

Deteksi Antibodi Akibat Paparan Virus AI Subtipe H5N1 pada Unggas Air Domestik di Sekitar Cagar Alam Pulau Dua

Dewi Elfidasari¹, Riris Lindia Puspitasari¹, Agridzadana Frisa²

¹Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi

²Mahasiswa Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Al Azhar Indonesia, Jl. Sisingamangaraja, Jakarta 12110

Penulis untuk korespondensi/Email: d_elfidasari@uai.ac.id

Abstrak – Antibodi terbentuk sebagai respon terhadap masuknya antigen sehingga dapat mengenali dan mengikat antigen secara spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi antibodi yang terbentuk akibat infeksi atau paparan virus AI subtipe H5N1 pada unggas air domestik peliharaan masyarakat (khususnya bebek dan mentok) yang diduga merupakan sumber awal penularan virus AI pada burung-burung air di sekitar kawasan CAPD. Analisa adanya antibodi pada serum dilakukan dengan uji HA dan HI. Hasil deteksi terhadap pembentukan antibodi pada serum darah unggas air domestik menunjukkan bahwa unggas-unggas tersebut pernah *terpapar* virus AI subtipe H5N1. Nilai rata-rata titer untuk masing-masing unggas yaitu $2^{7,9}$ untuk mentok dan $2^{4,6}$ untuk Itik dengan nilai seroprevalensi untuk keseluruhan spesies mencapai 100% akan tetapi seluruh sampel unggas yang diuji tidak menunjukkan gejala klinis infeksi AI.

Abstract – Antibodies formed as a response to the entry of antigens that can recognize and bind to specific antigens. This study aims to detect the antibodies due to infection or exposure to AI virus subtype H5N1 in domestic waterfowl pet society (especially duck and stuck) which allegedly is the initial source of transmission of AI virus in water birds around the CAPD. We use HA and HI test to analyzed the antibody. Our results of the detection of antibody formation in the blood serum showed that domestic waterfowl birds were exposed to AI virus subtype H5N1. Average titer values were 27.9 and 24.6 for bird and duck, respectively with seroprevalence achieving 100% overall species. All poultry samples tested showed no clinical symptoms of AI infection.

Keyword – Antibody, Water fowl, HI-Test, AI Virus Subtype H5N1, titer

PENDAHULUAN

A *Avian Influenza* (AI) subtipe H5N1 sejak tahun 1959 sudah mulai mewabah di belahan dunia. Benua Asia, Afrika, Amerika, Australia bahkan Eropa dalam kurun waktu yang panjang telah terinfeksi Virus AI (VAI) tersebut sehingga menyebabkan kerugian besar. Virus ini pertama kali menyerang unggas jenis ayam.

Pada tahun 1959 dilaporkan bahwa dua kelompok ayam terindikasi terkena virus AI di Skotlandia. Kemudian ribuan hingga puluhan ribu kalkun ditemukan mati di sekitar Inggris dan Kanada dan semakin meluas pada jenis unggas lainnya

termasuk angsa, bebek, burung puyuh bahkan burung liar. Ratusan ribu bahkan jutaan unggas harus dimusnahkan. Virus AI mulai masuk Asia sekitar tahun 1994 di Pakistan dan di awal tahun 2003 sudah mewabah hingga Indonesia

Berbagai jenis unggas, mamalia pun menjadi target penularan Virus *Avian Influenza* (VAI) subtipe H5N1 tidak terkecuali pada manusia. Data yang dilaporkan kepada WHO, sejak 2003 hingga 2010 telah terjadi 503 kasus *Avian Influenza* (AI) pada manusia dengan tingkat kematian mencapai 59,4% atau sekitar 299 kasus terjadi kematian.

Burung-burung air yang liar, terutama yang termasuk dalam orde *Anseriformis* (bebek dan angsa) dan *Charadriiformis* (burung camar dan burung-burung pantai), adalah pembawa (*carrier*) seluruh varietas sub tipe dari virus influenza A, dan oleh karenanya, sangat mungkin merupakan penampung (*reservoir*) alami untuk semua jenis virus influenza [1] [2].

Data pada kasus yang pernah terjadi di daerah Banten Indonesia, dikutip dari laporan Departemen Pertanian menyatakan bahwa sejak akhir bulan Agustus 2003 sampai akhir Januari 2004 telah terjadi kematian pada unggas sedikitnya 4,7 juta ekor [3].

Virus-virus influenza A unggas biasanya tidak menimbulkan penyakit pada *reservoir* alami mereka karena Virus tersebut dalam keadaan *Low pathogenic* atau berpatogenitas rendah sehingga hanya mengakibatkan penurunan produksi telur yang bersifat ringan dan sementara, atau menurunkan penambahan berat badan dalam unggas pedaging [4]. Turunan (*strain*) virus *Influenza* berpatogenitas rendah (*Low Pathogenic Avian Influenza Virus, LPAIV*) dapat ditularkan dari unggas *reservoir* ke unggas ternak yang rentan seperti ayam dan kalkun.

Pada spesies unggas *reservoir* tersebut menjadi sebab dari terjadinya beberapa siklus penularan, turunan (*strain*) virus tersebut dapat mengalami serangkaian mutasi yang beradaptasi dengan inangnya yang baru. Virus *Influenza A* sub tipe H5 dan H7 bukan saja mengalami fase adaptasi dengan inang tetapi dapat pula berubah dengan cepat melalui mutasi menjadi bentuk yang sangat patogen (*Highly Pathogenic Avian Influnza Virus, HPAIV*), yang mampu menimbulkan penyakit sistemik yang ganas dan mematikan secara cepat [5].

Dari hasil penelitian yang dilakukan pada tahun 2007-2011 terbukti bahwa unggas air dengan spesies Kowak Malam (*Nycticorax nycticorax*), Kuntul Besar (*Casmerodius albus*), Kuntul Sedang (*Egretta intermedia*), Kuntul Kecil (*Egretta garzetta*) dan Kuntul Kerbau (*Bubulcus ibis*) di kawasan Cagar Alam Pulau Dua (CAPD) telah terpapar AI sub tipe H5NI [6] [7]. Pola interaksi antara unggas liar dan unggas domestik yang dipelihara dengan sistem *backyard* diketahui sangat dekat, sehingga muncul dugaan bahwa unggas domestik di kawasan CAPD telah terpapar VAI sub tipe H5N1.

