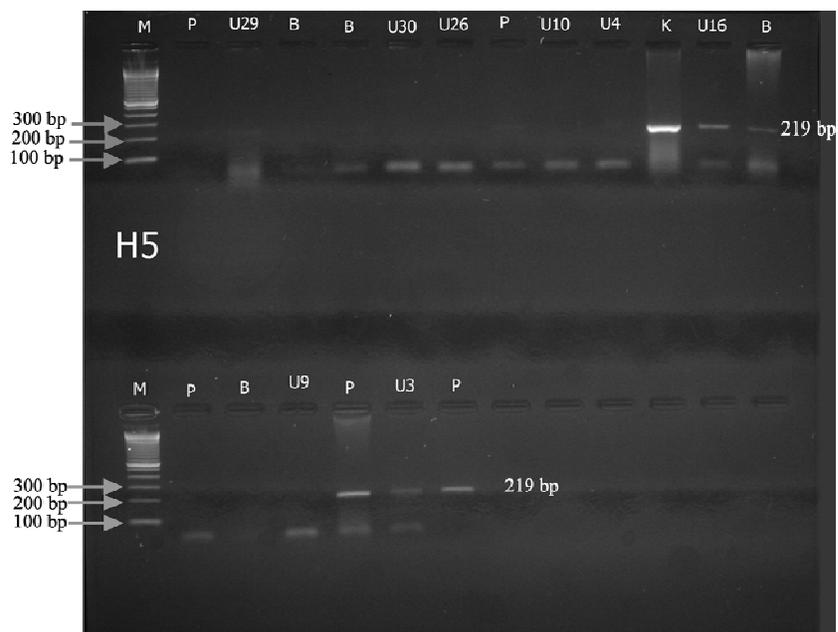
Tabel 6. Hasil Uji HA Inokulum Isolat Kecamatan Gunungpati.

No.	Kode sampel inokulum	Jenis unggas	Uji HA cepat (+/-)	Uji HA lambat (+/-)	Titer HA
1	U1	Entok	-	-	-
2	U2	Ayam	-	-	-
3	U3	Entok	+	+	2 ¹¹
4	U4	Itik	+	+	2 ¹¹
5	U5	Itik	-	-	-
6	U6	Itik	-	-	-
7	U7	Ayam	-	-	-
8	U8	Entok	-	-	-
9	U9	Ayam	+	+	2 ¹⁰
10	U10	Angsa	+	+	2 ¹¹
11	U11	Ayam	-	-	-
12	U12	Ayam	-	-	-
13	U13	Ayam	-	-	-
14	U14	Angsa	-	-	-
15	U15	Itik	-	-	-
16	U16	Angsa	+	+	2 ⁹
17	U17	Angsa	-	-	-
18	U18	Angsa	-	-	-
19	U19	Angsa	-	-	-
20	U20	Ayam	-	-	-
21	U21	Entok	-	-	-
22	U22	Itik	-	-	-
23	U23	Entok	-	-	-
24	U24	Entok	-	-	-
25	U25	Entok	-	-	-
26	U26	Itik	+	+	2 ⁸
27	U27	Itik	-	-	-
28	U28	Entok	-	-	-
29	U29	Entok	+	+	2 ¹¹
30	U30	Entok	+	+	2 ¹¹
31	K	-	+	+	2 ¹¹

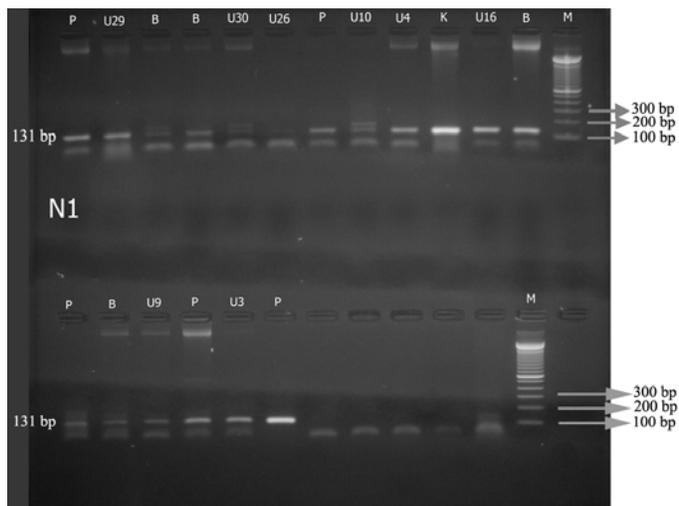
Angka titer HA menunjukkan selang antara 2⁸-2¹¹. Titer HA 2⁸ sudah tergolong tinggi (Natih *et al.* 2010) Titer HA ini merupakan jumlah unit HA yang dapat mengaglutinasi sel darah merah sehingga pada sumur terlihat titik-titik merah yang tersebar tidak memusat di tengah.

Sebanyak 8 inokulum yang positif HA, kemudian diisolasi RNANYA. Isolasi RNA dilakukan menggunakan *Trizol[®] LS Reagent* (Invitrogen). Dalam isolasi RNA diperlukan kecermatan yang tinggi, dikarenakan apabila terjadi kesalahan prosedur dapat mengakibatkan rusak atau hilangnya RNA sehingga akan menyulitkan pada langkah selanjutnya.

Tahap berikutnya adalah identifikasi subtype virus AI H5N1 dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik (Tabel 4). Pita-pita cDNA yang didapat kemudian divisualisasikan pada elektroforesis. *Running* elektroforesis dilakukan dua kali, yaitu untuk H5 dan N1. Pita-pita tersebut akan melewati gel agarose yang berpori bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif dari alat elektroforesis. Ukuran pita yang diharapkan adalah spesifik berukuran 219 bp untuk gen H5nya (Gambar 9), dan 131 bp untuk gen N1nya (Gambar 10).



Gambar 9. Elektroforegram isolat berdasarkan gen H5. M: marker. K: Kontrol (+). Kode U3, U4, U10, U16, U26, U29: sampel positif H5. Kode U1, U2, U5-U9, U11-U15, U17-U25, U27, U28, U30: sampel negatif H5. Kode P & B: isolat diluar kecamatan Gunungpati (bukan termasuk hasil penelitian ini).



