

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS AI (*Avian Influenza*) SUB-TIPE H5N1 PADA ITIK SAKIT YANG DIPERDAGANGKAN DI PASAR UNGGAS HULU SUNGAI UTARA

Isolation and Identification of AI (*Avian Influenza*) Virus Sub-type H5N1 on the Duck Trade in the Poultry Market Hulu Sungai Utara

Herliani ^{1*}, Abrani Sulaiman ¹, M. Ilmi Hidayat ²

¹ Faculty of Agriculture, Lambung Mangkurat University, Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36 Banjarbaru 70714. Telp. 0511-4781551, Indonesia

² Faculty of Agriculture, Kalimantan Islamic University, Jl. Adhyaksa No.2 Kayutangi Banjarmasin, Telp. : 0511-3304352, Indonesia

*Penulis koresponden: herliani@ulm.ac.id

Abstract

The main purpose of this research is to maintain the population of alabio duck, which is the germplasma in South Kalimantan. While the specific objectives of this study are expected to be able to prepare alabio ducks that are free from Avian Influenza (AI) virus. AI virus is type A influenza virus with birds as the main host. AI virus is broadly divided into Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) and High Pathogenic Avian Influenza (HPAI). One source of the spread of AI is the live poultry market because of poor biosecurity, cleanliness and poor sanitation that causes the spread and transmission of AI viruses in the poultry market. Samples were collected by cloaca swab in the poultry market of Hulu Sungai Utara District (HSU). Obtained 14 samples taken from ducks suspected of being sick with clinical symptoms of torticollis, tremor and difficulty standing, isolated on TAB Specific Negative Antibody (SAN) then incubated for five days, after the allantoic fluid incubation period was tested by hemagglutinin (HA) test and test hemagglutinin-Inhibition (HI). The results showed six that samples of virus were positive. So it can be concluded that ducks that are traded in the HSU poultry market are infected with AI virus H5N1 subtype and the HSU poultry market has the potential as a place for the spread of AI to both poultry and buyers.

Keywords: Avian Influenza Virus, ducks, H5N1, market, trading

1. PENDAHULUAN

Ditjen PKH 2013, melaporkan bahwa sejak bulan Oktober 2012 penyakit flu burung telah menyerang ternak itik di Indonesia, menyebar di 16 provinsi pada 104 kabupaten/kota. Wabah penyakit ini merupakan ancaman serius terhadap kehidupan masyarakat karena dampaknya bukan hanya aspek zoonosis semata tapi juga berdampak pada sektor ekonomi karena tingginya tingkat kematian pada ternak unggas, flu burung juga menimbulkan kepanikan karena terbukti dapat menular dan mematikan pada manusia (Hasan, 2009; Dharmawan dan Wahyuningsih, 2010). Virus AI menyebar sangat cepat sehingga menyebabkan kematian pada unggas dalam jumlah sangat besar.

Menurut Asmara (2012) kasus kematian massal pada ternak itik sebagian besar disebabkan oleh virus AI sub-tipe H5N1 *clade* 2.3.2.1. Virus jenis ini bukan merupakan hasil mutasi dari virus AI *clade* 2.1 yang sebelumnya sudah mewabah di Indonesia. Dharmayanti (2013) melaporkan

kematian pada itik bukan hanya disebabkan oleh adanya introduksi virus AI *clade* 2.3.2. saja, tapi dapat juga disebabkan oleh virus AI *clade* 2.1.3. Dari data tersebut menunjukkan virus AI H5N1 masih berada di Indonesia dan merupakan ancaman bagi peternak unggas maupun manusia. Pudjiatmoko (2012) menyatakan bahwa pemeriksaan secara klinis terhadap itik yang terinfeksi *Avian Influenza*, itik yang sakit menunjukkan gejala klinis syaraf seperti torticollis, tremor, kesulitan berdiri, kehilangan keseimbangan saat berjalan dan pada kasus parah disertai kematian. Virus AI menginfeksi tubuh itik yang rentan kemudian masuk kedalam tubuh, melalui proses adaptasi dapat berubah sifat dari *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI), virus yang telah mengalami perubahan akan bersifat patogen dan sangat berbahaya serta dapat menyebabkan kematian pada itik. Karena habitat itik dekat dengan perairan umum dan pola pemeliharaan yang digembalakan sehingga berpotensi besar untuk

menyebarkan virus flu burung dari itik ke lingkungan sekitarnya.

