

Deteksi, Isolasi, dan Identifikasi *Avian influenza* Subtipe H5N1 pada Unggas di Pulau Jawa, Indonesia Tahun 2016

(*DETECTION, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF H5N1 SUBTYPE AVIAN INFLUENZA IN POULTRY IN JAVA ISLAND, INDONESIA, 2016*)

**Dyah Ayu Hewajuli^{1,2}, Ni Luh Putu Indi Dharmayanti²,
I Wayan Teguh Wibawan³**

^{1,3}Mikrobiologi Medik, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus Dramaga, Institut Pertanian Bogor,
Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

²Departemen Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner,
Badan Litbang, Kementerian Pertanian
Jl. RE Martadinata No 30, PO Box 151, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16114
Telp (0251)8331048, 8334456, Fax (0251)8336425;
Email: dhewajuli@yahoo.com

ABSTRAK

Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 membahayakan peternakan unggas di Indonesia sampai saat ini. Sejak virus *Avian influenza clade 2.3.2* ditemukan pada unggas air tahun 2012, kasus kematian pada unggas air masih terjadi sampai sekarang. Perubahan kondisi cuaca ekstrim dengan curah hujan tinggi dan kejadian banjir akhir-akhir ini, peternakan unggas skala kecil yang tidak menerapkan biosekuriti secara ketat dan vaksinasi yang tepat, dan rantai pemasaran unggas pada pedagang pengumpul meningkatkan kasus dan penyebaran *Avian influenza* pada unggas. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi virus *Avian influenza* pada unggas di Jawa Tengah, Jawa Barat, Jawa Timur dan Banten pada tahun 2016. Penelitian ini dilakukan dengan metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk mengidentifikasi virus *Avian influenza* subtipe H5N1 pada unggas. Penelitian ini juga dilakukan dengan metode isolasi virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dari unggas ke telur ayam bertunas (TAB) umur 9-11 hari. Hasil penelitian menunjukkan sebanyak 24 *pool* sampel bereaksi positif terhadap RT-PCR dengan primer matrik, sebanyak 15 *pool* sampel bereaksi positif terhadap RT-PCR dengan primer H5 dan sebanyak 11 *pool* sampel bereaksi positif terhadap RT-PCR dengan primer N1. Sebanyak dua isolat virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat diisolasi dari sampel yang dikoleksi dari Kota Serang dan sebanyak enam isolat virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dari kasus *Avian influenza* pada unggas air di Kabupaten Lamongan. Titer EID₅₀ isolat virus *Avian influenza* subtipe H5N1 adalah di atas 10⁸. Simpulan penelitian adalah virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat dideteksi pada sampel usap kloaka, trakea, dan organ unggas yang dikoleksi di Kabupaten Pekalongan, Kabupaten Brebes, Kota Serang, dan Kabupaten Lamongan tahun 2016. Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat ditumbuhkan dan diisolasi dari sampel yang dikoleksi dari Kota Serang dan Kabupaten Lamongan tahun 2016. Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat dideteksi, diisolasi, dan diidentifikasi pada unggas di Pulau Jawa, Indonesia pada tahun 2016.

Kata-kata kunci: virus *Avian influenza* subtipe H5N1; isolat lapang; unggas; RT-PCR

ABSTRACT

H5N1 subtype *Avian influenza* has harmed for poultry in Indonesia currently. Since clade 2.3.2 *Avian influenza* has been found in waterfowl from 2012, mortality of waterfowl has been occurred until now. Change of extreme weather condition with high rainfall and flood, small poultry that does not adjust stricted biosecurity and without vaccination program, and chain sale of poultry on traders can increase case and transmission of *Avian influenza* in poultry. The objective of study was to isolate and identify *Avian influenza* on poultry in Central Java, West Java, East Java and Banten in 2016. The study was

conducted by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method to identify H5N1 subtype *Avian influenza* on poultry. The study was also conducted by isolation of H5N1 subtype *Avian influenza* from poultry into 9-11 days of embrionated chicken eggs. The study result represented that a number of 24 *pool* samples were positive reacted on RT-PCR with matrix primer, a total of 15 *pool* samples was positive reacted on RT-PCR with H5 primer and as many as 11 *pool* samples were positive reacted on RT-PCR with N1 primer. Two isolates of H5N1 subtype *Avian influenza* were isolated samples collected from the Serang City and six isolates of H5N1 subtype *Avian influenza* from *Avian influenza* case on waterfowl in Lamongan District. EID_{50} titer isolates of *Avian influenza* virus subtype H5N1 were $> 10^8$. The conclusion of this study was H5N1 subtype *Avian influenza* detected on samples collected from cloacal, trachea swab and organs of poultry from Pekalongan District, Brebes District, Serang City, and Lamongan District in 2016. H5N1 subtype *Avian influenza* can be grown and isolated from samples collected of Serang City and Lamongan District in 2016. H5N1 subtype *Avian influenza* can be detected, isolated, and identified in poultry in Java Island, Indonesia in 2016.

Keywords: H5N1 subtype *Avian influenza*; field isolate; poultry; RT-PCR

PENDAHULUAN

Virus flu burung atau *avian influenza* (AI) berdasarkan *sequence* genetik dan kemampuannya menimbulkan penyakit pada unggas dikarakterisasi menjadi *Highly Pathogenic Avian influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian influenza* (LPAI) (Senne *et al.*, 1996). Virus *Avian influenza* mempunyai beberapa sub tipe berdasarkan protein *Haemagglutinase* (H) dan *Neuraminidase* (N). Virus *Avian influenza* sub tipe H5 dan H7 bersifat patogen tetapi tidak semua sub tipe H5 dan H7 bersifat patogen. Virus *Avian influenza* sub tipe H5 dan H7 bersifat patogen apabila mempunyai motif *multiple basic asam amino* pada daerah *cleavage site* HA (OIE, 2015).

Wabah flu burung sub tipe H5 pada unggas pertama kali terjadi di Indonesia pada tahun 2003 dan awal tahun 2004. Angka kesakitan dan kematian pada unggas (ayam ras petelur, ayam ras pedaging, ayam kampung dan itik) yang ditimbulkan wabah ini adalah 90%. Penyebarannya berlangsung sangat cepat sehingga virus *flu burung* menulari hampir di seluruh Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2004). Virus flu burung masih bersirkulasi di Indonesia karena virus *Avian influenza* tidak hanya mampu dideteksi pada peternakan unggas tetapi juga pada unggas dan produk unggas di pasar tradisional yang menjual produk tersebut (Hartawan *et al.*, 2014). Virus ini dapat dideteksi dan diidentifikasi pada unggas dan lingkungan di sekitar kasus *Avian influenza* pada manusia di Indonesia (Hewajuli *et al.*, 2014).

Sebagian besar virus *Avian influenza* yang bersirkulasi di Indonesia termasuk HPAI karena mempunyai motif *multiple basic asam amino* (QRERRRKKR//G) pada daerah *cleavage site* HA (Smith *et al.*, 2006). Karakter genetik

virus *Avian influenza* di Indonesia mempunyai tiga jenis motif urutan asam amino di daerah *cleavage site* yaitu PQRERRRKKR//G, PQRESRRKKR//G, dan PQREGRRKR//G (Dharmayanti *et al.*, 2008). Sebagian besar virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 yang ditemukan pada unggas air (itik) di Indonesia mempunyai motif QRERRRKKR tetapi sebagian kecil bermotif QRESRRKKR (Susanti *et al.*, 2008). Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2.1 yang menginfeksi itik domestik di Vietnam mempunyai motif asam amino QRERRRKR/GLF (Bui *et al.*, 2014).

Beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa virus HPAI H5N1 tidak menimbulkan gejala klinis pada unggas air karena merupakan inang alami (*reservoir*) virus tersebut. Namun demikian, virus HPAI dapat menimbulkan penyakit yang parah dengan gangguan saraf sampai dengan kematian pada unggas air (Capua dan Mutinelli, 2001). Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 sebelumnya tidak bersifat patogen pada unggas air di Indonesia tetapi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 menyebabkan wabah kematian itik pada akhir tahun 2012. Virus ini sebelumnya belum pernah dilaporkan bersirkulasi di Indonesia karena pre dominan virus H5N1 di Indonesia adalah virus H5N1 *clade* 2.1 yang terbagi menjadi *clade* 2.1.1; 2.1.2; 2.1.3. (Wibawa *et al.*, 2012; Dharmayanti *et al.*, 2013).

Virus HPAI H5N1 dinyatakan endemik di hampir seluruh wilayah di Indonesia sejak ditemukan pertama kali pada akhir tahun 2003 dan awal tahun 2004 (Dharmayanti *et al.*, 2004). Meskipun laporan kasus *Avian influenza* pada unggas menurun secara bertahap dari tahun 2007 ke 2016, kasus *Avian influenza* pada unggas selalu terjadi berulang setiap tahun sejak ditemukan tahun 2003 (Ditjennak, 2016). Virus

Avian influenza masih menjadi ancaman bagi peternakan unggas di Indonesia sampai saat ini. Sejak virus *Avian influenza* baru *clade* 2.3.2 ditemukan pada unggas air tahun 2012, kasus kematian pada unggas air masih terjadi sampai sekarang.

Pola kejadian kasus *Avian influenza* biasanya meningkat pada musim hujan. Perubahan kondisi cuaca ekstrim dengan curah hujan tinggi dan kejadian banjir akhir-akhir ini, peternakan unggas skala kecil yang belum menerapkan biosekuriti secara ketat dan vaksinasi yang tepat, dan rantai pemasaran unggas pada pedagang pengumpul berpotensi meningkatkan kasus dan penyebaran *Avian influenza* pada unggas. Kondisi tersebut memerlukan monitoring sirkulasi virus *Avian influenza* untuk mengetahui situasi terkini di Indonesia (Ditjennak 2016; 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada unggas di Pulau Jawa pada tahun 2016 sehingga menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya yang berguna untuk program pengendalian kasus *Avian influenza* di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk mengidentifikasi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada unggas dan isolasi ke telur ayam bertunas (TAB) umur 9-11 hari untuk mengisolasi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada unggas. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, dengan fasilitas Laboratorium BioSafety Level 3 (BSL 3).

Sampel

Sampel usap kloaka, trakea, dan organ diambil dari unggas (ayam kampung, ayam ras, itik, entok, dan angsa) yang hidup maupun mati di Kabupaten Pekalongan, dan Brebes (Jawa Tengah), Kabupaten Cirebon (Jawa Barat), Kota Serang (Banten) serta Kabupaten Lamongan (Jawa Timur). Sampel usap kloaka dari unggas diperoleh dari tiga peternakan itik di Kabupaten Pekalongan, 10 peternakan itik di Kabupaten Brebes, lima peternakan itik di Kabupaten Cirebon, 23 pedagang unggas di Kota Serang, tiga ekor itik kiriman Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Kabupaten Lamongan. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Mei sampai dengan Oktober tahun 2016. Perolehan sampel usap kloaka, trakea dan organ dari berbagai Kabupaten di Jawa Tengah, Jawa Barat, Banten, dan Jawa Timur disajikan pada Tabel 1.

Sampel usap kloaka selanjutnya disimpan dalam media transport (DMEM) dan antibiotik (penisilin 2000 unit/mL, sterptomisin 2 mg/mL). Usap kloaka, trakea atau organ dalam tabung yang berisi media transport *divortex* selama 15 detik, media tersebut selanjutnya dibuang dan sampel dalam medium transport dihomogenisasi dengan vortek serta disentrifugasi dengan kecepatan 2500-3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dapat digunakan untuk isolasi RNA maupun isolasi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada TAB. Untuk penanganan sampel organ dilakukan dengan organ digerus dalam mortal steril dengan *pestle* steril kemudian buat suspensi 10% dengan media transport DMEM. Selanjutnya, supernatan dan organ dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500-3500 rpm

Tabel 1. Jumlah usap kloaka, usap trakea, dan organ unggas yang diperoleh dari Kabupaten Pekalongan (Jawa Tengah), Brebes (Jawa Tengah), Cirebon (Jawa Barat), Kota Serang (Banten), dan Kabupaten Lamongan (Jawa Timur) tahun 2016

No	Kabupaten/Kota	Jumlah Sampel		
		Usap Trakea	Usap Kloaka	Organ
1	Pekalongan	-	55	-
2	Brebes	-	142	-
3	Cirebon	-	65	-
4	Serang	-	108	-
5	Lamongan	3	3	15
	Total	3	373	15

selama 15 menit. Supernatan kemudian diambil dan digunakan dalam proses isolasi RNA maupun isolasi virus *Avian influenza* subtype H5N1 pada TAB.

Setiap 2-3 sampel usap kloaka, trakea atau organ dikumpulkan (*pooled*) menjadi satu berdasarkan spesies dan pemilik, sehingga didapatkan 18 *pool* inokulum dari Kabupaten Pekalongan, 44 *pool* inokulum dari Kabupaten Brebes, 19 *pool* inokulum dari Kabupaten Cirebon, 46 *pool* inokulum dari Kabupaten Cirebon, 21 *pool* inokulum dari Kabupaten Lamongan. Sampel usap kloaka, trakea dan organ segera diperiksa setelah diinkubasi selama 1-2 jam dalam suhu ruang. Apabila sampel tidak memungkinkan untuk dikerjakan secepatnya, maka sampel disimpan pada suhu 4°C selama empat hari. Pada penyimpanan lebih dari empat hari, sampel disimpan pada suhu -80°C (OIE, 2015).

Uji Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan QIAmp RNA viral mini kit (*Qiagen*) yang tersedia secara komersial dan penggunaannya sesuai instruksi penggunaan dengan sedikit modifikasi. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript III one Step RT-PCR system (Life Technology)*. Primer matrik, dan program RT-PCR dilakukan sesuai dengan Fouchier *et al.* (2000), Primer H5, dan program RT-PCR yang digunakan sesuai dengan Lee *et al.* (2001), sedangkan primer N1 dan program RT-PCR yang digunakan sesuai dengan Wright *et al.* (1995). Apabila sampel tidak dapat diamplifikasi dengan primer H5, dan program RT-PCR dilakukan sesuai dengan Lee *et al.* (2001), sampel diuji dengan primer H5, dan program RT-PCR sesuai dengan Dharmayanti *et al.* (2016). Hasil amplifikasi divisualisasi dengan UV *transiluminator* dan didokumentasikan.

Isolasi Virus *Avian influenza* Subtipe H5N1 pada Telur Ayam Bertunas (TAB)

Sampel usap kloaka, trakea maupun organ yang menunjukkan hasil positif RT-PCR terhadap primer matrik, selanjutnya ditumbuhkan pada TAB umur 9-11 hari. Sebanyak 200 µL inokulum sampel usap kloaka, trakea maupun organ diinjeksikan pada ruang alantois TAB umur 9-11 hari, selanjutnya pengamatan terhadap kematian embrio dilakukan sampai dengan empat hari

pascainfeksi. Cairan alantois dipanen dari TAB umur 9-11 hari yang mengalami kematian. Cairan alantois diuji aglutinasi cepat terhadap sel darah merah (RBC) 5%, kemudian dikonfirmasi terhadap RT-PCR dengan primer H5 sesuai dengan Lee *et al.* (2001) dan Dharmayanti *et al.* (2016), dan RT-PCR dengan primer N1 sesuai dengan Wright *et al.* (1995).

