

Deteksi Antigen Virus *Avian Influenza* pada Ayam Kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran, Bali

(*ANTIGEN DETECTION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS OF KAMPONG CHICKEN
IN BERINGKIT ANIMAL MARKET AND GALIRAN PUBLIC MARKET, BALI*)

**Annisa Musdalifa¹,
Gusti Ayu Yuniati Kencana², I Nyoman Suartha³**

¹Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,

²Laboratorium Virologi Veteriner,

³Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,

Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234;

Telp/Fax. 0361-223791

e-mail: yuniati_kencana@unud.ac.id

ABSTRAK

Avian Influenza termasuk ke dalam kelompok penyakit menular strategis dan bersifat zoonosis. Penyebabnya adalah virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) subtipe H5N1. Introduksi virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 dapat melalui jalur pasar karena berpotensi dalam penyebarannya penyakit *Avian Influenza* pada ayam kampung secara alamiah melalui kontak langsung dengan unggas lain. Penelitian ini dilakukan di Pasar Hewan Beringkit, Kabupaten Badung dan Pasar Umum Galiran, Kabupaten Klungkung. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui keberadaan virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 pada ayam kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran. Sampel yang digunakan sebanyak 120 sampel swab kloaka dan swab trakea ayam kampung, dengan jumlah masing-masing pasar sebanyak 60 sampel. Periode pengambilan sampel dilakukan selama dua bulan dengan periode pengambilan setiap dua minggu sekali sebanyak empat kali. Pengambilan sampel dilakukan pada ayam kampung berumur di atas tiga bulan yang tidak divaksinasi. Isolasi virus pada telur ayam berembrio (TAB) berumur sembilan hari dan identifikasinya dengan uji hemaglutinasi (HA), uji hambatan hemaglutinasi (HI) serta *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Analisis data hasil uji antigen *Avian Influenza* dengan uji statistika non-parametrik *Chi-square* (χ^2). Hasil uji sampel swab kloaka dan trakea ayam kampung asal Pasar Beringkit positif virus *Avian Influenza* sebesar 5%, sedangkan sampel positif virus *Avian Influenza* asal Pasar Galiran sebesar 6,7%. Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa virus *Avian Influenza* terdeteksi pada ayam kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran, virus AI masih bersikulasi pada daerah asal peternakan dan penyakit AI masih mewabah di Bali.

Kata-kata kunci: *avian Influenza*; H5N1; ayam kampung; pasar hewan

ABSTRACT

Avian Influenza is a strategic infectious disease group and zoonotic. The causes is highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 subtype. The introduction of the Avian Influenza viruses H5N1 subtype can be through the market because potentially to spread Avian Influenza disease against in kampung chicken which can occurs naturally through direct contact with another birds. This research was conducted at Beringkit Animal Market, Badung Regency and Galiran Public Market, Klungkung Regency. This study aims to determine the presence of Avian Influenza virus H5N1 subtype in kampung chicken at

Beringkit Animal Market and Galiran Public Market. The samples used were 120 samples of cloaca swab and trachea swab in kampung chicken, with 60 samples in each market. The sampling period is carried out for two month every two weeks four times. Sampling was done on kampung chicken aged above three months that were not vaccinated. Isolated viruses in the embryonic chicken eggs aged nine days and identified of viruses with hemagglutination test (HA), hemagglutination inhibition test (HI) and Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The result antigen of Avian Influenza analyzed with non-parametric statistical test Chi-square (χ^2). Result of cloaca and trachea swabs in kampung chicken at Beringkit Animal Market the positive sample Avian Influenza by 5%, while the positive sample Avian Influenza at Galiran Public Market by 6,7%. Based on the result of this research can be concluded that the Avian Influenza viruses was detected in kampung chickens at Beringkit Animal Market and Galiran Public Market, AI viruses are still circulated at the area of origin of livestock farming.

Keywords: avian Influenza; H5N1; kampung chicken; animal markets

PENDAHULUAN

Ayam kampung merupakan salah satu plasma nutfah yang mempunyai potensi penggerak ekonomi perdesaan. Sistem pemeliharaan ayam kampung biasanya dilakukan secara tradisional dan semi intensif. Secara tradisional ayam kampung dipelihara dengan cara dibiarkan lepas, tanpa memperhatikan aspek teknis dan perhitungan ekonomi usahanya. Sistem pemeliharaan secara semi intensif dilakukan dengan penyediaan kandang dan pemisahan anak ayam yang baru menetas dari induknya. Pemeliharaan ayam kampung secara tradisional dapat memudahkan terjadinya kontak dengan hewan lain atau unggas liar seperti itik sebagai reservoir *Avian Influenza*. Usaha pemeliharaan secara tradisional dan semi intensif menyebabkan perkembangan dan kesehatan ayam sulit terkontrol, bahkan peternak ayam kampung juga jarang melakukan vaksinasi *Avian Influenza* sehingga sangat mungkin terinfeksi berbagai penyakit (Darmawi *et al.*, 2015).

Salah satu penyakit infeksi pada unggas yang disebabkan oleh virus adalah *Avian Influenza* (AI). *Avian Influenza* sub tipe H5N1 termasuk ke dalam kelompok penyakit menular strategis dan bersifat zoonosis mematikan baik pada unggas maupun manusia yang terinfeksi (Kencana, 2012). Penyebabnya adalah virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) sub tipe H5N1. Virus HPAI sub tipe H5N1 telah mewabah pada unggas hampir di seluruh belahan dunia pada tahun 1959 (Friza *et al.*, 2017). Di dalam penanggulangan penyakit menular strategis, *Avian Influenza* sub tipe H5N1 merupakan penyakit zoonosis prioritas. Saat ini penyakit *Avian Influenza* telah bersifat endemik di Indonesia (Kusumastuti *et al.*, 2015). Dalam upaya surveilans dan menelusuri penyebaran penyakit *Avian Influenza* perlu dilakukan secara berkala.