Kalimantan Selatan memiliki rumpun itik yang dikenal dengan sebutan itik alabio yang menjadi sumber daya genetik lokal. Sejak tahun 2011 itik alabio telah resmi menjadi salah satu itik percontohan nasional yang tertuang pada Peraturan Menteri Pertanian, dengan keputusan Nomor 2921/Kpts/OT.140/6/2011 menyatakan bahwa itik alabio merupakan kekayaan sumberdaya genetik ternak lokal Indonesia yang mempunyai ciri khas yang berbeda dengan rumpun itik asli atau lokal lainnya. Masyarakat Kalimantan Selatan menjadikan itik alabio dikenal sebagai sumber mata pencaharian karena itik alabio penghasil daging dan telur (Susanti dan Prasetyo 2009).

Itik alabio berasal dari Kecamatan Alabio Kabupaten Hulu Sungai utara, Provinsi Kalimantan Selatan, dilihat dari sudut epidemiologi rentan terhadap flu burung karena merupakan tempat lalu lintas ternak, tempat peternakan unggas, sebagai pasar transaksi jual-beli unggas dan merupakan sentral peternakan itik di Kalimantan Selatan. Itik alabio biasanya dijual hidup di pasar unggas bercampur dengan unggas hidup lainnya.

Salah satu sumber penyebaran penyakit AI adalah *live bird market* dimana bermacam-macam unggas-unggas dijual (Kyaw *et.al.* (2008). Pasar unggas yang kurang memperhatikan manajemen pasar dan tatalokasi yang baik, biosekuritas yang lemah serta kebersihan yang buruk akan mendorong penyebaran dan penularan virus AI di pasar unggas. Pasar unggas juga memfasilitasi kontak langsung antara burung liar yang membawa virus *Avian Influenza* (AI) pada unggas dengan manusia (pedagang maupun pembeli) (Poetranto *et.al.* 2011).

Itik alabio yang diperdagangkan pada pasar unggas Hulu Sungai Utara berpotensi menyebabkan terjadinya persebaran virus *Avian Influenza* karena itik tersebut dijual dan didistribusikan ke berbagai daerah di Kalimantan Selatan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian dengan judul Isolasi dan Identifikasi Virus AI (*Avian Influenza*) subtipe H5N1 pada itik alabio sakit yang diperdagangkan pada pasar unggas Hulu Sungai Utara

1. METODE

2.1 Isolasi Virus

Sampel diambil dari beberapa pasang itik alabio yang ada yang dijual di pasar unggas Hulu Sungai Utara. Sampel yang didapat berjumlah 14 buah

berasal dari itik alabio sakit dengan gejala klinis tortikolis, tremor, dan kesulitan berdiri.

Sampel *swab* kloaka itik alabio di masukkan ke miktotube yang berisi *phosphate buffered saline* (PBS) sebanyak 0.5 ml dengan menambahkan Streptomycin (2mg/ml) dan Penicillin (2000 unit/ml). Suspensi sample dibawa ke laboratorium dan disentrifigase dengan kecepatan rendah (500 - 1500 x g). Suspensi diletakan pada suhu ruang selama 15-60 menit sebelum diinokulasikan ke dalam cairan alantois TAB (Telur Ayam Berembrio) SAN (Spesifik Antibodi Negatif) usia 9-11hari sebanyak 0,1-0,2 ml dan diinkubasikan pada suhu 35 – 37°C dengan kelembapan relative 60-70% selama 5 hari. TAB yang mati dan yang tersis setelah waktu inkubasi didinginkan pada suhu 4°C selama 4 – 18 jam, cairan alantois dipanen secara aseptik kemudian dilakukan uji HA.

