

## Diagnosis Molekuler Virus Flu Burung-A Subtipe H5 Berdasarkan Amplifikasi Gen M dan H5 dengan Metode *Onestep Simplex* RT-PCR

(*MOLECULAR DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS TYPE A  
AND SUBTYPE H5 BY AMPLIFICATION OF ITS M AND H5 GENES  
USING ONE STEP SIMPLEX RT-PCR BASED ON*)

Aris Haryanto<sup>1</sup>, Bibiana Krisanti<sup>1</sup>, Sri Handayani Irianingsih<sup>2</sup>,  
Dini Wahyu Yudianingtyas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281.  
Telp. 0274-560865, Email: arisharyanto@yahoo.com

<sup>2</sup>Laboratorium Virologi dan Bioteknologi, Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta.

<sup>3</sup>Laboratorium Virologi, Balai Besar Veteriner, Maros, Sulawesi Selatan.

### ABSTRAK

Virus flu burung (*avian influenza*)-A termasuk famili *Orthomyxoviridae* merupakan kelompok virus dengan genom berupa RNA serat tunggal dan bersegmen. Virus ini dibedakan menjadi beberapa subtipe didasarkan pada glikoprotein permukaannya, yaitu *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA). Di antara subtipe tersebut, subtipe H5 dan H7 virus flu burung / *avian influenza* (AI) dilaporkan paling patogen. Metode diagnosis virus AI secara konvensional, dilakukan dengan cara isolasi virus dalam telur ayam berembrio (TAB), uji *haemagglutination activity* (HA), dan uji *haemagglutination inhibition* (HI). Meskipun metode-metode tersebut sensitif dan akurat, akan tetapi pelaksanaannya tidak cepat dan membutuhkan waktu yang cukup lama, sedangkan metode diagnosis komersial dengan *immunofluorescence assay* dan *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA) meskipun berjalan lebih cepat, namun sensitifitas dan keakuratan lebih rendah. Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini kami mengembangkan metode diagnosis cepat dan akurat berbasis amplifikasi DNA menggunakan metode *OneStep Simplex Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Penelitian ini menggunakan 10 sampel virus AI koleksi Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates yang diamplifikasi secara RT-PCR dengan berbagai variasi suhu *annealing* pada 50° dan 52°C. Sebelumnya sampel virus terlebih dahulu diinokulasi dan dipropagasi di dalam telur ayam berembrio yang *specific antigen negative* (SAN) dan dilakukan uji serologis dengan uji HA dan HI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari sebanyak 10 isolat yang digunakan, semuanya isolat adalah positif virus AI tipe A. Hasil amplifikasi juga menunjukkan bahwa 8 dari 10 isolat tersebut merupakan virus AI tipe A subtipe H5. Metode RT-PCR ini dapat digunakan untuk mendiagnosis virus influenza tipe A subtipe H5 secara cepat, tepat, dan akurat.

Kata kunci : virus AI, uji HA dan HI, gen M dan H5, OneStep Simplex RT-PCR

### ABSTRACT

Influenza A viruses which belong to the Family of *Orthomyxoviridae* are a group of viruses with segmented ssRNA genome. The viruses can be subgrouped into many subtypes on the basis of their surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins. Among the HA subtypes, H5 and H7 have been found to be the most pathogenic. Conventional diagnosis of the viruses is usually performed by isolation of the viruses in embryonated eggs, and hemagglutination (HA) and hemagglutination inhibition test. Although those methods are sensitive and accurate, they are time consuming and require laboratory facilities with high biosafety level. Commercial methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence assay also provide a rapid result but less sensitive and specific than conventional methods. Molecular diagnosis by amplification of M and H5 genes using one step simplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) provides a rapid and accurate diagnosis for the viruses. A study was therefore conducted to evaluate the accurate and rapidity of such the molecular tests for diagnosis of avian influenza A virus, subtype H5. As many as 10 sample of the virus isolates which were available at the Animal Disease investigation Center in Wates, Yogyakarta, were used in this study. The virus isolates were firstly propagated in specific antigen negative (SAN) chicken embryos and tested by HA/HI test. The viruses were then subjected for the RT-PCR test with varying annealing temperatures of 50°C and 52°C. The result showed that all 10 isolates were type A influenza virus and 8 out of 10 were influenza A subtype H5 influenza virus. RT-PCR used in this study appears to be more sensitive, rapid and accurate as compared to those by serological and isolation of the virus in embryonated eggs.

Key words : AI virus, HA and HI test, M and H5 genes, OneStep Simplex RT-PCR

## PENDAHULUAN

Flu burung / *avian influenza* (AI) disebabkan oleh virus influenza yang tergolong dalam famili *Orthomyxoviridae*. Virus tersebut merupakan virus RNA berantai tunggal, protein permukaan utamanya adalah *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA). Berdasarkan antigen yang dimiliki oleh virus influenza, diketahui terdapat tiga tipe, yaitu A, B, dan C. Virus influenza A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda, dan jenis mamalia lainnya (cerpelai, anjing laut, dan paus). Virus influenza tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia. Berdasarkan bentuk penyakit yang ditimbulkannya, virus influenza tipe A dibagi menjadi bentuk akut *highly pathogenic avian influenza*/HPAI dan bentuk ringan *low pathogenic avian influenza*/LPAI (Tabbu, 2000).

Virus influenza tipe A merupakan virus beramplop yang mempunyai delapan segmen RNA dan menyandi 10 protein. Virus tersebut dapat dibedakan menjadi berbagai subtipe berdasarkan perbedaan antigennya, yaitu protein permukaan (glikoprotein) *hemagglutinin* dan *neuraminidase*. Saat ini diketahui terdapat 16 *hemagglutinin* (H1-H16) dan sembilan *neuraminidase* (N1-N9) subtipe yang termasuk dalam virus AI tipe A (Nicholson, 2003).

