

## **Penerapan Metode Diagnosis Cepat Virus Avian Influenza H5N1 dengan Metode *Single Step Multiplex* RT-PCR**

(APPLICATION OF RAPID DIAGNOSIS METHOD FOR AVIAN INFLUENZA VIRUS  
H5N1 USING SINGLE STEP MULTIPLEX RT-PCR)

**Aris Haryanto<sup>1</sup>, Ratna Ermawati<sup>1</sup>, Medania Purwaningrum<sup>1</sup>,  
Dini Wahyu Yudianingtyas<sup>4</sup>, Michael Haryadi Wibowo<sup>2</sup>, Charles Rangga Tabbu<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Biokimia, <sup>2</sup>Bagian Mikrobiologi, <sup>3</sup>Bagian Patologi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281. Telp. 62-274-560865,  
<sup>4</sup>Laboratorium Virologi, Balai Besar Veteriner (BBVet) Maros, Sulawesi Selatan.  
E-mail: arisharyanto@yahoo.com.

### **ABSTRACT**

Avian influenza (AI) virus is a segmented single stranded (ss) RNA virus with negative polarity and belong to the *Orthomyxoviridae* family. Diagnose of AI virus can be performed using conventional methods but it has low sensitivity and specificity. The objective of the research was to apply rapid, precise, and accurate diagnostic method for AI virus and also to determine its type and subtype based on the Single Step Multiplex Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction targeting M, H5, and N1 genes. In this method M, H5 and N1 genes were simultaneously amplified in one PCR tube. The steps of this research consist of collecting viral RNAs from 10 different AI samples originated from Maros Disease Investigation Center during 2007. DNA Amplification was conducted by Simplex RT-PCR using M primer set. Then, by single step multiplex RT-PCR were conducted simultaneously using M, H5 and N1 primers set. The RT-PCR products were then separated on 1.5% agarose gel, stained by ethidium bromide and visualized under UV transilluminator. Results showed that 8 of 10 RNA virus samples could be amplified by Simplex RT-PCR for M gene which generating a DNA fragment of 276 bp. Amplification using multiplex RT-PCR method showed two of 10 samples were AI positive using multiplex RT-PCR, three DNA fragments were generated consisting of 276 bp for M gene, 189 bp for H5 gene, and 131 bp for N1. In this study, rapid and effective diagnosis method for AI virus can be conducted by using simultaneous Single Step Multiplex RT-PCR. By this technique type and subtype of AI virus, can also be determined, especially H5N1.

Key words : H5N1, Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR), Single Step Multiplex RT-PCR, agarose gel electrophoresis.

### **ABSTRAK**

Virus avian influenza (AI) adalah virus RNA bersegmen, beruntai tunggal dengan polaritas negatif yang termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*. Diagnosis terhadap virus AI dapat dilakukan dengan beberapa metode konvensional yang sudah ada sebelumnya, namun demikian metode-metode tersebut memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk penerapan metode diagnosis cepat AI yang sekaligus dapat menentukan tipe dan sub tipe virus AI dengan metode yang berbasis *Single Step Multiplex Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* pada gen M, H5, dan N1, yang dilakukan secara simultan dalam satu tabung reaksi RT-PCR, sehingga proses amplifikasi akan menjadi lebih efisien dari segi waktu dan biaya. Tahapan penelitian meliputi koleksi sebanyak 10 sampel RNA virus AI dari isolat virus di Balai Besar Veteriner (BBVet) Maros tahun 2007. Amplifikasi DNA secara *Simplex Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR) pada gen M (Matriks) dan amplifikasi DNA secara simultan berbasis *Single Step Multiplex Reverse Transcriptase PCR* pada gen M, H5, dan N1. Selanjutnya dilakukan pemisahan fragmen DNA hasil amplifikasi secara elektroforesis pada gel agarose 1,5 % dengan pewarnaan *ethidium bromide*, dan terakhir dilakukan analisis hasil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 8 dari 10 sampel virus AI yang memberikan hasil positif pada tahap *Simplex RT-PCR*, yang ditunjukkan dengan adanya fragmen DNA gen M sebesar 276 bp. Hasil dari *Single Step Multiplex RT-PCR* 2 sampel yang positif terinfeksi virus AI sub tipe H5N1, yang ditunjukkan dengan adanya 3 fragmen DNA sebesar 276 bp untuk gen M, 189 bp untuk gen H5, dan 131 bp untuk gen N1. Metode amplifikasi RT-PCR berbasis *Single Step Multiplex RT-PCR* yang dilakukan secara simultan ini memberikan hasil yang cepat dan efektif serta dapat digunakan untuk menentukan tipe dan sub tipe virus AI, khususnya H5N1.

Kata kunci : H5N1, *Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR), *Single Step Multiplex RT-PCR*, elektroforesis gel agarose.

## PENDAHULUAN

*Avian Influenza* (AI) adalah penyakit pada unggas yang sangat menular, disebabkan oleh virus influenza tipe A, termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* (Lamb dan Krug, 2001). Virus influenza tipe A merupakan virus RNA bersegmen, berantai tunggal (ss) dengan polaritas negatif. Virus tersebut mempunyai amplop pada bagian permukaan dan terdiri dari 8 segmen genom dengan panjang total mencapai 14 kb yang menyandi sekitar 10 protein virus. Delapan segmen tersebut adalah PB1 (PB1 dan PB1-F2), PB2, PA, HA, NP, NA, M (M1 dan M2), serta NS (NS1 dan NS2) (Horimoto dan Kawaoko, 2001; Whittaker, 2001). Hemagglutinin (HA) virus disandi dalam segmen ke-4 dan neuraminidase (NA) dalam segmen ke-6. Segmen yang lain menyandi protein internal virus dan protein lain yang penting untuk viabilitas virus seperti misalnya segmen 8 yang menyandi NS1 yaitu suatu protein nonstruktural yang berfungsi dalam melakukan hambatan terhadap respon antiviral dari inang (Lamb, 1989).