Paparan virus ini pada unggas domestik dapat menyebabkan kematian pada unggas peliharaan masyarakat. Hal ini secara langsung akan mempengaruhi kondisi sosial-ekonomi para peternak unggas. Untuk membuktikan dugaan adanya antibodi akibat masuknya VAI sub tipe H5N1 pada unggas domestik, maka dilakukan penelitian uji seroprevalensi VAI sub tipe H5N1 pada unggas domestik peliharaan masyarakat di sekitar kawasan CAPD.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi antibodi yang terbentuk akibat infeksi atau paparan virus AI sub tipe H5N1 pada unggas air domestik peliharaan masyarakat (khususnya bebek dan mentok) yang diduga merupakan sumber awal penularan virus AI pada burung-burung air di sekitar kawasan CAPD.

TINJAUAN PUSTAKA

Antibodi adalah suatu substansi khusus yang dibentuk oleh tubuh sebagai respon terhadap atimulasi antigen yang bersifat antigenik. Semua molekul antibodi termasuk ke dalam kelas khusus protein serum yang disebut globulin, meskipun tidak semua globulin serum merupakan antibodi [8]. Antibodi disebut juga immunoglobulin (Ig) [9].

Antigen adalah senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh dan dapat menstimulus respon imun atau antibodi. Secara fungsional antigen terbagi menjadi imunogen atau haptan. Imunogen adalah bahan yang dapat menimbulkan respon imun. Imunogen dapat diartikan sebagai antigen yang dapat merangsang sistem imun dengan sangat kuat terutama dalam konteks imunitas protektif terhadap organisme patogen. Sedangkan haptan adalah molekul yang dapat bereaksi dengan antibodi tetapi tidak menstimulus pembentukan antibodi langsung [10].

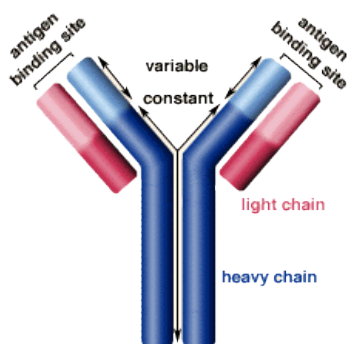
Antibodi dibentuk di dalam tubuh sebagai respon terhadap masuknya antigen sehingga dapat mengenali dan mengikat antigen secara spesifik. Oleh sebab itu antibodi dapat membantu proses perusakan dan pemusnahan antigen. Antibodi bersifat sangat spesifik dalam mengenali determinan antigenik dari suatu antigen sehingga apabila suatu organisme mempunyai beberapa determinan antigenik, maka tubuh akan memproduksi beberapa antibodi sesuai dengan jenis epitop yang dimiliki oleh setiap mikroorganisme. Setiap antibodi mempunyai sedikitnya dua situs identik yang dapat berikatan

dengan determinan antigenik yang disebut *antigen-binding sites*. Jumlah dari *antigen-binding sites* setiap antibodi disebut valensi dari antibodi [9].

Antibodi dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel β akibat stimulus dari antigen. Antibodi yang telah terbentuk secara spesifik akan mengikat antigen sejenis yang masuk kembali ke dalam tubuh [9] [10].

Mekanisme pembentukan antibodi yang disampaikan oleh Burnet menerangkan bahwa sel yang berperan dalam proses imun, yaitu sel limfosit hanya dapat mengikat satu antigen atau grup antigen yang berkerabat dekat serupa. Setiap individu memiliki kumpulan sel-sel limfosit yang berlainan dan dapat bereaksi dengan suatu antigen secara spesifik. Bila antigen masuk ke dalam tubuh maka akan segera diikat oleh reseptor yang sesuai yang terdapat pada permukaan sel limfosit, selanjutnya sel limfosit akan berproliferasi membentuk satu klon. Sebagian dari sel klon akan menyebar melalui peredaran darah dan kelenjar limfe ke dalam jaringan tubuh sebagai cadangan sel yang sensitif terhadap antigen tersebut (memory cell). Kemudian sel β tertentu akan berdiferensiasi dengan cepat dan mensekresi antibodi yang spesifik terhadap antigen tertentu. Apabila antigen yang sama masuk untuk kedua kalinya ke dalam tubuh, maka antigen akan dikenali oleh sel memory, sehingga mengakibatkan terbentuknya zat anti yang lebih cepat dan lebih banyak [9].

Struktur dasar antibodi berbentuk seperti “Y” memiliki 4 rantai protein yang tersusun dari dua rantai polipeptida ringan (*light-chain*) dan dua rantai polipeptida berat (*heavy-chain*) yang identik. Setiap rantai-rantai ini akan dihubungkan oleh ikatan disulfida (Gambar 1)



Gambar 1. struktur molekul antibodi (Sumber : <http://www.biology.arizona.edu/immunologi>)

Spesifikasi *antigen-antibodi* dalam membentuk respon imun berada pada dua lengan dari Y dengan cara membandingkan deretan asam amino dari molekul-molekul antibodi yang berbeda. Percabangan yang terdapat pada Y ini mampu menentukan peran antibodi terhadap masuknya antigen tertentu ke dalam tubuh melalui respon imun tubuh [9]

Spesifikasi virus AI sub tipe H5N1 yang mewabah di Asia adalah termasuk virus influenza tipe A, yang tergolong family *Orthomyxoviridae*. Virus ini memiliki ukuran diameter virions 80 hingga 120 nm yang berbentuk filamen, dan terdiri dari delapan segmen berbeda dari *negative-stranded RNA*. Virus ini termasuk dalam jenis virus *host-specific*, artinya mempunyai inang tertentu yang khusus. Inang tertentu tersebut merupakan tempat virus berkembang biak dan memiliki potensi untuk menyebar melalui aktivitas tertentu, jenis hewan yang menjadi inang bagi AIV (H5N1) adalah unggas [11].