Gambar 10. Elektroforegram isolat berdasarkan gen N1. M: marker. K: Kontrol (+). Kode U3, U4, U9, U10, U16, U26, U29, U30: sampel positif N1. Kode U1, U2, U5-U8, U11-U15, U17-U25, U27, U28: sampel negatif N1. Kode P & B: isolat diluar kecamatan Gunungpati (bukan termasuk hasil penelitian ini).

Berdasarkan hasil elektroforesis menunjukkan bahwa 6 isolat (U3, U4, U10, U16, U26, dan U29) positif H5N1 (Gambar 9 & 10) dengan titer HA 10^9 - 10^{11} (Tabel 6). Keenam isolat H5N1 berasal dari kelurahan Sekaran (1 isolat), Kalisegoro (2 isolat), Pakintelan (3 isolat). Selain keenam sampel tersebut, 2 sampel positif N1 tetapi negatif untuk H5, sehingga subtipenya adalah HxN1 yaitu masing-masing U9 dan U30. Kedua isolate positif H5N1 berasal dari entok (2 isolat), itik (2 isolat), dan angsa (2 isolat) (Tabel 7).

Tabel 7. Data hasil RT-PCR Sampel, Isolat Kecamatan Gunungpati

No.	Inokulum	Jenis	Asal	H5	N1	Subtipe
1	U3	Entok	Sekaran	+	+	H5N1
2	U4	Itik	Kalisegoro	+	+	H5N1
3	U9	Ayam	Kalisegoro	-	+	HxN1
4	U10	Angsa	Kalisegoro	+	+	H5N1
5	U16	Angsa	Pakintelan	+	+	H5N1
6	U26	Itik	Pakintelan	+	+	H5N1
7	U29	Entok	Pakintelan	+	+	H5N1
8	U30	Entok	Patemon	-	+	HxN1

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari total sampel (50) usap kloaka, 6 positif VAI H5N1 dengan prevalensi 12%, dan 2 positif HxN1 (4%) (Lampiran 4). Hasil ini juga menunjukkan bahwa semua unggas yang positif VAI H5N1 adalah unggas air yaitu 2 isolat dari entok (11,76%), 2 isolat dari itik (16,67%), dan 2 isolat dari angsa (18,18%) (Tabel 8).

Tabel 8. Jumlah dan Prevalensi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 yang Diisolasi dari Unggas di Peternakan Tradisional Kecamatan Gunungpati.

Kelurahan	Isolat VAI H5N1				Total Prevalensi
	Itik	Entok	Angsa	Ayam	
Kalisegoro	1 (20%)	0	1 (100%)	0	2 (16,67%)
Ngijo	0	0	0	0	0
Pakintelan	1 (20%)	1 (20%)	1 (12,5%)	0	3 (15,78%)
Patemon	0	0	0	0	0
Sekaran	0	1 (12,5%)	0	0	1 (6,67%)
Total	2	2	2	0	6 (12%)
Prevalensi	(16,67%)	(11,76%)	(18,18%)		

B. Pembahasan

Titer HA adalah pengenceran tertinggi yang masih memperlihatkan aglutinasi sempurna (WHO 2002). Uji HA merupakan suatu uji untuk mengetahui keberadaan antigen virus yang dapat mengaglutinasi Sel Darah Merah (SDM). Berdasar hasil penelitian menunjukkan bahwa titer HA virus cukup tinggi sebesar lebih dari 2^8 (Natih *et al.* 2010). Untuk dapat mengaglutinasi sempurna diperlukan sekitar 10^7 unit virus. Uji HA digunakan untuk menghitung kandungan virus yang telah mati (tidak infeksi) dan yang masih hidup (infeksi). Untuk menghitung jumlah virus infeksi digunakan uji Egg Infectious Dose ₅₀

(EID₅₀) (Angi *et al.* 2009), tetapi di penelitian ini tidak dilanjutkan ke uji tersebut.

Dalam menentukan subtipe VAI khususnya H5N1, konfirmasi yang paling tepat adalah dengan amplifikasi gen HA dan NA, atau dengan mengetahui sekuens nukleotida gen HA dan NA (WHO 2005) dengan reaksi RT-PCR. PCR memberikan alternatif yang cepat dan efektif pada isolasi virus untuk mendeteksi virus influenza A (Dharmayanti *et al.* 2004).

Genom virus *avian influenza* adalah *single-strand* RNA sehingga pada reaksi PCR dibutuhkan sintesa sebuah DNA *copy* (cDNA) yang berkomplementar dengan RNA virus. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik yang mempunyai banyak kelebihan dalam mengidentifikasi genom, termasuk dalam hal ini genom VAI, ketika virus tidak dalam jumlah yang banyak. *Reverse Transcriptase* (RT) adalah enzim polimerase yang digunakan untuk mensintesa cDNA, sehingga reaksinya disebut RT-PCR. Metode RT-PCR sudah banyak digunakan untuk mendiagnosa adanya virus avian influenza, biasanya metode ini akan dilanjutkan dengan sekuensing DNA untuk melihat lebih jauh tentang karakter molekuler virus ini, seperti mutasi virus, hubungan kekerabatan dan untuk rekayasa genetik lainnya (Dharmayanti *et al.* 2004).

Hasil identifikasi yang terlihat pada elektroforegram (Gambar 9 & 10) menunjukkan sensitivitas dari primer spesifik pendeteksi virus VAI subtipe H5N1 terbukti berhasil. Pada Gambar 9 dan 10, untuk 6 isolat positif terlihat pita spesifik yang diinginkan. Untuk 2 sampel yang negatif H5 tetapi positif untuk primer N1 berarti subtipe VAI tersebut HxN1, dengan (x) adalah subtipe H lain (H1-H16 selain H5).