Secara konvensional, metode yang digunakan untuk mendiagnosis infeksi virus AI dengan cara isolasi virus dari telur ayam berembrio (TAB), metode *immunofluorescence* dan uji *hemagglutinin inhibitor* (HI). Ketiga metode diagnosis tersebut merupakan metode yang sensitif dan akurat, namun untuk itu diperlukan waktu yang cukup lama. Metode diagnosis yang lain adalah *immunofluorescence assay* (IFA) and *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA) merupakan metode diagnosis yang relatif lebih cepat, namun tingkat sensitifitas dan keakuratannya lebih rendah dari pada metode isolasi virus dari TAB (Payungporn *et al.*, 2004).

Penelitian ini dilakukan berdasarkan sumber dan fakta-fakta yang ditemukan di lapangan, bahwa metode-metode diagnosis virus AI secara konvensional yang rutin dilakukan belum dapat mengidentifikasi virus AI sampai pada subtipenya. Virus AI, khususnya subtipe H5 merupakan subtipe yang paling patogen, untuk itu harus dapat diidentifikasi dengan tepat, cepat, dan akurat. Masalah biaya untuk diagnosis juga penting untuk dipertimbangkan

agar dapat ditekan serendah mungkin, terutama pada jumlah kasus yang banyak di lapangan, di samping itu, fakta juga menunjukkan bahwa metode-metode diagnosis secara konvensional masih kurang efektif, tidak praktis, dan memakan waktu yang lama. Pada penelitian ini dilakukan diagnosa molekuler virus AI berdasarkan subtipenya H5 dengan menggunakan metode *OneStep Simplex* RT-PCR dengan variasi pada suhu *annealingnya*. Diagnosis ini dilakukan dengan menggunakan *template* molekul RNA virus AI yang terlebih dahulu ditranskripsi balik (*reverse transcription*) menjadi *complementary DNA* (cDNA). Hasil isolasi virus dalam TAB dan hasil uji serologi virus AI sebelum diamplifikasi secara *OneStep Simplex* RT-PCR, digunakan untuk membandingkan sensitifitas dan spesifitas ketiga metode diagnosis tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendiagnosis virus AI pada beberapa unggas berdasarkan hasil amplifikasi gen penyandi protein *matrix* (M) dan H5 secara efektif, cepat, tepat dan akurat menggunakan metode diagnosis *OneStep Simplex* RT-PCR dengan variasi pada suhu *annealingnya*. Tujuan lainnya adalah untuk mengetahui tingkat sensitifitas, dan keakuratan metode RT-PCR dibandingkan dengan isolasi virus dan uji serologi.

## METODE PENELITIAN

### Persiapan Bahan dan Peralatan

Bahan utama penelitian ini adalah 10 sampel isolat virus AI koleksi Balai Besar Veteriner (BB Vet) Wates. Isolasi dan uji serologi virus dilakukan dengan menggunakan larutan *Alsevers*, eritrosit ayam 1%, serum dengan antibodi H5, *phosphate buffer saline* (PBS), *specific antibody negative* (SAN) terhadap H5, *iodine tinktur*, antibiotik *Penicilin-Streptomycin*, dan pewarna kuku. Bahan lain yang digunakan adalah kit ekstraksi RNA (QIAamp Viral RNA Kit, nomor katalog : 52904), selain itu untuk amplifikasi gen M dan H5 digunakan kit RT-PCR (Qiagen *One Step* RT-PCR Kit, nomor katalog: 210210), gel agarose *ultrapure TM agarose-1000* (Invitrogen), *ultra pure Tm buffer* (Invitrogen, nomor katalog: 15581-044), *SYBR Safe DNA Gel Stain*, *DNA Marker 100 bp ladder*, dan 2 pasang primer, M dan H5 yang disajikan dalam Tabel 1.

Peralatan yang digunakan adalah spuit 3 ml, pinset, gunting, pewarna kuku, pengaduk, *microtiter plate* dasar V, *thermocycler* dari GeneAmp® PCR System 2700, tabung *eppendorf* steril 1,5 ml dan 0,5 ml, tip pipet ukuran (10 µl, 100 µl, 200 µl, dan 1000 µl) dari *Eppendorf tip dualfilter* dan *art molecular bioproduct*, mikropipet, rak tabung *eppenndorf*, *laminar hood*, *Biosafety Cabinet* (BSC) 2, *sentrifuge* Sorvall® pico, *horizontal agarose gel electrophoresis apparatus* (MUPID) dari OWI dan kelengkapannya, plastik parafilm, *power supply*, UV illuminator UVT-20 M, *vortex mixer*, *spin down*, timbangan elektrik, *aluminium foil*, botol kaca, gelas beker, labu erlenmeyer 100 ml, gelas ukur 25 ml dan 250 ml, *microwave oven*, *freezer start emerald sanyo* (4 °C), *freezer kirsch froster-med-95* (-20 °C), masker, sarung tangan (*latex gloves*) dan kamera digital (Casio).

**Koleksi Sampel Virus AI**

Sampel virus AI yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari isolat virus yang dikoleksi oleh BBVet Wates tahun 2008-2009. Sampel virus diterima dalam bentuk isolat yang belum diekstraksi sebanyak 10 sampel. Adapun isolat-isolat tersebut tercantum pada Tabel 2.

**Inokulasi dan Propagasi Virus dalam TAB**

Dalam penelitian ini dilakukan inokulasi virus dalam TAB yang bertujuan untuk isolasi sekaligus reaktivasi virus AI. TAB berumur sembilan hari diseleksi untuk inokulasi. Telur-telur tersebut diterawang (*candling*) untuk melihat kondisi embrio dan letak ruang udara. Letak ruang yang telah diketahui menentukan posisi tepat inokulasi. Selanjutnya bagian-bagian tersebut ditandai. Telur-telur yang dibutuhkan untuk inokulasi 10 sampel adalah sebanyak 20 butir telur, dengan masing-masing sampel diinokulasikan ke dalam dua butir telur dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit di dalam inkubator.