Introduksi virus AI ke dalam ekosistem peternakan telah menyebabkan terjadinya wabah penyakit pada unggas domestik dan dapat melalui jalur pasar. Sementara itu, tata niaga perdagangan unggas di negara berkembang seperti Indonesia masih bersifat tradisional dan berpotensi dalam penyebaran wabah penyakit (Suartha *et al.*, 2010). Fluktuasi keberadaan virus *Avian Influenza* di pasar sebagai indikator merebaknya wabah penyakit ke daerah lain, karena pasar merupakan tempat berkumpulnya ternak kemudian menyebar keseluruh wilayah.

Kondisi pasar tradisional di Indonesia terutama di wilayah Bali sanitasinya buruk (Suartha *et al.*, 2010). Pasar Umum Galiran merupakan salah satu pasar tradisional di Kabupaten Klungkung, Bali yang menyediakan berbagai ternak seperti itik, ayam, babi, dan berbagai kebutuhan lainnya (Damanik *et al.*, 2013). Pasar Hewan Beringkit di Kabupaten Badung, Bali merupakan pasar hewan terbesar di Bali yang memungkinkan semua ternak masuk ke pasar kemudian menyebar ke seluruh wilayah di Bali. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan virus *Avian Influenza* pada ayam kampung di pasar, khususnya Pasar Hewan Beringkit, dan Pasar Umum Galiran, Bali.

Keberadaan virus *Avian Influenza* dapat ditentukan tipe dan subtipe virusnya, melalui uji *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan menggunakan primer dan probe spesifik terhadap gen matriks (MA), H5 dan N1. Terdeteksinya keberadaan virus *Avian Influenza* pada kedua pasar tersebut dapat mengetahui masih adanya sirkulasi virus *Avian Influenza* berdasarkan pola penyebaran unggas meliputi pedagang, daerah asal unggas, dan pembeli unggas serta menunjukkan penyakit AI masih mewabah di Bali.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Pasar Hewan Beringkit, Kabupaten Badung dan Pasar Umum Galiran, Kabupaten Klungkung, Bali. Isolasi dan identifikasi virus dilakukan di Laboratorium Virologi, Balai Besar Veteriner Denpasar. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 120 sampel swab kloaka dan swab trakea ayam kampung, dengan jumlah masing-masing pasar sebanyak 60 sampel. Jumlah sampel yang diambil setiap minggu sebanyak 15 sampel, per pasar dari lima pedagang, setiap pedagang diambil tiga ekor ayam kampung yang memiliki ayam kampung 5-10 ekor. Pengambilan sampel dilakukan selama dua bulan dengan periode

pengambilan setiap dua minggu sekali sebanyak empat kali. Pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling*, sampel diambil secara terencana dengan pertimbangan tertentu yaitu ayam kampung umur tiga bulan dan tidak divaksinasi *Avian Influenza*. Parameter yang diamati adalah terdeteksinya virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 pada ayam kampung.

Bahan yang digunakan untuk isolasi dan identifikasi virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 yaitu Telur Ayam Berembrio (TAB) berumur sembilan hari, *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Master Mix) dan Antigen standart untuk kontrol positif AI sub tipe H5N1 (Pusvetma, Surabaya, Indonesia). Virus AI dideteksi dengan primer dan probe yakni sebagai berikut Gen Matriks (Primer: 5'-AGATGAGYCTCCTAACCGAGGTCG dan Probe: Probe Influenza/ 6158014-1/C6), H5 (Primer H5 Fwd 5'-TTGGTTACCATGCAAACAAYT-3', Primer H5 Rev 5'-TRTCTTGGGCRGTGTGTAACA-3' dan Probe H5: 5'-FAM-CAGGTTGACACAATAATGGAAAAGBHQ3-3') (Tan *et al.*, 2010) serta N1 (Primer NIF2 : GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC, Primer NIR1: TGATAGTGTCTGTTATTATGCC, Probe N1: TTGTATTTCAATACAGCCAC) (Payungporn *et al.*, 2006).

Pengambilan Sampel

Sampel swab kloaka dan trakea diambil dari ayam kampung dengan menggunakan *cotton swab* steril, kemudian dimasukkan kedalam tabung mikro yang telah berisi transport *medium* 199 *hanks*. Tabung disimpan didalam *cool box* untuk dibawa ke Laboratorium. Masing-masing sampel swab kloaka dan trakea dilakukan penggabungan sampel (*pooling*) yang disesuaikan dengan pedagang asal unggas.

Isolasi Virus AI pada Telur Ayam Berembrio (TAB)

Inokulum dibuat dengan mencampur sampel swab kloaka dan trakea dalam TAB dengan kandungan 10.000 µg/mL penisilin dan 10.000 µg/mL streptomisin dan diinkubasikan pada inkubator bersuhu 37°C selama 30 menit. Inokulum yang telah dibuat, diisolasi pada telur ayam berembrio (TAB) umur sembilan hari. Inokulasi suspensi virus dilakukan melalui ruang alantois dengan dosis 0.2 mL per telur. Telur diinkubasikan di dalam inkubator bersuhu 37°C selama empat hari dan diamati setiap hari (Ulum *et al.*, 2013). Panen cairan alantois dilakukan empat hari pascainokulasi dan selanjutnya digunakan sebagai sumber antigen. Konfirmasi virus dilakukan dengan menggunakan antigen dan serum AI standar dari Balai Besar Veteriner Denpasar dengan

uji hemaglutinasi (HA) dan uji hambatan hemaglutinasi (HI) teknik mikrotiter prosedur baku. Dalam satu *pooled* TAB positif akan dipisahkan kembali, untuk konfirmasi salah satu sampel yang positif.