Uji Egg Infective Dose 50 (EID₅₀) Isolat Virus *Avian influenza* Subtipe H5N1

Isolat virus *Avian influenza* H5N1 yang diuji EID₅₀ diencerkan berseri dengan kelipatan 10 menggunakan pelarut *Phosphat Buffer Saline* (PBS) yang mengandung antibiotik (penisilin 2000 unit/mL, streptomisin 2 mg/mL) dengan pH netral. Setiap pengenceran disuntikkan 0,1 mL pada TAB umur 9-11 hari, kemudian diinkubasi dan diamati sampai dengan empat hari pascainfeksi. Hasil EID₅₀ dihitung dan ditentukan dengan rumus Spearman Karber.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel-sampel usap kloaka, usap trakea, dan organ dari unggas sakit yang berasal dari Kabupaten Pekalongan, Brebes (Jawa Tengah), Cirebon (Jawa Barat), Kota Serang (Banten), dan Kabupaten Lamongan (Jawa Timur) setelah diuji dengan metode RT-PCR disajikan pada Tabel 2, 3, 4, 5, dan 6.

Hasil uji RT-PCR terhadap sampel dari usap kloaka itik dari Kabupaten Pekalongan, Brebes dan Cirebon memperlihatkan bahwa sebanyak 12 *pool* sampel dari Kabupaten Pekalongan, 40 *pool* sampel dari Kabupaten Brebes, 19 *pool* sampel dari Kabupaten Cirebon menunjukkan hasil negatif terhadap primer M sehingga tidak dilanjutkan untuk pengujian RT-PCR, lebih lanjut dengan primer H5 dan N1. Namun demikian, terdapat enam *pool* sampel yang dikoleksi dari Kabupaten Pekalongan, empat *pool* sampel yang diperoleh dari Kabupaten Brebes menunjukkan hasil positif terhadap primer H5. Lebih lanjut, sebanyak lima *pool* sampel dari Kabupaten Pekalongan bereaksi positif terhadap primer N1 tetapi terdapat satu *pool* sampel dari Kabupaten Brebes menunjukkan hasil negatif terhadap primer N1. Meskipun demikian, terdapat lima sampel dari usap kloaka itik diidentifikasi sebagai *Avian influenza* subtype H5N1 karena mampu mengamplifikasi primer H5 dan N1,

Tabel 2. Hasil uji RT-PCR sampel usap kloaka itik yang berasal dari Kabupaten Pekalongan, Jawa Tengah tahun 2016

No	Nama	Alamat			Spesies	Sampel Usap	Pool Sampel Usap	Hasil RT-PCR		
		Peternak	Kelurahan	Kecamatan				Kabupaten	M	H5
1	Slamet	Salit	Kajen	Pekalongan	Itik	15	5	1	0	tidak diuji
2	Eko	Kalipancur	Bojong	Pekalongan	Itik	15	5	2	2	2
3	Ranti	Pododadi	Karanganyar	Pekalongan	Itik	25	8	3	3	3
Total						55	18	6	5	5

Keterangan: RT-PCR= *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Tabel 3. Hasil uji RT-PCR sampel usap kloaka itik yang berasal dari Kabupaten Brebes, Jawa Tengah tahun 2016

No	Nama	Alamat			Spesies	Sampel Usap	Pool Sampel Usap	Hasil RT-PCR		
		Peternak	Kelurahan	Kecamatan				Kabupaten	M	H5
1	Dinas	Limangan	Brebes	Brebes	Itik	35	15	2	1	0
2	Harjo	Limangan	Brebes	Brebes	Itik	15	5	0	tidak diuji	tidak diuji
3	Suntoro	Wanasari	Wanasari	Brebes	Itik	20	6	0	tidak diuji	tidak diuji
4	Tarodi	Wanasari	Wanasari	Brebes	Itik	15	5	2	0	tidak diuji
5	Sudin	Wanasari	Wanasari	Brebes	Itik	7	2	0	tidak diuji	tidak diuji
6	Surono	Pakijangan	Bulukamba	Brebes	Itik	10	3	0	tidak diuji	tidak diuji
7	Kliwon	Pakijangan	Bulukamba	Brebes	Itik	10	3	0	tidak diuji	tidak diuji
8	Rahmat	Kecipir	Losari	Brebes	Itik	10	3	0	tidak diuji	tidak diuji
9	Rokib	Kecipir	Losari	Brebes	Itik	10	3	0	tidak diuji	tidak diuji
10	Suali	Kecipir	Losari	Brebes	Itik	10	3	0	tidak diuji	tidak diuji
Total						142	44	4	1	0

Keterangan: RT-PCR= *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Tabel 4. Hasil uji RT-PCR sampel usap kloaka itik yang Berasal dari Kabupaten Cirebon, Jawa Barat tahun 2016

No	Nama	Alamat			Spesies	Sampel Usap	Pool Sampel Usap	Hasil RT-PCR		
		Peternak	Kelurahan	Kecamatan				Kabupaten	M	H5
1	Rohadi	Bangun Dua	Kelangenan	Cirebon	Itik	11	3	0	tidak diuji	tidak diuji
2	Sukida	Bangun Dua	Kelangenan	Cirebon	Itik	9	3	0	tidak diuji	tidak diuji
3	Subadi	Bangun Dua	Kelangenan	Cirebon	Itik	10	3	0	tidak diuji	tidak diuji
4	Catu	Kreo	Kelangenan	Cirebon	Itik	15	4	0	tidak diuji	tidak diuji
5	Didi	Kreo	Kelangenan	Cirebon	Itik	20	6	0	tidak diuji	tidak diuji
Total						65	19	0	0	0

Keterangan: RT-PCR= *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Tabel 5. Hasil uji RT-PCR sampel usap kloaka unggas yang berasal dari Kota Serang, Banten tahun 2016

No	Nama	Alamat			Spesies	Sampel Usap	Pool Sampel Usap	Hasil RT-PCR		
		Pedagang	Pasar	Kecamatan				Kota	M	H5
1	Sayuti	Kalodran	Walangtaka	Serang	Itik	4	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Kampung	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
2	Japar	Kalodran	Walangtaka	Serang	A.Petelur	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
3	Buang	Kalodran	Walangtaka	Serang	Itik	7	3	0	tidak diuji	tidak diuji
4	Samsuri	Kalodran	Walangtaka	Serang	A.Kampung	5	1	1	0	tidak diuji
5	Dulkamid	Kalodran	Walangtaka	Serang	Itik	4	2	1	1	0
					Entok	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
6	Cholik	Kalodran	Walangtaka	Serang	Itik	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					Entok	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Kampung	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
7	Darsah	Kalodran	Walangtaka	Serang	Entok	5	2	0	tidak diuji	tidak diuji
8	Aat	Kalodran	Walangtaka	Serang	A.Kampung	3	1	1	1	1
9	Orib	Kalodran	Walangtaka	Serang	Entok	3	1	1	1	1
10	Davi	Kalodran	Walangtaka	Serang	Entok	4	2	0	tidak diuji	tidak diuji
11	Pendi	Kalodran	Walangtaka	Serang	Itik	4	2	0	tidak diuji	tidak diuji
12	Hapipi	Kalodran	Walangtaka	Serang	Entok	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					Itik	7	3	0	tidak diuji	tidak diuji
13	Abidin	Kalodran	Walangtaka	Serang	ItikEntok	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
14	Munir	Kalodran	Walangtaka	Serang	Itik	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Kampung	3	1	1	1	1
15	Dody	Kalodran	Walangtaka	Serang	Entok	3	1	1	1	1
					Itik	4	2	2	0	tidak diuji
					A.Kampung	2	1	1	0	tidak diuji
16	Sobari	Kalodran	Walangtaka	Serang	Entok	3	1	0	tidak diuji	tidak diuji
17	Saipudin	Rau	Serang	Serang	Entok	1	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Pedaging	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Kampung	2	1	1	0	tidak diuji
18	Muhtadi	Rau	Serang	Serang	Itik	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					Entok	3	1	1	1	0
19	Irfan	Rau	Serang	Serang	Itik	3	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Kampung	2	1	1	1	0
20	Udin	Rau	Serang	Serang	A.Kampung	3	1	0	tidak diuji	tidak diuji
21	Baimudi	Rau	Serang	Serang	Angsa	1	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					Entok	3	1	0	tidak diuji	tidak diuji
22	Fais Putra	Rau	Serang	Serang	A.Petelur	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
					A.Kampung	2	1	0	tidak diuji	tidak diuji
23	H.Pendi	Rau	Serang	Serang	A.Pedaging	3	1	0	tidak diuji	tidak diuji
Total						108	46	12	7	4