Langkah selanjutnya adalah inokulasi virus ke dalam TAB. Cara untuk inokulasi adalah dengan membuat lubang menggunakan pelubang telur, Setelah semua sampel diinokulasikan, ditutup dengan menggunakan pewarna kuku (sebagai pengganti parafin cair) dan dimasukkan ke dalam inkubator. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menggunakan peralatan *candling* untuk mengetahui apakah terjadi kematian embrio. Jika teramati embrio mati, maka TAB dimasukkan ke dalam refrigerator selama 3-4

Tabel 1. Sekuen nukleotida primer gen M (AAHL, 2004) dan H5 (Lee *et al.*, 2001).

Gene Target	Sequence Primer	Produk PCR (bp)
gen M	MF : 5'-GCACTTGAATTGTGGATTCTTAGTC-3' MR : 5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTACTCC-3'	200
gen H5	H5F : 5'-ACACATGCYCARGACATACT-3' H5R : 5'-CTYTGRTTYAGTGTGAATGT-3'	545

Tabel 2. Sampel isolat yang digunakan pada penelitian

No Sampel	Kode Sampel	Spesimen	Asal Sampel	Asal Hewan
1	38/I/08	Organ	Banyumas	Ayam
2	91/II/08	Swab	Gunung Kidul	Buras
3	124/II/08	Swab	Sragen	Buras
4	178/III/08	Organ	Pemalang	Ayam
5	1503/XII/08	JP 5-7	Jepara	Buras
6	14/I/09	Swab	Majalengka	Buras
7	378/III/09	Organ	Lamongan	Buras
8	379/III/09	Organ	Pamekasan	Buras
9	29/I/09	Organ	Blora	Buras
10	157/II/09	Organ	Kulonprogo	Broiler

jam. Setelah pendinginan dilakukan, sampel-sampel virus tersebut siap untuk dipanen.

Pemanenan dilakukan dengan cara membuka cangkang telur secara hati-hati menggunakan gunting dan pinset. Cairan *allantois* diambil menggunakan spuit 3 ml atau dengan mikropipet 1000  $\mu$ l semaksimal mungkin. Selanjutnya cairan *allantois* diuji untuk mengetahui apakah cairan *allantois* yang dipanen bersifat mengaglutinasi eritrosit ayam atau tidak. Metode yang digunakan ini adalah metode *hemagglutination activity* (HA) kualitatif, yaitu dengan cara mencampur SDM ayam dan cairan *allantois* menggunakan perbandingan 1:1 pada papan pencampur menggunakan pengaduk. Adanya aglutinasi ditunjukkan dengan timbulnya presipitat halus seperti pasir.

#### Uji HA

Uji serologis yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi uji HA dan uji HI berdasarkan metode yang dilakukan oleh *Australian Animal Health Laboratory* (Batson, 2007). Hasil uji HA dinyatakan positif jika pada dasar *microtiter plate* tampak presipitat halus seperti pasir yang berarti terjadi aglutinasi SDM. Interpretasi hasil berdasarkan *end point*, yaitu pada sumuran terakhir masih terdapat aglutinasi SDM ayam. Titer HA virus atau antigen adalah kebalikan angka pengenceran pada sumuran *end point*. Untuk mengetahui ketepatan dari antigen 4 HAU yang dipergunakan dilakukan uji *back* titrasi dengan melakukan pengenceran serial kelipatan dua dalam PBS pada lubang-lubang *microtiter*. Cara yang dilakukan seperti pada uji HA tetapi cairan *allantois* diganti dengan virus 4 HAU. Ketepatan antigen 4 HAU ditunjukkan dengan masih adanya aglutinasi pada lubang-lubang pengenceran  $2^{-1}$  dan  $2^{-2}$ .

#### Uji Serotyping HI

Uji serotyping HI ini merupakan metode yang digunakan untuk konfirmasi virus AI, dengan menggunakan antiserum standar positif antibodi terhadap virus AI subtipe H5. Interpretasi hasil titer HI ditunjukkan pada pengenceran serum tertinggi yang masih memberikan inhibisi (penghambatan) pada antigen 4 HAU. Inhibisi ditetapkan dengan melakukan pengamatan SDM pada lubang-lubang *microtiter plate*, bila *microtiter plate* dimiringkan terlihat SDM membentuk tetesan air mata yang serupa dengan SDM kontrol.

#### Ekstraksi RNA

Ekstraksi sampel bertujuan untuk mendapatkan produk RNA yang berasal dari isolat virus yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan kit ekstraksi dari Qiagen. Metode ekstraksi RNA dilakukan sesuai dengan *manual procedure* yang direkomendasikan oleh Qiagen.

#### Amplifikasi DNA secara *OneStep Simplex RT-PCR* pada Gen M dan H5

Primer yang digunakan dalam tahap *OneStep Simplex RT-PCR* ini adalah primer M *Forward* (MF) dan M *Reverse* (MR) dengan konsentrasi masing-masing primer sebanyak 10 pmol. Komponen RT-PCR yaitu sampel RNA hasil ekstraksi isolat virus dari BBVet Wates sebanyak 5  $\mu$ l, sepasang primer gen M (primer MF dan primer MR), dan kit dari Qiagen, yaitu QIAGEN *OneStep RT-PCR Enzyme Mix*.

Langkah pertama adalah persiapan bahan untuk tahap *OneStep Simplex RT-PCR*, yaitu 10 sampel RNA virus hasil ekstraksi ditambah 3 reaksi untuk *positive control* (PC), *negative control* (NC), dan *non-template control* (NTC). Amplifikasi RT-PCR gen M dilakukan dalam beberapa tahapan reaksi yaitu diawali dengan satu siklus *reverse transcription* (RT) pada suhu 50°C selama 30 menit yang diikuti dengan satu siklus denaturasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit. Tahapan amplifikasi PCR sendiri terdiri dari tiga tahap yaitu *denaturasi* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit, dan *ekstensi/elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahapan amplifikasi PCR dilakukan secara berulang sebanyak 30 siklus. Proses *OneStep Simplex RT-PCR* gen M selanjutnya adalah satu tahapan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit dan diakhiri dengan proses pendinginan pada suhu 4°C. Produk hasil *OneStep Simplex RT-PCR* kemudian disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C untuk selanjutnya dipisahkan melalui tahap elektroforesis dalam gel agarose.