Pada Gambar 9 dan 10 terlihat pada setiap sumur terdapat dua pita yang letaknya berdekatan, yaitu pita dibawah pita target. Letak pita tersebut berada di bawah 100 bp. Pita ini sebenarnya bukanlah pita gen yang dimaksud. Ada beberapa kemungkinan hal tersebut dapat terjadi. Pita tersebut adalah molekul-molekul zat pewarna (MgSO₄) sisa yang tidak menempel pada pita target, yang ikut berjalan bersama pita target. Kemungkinan lain pita tersebut adalah primer

yang melakukan aneling sendiri. Pada penelitian ini pita tersebut kemungkinan besar adalah pita dari primer yang melakukan aneling sendiri saat proses PCR dengan ciri khasnya adalah ukuran pita dibawah 100 bp (hampir seukuran dengan primernya). Molekul tersebut juga ikut berpendar dan terlihat di elektroforegram (Anonim 2003; Anonim 2007).

Sebanyak 50 isolat sampel yang berasal dari kecamatan Gunungpati menunjukkan 6 isolat positif virus H5N1. Isolat positif H5N1 semuanya berasal dari unggas air dari Sekaran, Kalisegoro, Patemon dan Pakintelan. Pada penelitian ini, isolat yang menunjukkan positif H5N1 berasal dari entok (11,76%), itik (16,67%), dan angsa (18,18%). Unggas air yang dikenal sebagai inang alami memungkinkan virus untuk menginfeksi, tanpa ada gejala yang membahayakan bagi inangnya. Peluang untuk virus beradaptasi juga memperbesar untuk menginfeksi inangnya (Strum & Ramirez *et al.* 2005). Data penelitian ini, perlu ditindak lanjuti dengan menyampaikan atau melaporkan ke Dinas peternakan terkait agar dilakukan pemeriksaan lebih rinci sebagai tindak lanjut untuk pencegahan dan penanggulangan VAI H5N1.

Penelitian sebelumnya oleh Susanti 2008, menyebutkan bahwa prevalensi unggas air di dua kabupaten di Jawa Barat juga tergolong tinggi. Angka prevalensi pada unggas air (itik 4,04%, entok 4,855, angsa 6,67%) ini didapatkan dari peternak tradisional di kabupaten Sukabumi dan Bogor. Kemudian penelitian dari pasar Nanchang, China tahun 2000 menunjukkan angka prevalensi pada itik hanya sebesar 1,3% (Liu *et al.* 2003). Bahkan prevalensi VAI subtype H5 pada unggas air di Minesota, Amerika Serikat cukup rendah, yaitu hanya sebesar 0,4% (Hanson *et al.* 2003). Berdasar penelitian-penelitian tersebut, untuk spesies angsa memiliki resiko infeksi yang relatif tinggi.

Wabah VAI sub tipe H5N1 di Hongkong tahun 2001 juga berasal dari reservoir itik dan angsa yang mengalami reasorsi dengan VAI unggas air lainnya sehingga muncul virus yang bersifat patogenik pada unggas darat (Sturm-Ramirez *et al.* 2004) sehingga pola peternakan dengan mencampur unggas darat maupun unggas air akan selalu beresiko AI H5N1. Penelitian-penelitian tersebut

semakin membuat masyarakat harus lebih waspada terhadap faktor-faktor yang dapat menularkan virus.

Sistem beternak dengan mengumbar ternak secara bebas (*backyard*) di Thailand dapat memberikan angka prevalensi hingga sebesar 56% untuk unggas yang terinfeksi VAI, walaupun infeksi tersebut tanpa menunjukkan gejala dari luar (Songserm, 2006). Pola beternak secara tradisional di kecamatan Gunungpati, menyebabkan masyarakat memiliki resiko baik menguntungkan ataupun merugikan masyarakat sendiri dibanding pada pola peternakan intensif (Tabel 9). Masyarakat kebanyakan memelihara unggas dengan tujuan menambah ekonomi rumah tangga. Diuntungkan lagi dengan mudahnya pemeliharaan unggas karena tanpa dirawat dengan intensif pun unggas tersebut masih dapat hidup dan mencari makanannya sendiri serta masih terlihat sehat. Di samping keuntungan, tentu saja ada juga kerugiannya, yaitu rentan terhadap penyakit.

Rencana penanggulangan *Avian Influenza* (AI) di Jawa Tengah cukup berat dilaksanakan, yang antara lain disebabkan oleh beberapa faktor berikut: (1) Kondisi sistem usaha peternakan yang tersebar secara luas, sehingga memerlukan kerja keras dan kegigihan tersendiri dari para petugas kesehatan hewan; (2) Penanggulangan sementara diutamakan pada ayam, khususnya ayam ras petelur, padahal menurut beberapa literatur bahwa unggas air justru lebih rentan dan potensial, menyebabkan wabah ini; (3) Petugas kesehatan hewan dan dukungan fasilitas yang terbatas; (4) Kurangnya rencana antisipasi dengan sistem deteksi dini, sehingga penanggulangan dilakukan pada paska *out break* sehingga memakan waktu, biaya dan tenaga yang besar (Saptana *et al.* 2005).

Sejak ditemukan kasus yang muncul pada warga Semarang, pemerintah kota Semarang tak henti-hentinya melakukan himbauan agar warga mau dan ikut andil dalam hal tanggap flu burung. Pemerintah juga melakukan pemusnahan terhadap unggas yang berada di sekitar rumah warga yang positif AI (Putro 2008). Pemusnahan tersebut tentunya akan merugikan bagi peternak karena kemungkinan peternak mendapatkan ganti rugi yang tidak layak atau bahkan mengikhlaskan unggasnya tanpa adanya biaya ganti rugi.

Belum ada penelitian tentang VAI H5N1 di kecamatan Gunungpati. Penelitian ini dilakukan meskipun belum ada publikasi adanya kasus VAI yang menginfeksi manusia, tetapi terbukti VAI H5N1 yang terkenal sangat patogen sudah mangancam wilayah ini khususnya pada unggas. H5N1 yang ditemukan pada unggas di kecamatan Gunungpati masih berada pada inang alaminya. Masyarakat tidak tahu apa yang telah dan akan terjadi pada VAI tersebut selanjutnya. Bisa saja virus tersebut mati atau masih hidup dengan replikasi tetap pada inang alaminya, atau juga dapat bermutasi menjadi lebih patogen sehingga dapat menyerang manusia.