Pembuatan Suspensi Eritrosit 1 %

Sebanyak 2,5 mL darah ayam diambil melalui vena *brachialis* dengan menggunakan *disposable syringe* volume 3 mL. Darah ayam selanjutnya ditampung pada tabung steril yang telah diisi antikoagulan sebanyak 2,5 mL. Eritrosit dicuci dengan cara ditambahkan 5 mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,2 ke dalam tabung yang berisi larutan darah, selanjutnya dicampur secara perlahan-lahan agar eritrosit tidak rusak. Sampel eritrosit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Eritrosit dipisahkan dari *buffycoat* dan supernatan, sehingga yang tinggal dalam tabung hanya endapan eritrosit. Proses selanjutnya dilakukan pencucian kembali eritrosit dengan cara ditambahkan PBS sampai 2/3 tabung lalu dihomogenkan. Proses pencucian eritrosit diulang kembali dengan cara yang sama sebanyak tiga kali. Endapan eritrosit kemudian diukur konsentrasinya dengan cara disentrifugasi menggunakan tabung mikrohematokrit. Eritrosit diukur *Packed Cell Volume* (PCV) lalu diencerkan dengan PBS sampai menjadi konsentrasi 1% dan siap digunakan untuk uji HA/HI (Kencana *et al.*, 2016).

Uji Hemaglutinasi (HA)

Sebanyak 0,025 mL PBS diisi pada masing-masing lubang plat mikro dengan menggunakan pipet mikro atau *microdroper*. Pada lubang pertama dan lubang kedua ditambahkan suspensi antigen yang diuji dan selanjutnya dibuat pengenceran seri kelipatan dua mulai dari lubang kedua sampai lubang ke-11 dengan menggunakan pengencer mikro. Kemudian 0,025 mL PBS ditambahkan ke dalam tiap-tiap lubang (1-12) dan selanjutnya diaduk dengan *microshaker*. Kemudian ditambahkan ke dalam setiap lubang masing-masing 0,05 mL suspensi sel darah merah 1% dan ayak kembali selama tiga detik. Plat mikro dieramkan pada suhu kamar selama satu jam dan diamati timbul atau tidaknya reaksi sel darah merah setiap 15 menit. Reaksi positif ditandai dengan adanya bentukan kristal pada sumuran plat mikro akibat reaksi hemaglutinasi. Pembacaan titer HA dilakukan dengan memiringkan plat mikro $\geq 45^\circ$. Titer HA virus dinyatakan sebagai kebalikan dari pengenceran tertinggi virus yang masih mampu menimbulkan reaksi aglutinasi secara sempurna. Pada umumnya titer HA yang digunakan pada uji HI adalah 4 unit (OIE, 2008).

Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

Sebanyak 0,025 mL PBS dimasukkan ke setiap sumuran plat mikro. Sumuran pertama diisi dengan 0,025 mL serum kemudian diencerkan secara berseri kelipatan dua mulai dari sumuran ke-1 sampai ke-10 dengan pengencer mikro dan dari sumuran nomor 10 suspensi dibuang sebanyak 0,025 mL. Masing-masing sumuran plat mikro ditambahkan dengan 0,025 mL suspensi antigen AI 4 unit HA mulai dari sumuran nomor 1 sampai nomor 11. Plat mikro diayak selama kurang lebih 15 detik dengan *mikroshaker* kemudian dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang. Suspensi eritrosit 1% ditambahkan ke dalam sumuran ke-1 sampai ke-12 sebanyak 0,025 mL lalu diayak kembali selama kurang lebih 15 detik. Plat mikro kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit sambil diamati. Pembacaan hasil uji HI dilakukan apabila pada sumuran nomor 11 sudah tampak adanya aglutinasi eritrosit dan pada sumuran nomor 12 tampak endapan eritrosit. Titer HI dibaca dengan memiringkan plat mikro 45° dan diamati ada atau tidaknya sel darah merah yang turun (*tearshaped*). Titer antibodi HI ditentukan dengan melihat pengenceran serum tertinggi yang masih mampu menghambat aglutinasi eritrosit 1% (OIE, 2008; Frisa *et al.*, 2017).

Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA virus AI dilakukan dengan menggunakan Master Mix *QIAamp*[®] *Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) sesuai dengan prosedur pembuat kit. Secara ringkas sebagai berikut: sebanyak 560 µL buffer AVL (0,56 mL/sampel) dan *carrier* RNA (56 µL/sampel) ditambahkan pada tube sesuai jumlah sampel, masukkan 140 µL sampel ke dalam tube. Campuran tersebut kemudian divortex dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 15–25°C, tambahkan 560 µL etanol 96–100% kemudian divortex selama 15 detik dan disentrifuse untuk mengendapkan sisa cairan. Pindahkan 630 µL sampel ke tube *Mini Spin Column*, kemudian disentrifuse 8000 rpm selama satu menit, cairan pada tabung column kemudian dibuang. Sisa sampel sebanyak 630 µL diambil, lalu dipindahkan ke *Mini Spin Column*, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit, cairan pada tabung column kemudian diganti atau dibuang. Sebanyak 500 µL AW1 ditambahkan, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit, cairan pada tabung column diganti atau dibuang. Sebanyak 500 µL AW2 ditambahkan kemudian disentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama tiga menit, cairan pada

tabung column diganti atau dibuang. Ulangi sentrifuse untuk mengendapkan sisa-sisa cairan dengan kecepatan 14000 rpm selama satu menit, tempatkan *Mini Spin Column* pada 1,5 mL *microcentrifuge tube*, selanjutnya tambahkan 60 μ L buffer AVE dan equilibrasi pada suhu ruang selama satu menit, kemudian sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit, RNA total siap digunakan.

