**REVIEW JURNAL**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA**

**BERBAGAI SPESIES UNGGAS SECARA SEROLOGIS DAN MOLEKULER**

**(Isolation and Identification of Avian Influenza in Different Species of Poultry by Means of Serological and Molecular Methods)**

****

**Anggota Kelompok 6 :**

1. **Ata Rofita Wasiati ( 1811201012 )**
2. **Tasya Muliasari ( 1811201024 )**
3. **Taofani Rizal Al Amin ( 1811201025 )**

**PRODI BIOTEKNOLOGI**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

**UNIVERSITAS ‘AISYIYAH YOGYAKARTA**

**APRIL 2019**

**BAGIAN I**

**IDENTITAS JURNAL**

1. **Judul**

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA

BERBAGAI SPESIES UNGGAS SECARA SEROLOGIS DAN MOLEKULER

(Isolation and Identification of Avian Influenza in Different Species of Poultry by Means of Serological and Molecular Methods)

1. **Jurnal**

Jurnal ini termasuk ke dalam jurnal kedokteran hewan

1. **Volume dan Halaman**

Jurnal ini dalam Vol. 10 No. 1 dan halaman 86-90

1. **Tahun**

Tahun disusunnya jurnal adalah 2016

1. **Penulis**

Jurnal inin dibuat oleh Teuku Zahrial Helmi, Charles Rangga Tabbu, Wayan Tunas Artama, Aris Haryanto, dan Muhammad Isa

1. **Reviewer**

Ata Rofita Wasiati, Tasya Muliasari , dan Taofani Rizal Al Amin

**BAGIAN II**

**ISI**

1. **Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi virus avian influenza (AI) melalui pemeriksaan serologis dan molekuler pada unggas yang diduga

terinfeksi virus AI di Provinsi Aceh.

1. **Latar Belakang**

Virus avian influenza (AI) merupakan virus yang terbagi atas tiga tipe, yaitu tipe A, B, dan C, berdasarkan atas perbedaan antigen pada protein inti (nucleoprotein) dan protein matriks. Virus influenza A dapat menginfeksi berbagai spesies unggas, mamalia, dan manusia, dan merupakan patogen utama yang berperan dalam pandemi influenza di seluruh dunia. Virus influenza A dikelompokkan berdasarkan pada dua antigen permukaan virus, yaitu protein hemaglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA), yang sampai saat ini telah ditemukan 18 HA (H1-H1) dan 11 NA (N1-N11). Faktor yang sangat memengaruhi kasus infeksi virus AI yang terus terjadi di Indonesia adalah akibat dari penanganan virus AI yang belum maksimal. Identifikasi dan karakterisasi virus AI dapat dilakukan dengan beberapa cara, baik secara konvensional maupun dengan metode diagnosis secara molekuler.

1. **Subjek Penelitian**

Subjek Penelitian ini adalah swab trakea, kloaka, dan organ, yang dikoleksi dari berbagai jenis unggas, yaitu dari daerah yang dilaporkan pernah mewabah virus AI pada unggas. Sampel dikoleksi dari tujuh kabupaten di Provinsi Aceh, yaitu Kabupaten Aceh Timur, Aceh Tamiang, Aceh Utara, Bireuen, Aceh Tengah, Bener Meriah, dan Aceh Besar.

1. **Metode Penelitian**
2. Bahan dan Metode
3. Koleksi Sampel

Sampel penelitian berupa swab trakea, kloaka, dan organ, yang dikoleksi dari berbagai jenis unggas, yaitu dari daerah yang dilaporkan pernah mewabah virus AI pada unggas.

1. Isolasi Virus

Hasil swab dibawa ke laboratorium, kemudian dibuat suspensi dengan menambahkan larutan phosphate buffered saline (PBS), pH 7,0-7,4, dan antibiotik. Suspensi diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1-2 jam, yang selanjutnya diinokulasikan pada telur ayam berembrio SPF atau specific antibody negative (SAN) umur 9-11 hari dan telur diinkubasikan pada suhu

37 C. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam sampai hari ke-4. Pada hari ke-4 semua telur dikeluarkan dari inkubator dan disimpan pada suhu 4 C, kemudian virus dipanen dengan cara mengambil cairan korioalantoisnya

1. Uji Serologis

Uji serologis dilakukan melalui uji (HA) dan (HI). Uji HA dilakukan secara mikroteknik menggunakan mikroplat bentuk V. Antigen yang berasal dari cairan

alantois telur ayam bertunas (TAB) diencerkan dengan PBS pada kelipatan ganda, yakni 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, dan seterusnya sampai 1/1024. Berikutnya ditambahkan

suspensi eritrosit ayam 0,5% pada setiap sumuran dan diinkubasi selama 40 menit. Setelah diketahui titer antigen, selanjutnya dibuat antigen 4 HA unit untuk digunakan pada uji HI (OIE, 2014). Uji HI juga dilakukan secara mikroteknik

menggunakan mikroplat bentuk V. Berikutnya pada setiap sumuran ditambah dengan antigen AI 4 HA unit dan diinkubasi selama 15 menit. Setelah berlalu ditambahkan suspensi eritrosit ayam 0,5% pada setiap sumuran dan diinkubasi selama 30 menit. Adanya hambatan aglutinasi menunjukkan adanya virus AI subtipe H5.

1. Desain Primer

Untuk amplifikasi gen matrix (M) menggunakan primer H5 didesain menggunakan informasi genetik virus H5N1.