Usaha peternakan unggas skala kecil didominasi oleh usaha rumah tangga yang pada umumnya merupakan usaha sampingan, tidak intensif dan dengan teknologi tradisional (Simatupang 2004). Pada usaha demikian peternak tidak mengenal kesehatan hewan peliharaannya sama sekali, sehingga unggas-unggas yang dipelihara rentan akan datangnya penyakit. Sementara ini masyarakat masih menganggap bahwa *Newcastle Disease* (tetelo) adalah penyakit yang sering dan paling merugikan bagi peternak, padahal terdapat penyakit lain yang lebih berbahaya yang dapat menular dari unggas ke manusia hingga menyebabkan kematian tinggi yaitu flu burung (Hasnudi *et al.* 2004). Penyakit tetelo adalah penyakit yang hanya menyerang unggas dengan gejala mirip dengan AI, tetapi masih dapat disembuhkan selama belum parah.

Selama ini penanggulangan kasus VAI di Indonesia khususnya di Semarang bersifat pengobatan. Daerah-daerah yang belum terdeteksi kasus, masyarakat acuh tak acuh terhadap penyakit ini, padahal VAI sudah menjadi penyakit endemik di Indonesia. Pemerintah pun baru bertindak setelah terjadi kasus di wilayah tertentu, dengan hanya memusnahkan unggas yang diduga akan tertular unggas yang telah terinfeksi. Tentu saja hal ini sangat merugikan masyarakat bahkan pemerintah sendiri. Kehilangan penghasilan yang tidak sedikit tentunya telah dialami para peternak tradisional, sehingga perlunya tindakan penanggulangan yang tepat baik dari pemerintah maupun peternak sendiri (Saptana *et al.* 2005).

Usaha-usaha penanggulangan VAI yang sudah dilakukan antara lain dengan pemusnahan unggas unggas pada radius tertentu pada daerah yang ditemukan kasus VAI baik kasus yang menyerang unggas ataupun manusia di Jawa Tengah.

Penyuluhan terhadap warga masyarakat sudah dilakukan pada masyarakat di Kabupaten Limapuluh Kota di Yogyakarta (Suryadi & Kusnanto 2007). Pemberian vaksin terhadap unggas sudah dilakukan tetapi masih belum maksimal dikarenakan harga yang tidak murah. Di kecamatan Gunungpati Semarang belum ada usaha-usaha apapun untuk menanggulangi virus, termasuk pengadaan vaksin.

Vaksinasi terhadap flu burung sudah ada dan terus dikembangkan. Keputusan untuk membuat vaksin ini tersedia di suatu negara hanya bisa dilakukan oleh Direktorat Kesehatan Hewan. Perlu digarisbawahi bahwa vaksinasi hanyalah salah satu metode untuk pencegahan dan pengendalian. Beberapa hal seperti kalayakan perkandangan yang sesuai juga menjadi faktor penting dalam pengendalian VAI. Menyendirikan unggas air dengan unggas domestik akan memperendah terjadinya kematian unggas akibat VAI (FAO 2005). Lingkungan sekitar peternakan juga mempengaruhi tingkat keamanan dari ternak. Kondisi lingkungan peternakan yang baik mengurangi dampak buruk pencemaran. Lingkungan yang tercemar membawa akibat jelek bagi kesehatan, yakni apabila peternakan unggas dibiarkan kotor dan tidak memenuhi standar persyaratan kesehatan lingkungan (Suryadi & Kusnanto 2007).

Hasil kajian di lapang terhadap program vaksinasi memberikan gambaran sebagai berikut : (1) Akibat kepanikan masyarakat peternak dalam menghadapi masalah yang dihadapi mereka melakukan dengan cara sendiri-sendiri; (2) Kesalahan terjadi penggunaan vaksin ilegal atas nama perseorangan dan melakukan vaksin dalam kondisi ayam sakit, sehingga mengakibatkan kematian yang lebih banyak dan cepat; dan (3) Pelaksanakan vaksinasi dengan vaksin legal dan dengan teknik yang tepat, serta dibarengi pembimbingan, serta pelaksanaan *biosecurity* yang ketat dapat menekan kematian secara cukup efektif, 70 persen populasi terselamatkan (Saptana *et al.* 2005).

Pelaksanaan upaya pencegahan flu burung oleh dinas peternakan beserta jajarannya sudah diupayakan semaksimal mungkin. Hal ini tercermin dari dilakukannya sosialisasi kepada peternak unggas, selebaran-selebaran dalam informasi tentang flu burung. Dinas peternakan dan perikanan merupakan sektor yang memiliki tanggung jawab besar dalam menghadapi penyakit flu burung di

bandingkan dengan sektor-sektor yang lain. Walaupun terdapat berbagai kendala seperti kurangnya tenaga yang ada dan dukungan dana yang tersedia, namun pemberdayaan potensi yang ada sudah dimanfaatkan semaksimal mungkin. Idealnya di setiap kecamatan terdapat masing-masing pos kesehatan hewan yang didukung oleh seorang dokter hewan dan petugas paremedik veteriner (Suryadi & Kusnanto 2007). Jalinan hubungan yang baik antara dinas peternakan, paramedik veteriner (petugas kesehatan ternak) dan pemilik ternak harus semakin dieratkan supaya kasus VAI yang telah diketahui keganasannya itu dapat diminimalisir (FAO 2005).

Perbaikan dalam sistem beternak juga penting dilakukan dalam menanggulangi VAI. Di daerah Tegal, banyak terdapat peternak itik dikarenakan kota tersebut merupakan sentra produksi sate itik dan telur asin. Langkah antisipasi yang dilakukan oleh peternak itik di Kabupaten Tegal adalah dengan membersihkan kandang dan lingkungan sekitar kandang 1-2 hari sekali. Pertahanan pertama pada itik agar penyakit tidak masuk ke lingkungan kandang yaitu dengan cara pembersihan kandang (Budiraharjo *et al.* 2009).