Proses Amplifikasi. Deteksi virus AI dengan uji *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan dengan Master Mix *QIAamp Viral RNA Mini Kit*. Pelaksanaan qiagen RT-PCR dilakukan dengan mencampurkan ke dalam tabung PCR bahan komponen qiagen PCR yang terdiri dari 2x Reaction mix 12,5 μ L template RNA 5 μ L, Primer F (20 M) 1 μ L, Primer R (20 M) 1 μ L, Probe (10 M) 0,5 - 1 μ L, enzim *reverse transcriptase* 0,5 μ L tambahkan *RNAse free water* (dH₂O) sebanyak 4,5 μ L. Kemudian tabung PCR tersebut dimasukkan ke dalam mesin *Rotor-Gene Q/QIAGEN's Real Time PCR Cycler (Applied Biosystem)*, yang telah diprogram dengan kondisi suhu: 1) sintesis cDNA 45°C selama 10 menit, 2) pre-denaturasi 95°C selama 10 menit dan dilanjutkan 45 kali siklus program dengan kondisi 3) denaturasi 95°C selama 15 detik, 4) *annealing* 60°C selama 45 detik dan extention/elongasi 72°C selama satu menit. Hasil amplifikasi dibaca oleh mesin komputer dan ditampilkan dalam bentuk pola grafik.

Interpretasi Hasil. Pembacaan *Real Time* PCR dilakukan dengan melihat pada *Result* yang menampilkan data detektor dan *Cycle threshold* (Ct). *Cycle threshold* (Ct) adalah siklus *flouresence* yang dihasilkan dari reaksi yang memotong *threshold* dan kemudian juga dilihat data *report* dan *Amplification Plot* (AP) nya untuk mengamati hasil *running* RT-PCR. Uji dinyatakan *valid*, jika Ct value kontrol positif kurang dari 40 dan kontrol negatif tidak memiliki karakter *curve* yang sama dengan kontrol positif. Bila Ct *value* dari sampel yang diuji bernilai kurang dari 25 dinyatakan positif kuat.

Analisis Data

Analisis data jumlah antigen positif *Avian Influenza* subtipe H5N1 di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran diuji dengan uji statistika non-parametrik *Chi-square* (χ^2) menggunakan aplikasi IBM SPSS versi 25 *for windows*.

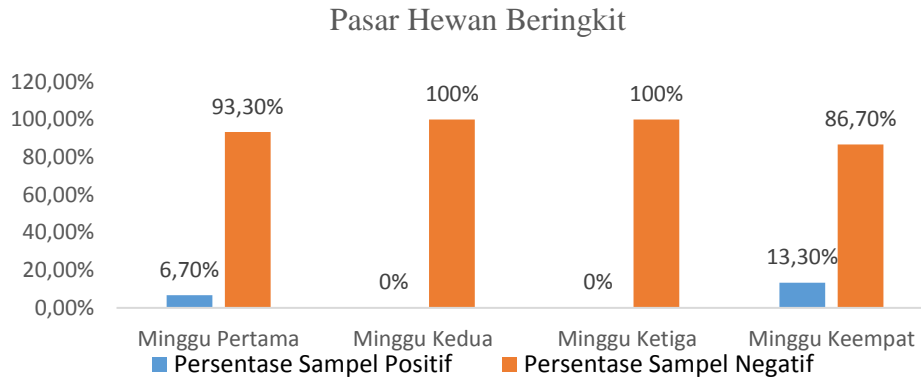
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi sampel swab kloaka dan trakea ayam kampung yang berasal dari Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran pada Telur Ayam Berembrio (TAB) digabungkan (*pooling*) berdasarkan pedagang, total *pool* yang digunakan sebanyak 40 *pooled*. Hasil uji swab kloaka dan trakea asal Pasar Hewan Beringkit terdapat tiga *pooled* positif, sedangkan sampel dari Pasar Umum Galiran terdapat empat *pooled* positif. Hasil identifikasi virus *Avian Influenza* melalui uji serologis dan uji molekuler menunjukkan bahwa ditemukannya antigen virus *Avian Influenza* pada ayam kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran. Deteksi antigen virus *Avian Influenza* setiap minggunya menunjukkan hasil yang berbeda. Hasil identifikasi virus AI subtype H5N1 di Pasar Hewan Beringkit dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi virus *Avian Influenza* (AI) subtype H5N1 di Pasar Hewan Beringkit

Waktu Pengambilan (Minggu ke-)	Pasar Beringkit							
	Jumlah Sampel	Uji HA		Uji HI		RT-PCR		
		(+)	(-)	(+)	(-)	Gen M	H5N1	
1	15	1	14	1	14	+	-	
2	15	0	15	0	15	-	-	
3	15	0	15	0	15	-	-	
4	15	2	13	2	13	+(1)	-	
Sub Total	60	3	57	3	57	2	0	

Uji serologis yang digunakan yaitu uji hemaglutinasi (HA) dan uji hambatan hemaglutinasi (HI). Pada Tabel 1 menunjukkan hasil positif di Pasar Hewan Beringkit sebanyak tiga dari 60 total sampel pada pengambilan sampel minggu pertama dan keempat. Minggu pertama satu sampel positif dengan titer virus AI sebesar 2^9 HA unit, sedangkan minggu keempat dua sampel positif dengan titer virus AI sebesar 2^{10} dan 2^6 HA unit.