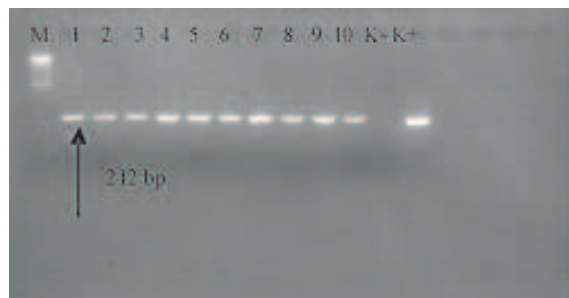
Keterangan: RT-PCR= *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Tabel 6. Hasil uji RT-PCR sampel usap kloaka, trakea dan organ itik yang berasal dari Kabupaten Lamongan, Jawa Timur tahun 2016

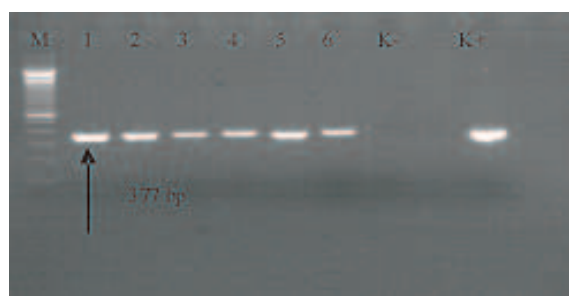
No	Nama Dinas	Spesies	Sampel Usap Kloaka/Trakea	Sampel Organ	Hasil RT-PCR		
					M	H5	N1
1	Kiriman Dinas	Itik 1	2	5	2	2	2
2	Lamongan	Itik 2	2	5	0	0	0
3		Itik 3	2	5	0	0	0
Total			6	15	2	2	2

Keterangan: RT-PCR= *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

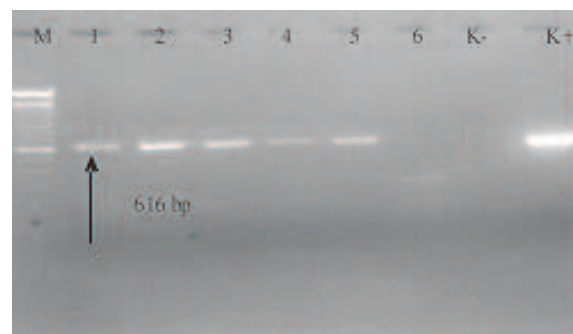
karena diperoleh potongan fragmen 212 bp dengan primer M, 377 bp dengan primer H5 dan 616 bp dengan primer N1. Hasil amplifikasi terhadap primer M, H5 dan N1 dari sampel Kabupaten Pekalongan dan Brebes disajikan pada Gambar 1, 2, dan 3.



Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan primer M. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 6 adalah sampel dari Kabupaten Pekalongan yang mampu mengamplifikasi primer M dan lubang 7 sampai 10 adalah sampel dari Kabupaten Brebes yang mampu mengamplifikasi primer M, K(-) adalah kontrol negatif, dan K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 377 bp

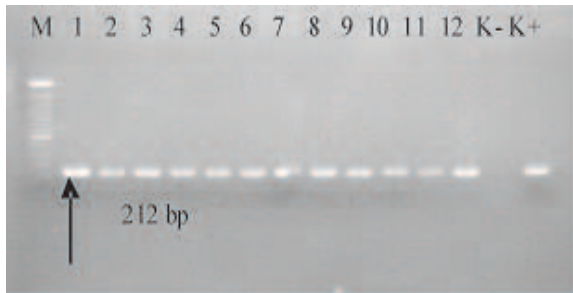


Gambar 2. Hasil amplifikasi dengan primer H5. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 5 adalah sampel dari Kabupaten Pekalongan yang mampu mengamplifikasi primer H5, Lubang 6 adalah sampel dari Kabupaten Brebes yang mampu mengamplifikasi primer H5, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 377 bp

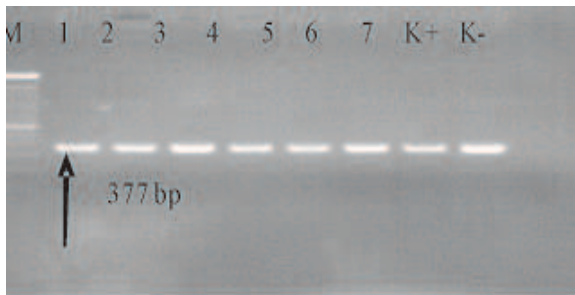


Gambar 3. Hasil amplifikasi dengan primer N1. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 5 adalah sampel dari Kabupaten Pekalongan yang mampu mengamplifikasi primer N1, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 616 bp

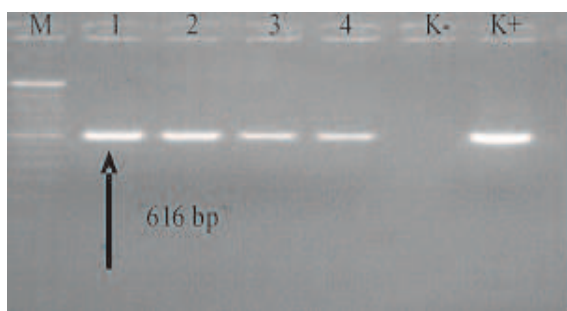
Hasil uji RT-PCR terhadap *pool* sampel usap kloaka unggas (itik, entok, angsa, ayam petelur, ayam pedaging, ayam kampung) yang berasal dari Kota Serang memperlihatkan bahwa sebanyak 34 *pool* sampel negatif terhadap primer M sehingga uji RT-PCR dengan primer H5 dan N1 tidak dilanjutkan terhadap sampel tersebut tetapi sebanyak 12 *pool* sampel yang diuji menunjukkan hasil positif terhadap primer M. Selanjutnya, 12 *pool* sampel yang positif terhadap primer M diuji RT-PCR dengan primer H5 menunjukkan hasil bahwa sebanyak tujuh *pool* sampel positif terhadap primer H5. Dari tujuh *pool* sampel tersebut diuji dengan RT-PCR primer N1 menunjukkan hasil sebanyak empat *pool* sampel positif terhadap primer N1. Semua sampel tersebut yang teridentifikasi positif terhadap primer M, H5, dan N1 ditunjukkan dengan potongan fragmen 212 bp, 377 bp, 616 bp. Hasil amplifikasi terhadap primer M, H5, dan N1 dari sampel Kota Serang disajikan pada Gambar 4, 5, dan 6.