Virus influenza diklasifikasikan menjadi 3 tipe yaitu A, B, dan C berdasarkan pada perbedaan antigenik pada nukleoprotein (NP) dan protein matriks (M), dan virus AI termasuk dalam tipe A. Penentuan subtipe virus AI ditetapkan berdasarkan antigenesitas pada 2 glikoprotein utama pada permukaan virus yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Namun, dari ketiga tipe tersebut hanya tipe A yang berpotensi menimbulkan pandemik (Swayne dan Suarez, 2000; Liu, 2005). Berdasarkan struktur protein permukaan virus, saat ini telah ditemukan 16 subtipe HA (H1-H16) dan 9 subtipe NA (N1-N9) dari virus influenza A (Wright dan Webster, 2001; Fouchier et al., 2005; OIE, 2008).

Protein lain yang dimiliki oleh virus ini antara lain nukleoprotein (NP) yang menjadi protein struktural utama, protein membran/matriks (M1 dan M2), protein polimerase (PA, PB1, dan PB2), dan protein nonstruktural (NS1 dan NS2) (Chan, 2002; Yuen et al., 1998; Guan et al., 2002; Peiris et al., 2004). Glikoprotein HA membentuk tonjolan (*spike*) pada permukaan virion, berfungsi sebagai media untuk berikatan dengan reseptor pada sel inang dan memasuki sel inang kemudian terjadi fusi dengan membran sel inang. Protein NA membentuk struktur pada permukaan partikel virus dan mengkatalisis pembebasannya dari sel yang terinfeksi, sehingga virus dapat menyebar (WHO, 2005).

Diagnosis penyakit AI meliputi diagnosis definitif yang didasarkan atas isolasi dan identifikasi virus serta diagnosis sangkaan yang didasarkan atas riwayat kasus, gejala klinik, perubahan patologik, dan tidak adanya penyakit pernafasan yang lain. Diagnosis dapat dilakukan dengan metode isolasi atau deteksi dan karakterisasi virus. Hal tersebut perlu dilakukan karena infeksi yang terjadi pada unggas dapat menimbulkan gejala klinis yang bervariasi. Variasi gejala klinis tersebut sangat dipengaruhi oleh faktor inang, strain virus, status imun inang, kondisi lingkungan, serta adanya infeksi sekunder dari mikroorganisme lain. Pemeriksaan serologik yang sering dipakai adalah uji *hemagglutination-inhibition* (HI) untuk mengetahui adanya antibodi terhadap *hemagglutinin* (HA) dan uji agar gel presipitasi (AGP) untuk mengetahui adanya antibodi terhadap NA (OIE, 2008). Uji serologik lain yang dipakai untuk mengetahui adanya pembentukan antibodi adalah *virus neutralization* (VN), *neuraminidase-inhibition* (NI), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), antibodi monoklonal, dan hibridisasi *in situ* (Tabbu, 2000). Diferensial diagnosis dari AI adalah *Newcastle Disease* (ND), *Pigeon Paramyxovirus*, *Infectious Bronchitis* (IB), *Swollen Head Syndrome* (SHS), *Avian Mycoplasmosis*, *Infectious Laryngotracheitis* (ILT), *Duck Plaque*, keracunan akut, *Acute Fowl Cholera* atau *Pasteurellosis* (Werner dan Timm, 2006; OIE, 2008).

Teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) mula-mula untuk melakukan analisis terhadap molekul RNA hasil transkripsi yang terdapat dalam jumlah sangat sedikit di dalam sel. Genom virus influenza terdiri dari rantai tunggal RNA oleh karena itu *complementary DNA* (cDNA) harus disintesis melalui proses RT-PCR. Teknik RT-PCR adalah proses polimerisasi yang digunakan untuk mensintesis cDNA (WHO, 2002). Sintesis cDNA dengan metode RT-PCR dilakukan dalam suatu campuran reaksi yang mengandung primer dengan spesifitas tinggi dan nukleotida bebas (dNTP) pada temperatur maksimal 42-50°C selama minimal 60 menit (Javois, 1999). Kelebihan metode RT-PCR adalah memiliki sensitivitas yang tinggi dalam mengamplifikasi *template* RNA dan sangat spesifik saat menggunakan primer yang spesifik dalam sintesis cDNA. Meskipun demikian, teknik tersebut juga memiliki kelemahan yaitu hanya dapat digunakan untuk amplifikasi DNA, tidak

untuk mempelajari fungsional protein (Kendall dan Riley, 2000).

*Multiplex* RT-PCR telah dikembangkan dan dioptimasi untuk mendeteksi virus AI tipe A. Selain itu metode tersebut dapat membedakan subtipe *hemagglutinin* H5, H7, dan H9. Xie *et al.*, (2006) melaporkan bahwa 4 pasang primer oligonukleotida spesifik digunakan untuk mendeteksi virus AI tipe A, subtipe H5, H7, dan H9. Selanjutnya produk *Multiplex* RT-PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose. Penelitian yang dilakukan oleh Xie *et al.* (2006) tersebut membuktikan bahwa metode *Multiplex* RT-PCR memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi. Metode *Multiplex* RT-PCR juga pernah digunakan untuk mendeteksi genom RNA dari 2 spesies virus yang berbeda yaitu AI tipe A dan *Respiratory Syncytial Virus*. Metode ini terbukti dapat secara cepat mendiagnosis genom RNA virus tersebut (Valassina *et al.*, 1997).