Strain yang sangat ganas dan lebih sering mengakibatkan kematian adalah dari virus influenza A sub tipe H5N1. Karena memiliki potensi menyebar dengan cepat diantara populasi unggas. Virus ini juga mampu menyerang manusia melalui udara yang telah tercemar oleh virus. AIV dapat bertahan hidup di air sampai 4 hari pada suhu 22°C dan lebih dari 30 jam pada 0°C. Virus ini dapat mati pada pemanasan 60°C selama 30 menit atau pada suhu 56°C selama 3 jam. Selain pemanasan, virus ini dapat mati dengan detergen, desinfektan seperti formalin atau cairan yang mengandung iodin [11].

Virus flu burung ganas sub tipe H5N1 pertama kali dilaporkan di Indonesia pada akhir tahun 2003. Sejak 2003 hingga 2008 sebanyak 31 dari 33 provinsi merupakan daerah terinfeksi flu burung dan sebanyak 294 dari 498 kabupaten/kota dengan jumlah kematian unggas mencapai 13 juta. Dua daerah atau dua provinsi yang masih bebas dari flu burung adalah Provinsi Maluku Utara dan Gorontalo [12].

Mewabahnya virus flu burung ganas sub tipe H5N1 di pulau Jawa, Sumatera, Sulawesi dan Bali menunjukkan adanya penyebaran virus ini yang terjadi secara sporadis di berbagai lokasi yang berbeda. Penelitian yang dilakukan FAO sejak April 2011 pada 29 dari 33 provinsi (88%) di Jawa, Bali, Sumatera, Sulawesi dan Kalimantan menunjukkan sebanyak 231 peternakan unggas

(terutama peternakan *backyard*) dari 2.131 desa telah terpapar virus AI, dengan 202 desa merupakan wilayah terinfeksi baru. Pada Mei 2011, peternakan unggas (terutama peternakan *backyard*) pada 110 desa (6%) dari 1.825 desa telah terpapar virus AI, dengan 77 desa merupakan wilayah terinfeksi baru. Wilayah yang terinfeksi ini rata-rata terkonsentrasi pada pulau Sumatera dan Jawa (FAO,2011). Jumlah kumulatif infeksi AI pada manusia di Indonesia sejak tahun 2005 sampai April 2012 adalah 188 kasus dengan 156 kematian [13].

Infeksi virus H5N1 dimulai ketika virus memasuki sel hospes setelah terjadi penempelan *spikes* virion dengan reseptor spesifik yang ada pada permukaan sel hospes. Virion akan menyusup ke sitoplasma sel dan akan mengintegrasikan materi genetiknya di dalam inti sel hospes, dan dengan mesin genetik dari sel hospes, virus dapat bereplikasi membentuk virion-virion baru, dan virion-virion ini kemudian menginfeksi kembali sel-sel di sekitarnya [14].

Virus influenza menempel pada sel inangnya dengan ikatan pada hemagglutinin (HA) pada virus dengan oligosakarida pada permukaan sel yang memiliki terminal asam sialat (*sialic acid*). HA pada virus AI cenderung menempel pada asam sialat yang berikatan dengan galaktosa dengan ikatan α -2,3 (SA α 2,3Gal), sedangkan virus yang biasa menyerang manusia berikatan pada ikatan SA α 2,6Gal. Sel epitel yang ada pada saluran pernafasan manusia hanya memiliki reseptor SA α 2,6Gal, sedangkan pada saluran pencernaan bebek (lokasi umum replikasi virus flu pada bebek) umumnya memiliki reseptor SA α 2,3Gal [15].

Secara teoritis, seharusnya virus AI tidak dapat menempel pada sel pernafasan manusia karena perbedaan reseptor tersebut. Namun demikian, dengan perubahan hanya 1 asam amino saja konfigurasi reseptor tersebut dapat dirubah sehingga reseptor pada manusia dapat dikenali oleh virus AI H5N1 [14].

Virus *Avian Influenza* ditularkan melalui kontak langsung dengan unggas tertular maupun secara tidak langsung. Infeksi dengan kontak langsung jika terkena paparan feses, cairan pernafasan atau ekskresi mata dari unggas terinfeksi [16].

Unggas dapat terinfeksi secara tidak langsung saat melakukan kontak dengan permukaan atau materi yang terkontaminasi virus, seperti tinja, air dan makanan. Tinja yang mengering dan hancur

menjadi serbuk dapat terhirup melalui udara oleh manusia atau hewan lain. Periode infektivitas virus *avian influenza* yang terdapat pada tinja maupun pada cairan liur sangat tergantung pada tingkat konsentrasi virus, pH, dan suhu. Virus *avian influenza* tidak dapat lagi terdeteksi di luar tubuh inang jika lewat dari empat minggu setelah adanya infeksi [17].

Kontaminasi virus *Avian Influenza* dapat terjadi pada air permukaan (kolam, sungai, danau), air tanah, dan tampungan air hujan. Dari keseluruhan sumber air diatas, air permukaan mempunyai potensi lebih tinggi terkontaminasi virus *Avian Influenza*. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberlangsungan virus di air sangat tergantung pada suhu, pH dan salinitas. Umumnya viabilitas virus *Avian Influenza* menurun jika salinitas meningkat dan meningkat apabila pH dibawah netral [17].

Penyebaran dalam kelompok unggas peternakan tergantung bentuk pemeliharaan, dalam kelompok yang dilepas di tempat yang kotor dan terjadi hubungan langsung serta percampuran dengan hewan lain, penyebaran infeksi berlangsung lebih cepat daripada yang dipelihara dalam kandang, tetapi masih juga diperlukan beberapa hari untuk terjadinya penularan yang sempurna. Seringkali hanya sebagian kandang saja yang terkena [18].