Gambar 4. Hasil amplifikasi dengan primer M. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 12 adalah sampel dari Kota Serang yang mampu mengamplifikasi primer M, K(-) adalah kontrol negatif dan K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 212 bp



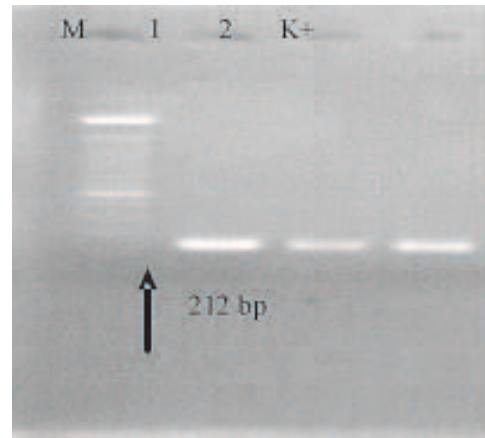
Gambar 5. Hasil amplifikasi dengan primer H5. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 7 adalah sampel dari Kota Serang yang mampu mengamplifikasi primer H5, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 377 bp



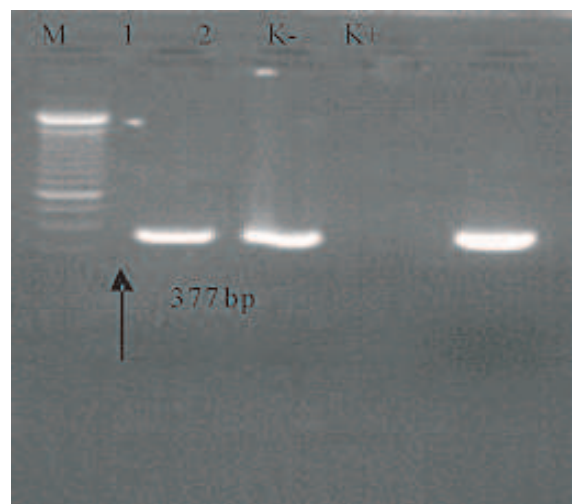
Gambar 6. Hasil amplifikasi dengan primer N1. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 4 adalah sampel dari Kota Serang yang mampu mengamplifikasi primer N1, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 616 bp

Pengujian RT-PCR primer Matrik, H5, dan N1 terhadap satu ekor itik dewasa yang dinekropsi kemudian diperoleh sebanyak tujuh sampel organ (*pool* ginjal, hati, limpa, jantung,

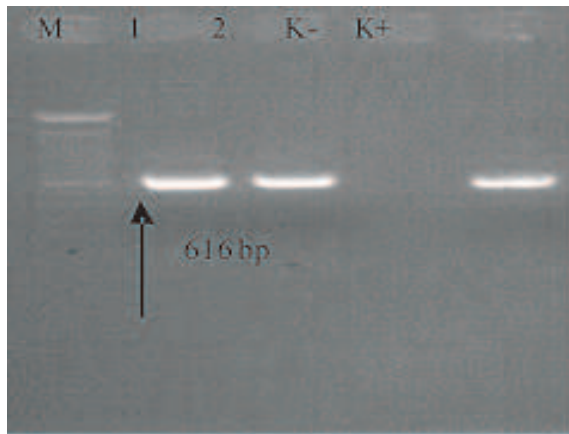
usus, proventrikulus, otak, trakea, paru, usap kloaka, dan usap trakea) serta dua ekor itik dara yang dinekropsi kemudian diperoleh sebanyak 14 sampel organ (*pool* ginjal, hati, limpa, jantung, usus, proventrikulus, otak, trakea, paru, usap kloaka, dan usap trakea) menunjukkan hasil bahwa sebanyak dua *pool* sampel positif terhadap *Avian influenza* primer M dan sub tipe H5N1. Hasil amplifikasi terhadap primer M, H5, dan N1 dari sampel Kota Serang disajikan pada Gambar 7, 8, dan 9.



Gambar 7. Hasil amplifikasi dengan primer M. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 2 adalah sampel dari Kabupaten Lamongan yang mampu mengamplifikasi primer M, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 212 bp



Gambar 8. Hasil amplifikasi dengan Primer H5. Lubang M adalah *moleculer weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 2 adalah sampel dari Kabupaten Lamongan yang mampu mengamplifikasi primer H5, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplikon adalah 377 bp



Gambar 9. Hasil amplifikasi dengan primer N1. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 2 adalah sampel dari Kabupaten Lamongan yang mampu mengamplifikasi Primer N1, K(+) adalah kontrol positif. Besar ampikon adalah 616 bp

Kasus wabah *Avian influenza* pada unggas yang terjadi dalam kurun waktu dan daerah tertentu dapat menyebabkan penyebaran virus *Avian influenza* dalam jumlah besar di lingkungan tersebut (Vong *et al.*, 2008). Seekor unggas yang terinfeksi virus *Avian influenza* dapat mengeluarkan (*shedding*) virus sebesar 10^{10} EID₅₀ dalam sehari selama 6-7 hari, baik itu melalui ekskresi kloaka maupun sekresi trakea (Webster *et al.*, 1978). Bahkan, Hinshaw *et al.* (1980) melaporkan bahwa *shedding* virus melalui ekskresi feses dapat terjadi dalam kurun waktu yang lebih lama (28 hari) sehingga semakin lama periode ekskresi virus *Avian influenza* maka kemungkinan penyebaran virus *Avian influenza* ke lingkungan semakin besar. Namun demikian, *shedding* virus AI subtipe H5N1 dapat pula melalui kloaka dan trakea dengan titer tinggi serta mencapai puncaknya pada hari ketiga setelah infeksi (Strum-Ramirez *et al.*, 2005). Unggas yang terinfeksi virus *Avian influenza* dapat disertai dengan gejala klinis atau tanpa menunjukkan gejala klinis (Easterday *et al.*, 1997; Webster dan Kawaoka, 1988). Seperti hasil penelitian dalam makalah ini, sebagian besar sampel positif *Avian influenza* berasal dari usap kloaka dari unggas tanpa menunjukkan gejala klinis sakit. *Shedding* virus *Avian influenza* dari unggas ke lingkungan melalui ekskresi feses kemungkinan dapat mencemari lingkungan dalam jumlah besar serta masih dapat tetap bertahan di lingkungan dalam kurun waktu dan kondisi tertentu. Ekskresi feses ke lingkungan dapat menularkan secara tidak

langsung virus *Avian influenza* dari unggas yang terinfeksi ke unggas lain di sekitarnya.

Kondisi fisik lingkungan seperti panas dan kekeringan berpengaruh terhadap stabilitas virus *Avian influenza* di lingkungan. Virus *Avian influenza* dapat diinaktifkan pada suhu 40°C selama 15 menit (Chumpolbanchorn *et al.*, 2006; Zarkov dan Urumova, 2013). Radiasi sinar ultraviolet secara langsung dapat merusak virus *Avian influenza* (Zou *et al.*, 2013). Pada penelitian ini, pengambilan sampel dari Kabupaten Pekalongan, Brebes, Cirebon dilakukan pada bulan Mei (2016) pada musim kemarau dengan curah hujan ringan. Musim kemarau dengan kondisi lingkungan yang panas dan kering kemungkinan berperan terhadap sirkulasi dan penyebaran virus *Avian influenza* di lingkungan. Virus *Avian influenza* yang diekskresikan dari unggas yang terinfeksi ke lingkungan melalui feses dapat dengan cepat diinaktifasi oleh paparan sinar ultraviolet, panas dan kekeringan. Virus *Avian influenza* yang sudah tidak aktif tersebut tidak mampu ditularkan kembali ke unggas lain. Keadaan seperti ini dapat dilihat dari hasil pengujian RT-PCR pada sampel yang berasal dari Kabupaten Pekalongan, Brebes, dan Cirebon yang menunjukkan sebagian besar bereaksi negatif terhadap virus AI primer M dan subtipe H5N1.