Pada metode diagnosis virus, isolasi virus tetap merupakan kriteria acuan bagi metode yang lain. Namun, pengamatan langsung dari virion atau penyusun virus merupakan metode diagnosis yang lebih cepat dan lebih murah, khususnya bila harus menguji sediaan dalam jumlah besar. Berbagai pilihan teknik telah tersedia untuk mendeteksi virus, antigen virus, atau asam nukleat virus. Beberapa bahkan memenuhi lima kriteria untuk dapat diterima di laboratorium klinis yang kecil untuk dokter hewan praktisi, yaitu cepat, sederhana, sensitif, spesifik, dan murah biayanya (Fenner *et al.*, 1995).

Penelitian ini dilakukan karena metode-metode yang digunakan untuk mendiagnosis virus AI tersebut kurang spesifik dan tidak dapat mengidentifikasi virus lebih detail terutama dalam penentuan tipe dan subtipe virus AI. Selain itu, metode diagnosis AI yang rutin digunakan pada saat ini cenderung membutuhkan biaya yang mahal karena menggunakan kit komersial dan memakan waktu yang relatif lama, terutama untuk mendiagnosis dengan jumlah sampel yang besar. Diagnosis molekuler rutin dengan mengamplifikasi genom virus AI menggunakan metode RT-PCR memberikan hasil yang lebih cepat dan akurat. Penggunaan metode diagnosis cepat berbasis *Single Step Multiplex* RT-PCR sudah pernah dilakukan oleh Payungporn *et al.*, (2004) di Thailand. Pada penelitian tersebut rancangan primer-primer RT-PCR tersebut diterapkan

untuk mendiagnosis sekaligus menentukan tipe dan subtipe virus AI yang lebih sensitif, cepat, dan akurat yang berbasis *Single Step Multiplex* RT-PCR pada sampel-sampel unggas yang terinfeksi virus AI yang berasal dari wilayah timur Indonesia. Pada *Single Step Multiplex* RT-PCR ini amplifikasi gen M, H5, dan N1 dilakukan secara simultan dalam satu tabung PCR, sehingga proses amplifikasi menjadi lebih efisien dari segi waktu dan biaya.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendiagnosis penyakit AI secara cepat, tepat, dan akurat sekaligus dapat menentukan tipe dan subtipe virus AI secara lebih efektif dengan metode yang berbasis *Single Step Multiplex* RT-PCR.

## METODE PENELITIAN

### Materi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat virus yang sudah dipropagasi dalam telur ayam berembrio dan telah diidentifikasi secara serologi tahun 2007 oleh Balai Besar Veteriner Maros. Sampel diterima dalam bentuk RNA virus yang sudah diekstraksi sebanyak 10 isolat. Materi lain yang digunakan dalam penelitian antara lain kit untuk RT-PCR yaitu SuperScript™ III *One-Step* RT-PCR *with Platinum Taq* (nomor katalog : 12574-026) produk dari Invitrogen yang terdiri dari 2x *Reaction Mix*, SSIII *Platinum Taq Mix*, dan 5 nM Mg Sulfat. Selain itu juga digunakan gel agarose (Promega Agarose LE Analytical Grade (nomor katalog : 608-274-4330)), *Buffer* 1x *Trizma base-Boric acid-EDTA* (TBE), *ethidium bromide*, *aquabidest*, *aquadest*, *Blue/Orange Loading Dye* (nomor katalog : 5405307), 1 kb DNA *Ladder* dari Invitrogen, 100 bp RAINBOW extended DNA *Marker* (nomor katalog : 304205), dan 3 pasang primer (disajikan pada Tabel 1).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *thermocycler* dari Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400, tabung *epENDORF* steril 1,5 ml dan 0,5 ml, *tip* pipet ukuran 10 µl, 100 µl, 200 µl, dan 100 µl warna putih, kuning, dan biru dari Axygen Scientific, mikropipet, rak tabung *epENDORF*, *horizontal agarose gel electrophoresis apparatus* (MUPID), cetakan gel (*tray*), sisir pembentuk sumuran (*well-forming combs*), plastik parafilm, *power supply*, *White/2UV Transilluminator*, *vortex*

Tabel 1. Sekuens primer untuk amplifikasi gen M, H5, dan N1 (Payungporn *et al.*, 2004).

Target Gen	Sequence Primer	Produk PCR (bp)	T <sub>m</sub>
gen M	MF : 5'-TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG-3'	276	52,8° C
	MR : 5'-TGTTGACAAAATGACCATCG-3'		53,2° C
gen H5	H5F : 5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3'	189	55,3° C
	H5R : 5'-CCACTTATTTCTCTCTGTTTAG-3'		57,1° C
gen N1	N1F : 5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	131	57,9° C
	NIR : 5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'		54,7° C

*mixer, spin down, timbangan elektrik, aluminium foil, botol kaca, gelas beker, labu erlenmeyer 100 ml, gelas ukur 25 ml dan 250 ml, microwave oven, magnetic stirrer, freezer, masker, sarung tangan (latex gloves) dan kamera digital Exillim (Casio).*