Penularan virus AI dapat terjadi antara lain dari unggas liar ke unggas ternak, sesama unggas ternak, dan unggas ke manusia. Efektifitas penularan virus AI dari ayam ke ayam tidaklah diragukan lagi [19]. Kebanyakan pasien AI pada manusia memiliki pengalaman kontak langsung dengan peternakan yang telah terinfeksi, setidaknya 1 minggu setelah serangan kematian pada peternakan. Kasus penularan antar manusia yang diakibatkan oleh partikel aerosol belum pernah ditemui [20].

Penyebaran virus AI H5N1 yang terjadi lebih banyak disebabkan oleh aktifitas peternakan dan perdagangan unggas. Ada kemungkinan bahwa unggas liar yang sakit kemudian bermigrasi menyebarkan virus H5N1 selama perpindahannya. Kegiatan manusia lebih berpotensi terhadap penyebaran virus H5N1. Pemberian pakan, kemudian perlengkapan peternakan dan kendaraan yang keluar masuk peternakan dapat terkontaminasi feses atau cairan sekresi saluran pernafasan dari unggas yang terinfeksi, kemudian menularkan virus H5N1 kepada unggas yang lain atau manusia [4] [21].

Unggas air diduga berperan sebagai reservoir HPAIV subtipe H5N1. Unggas air yang merupakan reservoir alami virus AI, memberi peluang yang besar terhadap bermunculannya berbagai sub-tipe dari kombinasi HA dan NA saat replikasi virus di saluran pencernaannya [21]. Strain HPAIV H5N1 hanya menyebabkan gejala klinis ringan pada itik, tetapi tetap mensekresikan virus (*viras shedding*) bersama kotorannya secara terus-menerus sehingga berpotensi menyebarkan virus yang bersifat patogenik bagi unggas lain dan (bahkan) manusia [11]. Penelitian yang dilakukan oleh Susanti, dkk. tahun 2007 di Jawa Barat (Daerah endemik *avian influenza* nomor 2 di Indonesia [17] menunjukkan bahwa angka prevalensi pada angsa 6,67%, pada itik 6,49% dan pada mentok 5,48%. Data ini menunjukkan bahwa unggas air (itik, mentok, angsa) berpotensi sebagai sumber penularan Virus AI H5N1 ke unggas darat dan manusia [20].

Itik, mentok dan angsa (Keluarga *Anatidae*), secara umum dikenal sebagai unggas air, merupakan inang alami virus flu burung jinak (*Low Pathogenic Avian Influenza Virus/LPAIV*) yang telah dipelajari dengan baik, dan merupakan satu-satunya kelompok burung dimana virus tersebut ditemukan sepanjang tahun dalam populasi liar [4]. Di dalam tubuh unggas air (itik, mentok dan angsa) terjadi toleransi yang seimbang, di mana replikasi virus terjadi secara efisien dan tidak menunjukkan gejala klinis. Ketidakmampuan unggas air dalam mengeliminasi virus secara sempurna, menyebabkan unggas air menjadi reservoir yang nyaman bagi tumbuhnya virus. Walaupun demikian, unggas air memiliki mekanisme untuk mengontrol pengaruh negatif patogen dari lingkungan dan respon imun bawaan yang protektif [19].

Unggas air merupakan burung liar yang paling banyak tertular pada saat kematian besar-besaran karena flu burung di China pada tahun 2004/2005, dan juga merupakan kelompok spesies burung liar yang umum tertular pada beberapa kejadian kematian saat virus tersebut menyebar dari Asia Timur ke Asia Barat dan Eropa. Itik, mentok dan angsa adalah kelompok burung air yang berjumlah 150 spesies dan tersebar di seluruh dunia. Umumnya berukuran sedang hingga besar, dengan tubuh yang berat, leher panjang dibandingkan dengan ukuran tubuh, kaki berselaput, dan pada sebagian besar spesies memiliki paruh lebar dan tumpul. Beberapa spesies, terutama itik, mentok dan angsa telah didomestikasikan sebagai ternak selama ribuan tahun [4].

Uji hambatan hemaglutinasi (*Hemagglutination-inhibition/Hi*) merupakan uji yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi di dalam darah. Karena pada uji ini digunakan antigen yang homolog sehingga akan terjadi ikatan antigen-antibodi, yang kemudian virus tidak akan dapat melekat atau berikatan dengan reseptor membran sel darah merah dan aglutinasi tidak akan terjadi. Uji HI mempunyai fungsi antara lain sebagai sarana untuk mengidentifikasi jenis antibodi tertentu dengan melihat reaksi antar antigen homolog yang telah diketahui dengan antibodinya, serta untuk mengetahui titer antibodi dengan cara mereaksikannya antara serum yang ingin diketahui antibodinya dengan antigen standar yang telah diketahui [5].

Uji HI memiliki dua metode yaitu metode α dan β . Metode α sering digunakan untuk menguji jenis antigen dengan melakukan pengenceran pada antigen. Kelebihan dari metode ini dapat mengidentifikasi antigen tanpa melakukan uji HA terlebih dahulu. Namun pada uji ini dibutuhkan antibodi dalam jumlah banyak dan titer yang cukup tinggi. Sedang metode β dapat digunakan untuk mengidentifikasi antibodi dan menghitung titer antibodi atau menguji jenis antigen dengan melakukan pengenceran pada antibodi dengan jumlah antigen tetap, jumlah antibodi yang digunakan sedikit dan dapat diketahui titer antibodinya, batas akhir pada pengenceran tertinggi yang mampu menghambat terjadinya aglutinasi secara sempurna disebut *End point* [5].

Uji HI dapat dilakukan secara makro atau mikrotitrasi, tergantung reagen-reagen yang digunakan. Perbedaan dari kedua metode hanya pada volume reagen dan virus standar yang digunakan. Pada makrotitrasi, virus standar yang digunakan yaitu 8HAU (*Hemagglutination Unit*) atau 10 HAU, sedangkan pada mikrotitrasi virus standar yang digunakan 4 HAU [22].