Selanjutnya, pengambilan sampel dari Kota Serang dan Lamongan dilakukan pada bulan September sampai dengan Oktober (2016) dengan curah hujan lebih besar dan masa peralihan dari musim kemarau ke musim penghujan. Musim penghujan dengan kelembapan yang tinggi, paparan sinar ultraviolet secara langsung berkurang berperan terhadap stabilitas virus *Avian influenza* di lingkungan sehingga kemungkinan besar virus *Avian influenza* pada feses tetap infeksi dalam kurun waktu lama. Virus *Avian influenza* dalam feses segar dengan kelembapan yang konstan dapat bertahan selama 14 hari pada suhu 4°C, selama enam hari pada suhu 15°C, dan dua hari pada suhu 22°C (Zarkov dan Urumova, 2013). Kubangan-kubangan air banyak terbentuk di tanah pada musim hujan. Kubangan air tersebut yang tercemari sekresi feses dari unggas yang terinfeksi virus *Avian influenza* dapat menularkan virus *Avian influenza* ke unggas lain yang kontak dengan sumber air tersebut. Virus *Avian influenza* yang mencemari air tersebut dapat bertahan berbulan-bulan (Franklin *et al.*, 2011). Kondisi ini berperan terhadap penularan dan penyebaran virus *Avian*

influenza ke unggas lain sehingga kemungkinan besar virus *Avian influenza* lebih banyak dideteksi dan diidentifikasi pada sampel yang diambil pada musim hujan. Hal ini terlihat pada hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa 12 *pool* inokulum usap (Kota Serang), dan dua *pool* inokulum usap (Kabupaten Lamongan) positif terhadap virus *Avian influenza* primer M dan subtipe H5N1.

Hasil pengujian RT-PCR pada sampel penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian sampel yang terdeteksi virus *Avian influenza* tipe A, tetapi sampel tidak teridentifikasi subtipe H5 dengan menggunakan primer Lee *et al.* (2001). Hasil diagnosis lebih akurat dan untuk menghindari hasil negatif semu akibat ketidakcocokan primer dengan virus lapang, sebaiknya diagnosis subtipe virus AI menggunakan lebih dari satu set primer (Dharmayanti *et al.* 2016). Pada penelitian ini, primer H5 yang dirancang Dharmayanti *et al.* (2016) digunakan sebagai uji konfirmasi. Set primer H5 yang dirancang oleh Lee *et al.* (2001) telah banyak digunakan untuk deteksi dan identifikasi virus *Avian influenza* subtipe H5 di Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2011a; Dharmayanti *et al.*, 2011b; Hewajuli dan Dharmayanti, 2012; Hewajuli dan Dharmayanti, 2014; Hartawan dan Dharmayanti, 2014).

Deteksi dan identifikasi virus *Avian influenza* subtipe H5 di Indonesia dengan menggunakan set primer H5 dari Lee *et al.* (2001) mampu dengan baik mendeteksi virus *Avian influenza* atau sampel lapang sejak kasus *Avian influenza* tahun 2003 sampai dengan 2011, tetapi mulai tahun 2012 primer ini tidak sensitif lagi dalam mendeteksi virus *Avian influenza* subtipe H5 yang bersirkulasi di Indonesia. Kegagalan dalam mendeteksi virus *Avian influenza* subtipe H5 kemungkinan disebabkan virus *Avian influenza* yang bersirkulasi sepanjang tahun 2012 sampai dengan sekarang mengalami mutasi yang bertepatan dengan lokasi disain primer sehingga menyebabkan primer H5-Lee menjadi tidak sensitif lagi dalam mendeteksi virus-virus *Avian influenza* terkini. Primer H5-Lee mempunyai keberhasilan terendah dalam mengidentifikasi sampel lapang, kemampuan deteksi primer H5-NLP lebih tinggi dari primer H5-Lee, sedangkan primer H5-ID mempunyai kemampuan deteksi yang tertinggi (Dharmayanti *et al.*, 2016).

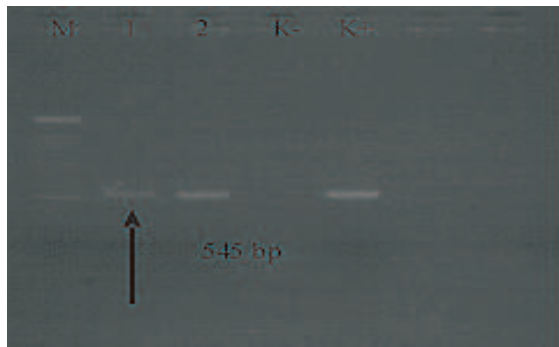
Selain faktor primer yang tidak cocok lagi, metode RT-PCR yang tidak berhasil mendeteksi subtipe virus *Avian influenza* dapat disebabkan

kemungkinan sampel tersebut adalah virus *Avian influenza* bukan subtipe H5 namun subtipe lainnya. Hal ini teramati pada penelitian ini, sampel yang positif terhadap primer matrik tetapi negatif terhadap primer H5 Lee *et al.* (2001), kemudian dilakukan uji konfirmasi dengan menggunakan rancangan primer H5 (Dharmayanti *et al.* 2016), hasilnya tetap menunjukkan negatif terhadap H5. Hal ini menegaskan bahwa sampel tersebut bukan merupakan virus *Avian influenza* subtipe H5 tetapi kemungkinan virus *Avian influenza* subtipe yang lain.

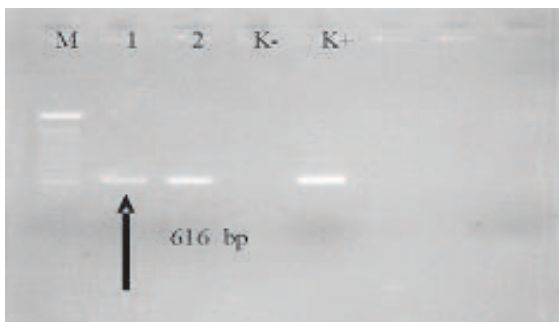
Sebanyak 12 *pool* sampel usap kloaka dari Kabupaten Pekalongan, Brebes, dan Cirebon yang positif RT-PCR terhadap primer matrik diinokulasikan ke TAB umur 9-11 hari. Selanjutnya, hasil uji hemaglutinasi (HA) cepat menunjukkan negatif sampai pasase ketiga. Sampel yang dikoleksi dari Kabupaten Pekalongan, Brebes, dan Cirebon tidak tumbuh pada TAB umur 9-11 hari.

Sebanyak 10 *pool* sampel usap kloaka dari Kota Serang yang positif RT-PCR terhadap primer matrik diinokulasi ke TAB umur 9-11 hari. Uji HA cepat memperlihatkan positif pada dua cairan alantois, tetapi negatif pada delapan cairan alantois. Hasil RT-PCR tersebut menunjukkan bahwa kedua cairan alantois tersebut positif terhadap primer H5 dan N1 sehingga diperoleh dua isolat *Avian influenza* subtipe H5N1 (A/chicken/Indonesia/Serang/Srg7/2016(H5N1), A/muscovyduck/Indonesia/Serang/Srg17/2016 (H5N1) dari koleksi sampel di Kota Serang. Hasil uji konfirmasi RT-PCR primer H5 dan N1 serta uji HA terhadap kedua isolat tersebut disajikan pada Gambar 10, 11, dan 12.