#### Amplifikasi DNA secara *OneStep Simplex RT-PCR* pada Gen H5

Pada amplifikasi DNA pada gen H5 ini mempunyai materi, metode, dan komposisi reagen sama seperti pada amplifikasi DNA pada gen M, perbedaaan hanya pada primer yang digunakan, yaitu primer H5 *Forward* (H5F) dan H5 *Reverse* (H5R).



**Elektroforesis Produk *OneStep Simplex* RT-PCR Gen M dan H5**

Tahapan visualisasi produk PCR yang dilakukan dengan elektroforesis berdasarkan metode yang digunakan oleh Sambrook *et al.*, (1989). Untuk melakukan elektroforesis DNA diperlukan suatu gel agarose sebagai medium elektroforesis. Gel agarose dengan konsentrasi 1,5 % dibuat dengan komposisi 1,2 g agarose, 80 ml 0,5x *buffer* TBE, dan 8 µl *SBYR Safe*. Tahapan elektroforesis DNA diawali dengan persiapan sampel, yaitu *loading dye* (*blue juice*) sebanyak 2 il, dan *template* produk *OneStep Simplex* RT-PCR sebanyak 8 il dicampur (*mix up and down*) dengan mikropipet di atas plastik parafilm. Proses elektroforesis berjalan selama 60 menit pada tegangan listrik 90 Volt.

Produk *OneStep Simplex* RT-PCR hasil elektroforesis divisualisasikan melalui *UV Transilluminator UVT-20 M* dengan panjang gelombang 260 nm. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya fragmen DNA sebesar 200 bp (gen M) dan 545 bp (gen H5) yang diinterpretasikan sebagai virus AI tipe A dan subtype H5.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Berdasarkan uji HA yang dilakukan, diketahui bahwa sampel nomor 1 sampai 4, dan 6 sampai 10 memberikan hasil positif terhadap uji HA yang dilakukan dan dapat dihitung titer HA. Sampel nomor 5 memberikan hasil negatif. Adanya hasil yang positif ini ditunjukkan

dengan adanya aglutinasi pada dasar cawan mikro, yaitu terbentuk presipitat seperti pasir halus. Hal tersebut menunjukkan bahwa virus tersebut adalah virus AI yang mempunyai glikoprotein *haemagglutinin*. Hasil negatif tampak karena pada dasar cawan mikro tidak terbentuk presipitat tetapi endapan/*clot*. Titer HA dihitung berdasarkan pengenceran tertinggi cairan allantois yang dapat mengaglutinasi SDM (Susanti *et al.*, 2007).

Pengujian virus 4 HAU menggunakan metode *Back Titration* dengan cara yang digunakan sama dengan uji HA. Perbedaan dengan uji HA adalah ketepatan antigen 4 HAU ditunjukkan dengan masih adanya aglutinasi pada sumuran-sumuran pengenceran 2<sup>-1</sup> dan 2<sup>-2</sup>. Berdasarkan hasil yang diperoleh dari uji HA sebelumnya, isolat 1503/VII/08 tidak digunakan karena negatif HA dan tidak diketahui titernya. Dari kesembilan sampel lainnya menunjukkan positif virus 4 HAU, selanjutnya dilakukan pengujian HI menggunakan kesembilan sampel tersebut. Menurut Swayne dan Suarez (2000), apabila hasil uji HA positif dapat dilanjutkan dengan uji HI untuk menentukan titer virus. Berdasarkan hasil dari uji HI dengan menggunakan serum positif terhadap virus AI tipe A subtype H5, sampel nomor 1 sampai 4 dan nomor 6 sampai 9 menunjukkan hasil positif dan dapat diketahui titer HI-nya, yaitu 2<sup>9</sup>, 2<sup>8</sup>, 2<sup>8</sup>, 2<sup>8</sup>, 2<sup>11</sup>, 2<sup>8</sup>, 2<sup>10</sup>, 2<sup>9</sup>, 2<sup>11</sup>. Sampel nomor 10 tidak bereaksi dengan uji HI yang dilakukan, yaitu sampel dengan kode 157/II/09. Interpretasi uji HI berbeda dengan uji HA, karena bila hasilnya positif, maka pada dasar cawan mikro akan

Tabel 3. Hasil uji serologis HA dan HI cairan allantois

No.	Kode Sampel	Status Serologis Sebelumnya		Uji HA	Enceran untuk virus 4 HAU(µl)		Titirasi Balik	Uji HI (H5)
		HA	HI (H5)		Virus	PBS		
1.	38/I/08	2 <sup>11</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>9</sup>	20	1260	2	2 <sup>6</sup>
2.	91/II/08	2 <sup>11</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>8</sup>	40	1240	3/2	2 <sup>7</sup>
3.	124/II/08	2 <sup>11</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>8</sup>	40	1240	2/1	2 <sup>7</sup>
4.	178/III/08	2 <sup>10</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>8</sup>	40	1240	3	2 <sup>7</sup>
5.	1503/XII/08	-	2 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-
6.	14/I/09	2 <sup>8</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>11</sup>	5	1275	2	2 <sup>6</sup>
7.	378/III/09	2 <sup>10</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>8</sup>	40	1240	3/2	2 <sup>4</sup>
8.	379/III/09	2 <sup>10</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>10</sup>	10	1260	2	2 <sup>5</sup>
9.	29/I/09	2 <sup>8</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>9</sup>	20	1260	2	2 <sup>6</sup>
10.	157/II/09	2 <sup>10</sup>	-	2 <sup>11</sup>	5	1275	2/1	-

Keterangan : HA = hemagglutinin; HI=hemagglutination inhibition; H5=subtipe virus influenza; HAU=HA unit

tampak adanya endapan/*clot* dan tidak ada presipitat halus. Hasil uji serologis HA dan HI pada cairan allantois yang dipanen dari TAB disajikan pada Tabel 3. Berdasarkan *Office International des Epizooties* (2008), titer HI dianggap positif menghambat virus 4 HAU bila terjadi hambatan aglutinasi SDM ayam pada pengenceran  $1/_{16}$  ( $2^{-4}$ ) atau lebih.