#### Amplifikasi DNA secara *Simplex* RT-PCR pada Gen Matriks (M)

Primer yang digunakan dalam tahap *Simplex Reverse Transcriptase* PCR ini adalah primer M *Forward* dan M *Reverse* (Payungporn *et al.*, 2004). Komponen *Simplex* RT-PCR antara lain sampel RNA virus dari BBVet Maros (Tabel 2). Sebanyak 5 µl, 2x *reaction mix*, dH<sub>2</sub>O, Koenzim (5 nM Mg Sulfat), sepasang primer gen M (primer MF dan primer MR), dan *reverse transcriptase* (SSIII Platinum Taq Mix). Sebanyak 1 µl *reverse transcriptase/Taq* (enzim) ditambahkan dalam tiap tabung *ependorf* tersebut, sehingga diperoleh volume akhir dalam setiap tabung *ependorf* 0,5 ml adalah 25 µl. Langkah selanjutnya adalah amplifikasi RT-PCR gen M dengan *Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400*, dengan tahapan reaksi yang diawali dengan satu siklus *reverse transcription* pada suhu 48°C selama 45 menit yang diikuti dengan satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit. Tahapan amplifikasi PCR sendiri terdiri dari 3 tahap yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 47°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 68°C selama 30 detik. Tahapan amplifikasi PCR dilakukan secara berulang sebanyak 40 siklus. Proses *Simplex* RT-PCR gen M diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 68°C selama 10 menit. Produk hasil *Simplex* RT-PCR kemudian disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C untuk selanjutnya dipisahkan melalui tahap elektroforesis dalam gel agarose.

#### Amplifikasi DNA secara *Multiplex* RT-PCR pada Gen M, H5, dan N1

Primer yang digunakan dalam tahap *Multiplex Reverse Transcriptase* PCR adalah primer M *Forward*, primer M *Reverse*, primer H5 *Forward*, primer H5 *Reverse*, primer N1 *Forward*, dan primer N1 *Reverse* (Payungporn *et al.*, 2004). Komponen yang lain, sama dengan komponen yang digunakan pada *simplex* RT-PCR. Tahapan reaksi pada *Multiplex* RT-PCR diawali dengan satu siklus *reverse transcription* (RT) pada suhu 48°C selama 45 menit yang diikuti dengan satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit. Tahapan amplifikasi PCR sendiri terdiri dari 3 tahap yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 47°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 68°C selama 30 detik. Tahapan amplifikasi PCR dilakukan secara berulang sebanyak 40 siklus. Proses *Multiplex* RT-PCR diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir pada suhu 68°C selama 10 menit. Produk *Multiplex* RT-PCR kemudian disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C untuk selanjutnya dapat digunakan sebagai sampel untuk elektroforesis.

#### Elektroforesis Hasil *Simplex* dan *Multiplex* RT-PCR Gen M, H5 dan N1

Untuk melakukan elektroforesis DNA diperlukan suatu *gel agarose* dengan konsentrasi 1,5%, dengan pewarnaan *ethidium bromide* dalam larutan buffer *Tris-Boric Acid-EDTA* (TBE) 1x. Pemisahan dilakukan dalam *apparatus* elektroforesis pada tegangan listrik sebesar 80 volt, selama 60 menit. Selanjutnya, produk *Simplex* dan *Multiplex* RT-PCR hasil elektroforesis dapat divisualisasikan melalui UV *Transilluminator* dan didokumentasi dengan kamera digital *Exillim* (Casio). Hasil positif untuk *Simplex* RT-PCR ditunjukkan dengan munculnya 1 fragmen DNA untuk gen M

sebesar 276 bp. Sedangkan hasil positif untuk *Multiplex* RT-PCR ditunjukkan dengan munculnya 3 fragmen DNA untuk gen M sebesar 276 bp, gen H5 sebesar 189 bp, dan gen N1 sebesar 131 bp.

Tahapan ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Amplifikasi gen M secara *Simplex* RT-PCR**

Hasil elektroforesis dari tahap *Simplex* RT-PCR ditunjukkan pada Gambar 1. Lajur M adalah DNA *Ladder* (*Marker*) yang berukuran 100 bp. Pada Gambar 1, fragmen DNA hasil amplifikasi DNA secara *simplex* RT-PCR berukuran 276 bp yang merupakan bagian gen penyandi protein matriks (M) pada virus AI yang terlihat pada lajur 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, dan 10. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedelapan sampel tersebut positif dan termasuk dalam virus AI tipe A. Hasil amplifikasi ini telah sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Payungporn *et al.*, (2004). Amplifikasi menggunakan PCR merupakan suatu metode alternatif yang cepat dan efektif untuk mendeteksi virus influenza A. Amplifikasi secara RT-PCR juga memberikan hasil yang sangat konsisten dengan metode serologi dan dapat digunakan untuk mengiden-tifikasi dan menentukan subtipe HA dari virus AI langsung dari homogenat organ (Claas *et al.* 1993; Yuen *et al.*, 1998; Lee *et al.* 2001). Namun, pada lajur 4 dan 5 tidak terlihat adanya fragmen DNA berukuran 276 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut negatif, bukan merupakan virus AI tipe A. Pada bagian bawah terlihat adanya *excess primer*, yaitu sejumlah

primer yang tidak terpakai pada saat proses amplifikasi terjadi.

**Amplifikasi Gen M, H5, N1 secara *Single Step Multiplex* RT-PCR**

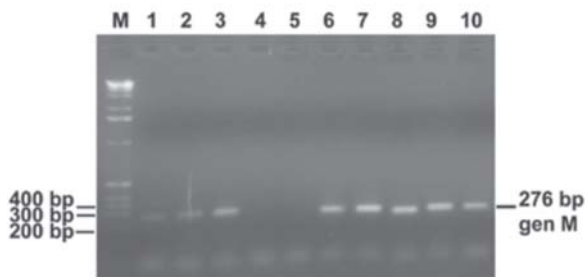
Pada sampel-sampel tersebut selanjutnya diamplifikasi lagi secara *Single Step Multiplex* RT-PCR, parameter yang digunakan adalah adanya produk amplifikasi pada tiga gen yaitu gen M sebesar 276 bp, gen H5 sebesar 189 bp), dan gen N1 sebesar 131 bp. Hasil elektroforesis secara *Single Step Multiplex* RT-PCR dapat dilihat pada Gambar 2.