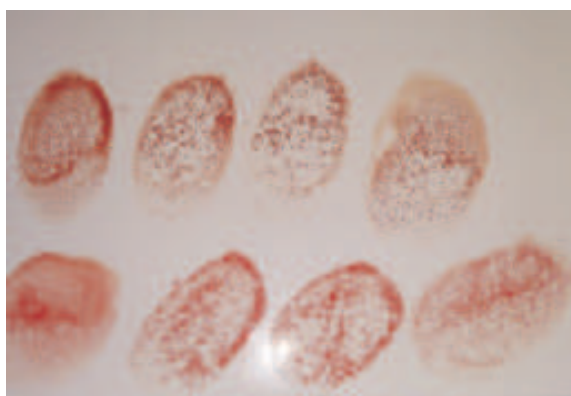
Hasil Uji HA cepat pada cairan alantois yang dipanen dari TAB umur 9-11 hari yang diinokulasi sampel usap kloaka dari Lamongan memperlihatkan positif terhadap empat cairan alantois yang diinokulasi organ itik (*pool* (ginjal, hati, limpa, jantung), otak, paru trakea, proventrikulus), cairan alantois dari usap kloaka dan trakea tetapi sebanyak satu cairan alantois dari organ itik (usus) negatif terhadap uji HA cepat. Hasil RT-PCR dengan primer H5N1 menunjukkan positif terhadap keenam cairan alantois yang positif HA sehingga diperoleh enam isolat virus *Avian influenza* subtipe H5N1 ((A/duck/Indonesia/Lamongan/GHLJ1a/2016(H5N1, A/duck/Indonesia/Lamongan/Prov1c/2016(H5N1), A/duck/Indonesia/Lamongan/Otak1d/2016H5N1), A/



Gambar 10. Hasil amplifikasi dengan primer H5. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 2 adalah cairan alantois isolat AI (A/chicken/Indonesia/Serang/Srg7/2016(H5N1), A/muscovy duck/Indonesia/Serang/Srg17/2016(H5N1) dari Kota Serang yang mampu mengamplifikasi primer H5, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplicon adalah 545 bp

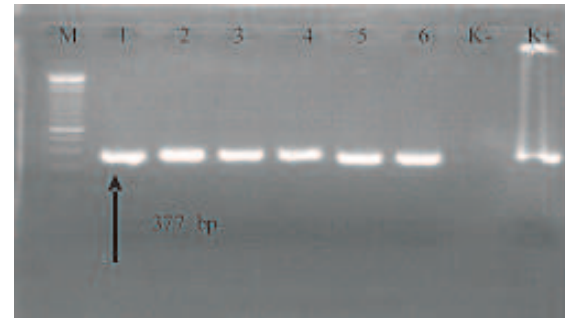


Gambar 11. Hasil amplifikasi dengan primer N1. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 2 adalah cairan alantois isolat AI dari Kota Serang ((A/chicken/Indonesia/Serang/Srg7/2016(H5N1), A/muscovy duck/Indonesia/Serang/Srg17/2016(H5N1)) yang mampu mengamplifikasi primer N1, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplicon adalah 616 bp

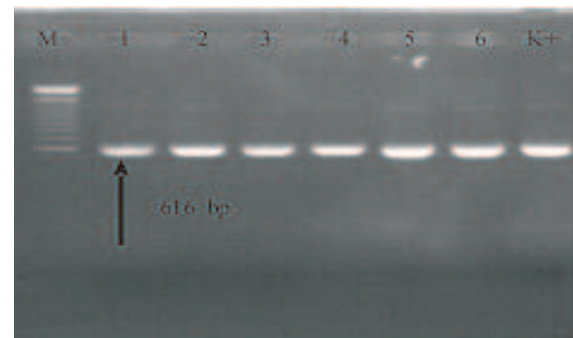


Gambar 12. Hasil uji hemaglutinasi (HA) cepat isolat virus *Avian influenza* subtipe H5N1 yang diisolasi dari Kota Serang dan Kabupaten Lamongan

duck/Indonesia/Lamongan/Trakeaparule/2016(H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Swabkloaka1f/2016H5N1), A/duck/Indonesia/Lamongan/Lmn Tr/2016 (H5N1)) dari koleksi sampel di Kabupaten Lamongan. Hasil uji konfirmasi RT-PCR primer H5 dan N1 terhadap keenam isolat tersebut disajikan pada Gambar 13 dan 14.



Gambar 13. Hasil amplifikasi dengan primer H5. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 6 adalah cairan alantois isolat AI ((A/duck/Indonesia/Lamongan/GHLJ1a/2016(H5N1), A/duck/Indonesia/Lamongan/Prov1c/2016(H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Otak1d/2016H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Trakeaparule/2016(H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Swabkloaka1f/2016H5N1), A/duck/Indonesia/Lamongan/Lmn Tr/2016 (H5N1)) dari Kabupaten Lamongan yang mampu mengamplifikasi primer H5, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplicon adalah 377 bp



Gambar 14. Hasil amplifikasi dengan primer N1. Lubang M adalah *molecular weight* 100 bp, Lubang 1 sampai 6 adalah cairan alantois isolat AI ((A/duck/Indonesia/Lamongan/GHLJ1a/2016(H5N1), A/duck/Indonesia/Lamongan/Prov1c/2016(H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Otak1d/2016H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Trakeaparule/2016(H5N1),A/duck/Indonesia/Lamongan/Swabkloaka1f/2016H5N1), A/duck/Indonesia/Lamongan/Lmn Tr/2016 (H5N1)) dari Kabupaten Lamongan yang mampu mengamplifikasi primer N1, K(+) adalah kontrol positif. Besar amplicon adalah 616 bp

Uji EID₅₀ dilakukan pada beberapa isolat virus *Avian influenza* subtipe H5N1 yang mampu diisolasi pada penelitian tahun 2016 yaitu A/chicken/Indonesia/Serang/Srg7/2016(H5N1), A/muscovyduck/Indonesia/Serang/Srg17/2016 (H5N1), dan A/duck/Indonesia/Lamongan/Lmn Tr/2016 (H5N1). Hasil uji EID₅₀ menunjukkan bahwa isolat A/chicken/Indonesia/Serang/Srg7/2016(H5N1) adalah 10^{8,82}/mL, isolat A/muscovyduck/Indonesia/Serang/Srg17/2016 (H5N1) adalah 10^{9,5}/mL dan isolat A/duck/Indonesia/Lamongan/Lmn Tr/2016 (H5N1) adalah 10^{8,82}/mL.

Tidak tumbuhnya beberapa sampel usap kloaka dan organ dari Kabupaten Pekalongan, Brebes, Cirebon, Kota Serang dan Kabupaten Lamongan yang diinokulasikan ke TAB umur 9-11 hari kemungkinan disebabkan virus *Avian influenza* yang berada dalam sampel usap kloaka tersebut inaktif atau jumlah virus tidak cukup untuk menginfeksi tetapi RNA dari virus *Avian influenza* masih dapat teridentifikasi dengan menggunakan uji RT-PCR. Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan virus menjadi inaktif, yaitu 1) Virus tidak mampu berkembang biak sendiri tetapi tergantung pada mekanisme metabolisme sel inang dan ribosom untuk bereplikasi dan berkembang biak. Dalam hal ini, virus sebagai parasit obligat mempunyai sifat lebih mudah mati apabila sudah berada di luar tubuh inang. Namun demikian, virus akan mempunyai stabilitas kelangsungan hidup lebih lama dalam lingkungan air yang membeku dan tetap bersifat infeksi sampai pencairan terjadi kembali (Shoham *et al.*, 2012); 2) Virus *Avian influenza* infeksi yang berada di lingkungan dapat diinaktifkan dengan suhu tinggi dan pH asam. Seperti hasil penelitian Lu *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa virus infeksi *Avian influenza* dalam feses segar dapat diinaktivasi hanya dalam waktu kurang dari 30 menit pada suhu 56°C dan pH 2 yang bersifat asam; 3) Siklus pencairan (*thawing*) juga berpengaruh terhadap titer virus *Avian influenza* sehingga dapat menyebabkan penurunan stabilitas virus *Avian influenza* (Nazir *et al.*, 2010). Proses pencairan-bekuan sampel saat penanganan berpengaruh terhadap perbanyakan virus *Avian influenza* pada TAB.

SIMPULAN

Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat dideteksi pada sampel usap kloaka unggas yang

dikoleksi tahun 2016 di Kabupaten Pekalongan, Kabupaten Brebes, dan Kota Serang. Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 diidentifikasi pada sampel unggas air yang diperoleh pada kasus *Avian influenza* di Kabupaten Lamongan tahun 2016. Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat ditumbuhkan dan diisolasi dari sampel yang dikoleksi dari Kota Serang dan Kabupaten Lamongan. Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 dapat dideteksi, diisolasi dan diidentifikasi pada unggas di Pulau Jawa, Indonesia pada tahun 2016.