Gambar 1. Diagram keberadaan virus *Avian Influenza* (AI) sub tipe H5N1 di Pasar Hewan Beringkit

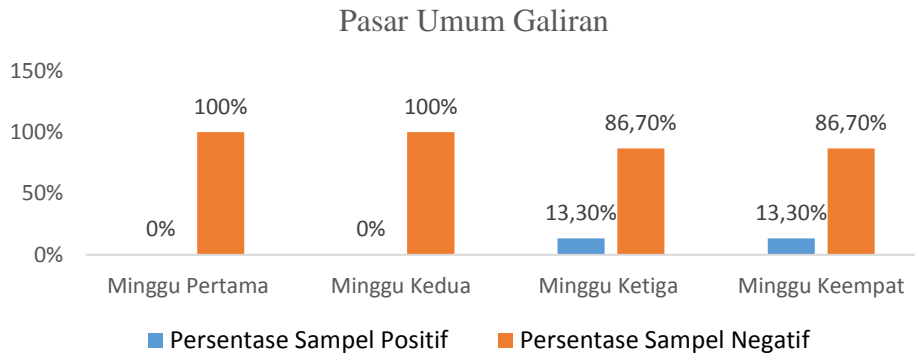
Gambar 1 menunjukkan diagram keberadaan virus *Avian Influenza* pada ayam kampung di Pasar Hewan Beringkit, Kabupaten Badung selama empat minggu. Minggu pertama menunjukkan sampel positif sebesar 6,7% dan sampel negatif sebesar 93,3%. Minggu kedua menunjukkan sampel negatif sebesar 100%.

Tabel 2. Hasil identifikasi virus *Avian Influenza* (AI) sub tipe H5N1 di Pasar Umum Galiran

Waktu Pengambilan (Minggu ke-)	Pasar Galiran						RT-PCR	
	Jumlah Sampel	Uji HA		Uji HI		Gen M	H5N1	
		(+)	(-)	(+)	(-)			
1	15	0	15	0	15	-	-	
2	15	0	15	0	15	-	-	
3	15	2	13	2	13	-	-	
4	15	2	13	2	13	-	-	
Sub Total	60	4	56	4	56	0	0	

Minggu ketiga menunjukkan sampel negatif sebesar 100%. Minggu keempat menunjukkan sampel positif sebesar 13,3% dan sampel negatif sebesar 86,7%. Total sampel positif virus *Avian Influenza* sebanyak 5,0%, sedangkan sampel negatif virus *Avian Influenza* sebanyak 95%. Tingkat keberadaan virus *Avian Influenza* setiap minggunya di Pasar Hewan Beringkit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hasil identifikasi virus AI sub tipe H5N1 di Pasar Umum

Galiran dimuat pada Tabel 2. Pada Tabel 2 ditunjukkan hasil positif di Pasar Umum Galiran sebanyak empat dari 60 total sampel pada pengambilan sampel minggu ketiga dan keempat. Minggu ketiga dua sampel positif dengan titer virus AI sebesar 2^8 dan 2^7 HA unit, sedangkan minggu keempat dua sampel positif dengan titer virus AI sebesar 2^8 dan 2^{10} HA unit.

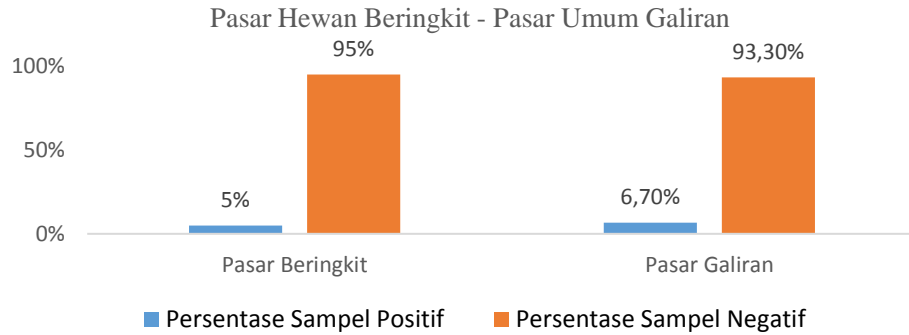


Gambar 2. Diagram keberadaan virus *Avian Influenza* (AI) subtype H5N1 di Pasar Umum Galiran

Gambar 2 menunjukkan diagram keberadaan virus *Avian Influenza* pada ayam kampung di Pasar Umum Galiran, Kabupaten Klungkung selama empat minggu. Minggu pertama menunjukkan sampel negatif sebesar 100%. Minggu kedua menunjukkan sampel negatif sebesar 100%. Minggu ketiga menunjukkan sampel positif sebesar 13,3% dan sampel negatif sebesar 86,7%. Minggu keempat menunjukkan sampel positif sebesar 13,3% dan sampel negatif sebesar 86,7%. Total sampel positif virus *Avian Influenza* sebanyak 6,7%, sedangkan sampel negatif virus *Avian Influenza* sebanyak 93,3%. Tingkat keberadaan virus *Avian Influenza* setiap minggunya di Pasar Umum Galiran tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

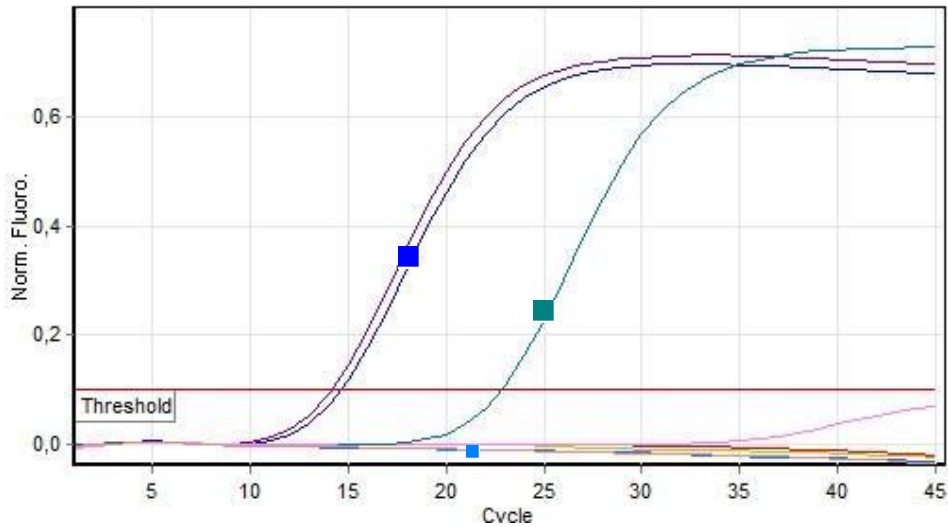
Gambar 3 menunjukkan diagram rerata keberadaan virus *Avian Influenza* setiap minggunya dari masing-masing pasar. Pasar Hewan Beringkit menunjukkan sampel positif virus *Avian Influenza* subtype H5N1 sebesar 5%, sedangkan sampel negatif virus *Avian Influenza* subtype H5N1 sebesar 95%. Pasar Umum Galiran menunjukkan sampel positif virus *Avian Influenza* subtype H5N1 sebesar 6,7%, sedangkan sampel negatif virus *Avian Influenza* subtype H5N1 sebesar 93,3%. Berdasarkan hasil analisis *chi-square* menunjukkan bahwa keberadaan virus *Avian Influenza* subtype H5N1 di Pasar Hewan Beringkit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap hasil keberadaan virus setiap minggunya dengan nilai Sig yaitu 0,431 ($P < 0,05$). Keberadaan virus *Avian*