Anjuran oleh FAO (2005) yaitu dengan perkandangan yang tertutup, sehingga unggas akan selalu berada dalam kandang tersebut dan tetap terlindung. Kontak antara unggas ternak dengan unggas terinfeksi dan lingkungan yang terkontaminasi lebih kecil dibanding dengan kandang terbuka. Pembuatan kandang tertutup ini memerlukan biaya yang sedikit mahal dan memerlukan perawatan ekstra. Solusi yang praktis adalah dengan kandang tertutup (untuk malam hari), pelataran yang berpagar dan pangadaan kolam di dalamnya (untuk siang hari).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Simpulan yang diambil dari penelitian ini adalah:

1. Hasil isolasi dan identifikasi dari 50 sampel usap kloaka asal unggas di kecamatan Gunungpati, menunjukkan 6 isolat positif VAI sub tipe H5N1 (12%), 2 isolat berasal dari entok (11,76%), 2 dari angsa (18,18%), dan 2 dari itik (12,67%).
2. Unggas-unggas air di peternakan unggas tradisional berpotensi sebagai penularan VAI, khususnya sub tipe H5N1.

B. Saran

1. Data prevalensi virus avian influenza sub tipe H5N1 hasil penelitian ini perlu ditindak lanjuti dengan berkoordinasi bersama dinas peternakan sebagai dasar pencegahan dan pengendalian virus ini.
2. Perlunya pembenahan peternakan yang lebih baik khususnya di kecamatan Gunungpati, terutama sistem perkandangan disesuaikan dengan anjuran pemerintah dan selalu menjaga kebersihan dan kesehatan unggas.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan berdasarkan angka prevalensi VAI sub tipe H5N1 yang cukup tinggi di peternakan tradisional kecamatan Gunungpati dengan sampel yang lebih banyak dan wilayah yang lebih luas agar hasil lebih akurat.

IX. DAFTAR PUSTAKA

- Akoso B.T. 2006. *“Waspada Flu Burung” Penyakit Menular Pada Hewan dan Manusia*. Yogyakarta: Kanisius.
- Angi, H.A., I Wayan T., Sri Murtini. 2009. Kemampuan Netralisasi Antibodi Spesifik Avian Influenza H5 Terhadap Beberapa Virus H5N1 isolat Lapang. *Jurnal Forum Pascasarjana* Vol. 32 Januari 2009:55-56.
- Anonim. 2003. SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Protocols. United States: INVITROGEN. Online at: www.invitrogen.com [6 Februari 2011].
- _____. 2007. SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase. USA: Molecular Station. Online at: <http://www.molecularstation.com/> [6 Februari 2011].
- Antara I-M.S., I-N. Suartha, I-K.S. Wiryana, I-M. Sukada, - W. Wirata, I-G.N.D. Prasetya, N.M.R.K. Dewi, T.K. Sari & I-G.N.K. Mahardika. 2009. Pola Distribusi Unggas dari Pasar Tradisional Berperan dalam Penyebaran Virus Flu Burung. *Jurnal Veteriner* 10 (2):104-110.
- Arsyad AM. 2008. Hubungan Pengetahuan Tentang Flu Burung Dengan Sikap Masyarakat Yang Memelihara Unggas Di Wilayah Mojogedang (*Skripsi*). Fakultas ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta. Online at: <http://www.etd.eprints.ums.ac.id/>. [20 Mei 2010].
- Asmara W. 2007. *lian Avian Influenza Peran Biologi Molekuler Dalam Pengenda dan Flu Burung*. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Hewan UGM Online at: <http://www.komnasfbpi.go.id/> [20 Mei 2010].
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2009. *Kota Semarang Dalam Angka 2009*. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Budiraharjo, K., D. Sumarjono, M. Handayani, & S. Gayatri. 2009. Studi Potensi Ekonomi Pengembangan Usaha Ternak Itik di Kabupaten Tegal. Seminar Nasional Kebangkitan Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro Semarang. Online at: <http://www.eprints.undip.ac.id/> [15 Juli 2010].
- Dharmayanti, R. Damayanti, A. Wiyono, R. Indriani dan Darminto. 2004. Identifikasi Virus Avian Influenza Isolat Indonesia dengan Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Rection (RT-PCR). *JITV* Vol. 9 No 2:136-143.

- Dharmayanti, R. Indriani, R. Damayanti & A.Wiyono. 2005. Isolasi dan Identifikasi Wabah Avian Influenza pada Bulan Oktober 2004-Maret 2005 di Indonesia. *Biol. Indon.* III (9):341-350.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2005. Pencegahan dan Pengendalian Flu Burung (*Avian Influenza*) pada Peternakan Unggas Skala Kecil (Buku Petunjuk bagi Paramedik Veteriner). *Online at: <http://www.fao.org/>* [15 Juli 2010].
- [FKH IPB] Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. 2006. Kajian karakter virus avian influenza pada unggas air sebagai dasar pengendalian penyakit Avian Influenza (AI). Laporan Akhir Penelitian Kerjasama Departemen Pertanian dan FKH IPB. Bogor: FKH IPB; 2006.
- Hanson BA, Stallknecht DE, Swayne DE, Lewis LA, Senne DA. 2003. Avian Influenza in Minnesota ducks during 1998-2000. *Avian Dis* 47: 867-871.
- Hasnudi, Iskandar S, & Sayed U. 2004. Pokok-pokok Pemikiran Bidang Peternakan. e-USU Repository Universitas Sumatera Utara. *Online at: <http://library.usu.ac.id/>* [15 Juli 2010].
- Hoffman E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146: 2275-2289.
- Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Long HT, Naipospos TSP, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JSM, & Webster RG. 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10682-10687.
- Imelda S & R Hengst. 2006. Media Melawan Flu Burung. Jakarta: On Track Media Indonesia. *Online at: <http://www.komnasfbpi.go.id/>* [15 Juli 2010].
- Kamps, SB, C Hoffman, & W Preiser. 2007. *Influenza Report*. Terjemahan K Anggraeni, Jakarta: Indeks.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, & Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97: 13-27.