SARAN

Beberapa tindakan utama untuk pengendalian penyebaran virus *Avian influenza* pada unggas adalah isolasi semua unggas yang terdeteksi *Avian influenza*, upaya pemusnahan terhadap unggas yang positif *Avian influenza*, desinfeksi lingkungan seperti kandang, halaman, selokan yang teridentifikasi positif *Avian influenza*, tidak memelihara unggas dengan cara mengumbar di pemukiman yang padat penduduk, kesadaran menerapkan pola hidup yang sehat dan bersih dari masyarakat seperti menggunakan masker ketika menangani unggas hidup dan segera cuci tangan setelahnya. Surat edaran dari Direktur Peternakan dan Kesehatan Hewan No. 22037/PD.510/F/07/2013 tanggal 22 Juli 2013 tentang peningkatan kewaspadaan pengendalian *Avian influenza* pada unggas dan No. 12141/PK.320/F/02/2016 tanggal 12 Februari 2016 tentang kesiagaan pengendalian *Avian influenza* di musim hujan sebaiknya diterapkan dengan sebaik-baiknya di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari APBN tahun 2016 dengan kode proposal penelitian 1806.109.002.054B. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan kerjasamanya kepada Nana Suryana, SE, Teguh Suyatno, Amd. serta laboran di Kelompok Penelitian Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, khususnya yang bekerja di penelitian *Avian influenza* sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bui VN, Dao TD, Nguyen TTH, Nguyen LT, Bui AN, Trinh DQ, Pham NT, Inui K, Runstadler J, Ogawa H, Nguyen KV, Imai K. 2014. Pathogenicity of an H5N1 *Avian influenza* virus isolated in Vietnam in 2012 and reliability of conjunctival samples for diagnosis of infection. *Virus Res* 179: 125-132
- Capua I, Mutinelli F. 2001. Mortality in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) associated with natural infection with a *Highly Pathogenic Avian influenza* virus of H7N1 subtype. *Avian Pathology* 30: 179-183
- Chumpolbanchorn K, Suemanotham N, Siripara N, Puyati B, Chaichoune K. 2006. The effect of temperature and UV light on infectivity of *Avian influenza* virus (H5N1, Thai field strain) in chicken fecal manure. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37(1): 102-105
- Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Wiyono A, Indriani R, Darminto. 2004. Identifikasi virus *Avian influenza* isolat Indonesia dengan reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9: 136-142
- Dharmayanti NLPI, Indriani R, Hartawan R, Hewajuli DA, Ratnawati A, Darminto. 2008. Pemetaan genetik virus *Avian influenza* di Indonesia 2007. *Jurnal Biologi Indonesia* 5 (2): 155-171
- Dharmayanti NLPI, Ibrahim F, Darminto, Soebandrio A. 2011a. Influenza H5N1 Virus of Birds Surrounding H5N1 Human Cases Have Specific Characteristics on the Matrix Protein. *Hayati J Biosci* 18(2): 82-90
- Dharmayanti NLP I, Samaan G, Ibrahim F, Indriani R, Darminto, Soebandrio A. 2011b. The genetic drift of Indonesian *Avian influenza* A H5N1 viruses during 2003-2008. *Microbiologi Indonesia* 5(2): 68-80
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA, Hardiman, Wibawa H, Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik molekuler dan patogenitas virus H5N1 clade 2.3.2. asal Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 18(2): 99-113
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA. 2016. Pengembangan sejumlah primer untuk reverse transcriptase polymerase chain reaction guna melacak virus flu burung di Indonesia. *J Veteriner* 17 (2): 183-196
- Ditjennak. 2016. Perkembangan kejadian *Avian influenza* (AI) pada unggas kondisi sampai dengan 2016. *ditjennak.pertanian.go.id*. <http://ditjennak.pertanian.go.id/berita-720-perkembangan-kejadian-avian-influenza-ai-pada-unggas-kondisi-sd-31-juli2016.html>
- Ditjenak 2017. Perkembangan kasus *Avian influenza* (AI) pada unggas kondisi sampai dengan 31 Januari 2017. URC PHMS Pusat Dirkeswan. <http://keswan.ditjennak.deptan.go>. diakses tanggal 1 Juli 2017
- Hewajuli DA, Dharmayanti, NLPI. 2014. Identifikasi flu burung H5N1 pada unggas di sekitar kasus *Avian influenza* pada manusia tahun 2011 di Bekasi. *J Veteriner* 15(1): 68- 78
- Hartawan R, Dharmayanti NLPI. 2014. Sirkulasi virus flu burung sub tipe H5N1 di pasar tradisional di Jawa Timur tahun 2012. 2014. *Berita Biologi* 7(1): 97-106
- Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. 1980. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Canadian Journal Microbiology* 26: 622-629
- Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. 1997. Influenza. Dalam : Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, (eds.). *Diseases of Poultry*. Ames. Iowa State University Press. Hlm. 583-605
- Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology* 38(11): 4096-4101
- Franklin AD, Vandalen KK, Huyvaert KP. 2011. *Avian influenza* virus in aquatic environments: an ecological perspective. Dalam: Majumdar SK, Brenner FJ, Huffman JE, Mclean RG, Panah AI, Pietrobon PJ, Keeler SP, Shive SE (Eds). *Pandemic influenza viruses :Science, surveillance and public health*. Pennsylvania. The Pennsylvania Academy of Science.

- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of *Avian influenza* viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 97: 13-22
- Lu H, Castro AE, Pennick K, Liu J, Yang Q, Dunn P, Weinstock D, Henzler D. 2003. Survival of *Avian influenza* virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Diseases* 47: 1015-1021
- Nazir J, Haumacher R, Abbas MD, Marschang RE. 2010. Use of filter carrier technique to measure the persistence of *Avian influenza* viruses in wet environmental conditions. *Journal of Virological Methods* 170: 99-105
- Office International des Epizooties (OIE). 2015. *Avian influenza* (Infection with *Avian influenza* viruses). *OIE Terrestrial Manual 2015* chapter 2.3.4: 1-21
- Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. 1996. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 *Avian influenza* viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Disease* 40: 425-437
- Shoham D, Jahangir A, Ruenphet S, Takehara K. 2012. Persistence of *Avian influenza* Viruses in Various Artificially Frozen Environmental Water Types. Hindawi Publishing Corporation *Influenza Research and Treatment*. Volume 2012, Article ID 912326, 11 pages doi:10.1155/2012/912326
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, DeJong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassa SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350: 258-268
- Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Chaisingh A, Long HT, Naipospos TSP, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG. 2005. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *Journal of Virology* 79: 11269-11279
- Susanti R, Soejoedono RD, Mahardika IGNK, Wibawan IWT, Suhartono MT. 2008. Analisis molekuler gen penyandi hemagglutinin virus highly pathogenic *Avian influenza* subtipe H5N1 isolat unggas air. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 13(3): 229-239
- Vong S, Ly S, Mardy S, Holl D, Buchy P. 2008. Environmental contamination during influenza A virus (H5N1) outbreaks, Cambodia, 2006. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1303-1305
- Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84: 268-278
- Webster RG, Kawaoka Y. 1988. Avian influenza. *Critical Review Poultry Biology* 1: 211-246
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, Rohmah A, Andesyha E, Romlah, Daulay RSD, Safitria K. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Timur: Identifikasi sebuah clade baru virus *Avian influenza* subtipe H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner* 12: 2-9
- Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1180-1184
- Zarkov IS, Urumova VS. 2013. Effects of humidity and temperature on avian influenza virus H6N2 persistence in faecal samples from experimentally infected ducks (*Anas platyrhynchos*). *Revue Médical Vétérinaire* 164(7): 343-347
- Zou S, Guo J, Gao R, Dong L, Zhou J, Zhang Y, Dong J, Bo H, Qin K, Shu Y. 2013. Inactivation of the novel *Avian influenza* A (H7N9) virus under physical conditions or chemical agents treatment. *Virology Journal* 10: 289 doi:10.1186/1743-422X-10-289