*Marker* atau DNA *Ladder* (lajur M) yang digunakan dalam tahap *Multiplex* RT-PCR ini berukuran 100 bp. Hasil positif pada tahap ini ditunjukkan dengan adanya tiga fragmen DNA pada gen M sebesar 276 bp, H5 sebesar 189 bp dan N1 sebesar 131 bp yang menunjukkan bahwa sampel tersebut adalah virus AI tipe A subtipe H5N1. Hasil positif ditunjukkan pada sampel nomer 6 dan 9 (lajur 6 dan lajur 9). Sedangkan lajur/sampel nomer 1, 2, 3, 7, dan 8 terlihat adanya dua fragmen DNA sebesar 276 bp dan 131 bp, yang menunjukkan bahwa virus yang terdapat dalam sampel tersebut termasuk virus AI tipe A subtipe N1 tapi bukan subtipe H5. Pada lajur 10 terlihat fragmen DNA yang sedikit berbeda, yaitu hanya terdapat satu fragmen DNA sebesar 131 bp yang berarti bahwa sampel tersebut positif N1 saja.

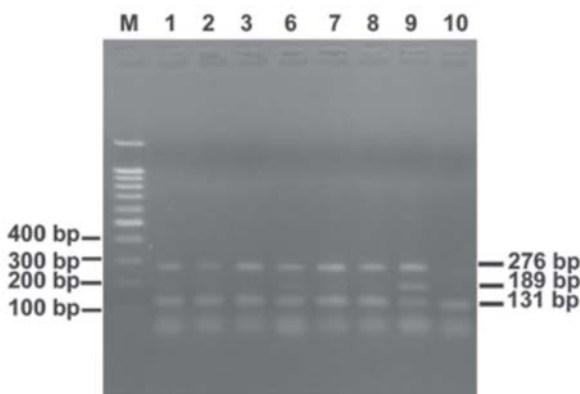
Pengujian dilakukan sesuai urutan identifikasi virus AI, yaitu jika positif dengan pasangan primer M dilanjutkan dengan primer H5 dan N1. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dengan primer M dipastikan bahwa koleksi isolat dengan hasil uji positif adalah virus AI tipe A. Pengujian dilanjutkan dengan menggunakan primer H5 dan N1, dan dari hasil

Tabel 2. Daftar sampel yang digunakan dalam penelitian

No	Kode Sampel	Asal Sampel	Asal Hewan
1	A/ Chicken / BBV M / 441-07	Tator	Ayam
2	A/ Swine / BBV M / 416(112)-07	Minahasa	Babi
3	A/ Chicken / BBV M / 456-07	Palu	Ayam
4	A/ Chicken / BBV M / 425-07	Jayapura	Ayam
5	A/ Chicken / BBV M / 238-07	Jayapura	Ayam
6	A/ Chicken / BBV M / 234(A)-07	Ambon	Ayam
7	A/ Chicken / BBV M / 240-07	Pare Pare	Ayam
8	A/ Chicken / BBV M / 236-07	Poso	Ayam
9	A/ Chicken / BBV M / 222-07	Palopo	Ayam
10	A/ Chicken / BBV M / 464-07	Minahasa Utara	Ayam



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen M (276 bp) 10 sampel dari BBVet Maros dengan metode *Simplex* RT-PCR.



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen M (276 bp), H5 (189 bp), dan N1 (131 bp) sampel positif *Simplex* RT-PCR dari BBVet Maros dengan metode *Multiplex* RT-PCR.

*Multiplex* RT-PCR menunjukkan bahwa 2 isolat teramplifikasi dengan primer ini, sedangkan 6 isolat lainnya tidak teramplifikasi. Rekapitulasi hasil dari tahap *Multiplex* RT-PCR terhadap 10 isolat virus dapat dilihat pada Tabel 3.

Terlihat bahwa hasil positif ditunjukkan dengan munculnya fragmen DNA produk amplifikasi pada *multiplex* RT-PCR baik pada gen M, H5, N1. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya fragmen DNA yang muncul, sedangkan kode x menunjukkan bahwa tidak dilakukan amplifikasi *multiplex* RT-PCR karena hasil *simplex* RT-PCR yang dilakukan sebelumnya pada sampel-sampel tersebut tidak menunjukkan adanya fragmen DNA hasil amplifikasi. Tabel 3 juga menunjukkan bahwa virus AI tipe A sub tipe H5N1 dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode *Single Step Multiplex* RT-PCR. Penelitian ini menjelaskan amplifikasi PCR secara simultan pada 3 target gen yaitu gen M, H5, dan N1 berbasis *Single Step Multiplex* mampu untuk mendeteksi virus influenza A sub tipe H5N1 secara cepat tepat dan akurat. Primer yang digunakan dalam *Multiplex* RT-PCR ini sudah didesain sedemikian rupa sehingga produk amplifikasi dapat terpisahkan dengan baik pada *gel agarose*. Ukuran spesifik dari fragmen DNA hasil amplifikasi RT-PCR untuk gen M sebesar 276 bp, gen H5 sebesar 189 bp dan gen N1 sebesar 131 bp. Amplifikasi *Multiplex* RT-PCR ini dilakukan secara *Single Step* pada satu tabung dalam satu tahapan

Tabel 3. Rekapitulasi hasil *Multiplex* RT-PCR terhadap 10 isolat virus dari BBVet Maros