Proses selanjutnya adalah ekstraksi menggunakan metode yang telah dijelaskan sebelumnya menggunakan kit ekstraksi dari *QIAamp Viral RNA Kit* menghasilkan RNA sebanyak 30 µl dari masing-masing isolat virus AI. Amplifikasi gen M dan H5 dilakukan berdasarkan metode diagnosis berbasis *OneStep Simplex RT-PCR* menggunakan kit RT-PCR *Qiagen One Step RT-PCR Kit* dan *thermocycler* dari GeneAmp® PCR System 2700 yang selanjutnya dilihat pada gel agarose melalui tahap elektroforesis. Pada amplifikasi gen M dan H5 ini dilakukan pada dua kali percobaan, yaitu pada suhu *annealing* 50°C dan 52°C. Susunan sampel yang digunakan pada masing-masing suhu *annealing* tersaji pada Tabel 4.

Pada Tabel 4 disajikan urutan isolat yang digunakan dalam penelitian untuk amplifikasi secara RT-PCR gen M dan H5 yang diurutkan sesuai dengan nomor sumuran dari nomor 1 sampai dengan 13. Proses amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan dua kondisi suhu *annealing* yang berbeda, yaitu dengan suhu *annealing* yang berbeda, yaitu dengan suhu *annealing* masing masing pada 50°C dan 52°C.

Hasil elektroforesis dari tahap *OneStep Simplex RT-PCR* Gen M dengan menggunakan suhu *annealing* 50 °C disajikan pada Gambar 1.

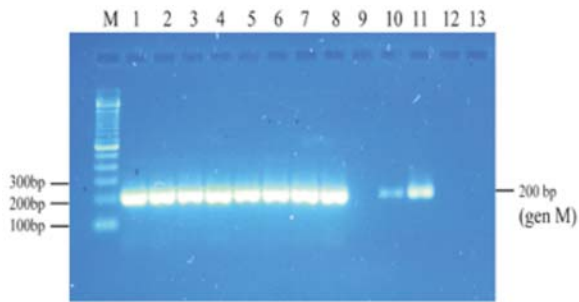
Lajur M adalah DNA *Ladder (Marker)* yang berukuran 100 bp. Pada Gambar 1, fragmen DNA yang berukuran 200 bp (gen M), seperti yang digunakan oleh *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL, 2004) terlihat pada sumuran nomor 1 sampai 8, nomor 10, dan nomor 11. Dari kesepuluh isolat tersebut, nomor 1 sampai 8 dan nomor 10 adalah virus AI tipe A, sedangkan isolat nomor 9, yaitu 1503/VII/08 bukan virus AI tipe A. Hasil elektroforesis tahap *OneStep Simplex RT-PCR* Gen H5 dengan menggunakan suhu *annealing* 50°C ditunjukkan pada Gambar 2.

Pada Gambar 2, fragmen DNA yang berukuran 545 bp (gen H5), seperti yang digunakan oleh Lee *et al.*, (2001) terlihat pada sumuran nomor 1 sampai 8 dan nomor 11. Dari kesepuluh isolat tersebut nomor 1 dan 8 adalah virus AI tipe A sub tipe H5. Isolat nomor 9 dan 10 bukan virus influenza A sub tipe H5, yaitu isolat 1503/VII/08 dan 157/II/09. Berdasarkan hasil uji sebelumnya yang telah dilakukan BBVet Wates, ternyata pada kesepuluh sampel yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat virus yang dapat menghemaglutinasi SDM ayam dan positif AI dengan amplifikasi gen M. Hasil tersebut berbeda dengan hasil uji serologi yang dilakukan dalam penelitian dan amplifikasi pada suhu *annealing* 50°C, karena pada penelitian ini dilakukan propagasi virus pada TAB yang baru dan adanya proses penyimpanan dalam jangka waktu lama.

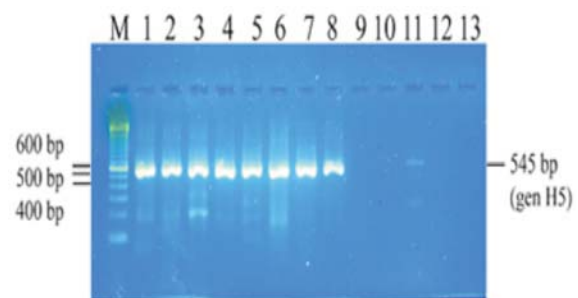
Untuk memastikan hasil yang didapat selanjutnya dilakukan amplifikasi ulang menggunakan suhu *annealing* yang

Tabel 4. Urutan isolat untuk amplifikasi gen M dan H5 menggunakan metode *OneStep Simplex RT-PCR*

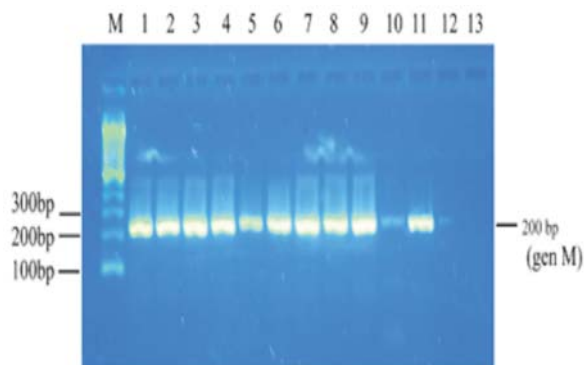
Nomor Sumuran	Urutan Isolat dengan Amplifikasi Suhu <i>Annealing</i> 50 °C	Urutan Isolat dengan Amplifikasi Suhu <i>Annealing</i> 52 °C
1.	38/I/08	38/I/08
2.	91/II/08	91/II/08
3.	124/II/08	124/II/08
4.	178/III/08	178/III/08
5.	14/I09	1503/XII/08
6.	378/III/09	14/I09
7.	379/III/09	378/III/09
8.	29/I/09	379/III/09
9.	1503/XII/08	29/I/09
10.	157/II/09	157/II/09
11.	Antigen 128 HA	Antigen 128 HA
12.	<i>Negative Control</i> (NC)	<i>Negative Control</i> (NC)
13.	<i>Non-template Control</i> (NTC)	<i>Non-template Control</i> (NTC)