Influenza sub tipe H5N1 di Pasar Umum Galiran tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap hasil keberadaan virus setiap minggunya dengan nilai Sig yaitu 0,066 ($P < 0,05$).



Gambar 3. Diagram keberadaan virus *Avian Influenza* (AI) sub tipe H5N1 di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran

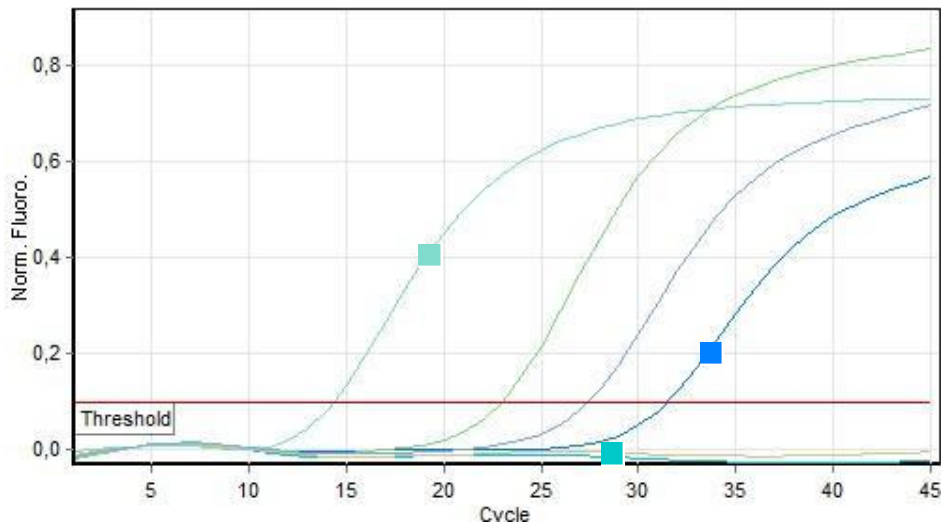
Hasil uji serologis sampel yang positif dilanjutkan dengan uji *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Uji RT-PCR merupakan uji sensitivitas yang bersifat *quantitative*, sehingga dapat mengetahui tipe dan sub tipe virus *Avian Influenza*. Hasil amplifikasi gen matriks virus *Avian Influenza* di Pasar Hewan Beringkit minggu pertama dimuat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Amplifikasi Sampel Pasar Hewan Beringkit Minggu Pertama terhadap positif Gen Matriks (Tipe-A)

Ket: ■ Kontrol Positif, ■ Kontrol negatif, ■ Sampel Beringkit minggu pertama.

Gambar 4 menunjukkan hasil positif amplifikasi gen matriks (Tipe-A) pada sampel Pasar Hewan Beringkit minggu pertama dengan nilai *Cycle threshold* (Ct) sebesar 14,63, sehingga hasil tersebut dikategorikan positif kuat. Hasil amplifikasi gen matriks virus *Avian Influenza* di Pasar Hewan Beringkit minggu keempat dimuat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Amplifikasi Sampel Pasar Hewan Beringkit Minggu Keempat terhadap positif Gen Matriks (Tipe-A)

Ket : ■ Kontrol positif, ■ Kontrol negatif, ■ Sampel Beringkit minggu keempat.

Gambar 5 menunjukkan hasil positif amplifikasi gen matriks (Tipe-A) pada sampel Pasar Hewan Beringkit minggu keempat dengan nilai *Cycle threshold* (Ct) sebesar 31,49, sehingga hasil tersebut dikategorikan positif. Hasil positif gen matriks kedua sampel tersebut, dilanjutkan dengan amplifikasi berikutnya untuk mengetahui virus *Avian Influenza* subtype H5N1. Namun, hasil dari amplifikasi subtype tersebut menunjukkan hasil negatif terhadap subtype H5N1. Hal tersebut menandakan bahwa virus *Avian Influenza* pada ayam kampung yang terdeteksi yakni virus AI tipe A.

Berdasarkan hasil isolasi ditandai dengan kematian embrio yang terjadi 2–3 hari pascainokulasi dengan menunjukkan perdarahan dan gangguan pertumbuhan yang dicirikan dengan embrio tampak lebih kecil (Kencana *et al.*, 2012). Hasil positif dapat disebabkan oleh stabilitas virus *Avian Influenza* di lingkungan sehingga kemungkinan besar tetap infeksi dalam waktu yang lama, sehingga jumlah virus pada swab kloaka dan trakea cukup banyak (Hewajuli *et*

al., 2017). Hasil negatif dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain materi genetik dari virus *Avian Influenza* yang dijumpai pada unggas sehat dan tidak menunjukkan respons pembentukan antibodi spesifik, sehingga hewan yang sehat secara klinis berpotensi sebagai penularan AI. Sebab kedua adalah kondisi awal infeksi, pada tahap ini belum terbentuk antibodi atau masih dalam jumlah atau dosis virus yang sedikit (Woolcock, 2008).