No	Kode Sampel	Hasil Simplex RT-PCR(gen M)	Hasil Multiplex RT-PCR		
			M	H5	N1
1	A / Chicken / BBV M / 441-07	+	+	-	+
2	A / Swine / BBV M / 416(112)-07	+	+	-	+
3	A / Chicken / BBV M / 456-07	+	+	-	+
4	A / Chicken / BBV M / 425-07	-	x	x	x
5	A / Chicken / BBV M / 238-07	-	x	x	x
6	A / Chicken / BBV M / 234(A)-07	+	+	+	+
7	A / Chicken / BBV M / 240-07	+	+	-	+
8	A / Chicken / BBV M / 236-07	+	+	-	+
9	A / Chicken / BBV M / 222-07	+	+	+	+
10	A / Chicken / BBV M / 464-07	+	-	-	+

Keterangan : + = ada produk RT-PCR  
 - = tidak ada produk RT-PCR  
 x = tidak dilakukan RT-PCR karena hasil simplek RT-PCR negatif

proses amplifikasi. Penggunaan metode *Single Step Multiplex* RT-PCR ini, mengurangi risiko terjadinya kontaminasi. Selain itu, *single-step process* lebih menghemat waktu daripada *two-step process*. *Single Step Multiplex* RT-PCR juga dapat dilakukan dengan biaya instrumen yang rendah dan dapat digunakan untuk mendeteksi virus influenza A subtipe H5N1 secara simultan (Zangenberg *et al.*, 1999; Elnifro *et al.*, 2000; Payungporn *et al.*, 2004; Thontiravong *et al.*, 2004; NgLisa *et al.*, 2006).

Metode diagnosis terhadap virus AI ini sangat berguna sebagai salah satu metode diagnosis yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi dan mengontrol wabah influenza. Seperti disebutkan dalam penelitian Malik *et al.*, (2004), yang menjelaskan bahwa metode *Multiplex* RT-PCR ini dapat mendeteksi bermacam-macam infeksi dan dapat digunakan untuk mempelajari epidemiologi penyakit tersebut.

Hasil amplifikasi secara *Simplex* RT-PCR dan *Multiplex* RT-PCR pada sampel babi (sampel nomer 2) dari Minahasa, menunjukkan bahwa sampel tersebut termasuk virus AI tipe A, tetapi bukan subtipe H5N1. Hal ini terlihat dengan munculnya dua fragmen DNA sebesar 276 bp (gen M) dan 131 bp (gen N1) yang menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung virus AI tipe A subtipe N1 tapi tidak termasuk subtipe H5. Babi terinfeksi secara alami oleh strain virus H1N1, H3N2, dan H1N2. Strain virus H1N1 termasuk *classic swine influenza*, virus H1N1 sama dengan virus yang terisolasi dari sumber unggas, seperti virus H1N2 dengan H1 sama dengan strain H1N1 dari manusia. Influenza pada babi diobservasi pertama di Amerika Serikat pada tahun 1918. Babi memiliki peluang untuk terinfeksi oleh semua subtipe virus AI tipe A (WHO, 2002).

Teknik RT-PCR merupakan metode alternatif dalam deteksi dan penentuan subtipe virus influenza yang cepat dan spesifik (Starick *et al.*, 2000; Munch *et al.*, 2001; Daum *et al.*, 2002; Donatelli *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2003; Payungporn *et al.*, 2004). Pengembangan terakhir dari metode PCR ini antara lain *Real-Time* PCR, *Multiplex* PCR, *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA), dan *Microarray* yang memiliki kecepatan tinggi dalam mendeteksi virus influenza (Ellis dan Zambon, 2002). Faktor terpenting dalam metode ini adalah desain primer gen M, H5, dan N1 dari virus AI. Kelebihan dari metode-metode tersebut adalah

kemampuannya dalam mengamplifikasi fragmen DNA secara cepat (3 jam) dan akurat sehingga tidak banyak waktu yang terbuang. Metode PCR memiliki sensitivitas yang tinggi (93%) dalam mendiagnosis infeksi virus terutama virus influenza A dibandingkan dengan metode kultur sel (80%) mau pun ELISA (62%) (Steininger *et al.*, 2002; Payungporn *et al.*, 2004).

Metode *Multiplex* RT-PCR sangat spesifik dan efisien sebagai suatu metode PCR secara individual. Selain dapat menghemat waktu, biaya dan reagen yang digunakan, metode tersebut juga dapat mengidentifikasi 3 atau 4 subtipe dalam satu tahap amplifikasi pada setiap gen HA dan NA. Metode ini lebih mudah dilakukan dan lebih cepat dalam menentukan subtipe virus daripada metode lainnya (Chang *et al.*, 2008). Metode *Multiplex* RT-PCR juga dapat digunakan untuk mengamplifikasi lebih dari satu agen infeksi dengan menggunakan lebih dari satu pasang primer. Kelebihan dari metode ini adalah kombinasi antara kecepatan dan sensitivitas PCR, serta mengurangi kebutuhan pengujian suatu spesimen klinis secara terpisah pada tiap-tiap virus (Malik *et al.*, 2004). Metode *Multiplex* RT-PCR juga dilaporkan oleh Auewarakul (2007) yang membuktikan bahwa metode tersebut memiliki spesifitas tinggi terhadap delapan segmen genom virus H5N1 untuk mendeteksi kemungkinan terjadinya *reassortment* virus. Namun, sensitivitasnya rendah untuk pemeriksaan spesimen klinis secara langsung.