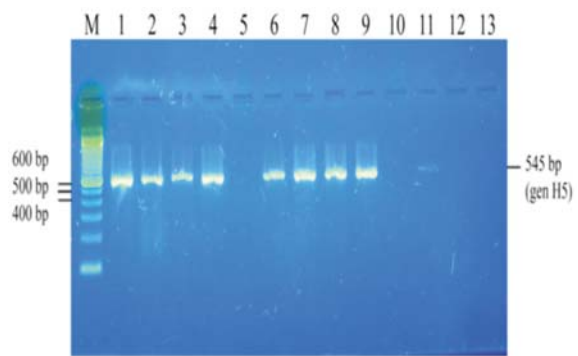
Gambar 1. Hasil amplifikasi gen M (200 bp) 10 sampel dari BBVet Wates dengan metode *OneStep Simplex* RT-PCR pada suhu *annealing* 50 °C. Lajur M adalah DNA *Ladder* 100 bp, lajur 1-10 menunjukkan nomor sampel, nomor 11 adalah *positive control* (PC) dari Antigen 128 HA, nomor 12 adalah *negative control* (NC), dan nomor 13 adalah *non-template control* (NTC). Sampel nomor 1 sampai 8, nomor 10, dan 11 menunjukkan hasil positif M, sedangkan sampel nomor 9 (1503/VII/08) menunjukkan hasil negatif M.



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen H5 (545 bp) 10 sampel dari BBVet Wates dengan metode *OneStep Simplex* RT-PCR pada suhu *annealing* 50 °C. Lajur M adalah DNA *Ladder* 100 bp, lajur 1-10 menunjukkan nomor sampel, nomor 11 adalah *positive control* (PC) dari Antigen 128 HA, nomor 12 adalah *negative control* (NC), dan nomor 13 adalah *non-template control* (NTC). Sampel nomor 1 sampai 8, dan nomor 11 menunjukkan positif H5, sedangkan nomor 9 (1503/VII/08) dan 10 (157/II/09) menunjukkan negatif H5.



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen M (200 bp) 10 sampel dari BBVet Wates dengan metode *OneStep Simplex* RT-PCR pada suhu *annealing* 52 °C. Lajur M adalah DNA *Ladder* 100 bp, lajur 1-10 menunjukkan nomor sampel, nomor 11 adalah *positive control* (PC) dari Antigen 128 HA, nomor 12 adalah *negative control* (NC), dan nomor 13 adalah *non-template control* (NTC). Sampel nomor 1 sampai 11 menunjukkan positif terhadap M.



Gambar 4. Hasil amplifikasi gen H5 (545 bp) 10 sampel dari BBVet Wates dengan metode *OneStep Simplex* RT-PCR pada suhu *annealing* 52 °C. Lajur M adalah DNA *Ladder* 100 bp, lajur 1-10 menunjukkan nomor sampel, nomor 11 adalah *positive control* (PC) dari Antigen 128 HA, nomor 12 adalah *negative control* (NC), dan nomor 13 adalah *non-template control* (NTC). Sampel nomor 1 sampai 4, 6 sampai 9, dan nomor 11 menunjukkan positif H5. Sedangkan sampel nomor 5 (1503/VII/08) dan 10 (157/II/09) menunjukkan hasil negatif H5.

ditingkatkan lebih tinggi, yaitu 52°C. Hasil elektroforesis dari tahap *OneStep Simplex* RT-PCR Gen M dengan menggunakan suhu *annealing* 52°C disajikan pada Gambar 3.

Pada Gambar 3, fragmen DNA yang berukuran 200 bp (gen M), seperti yang digunakan oleh AAHL (2004) terlihat pada sumuran nomor 1 sampai 11. Dari sepuluh sampel yang digunakan dalam penelitian menunjukkan bahwa sampel-sampel yang digunakan adalah virus influenza tipe A. Hasil

elektroforesis dari tahap *OneStep Simplex* RT-PCR gen H5 dengan menggunakan suhu *annealing* 52°C ditunjukkan pada Gambar 4.

Pada Gambar 4, disajikan fragmen DNA hasil amplifikasi berukuran 545 bp (gen H5), sesuai dengan yang dilakukan oleh Lee *et al.*, (2001) dan terlihat pada sumuran nomor 1 sampai 4, nomor 6 sampai 9, dan nomor 11. Hal tersebut menunjukkan bahwa dari sepuluh sampel yang digunakan, sampel nomor 1 sampai 4 dan nomor 6 sampai 9 adalah virus influenza

A subtype H5. Sampel nomor 5 dan 10, yaitu isolat 1503/VII/08 dan 157/II/09 bukan virus influenza A subtype H5,

Berdasarkan kedua metode *OneStep Simplex* RT-PCR tersebut ternyata didapatkan perbedaan hasil, yaitu pada suhu *annealing* 50°C, isolat 1503/VII/08 menunjukkan hasil negatif gen M, sedangkan pada suhu *annealing* 52°C menunjukkan hasil positif gen M. Berdasarkan hal tersebut sepuluh isolat yang digunakan dalam penelitian, termasuk isolat 1503/VII/08 adalah virus influenza A. Hasil amplifikasi gen H5 menggunakan metode *OneStep Simplex* RT-PCR menunjukkan bahwa dari sepuluh isolat yang digunakan, isolat 1503/VII/08 dan 157/II/09 bukan merupakan virus influenza A subtype H5.