2.2 Uji Hemaglutinasi (HA) Mikroteknik

Uji HA mikroteknik menggunakan mikrotelat bentuk V. Cairan alantois dari TAB yang telah diinokulasikan virus diencerkan dengan PBS pada kelipatan ganda, yakni 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, dan seterusnya sampai 1/1024, kemudian ditambahkan eritrosit ayam 0,5% pada setiap lubang. Selanjutnya diinkubasikan selama 40 menit. Uji HA positif ditandai dengan terjadinya hemaglutinasi sempurna (100%) yang terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata (*diffuse*) pada dasar mikrotelat dan penjernihan dari cairan bagian atas tanpa terjadi pengendapan eritrosit yang berbentuk titik didasar mikrotelat (OIE 2014). Setelah diketahui titer antigen, selanjutnya dibuat antigen 4 HA unit untuk identifikasi virus pada uji HI.

2.3 Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) Mikroteknik

Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) memiliki sensitifitas yang tinggi karena dapat mendeteksi antigen hemaglutinin (HA) virus AI secara spesifik. Uji HI menggunakan kontrol antiserum H5N1 *clade* 2.3.2 yang telah diketahui titernya sebesar 2⁵ diencerkan dengan PBS pada kelipatan 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, dan seterusnya sampai 1/1024, kemudian ditambahkan antigen sampel 4 HAU dan juga satu baris menggunakan antigen AI produksi Balitvet Banjarbaru sebagai kontrol. Inkubasikan selama 20 menit. Setelah itu tambahkan RBC (*Red Blood Cell*) ayam 1%. Kemudian diinkubasikan kembali selama 30 menit, hasil terbaik apabila diinkubasikan pada suhu kulkas dengan penambahan waktu.

Adanya hambatan aglutinasi menunjukkan virus *Avian Influenza* subtype H5N1 (OIE, 2014). Menurut Capua and Terregino (2009), isolat sampel dianggap positif apabila titer HI dari serum menggunakan antigen sampel $\pm$ sama dengan titer HI dari serum dengan menggunakan antigen kontrol.

2.4 Analisis Data

Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar, selanjutnya data dianalisis secara deskriptif

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi sampel lapangan yang dilakukan selama kurang lebih 1 bulan. diperoleh 14 sampel swab itik alabio yang diduga terinfeksi *Avian Influenza*. Sampel swab dimasukkan ke dalam PBS (phofat Baffer Salin) yang telah dicampur dengan antibiotik dan antifungi yang tujuannya untuk mengurangi cemaran bakteri dan jamur.



Gambar.1 Pasar unggas Hulu Sungai Utara

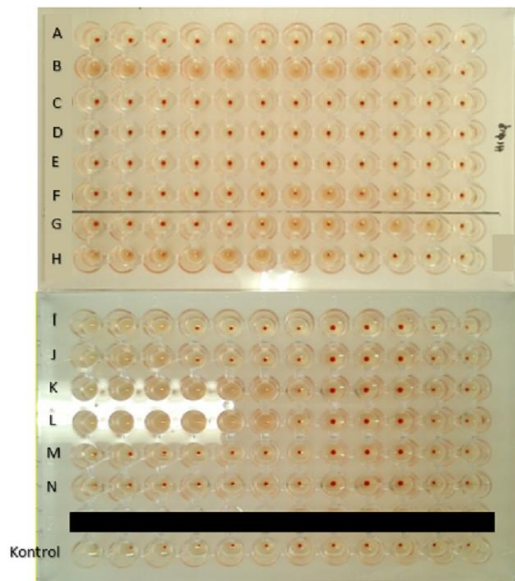
Pengambilan sampel penelitian ini dipilih swab kloaka, sebab kloaka diketahui merupakan tempat feses dieksresikan. Virus AI dapat bertahan hidup walau di luar tubuh inangnya, salah satunya pada feses, dengan suhu 4°C virus tetap hidup di feses hingga 35 hari, sedangkan pada 37°C dapat bertahan hidup hingga 6 hari (Poetranto 2011). Sistem pencernaan dan sistem respirasi diketahui memiliki reseptor virus AI yaitu Neu5Aca-2,3Gal (reseptor α -2,3, *avian-like receptors*). Sehingga ketika unggas terinfeksi virus AI, virus yang masuk melalui saluran pencernaan unggas akan bereplikasi menjadi semakin banyak, kemudian sel akan lisis dan virua AI akan terlepas dan masuk ke saluran pencernaan unggas dan keluar melalui feses. (Costa *et al.* 2012; Radji 2006). Sampel yang diperoleh kemudian diinokulasikan pada TAB SAN dan diinkubasikan selama 5 hari. Setelah di panen secara aseptis, cairan allantois di uji HA.