Uji *Single Step Multiplex* RT-PCR memiliki sensitivitas antara 103-104 RNA kopi/ $\mu$ l. Penemuan ini membuktikan bahwa pengujian ini sangatlah sederhana dan memiliki beberapa kelebihan. Kelebihan dari uji tersebut antara lain efektif, cepat, dan akurat dalam mendeteksi virus influenza subtipe H5N1 pada unggas dan bahkan pada manusia. Sensitivitas dan spesifitasnya yang tinggi, dapat menghemat biaya per sampel daripada menggunakan metode konvensional (propagasi virus pada telur unggas berembrio). Selain itu, uji ini mudah dilakukan karena dapat dilakukan dalam satu tabung, dalam satu proses sederhana/*single-step process* (RT-PCR), dan dengan resiko terjadinya kontaminasi yang rendah. Kelebihan lain yang dimiliki uji ini adalah keunggulannya dalam mendeteksi lebih dari satu subtipe virus dan dapat digunakan untuk pemeriksaan pada spesimen manusia. Metode ini juga dapat

digunakan untuk skrining kasus-kasus yang diduga disebabkan oleh virus influenza tipe A subtype H5N1 untuk mengontrol penyebaran virus tersebut (Spackman *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2004; Payungporn *et al.*, 2004; Thontiravong *et al.*, 2004). Metode *Multiplex* RT-PCR ini digunakan untuk menginvestigasi prevalensi dari setiap subtype virus AI dan dapat mendeteksi secara cepat HPAI dari spesimen klinis dan isolat virus (Chang *et al.*, 2008).

Pemilihan sekuen primer merupakan satu hal yang sangat penting untuk memperoleh sensitivitas dan spesifitas RT-PCR yang tinggi. Metode diagnosis molekuler ini menggunakan primer spesifik yang telah didesain untuk mendeteksi *strain* virus influenza A subtype H5N1. Primer Matriks disusun berdasarkan daerah yang tepat pada gen Matriks yang telah dirancang untuk mendeteksi virus AI tipe A dari berbagai spesies dengan metode *Single-tube Reverse Transcriptase* PCR (Fouchier *et al.*, 2000). Primer yang digunakan mempunyai target pada gen *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA) yang memiliki peluang besar untuk mengalami evolusi (Webster *et al.*, 1992). Pasangan primer yang spesifik untuk gen *hemagglutinin* (HA) biasanya berhubungan dengan virus influenza yang digunakan (Lee *et al.*, 2001). Primer H5 yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer spesifik yang didesain untuk mengamplifikasi gen H5 virus AI subtype H5, demikian juga dengan primer N1 yang didesain untuk mengamplifikasi gen NA subtype N1.

### SIMPULAN

Metode diagnosis virus AI tipe A subtype H5N1 yang berbasis *Single Step Multiplex* RT-PCR menunjukkan hasil positif dengan munculnya 3 fragmen DNA masing-masing sebesar 276 bp untuk gen M, 189 bp untuk gen H5, dan 131 bp untuk gen N1. Metode diagnosis cepat ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode yang telah ada sebelumnya. Selain itu, metode ini juga efektif untuk mendeteksi gen M, H5, dan N1 secara simultan dengan format amplifikasi berbasis *Single Step Multiplex* RT-PCR sehingga dapat menentukan tipe dan sekaligus subtype virus AI dengan tingkat spesifisitas dan efektifitas yang tinggi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Bagian Biokimia dan Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan dan Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Desentralisasi Hibah Bersaing XV (2007-2008) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### DAFTAR PUSTAKA

- Auewarakul P, Sangsiriwut K, Chaichoune K, Thitithanyanont A, Wiriyarat W, Songserm T, Ponak-nguen R, Prasertso-pon J, Pooruk P, Sawanpanyalert P, Ratanakorn P, Puthavathana P. 2007. Surveillance for Reassortant Virus by Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Specific for Eight Genomic Segments of Avian Influenza A H5N1 Viruses. *J Clin Microbiol.* 45:1637-1639.
- Chan PK. 2002. Outbreak of Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 34:S58-64.
- Chang KH, Park JH, Song MS, Oh TK, Kim SY, Kim CJ, Kim H, Sung MH, Han HS, Hahn YS, Choi YK. 2008. Development of Multiplex RT-PCR Assays for Rapid Detection and Subtyping of Influenza Type A Viruses from Clinical Specimens. *J Microbiol Biotechnol* 18:1164-1169.
- Claas ECJ, Van Milaan AJ, Sprenger MJW, Ruiten-Stuiver M, Arron GI, Rothbarth PH, Masurel N. 1993. Prospective Application of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Influenza Infections in Respiratory Samples from A Children's Hospital. *J Clin Microbiol* 31:2218-2221.
- Daum LT, Canas LC, Schadler CA. 2002. A Rapid, Single-Step Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay for The Detection of Human H1N1, H3N2, and B Influenza. *J. Clin. Virol.* 25:345-350.
- Donatelli I, Campitelli L, Trani LD, Puzelli S, Selli L, Fioretti A, Alexander DJ, Tollis M, Krauss S, Webster RG. 2002. Characterization of H5N2 Influenza Viruses from Italian Poultry. *J Gen Virol* 2001:635-630.