Hasil dari amplifikasi gen M dan H5 ini selanjutnya dikoreksi dengan hasil uji serologi yang sebelumnya dilakukan, yaitu dari hasil uji HA dan HI. Hasil uji HA yang dilakukan, diketahui bahwa sembilan isolat virus yang digunakan menunjukkan hasil positif, yaitu mempunyai kemampuan mengaglutinasi eritrosit ayam dan satu isolat menunjukkan hasil negatif, yaitu isolat 1503/VII/08. Berdasarkan amplifikasi gen M (200 bp) menggunakan *OneStep Simplex* RT-PCR, sepuluh isolat yang digunakan adalah virus influenza A. Virus tersebut mempunyai kemampuan untuk menghemaglutinasi eritrosit ayam. Perbedaan tersebut muncul karena titer virus dari isolat 1503/VII/08 sangat rendah sehingga tidak dapat teridentifikasi pada uji HA sehingga memberikan hasil negatif. Hal tersebut dibuktikan pada pemanenan cairan

alantois dari isolat tersebut, kematian embrio tidak terjadi karena infeksi virus yang diinokulasikan pada TAB tersebut, tetapi karena sengaja dimatikan setelah hari keempat pascainokulasi. Berdasarkan hal ini menjelaskan bahwa kesepuluh isolat yang digunakan, termasuk isolat 1503/VII/08 adalah virus influenza A berdasarkan amplifikasi gen M menggunakan metode *OneStep Simplex* RT-PCR, yaitu suhu *annealing* 52°C.

Hasil uji HI yang dilakukan dengan menggunakan antibodi spesifik terhadap H5, diketahui bahwa delapan isolat yang diuji bereaksi positif dan diketahui titernya, sedangkan isolat 1503/VII/08 dan 157/II/09 menunjukkan hasil negatif. Pada isolat 1503/VII/08 pada pengujian sebelumnya oleh BBVet Wates menunjukkan hasil positif H5 tetapi pada penelitian yang dilakukan hasilnya negatif. Hal tersebut terjadi karena pada propagasi virus yang dilakukan, virus tidak berkembang pada TAB yang ditandai dengan tidak adanya kematian embrio secara alami. Pada amplifikasi gen H5 (545 bp) dengan metode *OneStep Simplex* RT-PCR menunjukkan hasil yang sama seperti pada uji HI sehingga dapat diketahui bahwa isolat 1503/VII/08 dan 157/II/09 bukan virus influenza A subtype H5, sedangkan yang lain adalah virus influenza A subtype H5.

Serangkaian proses penelitian yang dilakukan ini merupakan tahapan-tahapan yang membantu dalam pengembangan diagnosis cepat, tepat, dan akurat terhadap virus influenza A subtype H5 melalui amplifikasi gen M dan H5 menggunakan metode *OneStep Simplex* RT-PCR. Tahapan tersebut meliputi proses-proses

Tabel 5. Rekapitulasi uji serologis dan molekuler menggunakan metode *OneStep Simplex* RT-PCR

No.	Sampel	Uji Serologi Penelitian		<i>OneStep Simplex</i> RT-PCR			
		HA	HI(H5)	<i>Annealing</i> 50°C		<i>Annealing</i> 52°C	
				M	H5	M	H5
1.	38/I/08	+	+	+	+	+	+
2.	91/II/08	+	+	+	+	+	+
3.	124/II/08	+	+	+	+	+	+
4.	178/III/08	+	+	+	+	+	+
5.	14/I/09	+	+	+	+	+	+
6.	378/III/09	+	+	+	+	+	+
7.	379/III/09	+	+	+	+	+	+
8.	20/I/09	+	+	+	+	+	+
9.	1503/XII/08	-	-	-	-	+	-
10.	157/II/09	+	-	-	-	+	-

Keterangan: HA = hasil uji HA, HI= hasil uji HI  
M = gen Matriks, H5= gen H5



yang telah dijelaskan sebelumnya, yaitu isolasi virus pada TAB serta uji serologis menggunakan HA dan HI. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka hasil akhirnya adalah sepuluh isolat yang digunakan merupakan isolat positif virus influenza A dengan delapan isolat diantaranya positif subtype H5. Hasil rekapitulasi uji serologi dan molekuler menggunakan metode *OneStep Simplex* RT-PCR dapat disajikan pada Tabel 5.

Proses isolasi virus pada TAB meliputi inokulasi sampai pemanenan virus. Proses tersebut dilakukan dengan cara yang benar dan tepat sesuai waktunya. Dalam penentuan waktu untuk panen virus, tidak boleh terlalu lama karena mengakibatkan pembusukan telur, sehingga virus tidak dapat dipanen. Seperti yang tercantum dalam *Office International des Epizooties* (2008), telur tersebut diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 4-7 hari dan kemudian telur diamati untuk melihat perubahan yang terjadi. Jika terjadi kematian embrio atau ditemukan embrio yang hampir mati, telur tersebut dimasukkan ke *refrigerator* pada suhu 4°C dan selanjutnya diuji aktivitas hemaglutinasi (HA) virus influenza yang dipanen.

Uji HA dan HI dilakukan berdasarkan kemampuan virus untuk menghemaglutinasi sel darah merah ayam (HA) dan penentuan subtype virus berdasarkan serum dengan antibodi spesifik (HI). Pada hasil pengujian diketahui bahwa isolat virus yang digunakan menunjukkan titer virus dan antibodi, kecuali pada sampel 1503/VII/08 yang memberikan hasil negatif pada uji HA, serta sampel 157/II/09 yang memberikan hasil negatif pada uji HI. Uji HA dapat memberikan hasil negatif apabila titer virus rendah. Selanjutnya bila HA positif dapat dilanjutkan dengan uji HI untuk menentukan titer virus (Swayne dan Suarez, 2000).

Uji HA dapat memberikan hasil negatif apabila titer virus rendah. Untuk dapat menginfeksi embrio (EID<sub>50</sub>), titer virus berkisar 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> per milliliter cairan allantois. Pada embrio yang tetap hidup setelah inkubasi, virus dapat dipasase kembali pada telur ayam berembrio yang baru. Selanjutnya bila HA positif dapat dilanjutkan dengan uji HI untuk menentukan titer virus (Swayne dan Suarez 2000).