- Li KS, Xu KM, Peiris JSM, Poon LLM, Yu KZ, Yuen KY, Shortridge KF, Webster RG, & Guan Y. 2003. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of Southern China: a candidat for the next influenza pandemic in humans? *J Virol* 77: 6988-6994.
- Liu M, Guan Y, Peiris M, He S, Webby RJ, Perez D, Webster RG. 2003. The quest of influenza A virus for new host. *Avian Dis* 47: 849-856.
- Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HHT, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM, & Tumpey TM. 2005. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from human in Asia 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol* 79: 11788-11800.
- Natih KKN, Retno D, Soejoedono, Wayan TW, Fachriyan HP. 2010. Preparasi Imunoglobulin G Kelinci sebagai Antigen Penginduksi Antibodi Spesifik Terhadap Virus *Avian Influenza* H5N1 Strain Legok. *Jurnal Veteriner Vol.11 No.2*: 99-106.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. 2010. Complete Nucleotides for Haemagglutinin (HA) and Neuramindase (NA) Genes. *Online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>* [15 Juli 2010].
- Nidom AC. 2005. Upaya Pencegahan dan Penanggulangan Pandemi Flu Burung. Surabaya: Airlangga University Press *Online at: <http://ebooks.lib.unair.ac.id/files/>* [12 Mei 2010].
- Nonik. 2008. Semarang Dinyatakan dalam Status Keadaan Luar Biasa Flu Burung. DW- World. *Online at: <http://www.dw-world.de/dw/>* [12 April 2010].
- [OIE] Office International des Epizooties. 2005. Update on avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1 from poultry in live bird market in Hanoi, Vietnam in 2001. *J Virol* 79: 4201-4212.
- Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, Amonsin A, & Poovororawan Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol* 17: 588-593.
- Putro, H.D . 2008. Satu Warga Positif Flu Burung Di Semarang. KOMPAS.com. *Online at: <http://nasional.kompas.com/>* [7 Juli 2010].

- Russell CJ & Webster RG. 2005. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell* 123:368-371.
- Saptana, E. Basuno & Y. Yusdja. 2005. Dampak Ekonomi Flu Burung Terhadap Kinerja Industri Perunggasan di Provinsi Jawa Tengah (Suatu Kajian Atas Kasus Flu Burung di Kabupaten Semarang dan Klaten. On line at <http://ejournal.unud.ac.id/abstrak/> [13 Januari 2010].
- Simatupang, P. Nizwar S. & P.U Hadi. 2004. Arah dan kebijakan pengembangan agribisnis peternakan di indonesia. Makalah disampaikan pada *Seminar Nasional Komunikasi Hasil-hasil Penelitian Ternak dan Usaha Pengembangan Peternakan Dalam Sistem Usahatani Lahan Kering*. BPTP Waingapu. Nusa Tenggara Timur 23-24 Agustus 2004.
- Songserm T, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, & Webster RG. 2006. Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic in Thailand. *Emerg Infec Dis* 12: 575-581.
- Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, & Webster RG. 2004. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol* 78: 4892-4901.
- Suryadi DH & H Kusnanto. 2007. Upaya Pencegahan Flu Burung Pada Peternakan Unggas Skala Kecil Di Kabupaten Lima Puluh Kota. Universitas Gajah Mada (UGM). Online at: http://lrc-kmpk.ugm.ac.id/id/UP-PDF/_working/No.6_Deni_07_06.doc.pdf [22 Juni 2010].
- Susanti R. R.d. Soejoedono, I-G.N.K. Mahardika, I-W.T. Wibawan & M.T. Suhartono. 2007. Potensi Unggas Air Sebagai Reservoir Virus High Pathogenic Avian Influenza Subtipe H5N1. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. *JITV* 12(2): 160-166. Online at : <http://peternakan.litbang.deptan.go.id/> [5 Juni 2009].
- Susanti R. 2008. Isolasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Dari Unggas Air Dengan Teknik Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES).
- [TDC] Tropikal Disesase Center. 2007. Avian Influenza.. Online at: avianflu.unair.ac.id/ [21 Mei 2009].

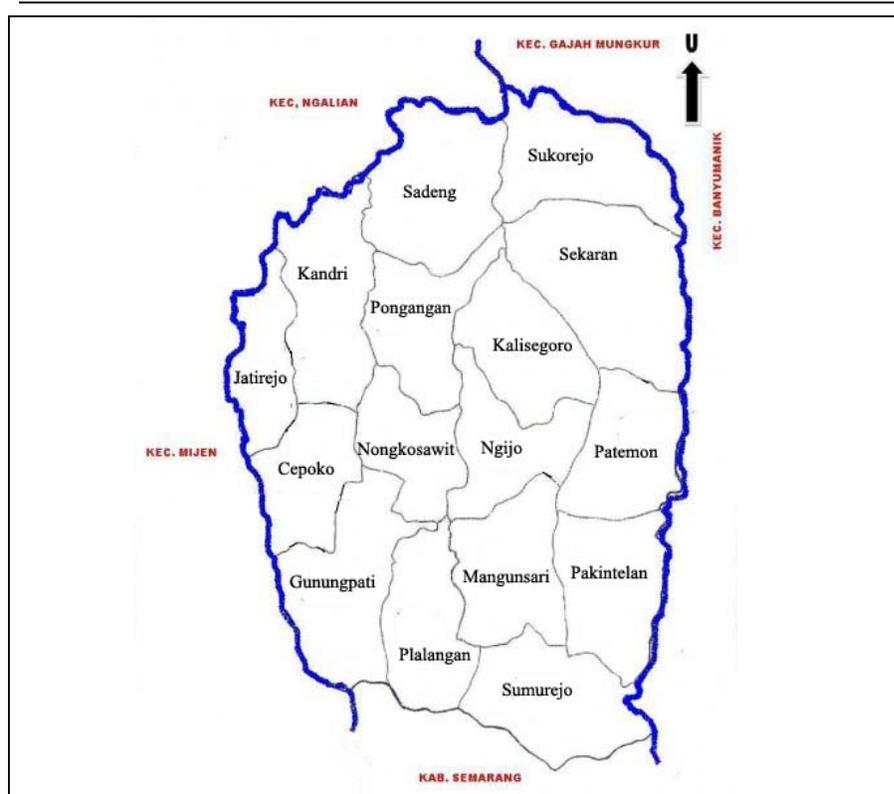
- [WHO] World Health Organization. 2002. WHO manual on animal influenza. Diagnosis and surveillance. *Online at: <http://www.who.int/>*. [12 November 2009].
- _____. 2004. Avian influenza A (H5N1): situation (poultry) in asia need for a long-term response, comparison with previous outbreaks. *http://www.who.int/*. [31 Oktober 2009].
- _____. 2005. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. *Online at: <http://www.who.int/>* [Juni 2009].
- _____. 2010. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1). *Online at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country*. [10 Mei 2010].
- Whittaker, GR. 2001. Replication cycle of an influenza virus. *Expert Reviews in Molecular Medicine Cambridge University Press. Online at: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/* [10 April 2010].
- Zhou JY, Shen HG, Chen HX, Tong GZ, Liao M, Yang HC, & Liu JX. 2006. Characterization of a highly pathogenic H5N1 influenza virus derived from bar-headed geese in China. *J Gen Virol* 87: 1823-1833.



LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Data dan Peta Kelurahan di Kecamatan Gunungpati.

No.	Nama Kelurahan	Luas area	Jumlah Penduduk
1	Pakintelan	274.808 ha	4.049 jiwa
2	Mangunsari	221.154 ha	4.038 jiwa
3	Plalangan	331.727 ha	3.422 jiwa
4	Gunungpati	667.696 ha	6.255 jiwa
5	Nongkosawit	190.906 ha	3.645 jiwa
6	Pongangan	319.762 ha	4.882 jiwa
7	Ngijo	318.762 ha	2.575 jiwa
8	Patemon	499.088 ha	4.016 jiwa
9	Sekaran	490.718 ha	6.241 jiwa
10	Sukorejo	288.063 ha	9.850 jiwa
11	Sadeng	425.503 ha	5.721 jiwa
12	Cepoko	245.405 ha	2.402 jiwa
13	Jatirejo	247.776 ha	1.723 jiwa
14	Sumurejo	325.159 ha	5.415 jiwa
15	Kalisegoro	281.884 ha	2.720 jiwa
16	Kandri	245.490 ha	3.799 jiwa



Sumber: BPS 2010

Lampiran 2. Data peternak dan jumlah ternak tradisional yang diambil sampel, di kecamatan Gunungpati.

Kelurahan	Nama Peternak	Jenis Unggas			Jumlah	
		Itik	Entok	Angsa Ayam		
Sekaran	Murokib	-	6	-	11	17
	Sri	6	7	-	-	13
Klisegoro	Sodikin	14	-	-	4	18
	Slamet	-	6	-	4	10
	Munawir	-	-	2	9	11
Muntal	Sunoto	-	-	3	6	9
Pakintelan	Susi	-	-	9	4	13
	Ibin	34	22	-	-	56
Patemon	Matohir	-	7	-	2	9
Jumlah		54	48	14	40	156

Lampiran 3. Pengumpulan sampel beserta polling usap kloaka unggas isolat kecamatan Gunungpati.

No	Kode label	Kelurahan	Pemilik	Jenis hewan
1	1/E	SEKARAN	MUROKIB	ENTOK
2	2/E			ENTOK
3	3/A			AYAM
4	4/E			ENTOK
5	5/E			ENTOK
6	6/I	KALISEGORO	SODIKIN	ITIK
7	7/I			ITIK
8	8/I			ITIK
9	9/I			ITIK
10	10/I			ITIK
11	11/A			AYAM
12	12/E		SLAMET	ENTOK
13	13/E			ENTOK
14	14/A			AYAM
15	15/B		MUNAWIR	ANGSA
16	16/A			AYAM
17	17/A			AYAM
18	18/A	SEKARAN	MUROKIB	AYAM
19	19/A			AYAM
20	20/A			AYAM
21	21/A			AYAM
22	22/B	NGIJO	SUNOTO	ANGSA
23	23/B			ANGSA
24	24/I			ITIK
25	25/B	PAKINTELAN	SUSI	ANGSA
26	26/B			ANGSA
27	27/B			ANGSA
28	28/B			ANGSA
29	29/B			ANGSA
30	30/B			ANGSA

Lampiran 3 (Lanjutan)

No	Kode label	Kelurahan	Pemilik	Jenis hewan
31	31/B			ANGSA
32	32/B			ANGSA
33	33/A			AYAM
34	34/E	SEKARAN	SRI	ENTOK
35	35/I			ITIK
36	36/I			ITIK
37	37/E			ENTOK
38	38/E			ENTOK
39	39/E			ENTOK
40	40/E	PAKINTELAN	IBIN	ENTOK
41	41/I			ITIK
42	42/I			ITIK
43	43/I			ITIK
44	44/I			ITIK
45	45/E			ENTOK
46	46/E			ENTOK
47	47/E			ENTOK
48	48/E			ENTOK
49	49/E	PATEMON	MATOHIR	ENTOK
50	50/E			ENTOK

Data polling AI

U1=1E+2E

U2=3A

U3=4E+5E

U4=6I+7I

U5=8I+9I

U6=10I

U7=11A

U8=12E+13E

U9=14A

U10=15B

U11=16A+17A

U12=18A+19A

U13=20A+21A

U14=22B+23B

U15=24I

U16=25B+26B

U17=27B+28B

U18=29B+30B

U19=31B+32B

U20=33A

U21=34E

U22=35I+36I

U23=37E+38E

U24=39E

U25=40E+45E

U26=41I+42I

U27=43I+44I

U28=46E+47E

U29=48E

U30=49E+50E

Lampiran 4. Data Pengamatan Pada Telur Ayam Berembrio SPF

No.	Hari ke-	Waktu	Kode sampel yang mati	Jumlah
1	1	Pagi (09.00)	U11,U13,U17	3
		Sore (15.00)	K, U28	2
2	2	Pagi (09.00)	U2, U3, U4, U5, U7, U16, U26, U30	8
		Sore (15.00)	U8, U9, U10	3
3	3	Pagi (09.00)	U1, U15, U20, U27	4
		Sore (15.00)	-	-
4	4	Pagi (09.00)	U19, U23, U25,	3
		Sore (15.00)	-	-
5	4 (hidup)		U6, U12, U14, U21, U22, U29, U18, U24	8
JUMLAH				31

Lampiran 5. Angka prevalensi VAI H5N1 kecamatan Gunungpati.