Uji serologis HA/HI menunjukkan hasil positif pada waktu pengambilan minggu pertama dan keempat asal Pasar Hewan Beringkit dan waktu pengambilan minggu ketiga dan keempat asal Pasar Umum Galiran. Hal ini menunjukkan bahwa terdeteksinya keberadaan antigen virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 pada kedua pasar tersebut berdasarkan pola penyebaran unggas di pasar unggas meliputi pedagang, daerah asal unggas, dan pembeli unggas. Sumber asal unggas yang diperdagangkan dapat diketahui dari daerah asal pedagang. Sumber unggas ini akan dapat menunjukkan daerah sumber penularan VAI jika ditemukan kasus AI yang berasal dari pasar tersebut. Hal ini sangat berpotensi dalam penyebarluasan Virus AI. Jika unggas di suatu wilayah terinfeksi AI, virus bisa disebarkan sampai ke wilayah yang jauh lintas kabupaten melalui Pasar Hewan Beringkit ataupun Pasar Umum Galiran (Antara *et al.*, 2009). Hal ini menandakan bahwa virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 masih bersirkulasi di peternakan asal unggas dan masih mewabah di Bali.

Konfirmasi lebih lanjut dengan uji RT-PCR digunakan untuk mengetahui tipe dan sub tipe virus *Avian Influenza*. *Real Time* PCR memiliki risiko lebih kecil kontaminasi silang, sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dan lebih pendek per-waktu penyelesaian sampel laboratorium (Tan *et al.*, 2010). Sensitivitas dan spesifisitas reaksi RT-PCR sangat ditentukan oleh urutan oligonukleotida primer yang digunakan (Helmi *et al.*, 2016). Hasil pemeriksaan identifikasi virus *Avian Influenza* dengan uji *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menunjukkan hasil yaitu Pasar Hewan Beringkit terdapat dua sampel positif gen matriks (Tipe A), namun hasil negatif pada sub tipe H5 sedangkan Pasar Umum Galiran menunjukkan hasil negatif terhadap gen matriks dan sub tipe H5.

Tidak ditemukannya reaksi positif RT-PCR pada sebagian sampel yang uji HA/HI positif dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain, antibodi yang ada sebagai akibat ayam kampung pernah terpapar dengan virus AI dan tidak menimbulkan sakit, atau terpapar virus pada waktu yang

sudah lama sehingga virus tidak ditemukan lagi dalam feses, jumlah virus yang ada pada swab kloaka dan trakea sangat kecil sehingga tidak terdeteksi pada saat melakukan uji RT-PCR (Spackman dan Suarez, 2008). Kegagalan dalam mendeteksi virus *Avian Influenza* subtype H5 kemungkinan disebabkan virus *Avian Influenza* yang bersirkulasi mengalami mutasi sehingga menyebabkan primer H5 menjadi tidak sensitif lagi dalam mendeteksi virus-virus *Avian Influenza* terkini. Selain faktor primer yang tidak cocok lagi, hal ini dapat disebabkan oleh kemungkinan sampel tersebut adalah virus *Avian Influenza* bukan subtype H5 namun subtype lainnya (Hewajuli *et al.*, 2017). Hal ini teramati pada penelitian ini, sampel yang positif terhadap primer matrik tetapi negatif terhadap primer H5.

Terdeteksinya antigen virus *Avian Influenza* subtype H5N1 berkaitan dengan pengaruh pasar unggas sebagai potensi penyebaran penyakit AI. Hal ini dapat disebabkan oleh tingkat biosekuriti yang rendah (Siahaan *et al.*, 2014). Upaya penanggulangan penyakit AI dengan program bioskuriti yang ketat meliputi depopulasi unggas terutama pada daerah tertular didahului dengan *stampling out* (Kencana *et al.*, 2012), kendaraan pengangkut unggas dan pegawai peternakan harus bersih, vaksinasi, penggunaan pakaian khusus (sepatu *boot* dan jas) serta pembersihan kandang dengan desinfektan (Woo dan Park, 2008). Semakin sering pedagang mendatangkan unggas untuk dijual, maka risiko penularan VAI semakin tinggi (Suartha *et al.*, 2010). Menurut Kung *et al.* (2003) adanya hari libur di pasar unggas hidup dan pengosongan kandang secara total serta pembersihan pasar terbukti efektif menurunkan tingkat isolasi virus AI. Apabila kedatangan unggas dalam waktu singkat maka masa karantina yang minimal selama 14 hari tidak terpenuhi, sehingga sulit menyatakan unggas tersebut bebas VAI secara klinis. Kegiatan penyuluhan yang sifatnya intensif sangat menunjang untuk meningkatkan pengetahuan masyarakat akan bahaya penyakit AI. Oleh karena itu perlu adanya kerjasama dan peran dari beberapa *stakeholder* seperti dinas pemerintahan, pasar, disiplin ilmu kedokteran hewan ataupun medis serta masyarakat dalam upaya mengatasi kasus *Avian Influenza* di Indonesia.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa virus *Avian Influenza* terdeteksi pada ayam kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran, Bali. Hasil

uji sampel swab kloaka dan swab trakea asal Pasar Hewan Beringkit positif virus *Avian Influenza* sebesar 5%, sedangkan sampel swab asal Pasar Umum Galiran positif virus *Avian Influenza* sebesar 6,7%. Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa virus *Avian Influenza* terdeteksi pada ayam kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran, virus AI masih bersikulasi pada daerah asal peternakan dan penyakit AI masih mewabah di Bali.