METODE PENELITIAN

Objek, Lokasi dan waktu Penelitian

Objek penelitian adalah serum darah unggas air domestik seperti bebek, itik dan entok yang dipelihara masyarakat di sekitar kawasan CAPD, yang merupakan suatu kawasan konservasi yang terletak di Teluk Banten, Kabupaten Serang, Propinsi Banten. Kawasan tersebut kira-kira 4 Km ke arah timur laut Pelabuhan Karang Hantu [23].

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-September 2012. Analisa sampel dilakukan di Lab. Terpadu Bag. Immunologi Dept. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

Metode Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel di CAPD akan dilakukan pada bulan Maret-Mei 2012. Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel adalah jarum suntik 1 ml, jangka sorong, penggaris, timbangan pegas (100 g), buku panduan lapangan, cincin penanda, mikrotube (kosong, telah berisi etanol absolute 96%) dan *cooling box*.

Bebek dan mentok peliharaan masyarakat diambil darahnya sebanyak 0,1-0,5 ml. Darah berasal dari vena *branchialis*, setelah diambil darah didiamkan beberapa saat untuk memisahkan antara serum dan sel darah merah selanjutnya serum akan disimpan ke dalam mikrotube yang telah diberi kode dan sel darah merah dimasukan dalam mirotube yang lain dan disimpan darah suhu-20°C [4] [5].

Pembuatan suspensi RBC 0,5%

Pengujian HA dan HI mikroteknik memerlukan suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5 % yang diperoleh dengan cara: darah ayam diambil melalui *vena brachialis* dengan menggunakan *sput* dan *needle* diambil sebanyak 3 ml kemudian dimasukkan dalam tabung *venoject* yang telah diisi dengan anti-koagulan EDTA. Darah tersebut disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Supernatan dibuang dan sisa endapannya dicuci dengan menambahkan PBS, kemudian disentrifuse lagi selama 5 menit. Setelah terjadi endapan kembali, supernatannya dibuang. Pencucian tersebut diulang sampai tiga kali dengan cara yang sama hingga didapatkan suspensi eritrosit 100%. Suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5 % didapatkan dengan menambahkan PBS hingga konsentrasi eritrosit 0,5 % [5].

Evaluasi Titer antibodi terhadap Virus AI

Untuk menguji keberadaan virus AI subtipe H5N1 pada suatu sampel darah, OIE merekomendasikan dilakukan dengan metode uji hambatan hemaglutinasi (*Hemaglutinasi Inhibition/Hi*) [5].

Uji Hemaglutinasi (HA)

Uji HA dilakukan untuk mendapatkan virus standar 4 HAU. Proses kerja dimulai dengan memasukkan PBS sebanyak 25 µl ke dalam 12 sumur pada *microplate* (*v bottom microplate*), kemudian

memasukkan susupensi virus AI subtipe H5N1 sebanyak 25 µl ke dalam sumur pertama. Virus dihomogenkan dengan cara menghisap dan mengeluarkan kembali dengan mikropipet minimal 5 kali kemudian dipindahkan ke sumur ke-2. Pengocokan dilakukan kembali sampai sumur ke-12. Selanjutnya pada setiap sumur ditambahkan PBS 25 µl dan 1% suspensi sel darah merah sebanyak 25 µl, inkubasi 20-40 menit. Kemudian diamati titer virusnya [5].

Uji Hambatan Hemaglutinasi (*Hemaglutination-Inhibition/Hi*)

Uji HI dilakukan dengan metode β dan menggunakan antigen berupa virus inaktif H5N1 pada titer 4HAU 25 µl dan sel darah 1%. Sebanyak 25 µl PBS dimasukkan ke dalam setiap sumur *v bottom microplate*, kemudian mencampurkan 25 µl serum uji ke dalam setiap sumur uji, larutan dihomogenkan. Serum yang diencerkan pada sumur pertama dipindahkan pada sumur ke-2 dan dihomogenkan kembali, lalu dipindahkan ke sumur ke-3 dan seterusnya sampai sumur ke-12. Setelah itu ditambahkan 25 µl virus standar (4HAU), lakukan pengocokan dengan cara mengoyang-goyangkan *microplate* secara perlahan agar semua cairan di dalam *microplate* homogen, inkubasi pada suhu ruang selama 20-40 menit. Setelah itu tambahkan 25 µl suspensi sel darah merah 1% ke dalam setiap sumur uji. Goyangkan *microplate*, inkubasi pada suhu ruang selama ± 30 menit, amati titer virusnya [5].

Untuk menghitung rata-rata titer antibodi digunakan perhitungan GMT (*Geometric Mean Titer*). Rumus penghitungan sebagai berikut [5] :

$$\text{Log}_2 \text{ GMT} = \frac{(\text{Log}_2 t_1)(S_1) + (\text{Log}_2 t_2)(S_2) + (\text{Log}_2 t_n)(S_n)}{N}$$

Keterangan :

- N = Jumlah contoh serum yang diamati
- t = Titer antibodi pada pengenceran tertinggi (yang masih dapat menghambat aglutinasi sel darah merah)
- S = Jumlah contoh serum yang bertiter 1
- n = Titer antibodi pada sampel ke-n

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil deteksi terhadap pembentukan antibodi pada serum darah unggas air domestik menunjukkan bahwa unggas-unggas tersebut pernah terpapar

virus AI sub tipe H5N1. Nilai rata-rata titer untuk masing-masing unggas yaitu $2^{7,9}$ untuk mentok dan $2^{4,6}$ untuk Itik dengan nilai seroprevalensi untuk keseluruhan spesies mencapai 100% (Tabel 1). Seluruh sampel unggas yang diuji tidak menunjukkan gejala klinis infeksi AI.