Tabel 1. Data kematian TAB yang diinokulasi virus AI dari itik alabio

No.	Label sampel	Hour post infection (hpi)	Titer HA	Keterangan
1	A	4x24 hpi	-	
2	B	2x24 hpi	2 ¹⁰	
3	C	4x24 hpi	-	
4	D	5x24 hpi	-	
5	E	5x24 hpi	-	
6	F	5x24 hpi	-	Tidak mati
7	G	5x24 hpi	-	Tidak mati
8	H	2x24 hpi	2 ⁷	
9	I	4x24 hpi	2 ³	
10	J	4x24 hpi	2 ³	
11	K	3x24 hpi	2 ⁶	
12	L	3x24 hpi	2 ⁶	
13	M	5x24 hpi	-	
14	N	5x24 hpi	-	
15	Kontrol	5x24 hpi	-	Tidak mati

Hasil uji HA (Gambar 2) menunjukkan adanya pertumbuhan virus yang diinokulasikan pada TAB. Pada dasar mikropelat terjadi hemaglutinasi pada sampel B, H, I, J, K dan L. Nilai titer HA berkisar antara 2⁵-2¹⁰. Nilai (titer) virus yang tinggi menunjukkan semakin cepat dan kuat terjadinya reaksi aglutinasi. Titer HA memperlihatkan jumlah unit HA yang dapat mengaglutinasi eritrosit sehingga pada mikropelat terlihat gumpalan kecil-kecil eritrosit yang tersebar dan tidak memusat di tengah. Stevens *et al.* (2006) menyatakan hal yang mendasari deteksi keberadaan virus AI adalah aktivitas dari protein HA. Protein HA virus influenza akan melekat secara spesifik dengan reseptor permukaan sel yang peka dimana reseptor ini berupa asam sialat α -2,3 dan memfasilitasi proses infeksi. Reseptor tersebut juga dimiliki oleh eritrosit ayam, apabila eritrosit ayam dicampur dengan virus influenza dalam pembagian yang seimbang maka terjadi ikatan antara eritrosit dan protein HA yang ditandai dengan aglutinasi. Sampel A, C, D, E, F, G, M dan N menunjukkan hasil negatif, terlihat dari tidak adanya aglutinasi pada dasar mikropelat yang disebabkan tidak adanya protein HA yang berikatan dengan eritrosit.

Banyak faktor yang mempengaruhi aglutinasi virus dengan eritrosit antara lain: eritrosit hewan yang digunakan, tempratur inkubasi, lama inkubasi, pH dari pengencer dan perlakuan serum (Burlison *et al.* 1992; Hierholzer *et al.* 1969).