SARAN

Perlu dilakukan vaksinasi dan surveilans rutin penyakit *Avian Influenza* pada unggas khususnya ayam kampung, dan edukasi masyarakat terkait pencegahan penyakit *Avian Influenza*. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut tentang keberadaan virus *Avian Influenza* selain subtype H5N1, seperti H9, H7 dan sebagainya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan kerjasama Balai Besar Veteriner Denpasar dengan FKH Universitas Udayana. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Veteriner Denpasar yang telah memberikan kepercayaan kepada penulis dan FKH Universitas Udayana untuk ikut surveilans rutin Penyakit *Avian Influenza*.

DAFTAR PUSTAKA

- Antara IMS, Suartha IN, Wiryana IKS, Sukada IM, Wirata IW, Prasetya IGND, Dewi NMRK, Sari TK, Mahardika IGNK. 2009. Pola distribusi unggas dari pasar tradisional berperan dalam penyebaran virus flu burung. *Jurnal Veteriner* 10 (2): 104-110.
- Damanik EG, Kencana GAY, Mahardika IGNK. 2013. Seroprevalensi penyakit avian influenza pada itik di kabupaten Klungkung. *Buletin Veteriner Udayana* 5 (2): 139-146.
- Darmawi, Fakhurrazi, Wiliana, Maryulia D, Mahdi A, Faisal J, Zakiah HM. 2015. Deteksi antibodi serum ayam kampung (*gallus domesticus*) terhadap virus newcastle disease di Kota Banda Aceh. *Jurnal Medika Veterinaria* 9(1): 5-8.
- Frisa A, Elfidasari D, Murtini S. 2017. Seroprevalensi virus avian influenza subtype H5N1 pada unggas domestik peliharaan masyarakat di kawasan cagar alam pulau dua serang Provinsi Banten. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi* 4 (2): 74-82.
- Helmi TZ, Tabbu CR, Artama WT, Haryanto A, Isa M. 2016. Isolasi dan identifikasi virus avian influenza pada berbagai spesies unggas secara serologis dan molekuler. *Jurnal Kedokteran Hewan* 10(1): 86-90.

- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI, Wibawan IWT. 2017. Deteksi, isolasi, dan identifikasi *avian influenza* subtype H5N1 pada unggas di Pulau Jawa, Indonesia Tahun 2016. *Jurnal Veteriner* 18(4): 496-509.
- Kencana GAY. 2012. *Penyakit Virus Unggas*. Denpasar. Udayana University Press. Hlm. 12-29.
- Kencana GAY, Mahardika IG NK, Suardana IBK, Astawa INM, Dewi N MK, Putra G NN. 2012. Pelacakan kasus flu burung pada ayam dengan *reverse transcriptase polimerase chain reaction*. *Jurnal Veteriner* 13(3): 303-308.
- Kencana GAY, Suartha IN, Paramita NMAS, Handayani AN. 2016. Vaksin kombinasi newcastle disease dengan *avian influenza* memicu imunitas protektif pada ayam petelur terhadap penyakit tetelo dan flu burung. *Jurnal Veteriner* 17(2): 257-264.
- Kusumastuti A, Syamsidar, Paderi AZ, Nurhandayani A, Kencana GAY. 2015. Identifikasi secara serologi galur virus flu burung subipe H5N1 clade 2.1.3 dan clade 2.3.2 pada ayam petelur. *Jurnal Veteriner* 16(3): 371-382.
- Kung NY, Guan Y, Perkins NR, Bissett L, Ellis T, Sims L, Morris R, Shortridge KF, Peiris JSM. 2003. The impact of a monthly rest day on *avian influenza* virus isolation rates in retails live poultry markets in Hong Kong. *Avian Diseases* 47: 1037-1041
- Office International des Epizooties (OIE). 2008. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: Office International Des Epizooties.
- Payungporn S, Chutinimtkul S, Chaisingh A, Damwongwontanapokin S, Buranathai C, Amonsin A, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2006. Single step multiplex real-time rt-pcr for H5N1 influenza a virus detection. *Journal of Virological Methods* 131(2): 1114-1117.
- Siahaan LL, Suartha IN, Mahardika IG NK. 2014. Seroprevalensi *avian influenza* pada itik di Pasar Hewan Beringkit dan peternakan di Badung. *Indonesia Medicus Veterinus* 3(2): 147-154.
- Spackman E, Suarez DL. 2008. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods in Molecular Biology* 436: 19-26.
- Suartha IN, Antara IMS, Wiryana IKS, Sukada IM, Wirata IW, Dewi N MRK, Mahardika IG NK. 2010. Peranan pedagang unggas dalam penyebaran virus *avian influenza*. *Jurnal Veteriner* 11: 220-225.
- Tan TT, Pawestri HA, My NN, Minh HV, Syahrial H, Vu TN, Doorn HRV, Wertheim HFL, Vinh CNV, Quang HD, Farrar JJ, Tinh HT, Sedyaningsih ER, Jong MDD. 2010. A real-time RT PCR for detection of clade 1 and 2 H5N1 influenza a virus using locked nucleic acid (LNA) taqman probes. *Virology Journal* 7(1): 1-5.
- Ulum F, Susanti R, Bintari SH. 2013. Isolasi dan identifikasi virus *avian influenza* subtype h5n1 pada unggas di pasar tradisional Semarang. *Journal of Biology & Biology Education (Biosaintifika)* 5(2): 130-137.
- Woo JT, Park BK. 2008. Seroprevalence of LPAIV (H9N2) and associated risk factor in the gyeonggi-do of Korea during 2005-2006. *Journal of Veterinary Science* 9(2): 161-168.
- Woolcock PR. 2008. *Avian influenza* virus isolation and propagation in chicken eggs. *Methods in Molecular Biology* 436: 35-46