Nilai titer antibodi yang tinggi diduga diperoleh dari sistem pertahanan tubuh yang merespon paparan virus AI secara terus menerus dari lingkungan sehingga menyebabkan unggas terinfeksi secara natural. Hal ini dikarenakan ketiadaan *biosecurity* pada sistem perternakan *backyard*, sehingga virus AI dapat dengan mudah bertransmisi dari unggas satu ke unggas yang lain melalui kontak langsung maupun tidak langsung [24]

. Tabel 1. Titer antibodi hasil Uji HI pada unggas air domestik di sekitar CAPD

Spesies	Σ Sampel	Σ Positif (%) (Seroprevalensi)	Rataan Titer Antibodi (GMT)
Mentok	14	100	$2^{6,9}$
Itik	15	100	$2^{4,6}$
Total	29	100	

Uji HI yang positif menandakan bahwa dalam tubuh hewan terdapat antibodi yang menunjukkan telah terjadi infeksi atau paparan Virus AI sub tipe H5N1 pada tubuh hewan, namun gejala klinis infeksi AI tidak ditemui pada hewan-hewan tersebut. Hal ini mungkin karena unggas domestik terpapar sedikit demi sedikit sehingga paparan ini mampu menstimulasi timbulnya antibodi anti H5N1 tetapi tidak cukup untuk menimbulkan gejala secara klinis [25].

Penelitian sebelumnya yang dilakukan tahun 2008 dan 2010 pada unggas liar di kawasan CAPD menunjukkan nilai titer antibodi H5N1 yang jauh lebih rendah dari data pada Tabel 1, yaitu $2^{0,583}$ pada burung Kuntul Besar, $2^{0,286}$ pada Kuntul Sedang, $2^{0,32}$ pada Kuntul Kecil dan $2^{0,28}$ pada Kowak Malam. Unggas liar, khususnya unggas air merupakan reservoir alami virus AI dimana replikasi virus terjadi secara efisien dan tidak menunjukkan gejala klinik. Sehingga keberadaan antibodi dalam titer yang rendah pada unggas liar merupakan respon alami dari sifat unggas liar tersebut [8] [9].

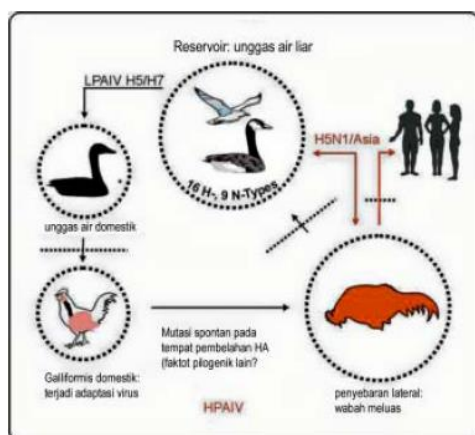
Penyebaran virus AI yang pada umumnya terjadi pada unggas domestik disebabkan karena kontak dengan unggas liar yang terinfeksi [16]. Pada siang hari unggas domestik yang dipelihara warga berkeliaran di daerah sawah dan tambak yang juga menjadi salah satu tempat mencari makan bagi unggas liar di kawasan CAPD. Jarak antara pemukiman penduduk dari habitat burung liar di kawasan CAPD hanya 500 meter. Unggas domestik dapat terinfeksi virus AI H5N1 dari unggas liar saat melakukan kontak dengan permukaan atau materi di lahan basah tempat mereka bersama-sama mencari makan yang telah terkontaminasi virus yang berasal dari paparan feses, air liur, cairan pernafasan atau ekskresi mata dari unggas liar yang terinfeksi [16].

Itik dan Mentok *backyard* merupakan unggas air yang mencari makan dengan menyaring hewan-hewan air tak bertulang belakang dan tumbuh-tumbuhan air dari air atau lumpur yang melewati deretan pinggiran yang berjajar sepanjang paruhnya [22]. Sumber makanan kedua jenis unggas tersebut dapat tercemar virus AI dan menyebabkan penularan melalui sistem rantai makanan. Siklus penularan tidak langsung antar unggas yang terjadi melalui rantai makanan yang tercemar virus AI dari feses ke mulut atau dari mulut ke feses disebut penularan rantai *oral-fecal* [20]. Sedangkan burung air liar dan ayam *backyard* di sekitar kawasan CAPD biasa meminum air di kubangan air bersama-sama dengan unggas air domestik seperti itik dan mentok [6].

Burung liar memang diketahui sebagai reservoir virus AI, tapi tidak semuanya termasuk dalam sub tipe H5N1. HPAIV sub tipe H5N1 telah menyebabkan kematian dalam jumlah besar pada burung liar, tapi pada surveilans intensif yang dilakukan di Eropa, Amerika Utara, Asia dan Afrika mencakup 750.000 sampel, sangat sedikit burung liar sehat yang ditemukan menyimpan virus AI sub tipe H5N1 [4] [26]. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menjelaskan bahwa pada unggas liar di kawasan CAPD yang menunjukkan seroprevalensi rendah, yaitu hanya 8,8% pada ketiga spesies kuntul dan 10,7% pada kowak malam [6] [7]. Hasil tersebut berbeda sangat jauh dari data yang diperoleh pada penelitian ini, yang menunjukkan bahwa analisa seroprevalensi pada semua spesies unggas domestik mencapai 100%. Hal ini menunjukkan bahwa burung liar diperkirakan bukan reservoir dari VAI sub tipe H5N1 [8].

Penelitian yang dilakukan Susanti, dkk [19] menunjukkan bahwa isolat virus AI dari unggas air (itik, mentok dan angsa) yang belum divaksinasi dan tidak menunjukkan gejala klinis pada peternakan *backyard* di Jawa Barat merupakan H5N1 strain HPAIV (*highly pathogenic*) [20]. Unggas air diduga berperan sebagai reservoir HPAIV H5N1. Unggas air yang merupakan reservoir alami virus AI, memberi peluang yang besar terhadap bermunculannya berbagai sub-tipe dari kombinasi HA dan NA saat replikasi virus di saluran pencernaannya [24].

Diduga sumber virus HPAIV sub tipe H5N1 merupakan hasil mutasi LPAIV sub tipe H5N1 pada unggas air yang ditularkan dari unggas liar. Kemudian HPAIV sub tipe H5N1 pada unggas air ini ditularkan kembali ke unggas liar sekaligus ke unggas darat, misalnya ayam (Gambar 2).