- Ellis JS, Zambon MC. 2002. Molecular Diagnosis of Influenza. *Rev Med Virol* 12:375-389.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. 2000. Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology. *J. Clin. Microbiol Rev* 13:559-570.
- Fenner F, Paul JE, Gibbs J, Frederick A, Murphy, Rott R, Studdert MJ, White DO. 1995. *Veterinary Virology*. 2<sup>nd</sup> Ed. edisi kedua. San Diego. Academic Press, Inc.
- 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. *J Clin Microbiol* 38. (11) :4096-4101.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. 2005. Characterization of A Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 79:2814-2822.
- Guan Y, Peiris JSM, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, Zhang LJ, Webster RG, Shortridge KF. 2002. Emergence of Multiple Genotypes of H5N1 Avian Influenza Viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8950-8955.
- Horimoto T, Kawaoko Y. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *J Clin Microbiol Rev* 14:129-149.
- Javois LC. 1999. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. second edition. New Jersey. Humana Press.
- Kendall LV, Riley LK. 2000. *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. The American Association for Laboratory Animal Science. Vol. 39 No. 1.
- Lamb R. 1989. Genes and Protein of The Influenza Viruses. In : *The Influenza Viruses*. Krug RM New York. Plenum Press 1-67.
- Lamb RA, Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: The Virus and Their Replication. In: *Fields Virology*, ed. Knipe DM, Howley PM, fourth edition. pp. 1487-1532. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Publisher.
- Lau L, Banks J, Aherne R, Brown IH, Dillon N, Collins RA, Chan K, Fung YW, Xing J, Yu ACH. 2003. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Methods to Detect Avian Influenza Virus. *Biochem Biophys Res Comm.* 313:336-342.
- Lee S, Chang P, Shien J, Cheng MC, and Shieh HP. 2001. Identification and Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcription-PCR. *J Virol Methods* 97:13-22.
- Liu JP. 2005. Avian Influenza-A Pandemic Waiting to Happen?. *J Microbiol Immunol Infect.* 39:4-10.
- Malik YS., Patnayak DP, Goyal SM. 2004. Detection of Three Avian Respiratory Viruses by Single-Tube Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay. *J Vet Diagn Invest* 16:244-248.
- Munch M, Nielsen L, Handberg K, Jorgensen P. 2001. Detection and Subtyping (H5 and H7) of Avian Type A Influenza Virus by Reverse Transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 146:87-97.
- Ng Lisa FP, Barr I, Nguyen T, Noor SM, Tan RSP, Lora V, Gupta AS, Khalil H, To TL, Hassan SS, Ren EC. 2006. Specific Detection of H5N1 Avian Influenza A Virus in Field Specimens by A One-Step RT-PCR Assay. *BMC Infect Dis* 6:40.
- Office International des Epizooties (OIE). 2008. Avian Influenza. *OIE Terrestrial Manual*. [www.oie.int](http://www.oie.int).
- Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutini-mitkul, S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, Amonsin A, Poovorawan Y. 2004. Single-Step Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection. *Viral Immunol* 17:588-593.
- Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng NF, Nicholls JM, Ng TK, Chan KH, Lai ST, Lim WL, Yuen YY, Guan Y. 2004. Re-Emergence of Fatal Human Influenza A Subtype H5N1 Disease. *Lancet* 363:617-619.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DI. 2002. Development of A Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and The Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *J Clin Microbiol* 40:3256-3260.
- Starick E, Romer-Oberdorfer A, Werner O. 2000. Type- and Subtype-Specific RT-PCR Assay for Avian Influenza A Viruses (AIV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 295-301.

- Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. 2002. Effectiveness of Reverse Transcription-PCR, Virus Isolation, and Enzym-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Influenza A Virus Infection in Different Age Groups. *J Clin Microbiol* 40:2051-2056.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly Pathogenic Avian Influenza. *Rev Sci Tech* 19:463-482.
- Tabbu CR. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Volume 1. Yogyakarta. Penerbit Kanisius.
- Thontiravong A, Payungporn A, Keawcharoen J, Chutinimitkul S, Wattanodorn S, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Theamboonlers A, Poovorawan Y, Oraveerakul K. 2004. The Single-Step Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay (RT-PCR) for Detecting H5, H7, and H9 Avian Influenza A Viruses. *Tohoku J Exp Med* 211:75-9.
- Valassina M, Anna M C, Maria G C, Piero EV. 1997. Rapid Detection of Different RNA Respiratory Virus Species by Multiplex RT-PCR : Application to Clinical Specimens. *J Clin Diagn Virol* 8:227-232.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Micribiol. Rev.* 56:152-179.
- Webster RG, Guan Y, Peiris M, Walker D, Krauss S, Zhou NN, Govorkova EA, Ellis TM, Dyrting KC, Sit T, Perez DR, Shortridge KF. 2002. Characterization of H5N1 Influenza Virus that Continue to Circulate in Geese in Southeastern China. *J Virol* 76:118-126.
- Werner O, Timm CH. 2006. Chapter 2: Avian Influenza. In : *Influenza Report 2006*. Kamps, Bernd S., Hoffmann C., Preiser W. Flying Publisher : Paris. [www.Influenza-Report.com](http://www.Influenza-Report.com).
- Whittaker GR. 2001. *Intercellular Trafficking of Influenza Virus : Clinical Implication for Molecular Medicine*. Cambridge University Press. Pp : 1-13.
- Wright PF, Webster RG. 2001. *Orthomyxoviruses*. D. M. Knipe (eds.), Fields Virology, fourth edition. Philadelphia. Lippincott-Raven. Pp.1533-1579.
- World Health Organization (WHO). 2002. *WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. WHO Global Influenza Programme. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1.
- World Health Organization (WHO). 2005 Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1515-1521. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid).
- Xie Z, Pang YS, Liu J, Deng X, Tang X, Sun J, Khan MI. 2006. A Multiplex RT-PCR for Detection of Type A Influenza Virus and Differentiation of Avian H5, H7, and H9 Hemagglutinin Subtypes. *Mol Cell Probes* 20:245-249.
- Yuen KY, Chan PKS, Peiris JSM, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ET, Sung R, Cheng AF. 1998. Clinical Features and Rapid Viral Diagnosis of Human Disease Associated with Avian Influenza A H5N1 Virus. *Lancet*. 351:467-471.
- Zangenberg G, Saiki RK, Reynolds R. 1999. Multiplex PCR: Optimization Guidelines, p. 73-94. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (ed.), *PCR Applications : Protocols for Functional Genomics*. San Diego. Academic Press.