Untuk memastikan hasil dari uji serologi yang telah dilakukan, langkah selanjutnya adalah amplifikasi gen M dan H5 menggunakan metode diagnosis RT-PCR. Adanya gen M menunjukkan bahwa virus tersebut positif virus influenza A, sedangkan adanya gen H5 menunjukkan bahwa virus tersebut adalah

virus influenza tipe A subtype H5. Pengujian yang dilakukan dengan menggunakan kit *OneStep* RT-PCR dari Qiagen serta primer M yang dipakai oleh AAHL (2004) dan primer H5 yang dipakai oleh Lee *et al.*, (2001). Penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali sebagai cara untuk optimasi suhu PCR, yaitu dengan suhu *annealing* 50°C dan 52°C. Dari percobaan pertama pada suhu 50 °C, ternyata tidak semua gen M muncul. Selanjutnya diusahakan dengan percobaan kembali tetapi dengan suhu yang lebih tinggi, yaitu 52°C. Berdasarkan sekuens primer yang digunakan, jumlah GC pada primer M lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah AT. Hal tersebut menyebabkan semakin tingginya T<sub>m</sub> yang diperlukan, sehingga suhu yang diperlukan semakin tinggi untuk terjadi penempelan primer (*annealing temperature*). Ikatan basa GC lebih stabil dibandingkan dengan dengan basa AT karena adanya ikatan hidrogen yang lebih banyak dan kuat, yaitu tiga ikatan dibanding AT yang hanya mempunyai dua ikatan hidrogen. Adanya ikatan yang lebih kuat tersebut menyebabkan suhu yang digunakan untuk melepaskan ikatan hidrogen menjadi lebih tinggi dan menyebabkan *melting temperature* (T<sub>m</sub>) meningkat (Lodge *et al.*, 2007).

Menurut Lee *et al.*, (2001), pasangan primer yang spesifik untuk mengamplifikasi gen *hemagglutinin* (HA) biasanya terkait dengan subtype virus influenza yang digunakan. Konsentrasi Mg pada campuran PCR (*PCR mix*) umumnya berkisar antara 0,5–5 mM. Kelebihan konsentrasi Mg pada *PCR mix* berpengaruh terhadap *primer annealing*, disosiasi rantai DNA, produk PCR, spesifitas produk PCR, terbentuknya *artefak* dan aktivitas enzim *Taq polymerase* (Viljoen *et al.*, 2005).

Metode RT-PCR adalah metode diagnosis yang sensitif, spesifik, dan akurat digunakan dalam mendiagnosis virus (Aguilar *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1996). Metode diagnosis tersebut dikembangkan untuk mendeteksi asam nukleat virus AI dari sampel dan mengidentifikasi virulensi virus yang berkaitan dengan HPAI, khususnya subtype H5 dan H7 (Swayne dan Suarez 2000). Amplifikasi PCR merupakan metode diagnosis yang dianjurkan sebagai cara cepat untuk mendeteksi virus influenza dengan spesifik berdasarkan tipe maupun subtipe (Payungporn *et al.*, 2004). Metode PCR tersebut mempunyai tingkat kecepatan dan sensitifitas dalam mendeteksi infeksi virus. Sensitifitas metode PCR mencapai 93%, yaitu lebih tinggi dari kultur sel (80%) dan ELISA (62%) (Steininger *et al.*, 2002).

## SIMPULAN

*OneStep Simplex* RT-PCR merupakan metode diagnosis yang efektif, cepat, tepat, dan akurat yang digunakan untuk mendiagnosis virus influenza tipe A subtipe H5, dari sebanyak 10 isolat virus yang diuji dalam penelitian, 10 isolat merupakan isolat yang terdiagnosis positif sebagai virus influenza tipe A dengan 8 isolat diantaranya terdiagnosis sebagai virus influenza A subtipe H5. Metode RT-PCR ini juga mempunyai tingkat sensitifitas dan keakuratan yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan uji serologi, yaitu uji HA dan HI. Dalam uji serologi tidak akan tampak hasilnya apabila titer virus yang digunakan rendah.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates, Kementan Republik Indonesia dan Kepala Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Multi Tahun Hibah Bersaing XVII (TA 2009-2010) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. dan Hibah Kompetitif Sesuai Strategi Nasional (TA 2009-2010) DP2M DIKTI Kemendiknas Republik Indonesia

## DAFTAR PUSTAKA

- AAHL. 2004. *Molecular Diagnostic Test Available at Australian Animal Health Laboratory*. www.csiro.au
- Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria JE. 2000. Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2, 3 and 4 in Clinical samples of Pediatric Patients by Multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 38: 1191–1195
- Batson M. 2007. *Haemagglutination Inhibition Test for the Detection of Antibodies to Influenza Viruses in Serum at Australian Animal Health Laboratory*. CSIRO 13: 4-45
- Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM (1997) Detection of Enteroviral RNA and Specific DNA of Herpesviruses by Multiplex Genome Amplification. *J Virol Methods* 66: 39–50
- Jackson R, Morris DJ, Cooper RJ, Bailey AS, Klapper PE, Cleator GM, Tullo AB. 1996. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Adenovirus and Herpes Simplex Virus in Eye Swabs. *J Virol Methods* 56: 41–48
- Lee S, Chang P, Shien J, Cheng MC. and Shieh H.P. 2001. Identification and Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcription-PCR. *J Virol Methods* 97:13-22.
- Lodge J, Lund P, Minchin S. 2007. *Gene Cloning Principles and Applications*. Taylor & Francis Group : British.
- Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. 2005. Influenza. *Lancet* 362 :1733-1745.
- Office International des Epizooties. 2008. *Avian Influenza. OIE Terrestrial Manual*. www.oie.int.
- Payungporn S, Piraya P, Salin C, Apiradee T, Juthatip K, Kanisak O, Alongkorn A, Yong P. 2004. Single-Step Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection. *Viral Immunol.* 17:588-593.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. second edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press :
- Susanti R., Soejoedono R.D., Mahardika I.G.N.K., Wibawan I.W.T. and Suhartono M.T. 2007. Waterfowl Potential as Reservoirs of High Pathogenic Avian Influenza H5N1 viruses. *JITV* 12(2): 160-166.
- 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
- Viljoen GJ, Nell LH, Crowther JR. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer : IAEA-FAO (Fiat-Panis).