Gambar 2. Bagan patogenesis dan epidemiologi influenza pada unggas (Sumber: Kamps, *et al.*, 2006)

Mentok dan Itik pada peternakan *backyard* berpotensi sebagai reservoir sekaligus pembawa virus AI sub tipe H5N1 ke ayam dan unggas air liar. Penelitian serupa juga pernah dilakukan oleh Lee, dkk (2005) yang membuktikan bahwa titer antibodi pada itik lebih rendah dibandingkan pada ayam dan burung puyuh [27]. Di Indonesia memang tidak dilakukan vaksinasi HPAIV H5N1 pada itik dikarenakan patogenitas virus ini yang sangat rendah pada itik [28].

Unggas air (mentok dan itik) berbeda dengan unggas lainnya, misalnya pada ayam, jumlah enzim proteolisis pada unggas air lebih sedikit dibandingkan dengan ayam sehingga paparan AI akan menyebabkan timbulnya gejala klinis yang cukup berarti pada ayam, bahkan mungkin sekali menyebabkan kematian. Enzim proteolisis tersebut

berfungsi untuk memecah prekursor hemaglutinin pada amplop virus dari bentuk inaktif menjadi aktif [29].

Sistem peternakan *backyard* yang memungkinkan setiap unggas saling berinteraksi secara bebas, dapat menyebabkan peningkatan resiko transmisi virus AI. Sistem peternakan *backyard* ini merupakan salah satu alasan tingginya titer antibodi masing-masing unggas air domestik pada penelitian ini. Kondisi tersebut disebabkan karena adanya keterpaparan virus AI yang terjadi secara terus-menerus dalam waktu yang lama. Hal ini berkorelasi dengan penelitian yang dilakukan Suardana, dkk tahun 2009 yang menunjukkan bahwa serum itik yang diberikan vaksinasi virus inaktif H5N1 memperlihatkan titer antibodi hingga 3,8 kali lebih tinggi pada vaksinasi kedua. Hewan yang baru saja terpapar virus (jangka waktu pemaparan belum terlalu lama) akan menunjukkan nilai titer yang rendah, karena jumlah virus masih sedikit sehingga hewan tidak mampu menghasilkan antibodi dalam jumlah yang cukup tinggi [29].

Tingginya seroprevalensi dan titer antibodi pada unggas air domestik (Itik dan Mentok) *backyard* milik penduduk di kawasan sekitar CAPD menunjukkan bahwa daerah ini telah endemis virus AI sub tipe H5N1. Pemeliharaan sistem backyard dengan biosecurity yang rendah merupakan kendala penanganan virus AI di Asia, termasuk Indonesia [30]. Sebanyak 10.000 ekor itik yang dipelihara dalam kandang tertutup dengan tingkat biosecurity yang tinggi, tidak satupun terinfeksi Virus AI H5N1 baik secara serologis maupun biologis. Itik backyard menunjukkan tingkat prevalensi Virus AI paling tinggi (47%) dibanding itik yang digembalakan di ladang pertanian (45,9%) dan itik yang dipelihara dalam kandang terbuka (23,5%) (Songserm, *et.al.*, 2006 dalam [20]).

Peran *biosecurity* sangat penting untuk mencegah wabah H5N1 pada peternakan unggas. Kegiatan *biosecurity* diantaranya mencegah kontak antara burung liar dengan unggas domestik dan membatasi akses manusia yang tidak berkepentingan ke dalam area peternakan. Sebagai contohnya kendaraan pengangkut unggas dan pegawai peternakan harus bersih dan terdesinfeksi sebelum memasuki area biosecure atau saat berpindah dari kandang ke gudang dan sebaliknya [29].

Selain itu pembersihan kandang dengan desinfektan dibanding tanpa desinfektan, keberadaan pekerja kandang yang lebih dari 1 orang dibanding tanpa

pekerja kandang, juga berpengaruh nyata terhadap penurunan seropositif Virus AI [30].

KESIMPULAN

Terdapat antibodi virus *avian influenza* subtype H5N1 pada tiga unggas air domestik (Itik *Anas sp* dan Mentok *Cairina moschata*) peliharaan masyarakat di sekitar kawasan Cagar Alam Pulau Dua. Seroprevalensi dari unggas air domestik tersebut adalah 100% sedangkan rata-rata titer antibodi untuk masing-masing spesies adalah 26^9 untuk Mentok *Cairina moschata* dan $2^{4,6}$ untuk Itik *Anas sp*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini mendapat bantuan dana dari Grant UAI 2012 melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LP2M) UAI berdasarkan Surat Perjanjian Kerja Internal Pelaksanaan RE TA 2012 No. 005/SPK/A-01/UAI/III/2012, untuk itu kami mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas kesempatan dan bantuan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

Terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Drh. Retno Soejoedono, M.S., Dr. Drh. Sri Murtini, M.Si., staf dan laboran Laboratorium Terpadu Dept. Ilmu dan Penyakit Hewan serta Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor atas bantuan, bimbingan dan pengarahannya selama analisis sampel di Laboratorium. Kepada pimpinan dan staf Kantor BKSDA Serang dan jagawana Cagar Alam Pulau Dua (Pak Madsahi dan Pak Umar), terimakasih atas bantuan dan kerjasamanya pada perizinan serta pengambilan sampel serum unggas air (liar dan domestik).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] R. G. Webster, S. Krauss, D. Hulse-Post and K. Sturm-Ramirez, "Evolution of influenza A viruses in wild birds," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 43, pp. S1-S6, 2007.
- [2] R. G. Webster, W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers and Y. Kawaoka, "Evolution and ecology of influenza A viruses," *Microbiol. Rev.*, vol. 56, pp. 152-179, 1992.
- [3] Winarno, Mengantisipasi penyakit flu burung, Jakarta: Departemen Pertanian, 2008.
- [4] FAO, Burung liar dan flu burung: Pengantar riset lapangan terapan dan teknik pengambilan sampel penyakit, Jakarta: Food and Agriculture Organization of the United Nation & Wetland International-Indonesia Programme, 2008.
- [5] OIE, "Update on avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1 from poultry in live bird market in Hanoi, Vietnam in 2001," *Journal of Virology*, vol. 79, pp. 4201-4212, 2005.
- [6] L. M. Kurniawati, "Seroprevalensi virus Avian Influenza subtype H5N1 pada ketiga spesies burung kuntul (*Caserosius albus*, *Egretta intermedia* dan *E. garzetta*) di kawasan Cagar Alam Pulau Dua, Serang, Propinsi Banten," Universitas Al Azhar Indonesia, Jakarta, 2011.
- [7] D. P. Aulia, "Seroprevalensi virus Avian Influenza H5N1 pada burung kuntul kerbau (*Bubulcus ibis*) di kawasan Cagar Alam Pulau Dua Serang Banten," Universitas Al Azhar Indonesia, Jakarta, 2007.
- [8] J. Pelczar, J. Michael and E. C. Chan, Dasar-dasar Mikrobiologi, Jakarta: UI-Press, 1988.
- [9] R. M, Imunologi dan Virologi., Jakarta: ISFI, 2010.
- [10] B. KG, Imunologi Dasar, Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 2000.
- [11] D. J. Hulse-Post, K. M. Sturm-Ramirez, J. Humberd, P. Seiler, S. Govorkova, S. Krauss, C. Scholtissek, P. Puthabathana, P. C. Buranathai, T. D. Nguyen, H. T. Long, T. Naipospos, H. Chen, T. M. Ellis, Y. Guan, J. Peiris and R. G. Webster, "Role of domestic duck in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 102, pp. 10682-10687, 2005.
- [12] S. A, "Banten masuk tiga besar kasus flu burung," Kompas.com, Jakarta, 2008.
- [13] Menkes RI, "Laporan kasus flu burung ke 188," 2011. [Online]. Available: <http://www.Depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1872-Laporan-Kasus-Flu-Burung-Ke-188.html>. [Accessed 02 Mei 2012].
- [14] R. M, "Avian influenza A (H5N1) : patogenesis, pencegahan dan penyebaran pada manusia," *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol. 3, pp. 55-65, 2006.
- [15] C. A. Nidom, R. Takano, S. Yamada, Y. Sakai-Tagawa, S. Daulay, D. Aswad, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Shinya, K. Iwatsu-Harimoto, Y. Muramoto and Y. Kawaoka, "Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 16, pp. 1515-1522, 2010.
- [16] J. Monke and M. I. Corn, "CRS Report for congress : Avian influenza in poultry and wild birds.," Congressional Research Services, 2007.
- [17] WHO, "Question and answers on avian influenza a selection of frequently asked question on animals, food and water.," Geneva, 2006.

- [18] K. M, "Flu Burung," 2006. [Online]. Available: <http://www.influenzareport.com/ir/ai.htm>. [Accessed 22 Oktober 2010].
- [19] R. Susanti, R. D. Soejoedono, I. Mahardika, I. Wibawan and M. T. Suhartono, "Identification of pathogenicity of avian influenza virus subtype H5N1 from waterfowls based on amino acid sequence of cleavage site hemagglutinin protein," *Indonesia Journal of Biotechnology*, vol. 13, pp. 1069-1077, 2008.
- [20] J. H. Beigel, D. Farraz, A. M. Han, F. G. Hayden, R. Hyer, M. D. de Jong, S. Lochindarat, N. Tien, N. T. Hien, T. T. Hien, A. Nicoll, S. Touch and K. Yuen, "Avian influenza A (H5N1) infection in humans," *N Engl J Med*, vol. 353, pp. 1374-1385, 2005.
- [21] Animal Helath Australia, Disease strategy avian influenza (version 3.4). Australian Veterinary Emergency Plan (AUSVETPLAN), Canberra: Primary Industries Ministerial Council, 2011.
- [22] S. RD, Penuntun praktikum penyakit infeksius PHK 401 (Lab. Virologi Imunologi), Bogor: Dept. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner FKH IPB, 2006.
- [23] Y. Rusila-Noor, D. Sartono and S. Dana, Paparan potensi dan nilai penting Cagar Alam Pulau Dua, Jakarta: Ditjen PKA, 2000.
- [24] M. M. Hadipour, G. Habibi and A. Vosoughi, "Prevalence of antibodies to H9N2 AIV in backyard chickens around Maharlo Lake in Iran," *Pak Vet J*, vol. 31, pp. 192-194, 2011.
- [25] K. Subbarao and G. Habibi, "Avian influenza infecting humans (review).," *Cellularand Molecular Life Sciences (CMLS)*, vol. 57, pp. 1770-1784, 2000.
- [26] WHO, Cumulative number of confirmed humans cases for Avian Influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2011, Geneva: WHO/GIP, 2011.
- [27] C. W. Lee, D. L. Suarez, T. M. Tumpey, H. W. Sung, Y. K. Kwon, Y. J. Lee, J. G. Choi, S. J. Joh, M. C. Kim, E. K. Lee, J. M. Park, X. Lu, J. M. Katz, E. Spackman, D. E. Swayne and J. H. Kim, "Characterization of highly pathogenic H5N1 Avian Influenza A viruses isolated from south Korea," *Journal of Virology*, vol. 79, pp. 3692-3702, 2005.
- [28] FAO, "H5N2 HPAI: Global overview, April-June 2011," EMPRES/FAO-GLEWS, 2011.
- [29] Isaias, "Prevalensi serologi avian influenza pada unggas sektor IV di desa Pesawahan Kec. Cicurug," Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2011.
- [30] J. Woo and B. K. Park, "Seroprevalence of LPAIV (H9N2) and associated risk factor in the Gyeonggi_do of Korea during 2005-2006," *J. Vet. Sci*, vol. 9, pp. 161-168, 2008.