- Angka prevalensi VAI H5N1 (+)= jml positif H5N1/total sampel usap kloaka x 100%

$$= 6/50 \times 100\%$$

$$= 12\%$$

- Angka prevalensi masing-masing isolat menurut jenis dan lokasi isolat.

Kelurahan	Isolat VAI H5N1				Total Prevalensi
	Itik	Entok	Angsa	Ayam	
Kalisegoro	1 (1/5x100% = 20%)	0	1 (1/1x100%= 100%)	0	2 (2/12x10 0%= 16,67%)
Ngijo	0	0	0	0	0
Pakintelan	1 (1/5x100% = 20%)	1 (1/5x100%= 20%)	1 (1/8x100%= 12,5%)	0	3 (3/19x10 0%= 15,79%)
Patemon	0	0	0	0	0
Sekaran	0	1 (1/8x100%= 12,5%)	0	0	1 (1/15x10 0= 6,67%)
Total Prevalensi	2 (2/12x00% = 16,67%)	2 (2/17x100% = 11,76%)	2 (2/11x100%= 18,18%)	0	6 (6/50x10 0% = 12%)

- Angka prevalensi VAI HxN1 = 2/ 50 x 100%

$$= 4\%$$

Lampiran 6. Pembuatan bahan-bahan penelitian

a. Pembuatan media transport PBS gliserol

Alat dan bahan:

1. Beker glass
2. Pengaduk/spatula
3. Tabung tube endorf
4. PBS 1x
5. Aquabidest
6. Gliserol
7. Penisilin
8. Streptomisin

Cara Kerja:

Pertama-tama PBS 1x dibuat dengan melarutkan 1 sachet PBS ke dalam 1 liter akuabidest. Diaduk hingga larut.

Untuk membuat 500 ml media transport, PBS 1x dimasukkan sebanyak 250 ml ke dalam beker glass, lalu ditambahkan 250 ml gliserol (perbandingan PBS : gliserol = 1:1). Kemudian penisilin dimasukkan sebanyak 1 ml dan 100 mg streptomisin. Diaduk hingga larut dan tercampur semua. Diambil sebanyak 0,5 ml, dimasukkan ke dalam tabung tube. Larutan dalam tube kemudian disimpan dalam freezer hingga siap digunakan.

b. Pembuatan SDM 5% dan 0,5%

Alat dan bahan:

1. Tabung venoject
2. Sduit
3. Sentrifus
4. PBS 1x
5. Na Sitrat
6. Darah ayam

Cara kerja:

Darah ayam diambil melalui *vena branchialis* dengan menggunakan spuit sebanyak 4 ml, kemudian dimasukkan dalam tabung venoject yang telah diisi dengan 1 ml anti-koagulan Na Sitrat, diaduk sampai merata. Darah disentrifuse selama 10 menit 2000 rpm. Supernatan dibuang dan sisa endapan dicuci dengan PBS seperti volume awal (5 ml), disentrifus lagi selama 10 menit. Diulang tiga kali dengan cara yang sama hingga didapatkan suspensi eritrosit 100%.

Suspensi eritrosit dengan konsentrasi 5% didapatkan dengan penambahan PBS pada SDM 100% hingga konsentrasi eritrosit menjadi 5%. Suspensi eritrosit konsentrasi 0,5% didapat dengan menambah PBS pada SDM 5% hingga konsentrasi menjadi 0,5%.

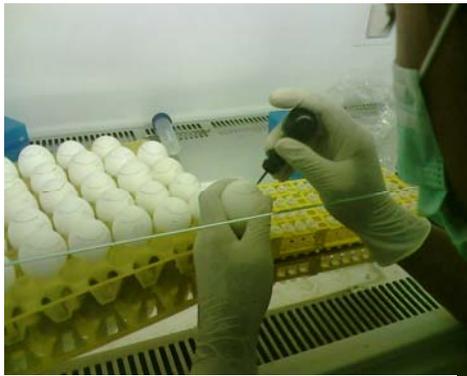
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Tipe peternakan yang mengumbar unggasnya secara bebas



Pengambilan sampel usap kloaka pada unggas



Pelubangan pada telur ayam berembrio bebas patogen



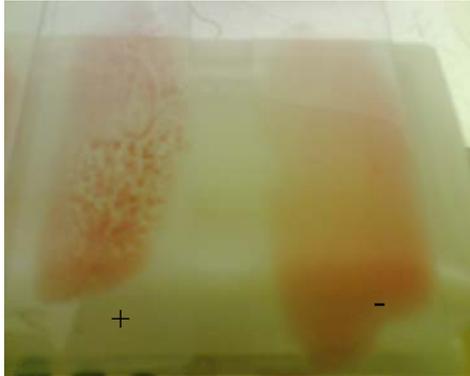
Injeksi sampel diduga virus ke dalam sampel TAB SPF



Pengamatan setiap hari untuk melihat apabila telur mati



Inkubasi telur pada incubator suhu 37° C



Hasil uji HA cepat yang memperlihatkan adanya aglutinasi SDM



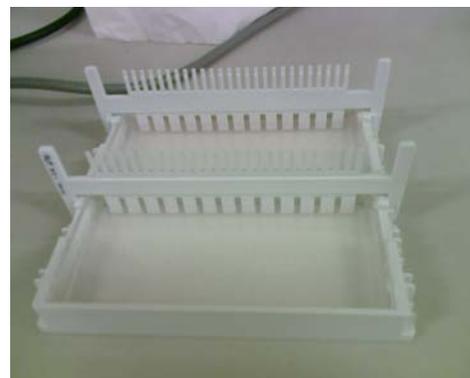
Uji HA lambat untuk mengetahui titer dari virus



Isolasi RNA virus avian influenza



Amplifikasi RNA VAI dengan teknik RT-PCR



Elektroforesis RNA VAI menggunakan agarose 2%



Visualisasi pita RNA pada gel agarose dengan UV transiluminator