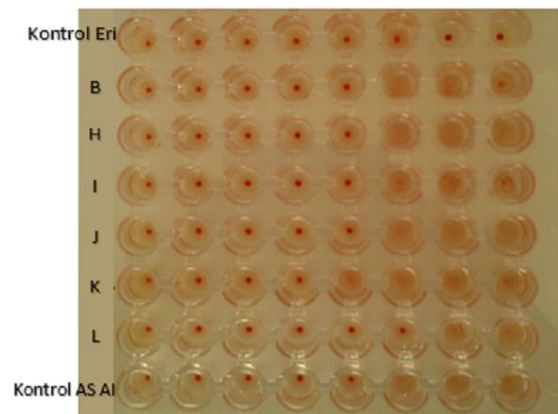


Gambar 2. Uji HA cairan allantois TAB yang diinokulasi virus AI dari tik alabio

Tabel 1 memperlihatkan kematian TAB terjadi pada 2x24 hpi setelah virus diinokulasikan, sedangkan TAB kontrol tidak mengalami kematian. Menurut Dharmayanti *et al.* (2014) virus AI sub tipe H5N1 dapat membunuh embrio ayam dalam waktu 48-72 jam tergantung dari karakter genetik dari virus. Kematian embrio terjadi kurang dari 24 jam pasca inokulasi akan dianggap sebagai kematian karena faktor non spesifik.

Untuk mengidentifikasi lebih lanjut terhadap sub tipe virus tersebut maka dilakukan uji HI menggunakan antiserum spesifik AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang telah diketahui titernya sebesar 2^5 . Antiserum diperoleh dari Balitvet Banjarbaru. Nilai titer HI dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 3. Kode sampel B, H, I, J, K, dan L menunjukkan hasil positif dengan nilai titer berkisar antara $2^4 - 2^6$, ditandai dengan adanya reaksi hambatan aktifitas hemaglutinasi dari isolat tersebut terhadap eritrosit ayam. Capua and Terregino (2009) menyatakan untuk identifikasi virus, titer HI dianggap positif apabila titer HI dari antiserum menggunakan antigen sampel $\pm$ sama dengan titer HI dari antiserum dengan menggunakan antigen kontrol. Hasil pembatan aglutinasi pada ke 6 sampel penelitian ini menunjukkan adanya virus Avian Influenza sub tipe H5N1. Antiserum yang digunakan telah Spesifik H5N1 *clade* 2.3.2 sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat swab kloaka itik alabio Hulu Sungai Utara adalah virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2. Titer 2^4 pada sampel K dengan titer 2^6 pada sampel L merupakan kesalahan dalam teknis

pengerjaan seperti tidak tepatnya pengenceran dalam pembuatan antigen 4 HA unit.



Gambar 3. Uji HI sampel positif HA

Tabel 2. Hasil uji HI yang berasal dari sampel positif uji HA

No.	Kode Sampel	Titer HI
1	Kontrol Eritrosit	-
2	B	2^5
3	H	2^5
4	I	2^5
5	J	2^5
6	K	2^4
7	L	2^6
8	Kontrol Antiserum AI dengan AG kontrol	2^5

Berdasarkan hasil uji HA/HI menggunakan antiserum spesifik virus AI, maka dapat dipastikan bahwa 6 dari 14 sampel tersebut positif virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2. Hal dapat dilihat dengan adanya aglutinasi pada hasil uji HA dan hasil uji hambatan aglutinasi pada hasil uji HI memperlihatkan reaksi spesifik antara virus AI dengan antiserum H5N1 *clade* 2.3.2.

Ditemukannya sampel positif terinfeksi virus AI setelah dilakukan uji HA dan uji HI menunjukkan bahwa itik yang diperdagangkan pada Pasar Unggas Hulu Sungai Utara terinfeksi virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 dan pasar unggas Hulu Sungai Utara berpotensi sebagai tempat penyebaran penyakit AI baik kepada sesama unggas maupun kepada pembeli. Itik alabio juga dikirim ke berbagai daerah di Kalimantan Selatan, bahkan juga keluar provinsi, seperti ke Kalimantan Tengah. Hal ini bisa memperbesar potensi itik alabio menjadi sumber penyebaran virus *Avian Influenza*.

Kasus yang terjadi pada tahun 2012, kematian banyak itik yang disebabkan H5N1 *clade* 2.3.2, tetapi itik juga diketahui dapat menjadi

pembawa (*carrier*) virus AI H5N1 *clade* 2.1.3 (DEPTAN, 2013). Hal ini menunjukkan bahwa itik tidak akan sakit karena infeksi dari virus AI H5N1 *clade* 2.1.3 tetapi virus ini dapat beradaptasi ditubuh itik dan menjadi patogenik terhadap ayam.

4. SIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa itik yang diperdagangkan pada pasar unggas Hulu Sungai Utara terinfeksi virus AI subtype H5N1 dan pasar unggas Hulu Sungai Utara berpotensi sebagai tempat terjadinya penyebaran penyakit AI baik kepada sesama unggas maupun kepada pembeli.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah memberikan dana Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) tahun 2018, Ketua dan Lab.Virologi Balai Veteriner Banjarbaru, Ketua LPPM ULM, dan Kepala Dinas Peternakan HSU.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Asmara W. 2012. *Flu Burung Jenis Baru Sebabkan Ribuan Itik dan Unggas Mati Mendadak*. Rilis Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. 10 Mei 2013.
- Burleson FG, Thoma MC, Danny LW. 1992. *Virology, A Laboratory Manual*. Academic Press, London, United Kingdom
- Capua I, Terregino C. 2009. Clinical Traits and pathology of avian influenza infections, Guidelines for farm visit and differential diagnosis. In: Capua I, Alexander DJ. (Eds). *Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*. Springer. Milan.
- Costa T, Chaves AJ, Valle R, Darji A, Riel DV, Kuiken T, Majo N, Ramis R. 2012. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Veterinary Research* 43:28
- DEPTAN. 2013. <http://epetani.deptan.go.id/budidaya/jurus-jitu-melawan-flu-burung-avian-influenza-8357> [1Maret 2014]
- Ditjen PKH. 2013. Update perkembangan kasus Avian Influenza (AI) pada unggas Statistik peternakan dan kesehatan hewan 2012. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian, Jakarta. 210 hlm.
- Dharmawan R, Wahyuningsih S. 2010. Penelusuran perkembangan virus Avian Influenza dengan metode antigenic cartography, *Prosiding Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah Kesehatan Hewan Tahun 2010 di Balai Besar Veteriner Wates*.
- Dharmayanti NLPI, Indriani R, Hartawan R, Ratnawati A. 2014. Fenotipe Virus Avian Influenza (AI) subtype H5N1 berbeda karakter genetik di Indonesia. *Jurnal Biologi Indonesia* 10(2): 259-269 (2014).
- Hasan MZ. 2009. *Kebijakan Nasional Pengendalian Penyakit Avian Influenza (Flu Burung) di Indonesia*. Surabaya 21 Januari 2009.
- Hierholzer JC, Morris TS, Elmer CH. 1969. Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Applied Microbiol.* 18: 824.
- Kyaw T, Mon CCS, Yu TT, Win TT. 2008. Study on HPAI Situation in Live Bird Markets in Myanmar. *The 15th Congress of the Federation of Asian Veterinary Association, FAVA and OIE Symposium*, Bangkok, Thailand. 27 – 30 October 2008.
- OIE. 2014. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 2.3.14*.
- Poetranto ED, Yamaoka M, Nastri AM, Krisna LAW, Rahman MH, Wulandari L, Yudhawati R, Ginting TE, Makino A, Shinya K, Kawaoka Y. 2011. An H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a local tree sparrow in Indonesia. *Microbiol Immunol* 55: 666–672
- Pudjiatmoko. 2012. Identifikasi sebuah *clade* baru virus Avian Influenza Subtipe H5N1 di Indonesia. *Jurnal Atani Tokyo*. 20 Desember 2012.
- Radji M. 2006. Avian InfluenzaA (H5N1): Patogenesis, pencegahan, dan penyebaran pada manusia. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 3(2): 55-65.
- Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312(5772):404-410
- Susanti T, Prasetyo LH. 2009. Pendugaan parameter genetik sifat-sifat produksi telur itik alabio. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner "Inovasi Teknologi Mendukung Pengembangan Agribisnis Peternakan Ramah Lingkungan"*. Bogor, 11-12 Nopember 2008. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 588-610.