1. Ekstraksi RNA Virus

Ekstraksi ribonucleic acid (RNA) virus yang berasal dari cairan korioalantois dilakukan menggunakan PurelinkTM micro-to-Midi Total RNA Purification System dari Invitrogen. Ekstrak RNA selanjutnya digunakan sebagai template

untuk revese transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) dan disimpan pada suhu -20 C sampai digunakan.

1. Amplifikasi Gen M dan H5 dengan Metode RT-PCR

 Sebelum dilakukan amplifikasi, dipersiapkan master mix dengan volume 22,5 μl untuk satu sampel. Sebanyak 1x buffer mix reaction dengan volume 12,5 μl dimasukkan ke dalam tube, kemudian ditambahkan dengan 0,5 μl primer forward dan 0,5 primer dengan konsentrasi 10 pmol/μl, lalu ditambahkan dengan 8 μl dH2O dan 1 μl enzim Taq SuperscriptTM III Polimerase. Campuran master mix ditambahkan dengan 2,5 μl RNA template sehingga volume total reaksi untuk satu sampel adalah 25 μl. Selanjutnya diamplifikasikan. Proses sintesis cDNA dilakukan dengan proses reverse transcription pada suhu 48 C selama 45 menit sebanyak satu siklus dan initial denaturation pada suhu 94 C selama 5 menit, sebanyak satu siklus. Kemudian proses dilanjutkan pada PCR amplifikasi sebanyak 40 siklus dengan suhu masing-masing denaturasi 94 C selama 30 detik, annealing 47 C selama 60 detik, ekstensi 68 C selama 30 detik, dan final ekstensi pada suhu 68 C selama 10 menit. Hasil RT-PCR kemudian di simpan pada suhu -20 C atau dapat langsung dielektroforesis.

1. Analisis Produk Hasil PCR dengan Elektroforesis

Produk amplifikasi PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dan ditambahkan Sybr safe 1,5 μl (10 mg/ml). Kemudian semua sumuran gel agarose diisi dengan sampel, marker, dan kontrol positif, dan dilakukan running elektroforesis pada tegangan 135 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis

dibaca pada trans-illuminator viewer.

1. Analisis Data

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

1. **Hasil dan Pembahasan**

Sampel swab dan organ pada berbagai jenis unggas yang diduga terinfeksi virus AI pada tujuh kabupaten/kota di Provinsi Aceh. Isolasi virus dilakukan pada TAB SPF umur 9- 11 hari dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37 C. Selanjutnya diambil cairan korioalantois secara aseptis dan diuji aglutinasi cepat pada plat kaca menggunakan sel darah merah (SDM)/eritrosit ayam 10%. Dari 37 sampel yang diisolasi dan diuji aglutinasi cepat ditemukan sebanyak tujuh sampel yang positif mengaglutinasi sel darah merah. Berdasarkan hasil uji aglutinasi cepat ini dapat diketahui keberadaan virus dalam cairan korioalantois.

Berdasarkan uji HA/HI dengan menggunakan antigen spesifik virus AI dan ND, maka dapat dipastikan bahwa ke-7 sampel tersebut positif virus AI. Adanya aglutinasi pada uji HA dan hambatan aglutinasi pada uji HI memperlihatkan reaksi spesifik antara virus AI dengan antibodi anti-H5N1. Jumlah (titer) virus yang tinggi ditandai dengan semakin cepat dan kuat terjadi reaksi aglutinasi. Sementara itu, adanya garis presipitasi pada uji immune diffusion (ID) menunjukkan karakter yang kuat dari virus AI.

Hasil inokulasi dan uji HA/HI yang positif kemudian dilanjutkan dengan screening untuk menentukan tipe dari virus AI dengan cara melakukan amplifikasi terhadap gen matriks. Amplifikasi ini dilakukan dengan metode single step RT-PCR dan menggunakan satu pasang primer yang spesifik terhadap virus influenza A, yaitu reverse dan forward.

Berdasarkan hasil elektroforesis, maka dapat diketahui bahwa proses RT-PCR yang dilakukan berlangsung dengan baik tanpa adanya kontaminasi. Hasil ini spesifik untuk menunjukkan virus AI tipe A, tetapi kurang spesifik untuk penentu subtipe H5N1. Gen M dengan panjang 1027 bp yang mempunyai daerah yang relatif conserved dibanding gen HA. Gen M dapat dilacak dengan menggunakan beberapa jenis primer M.

Semua sampel positif gen matriks, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi terhadap gen hemaglutinin. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua sampel termasuk kedalam subtipe H5 yang ditandai dengan munculnya pita DNA pada posisi 1.725 bp.

Berdasarkan hasil pada sampel (C) yaitu virus berasal dari ayam petelur pita DNA yang muncul sangat tipis, sedangkan pada sampel lain yang berasal dari puyuh, pita yang muncul sangat tebal. Hal ini kemungkinan disebabkan karena primer yang digunakan kurang spesifik terhadap virus AI yang berasal dari ayam. Reaksi demikian menunjukkan kemungkinan telah terjadinya mutasi gen HA dari virus AI yang berasal dari ayam.

Mutasi pada virus AI dapat terjadi melalui antigenic drift (point mutation) akibat tekanan imunologis dan usaha virus untuk menghindar dari sistem imun tubuh inang. Pada kondisi lain, mutasi terjadi melalui antigenic shift akibat penataan genetik dari beberapa subtipe (genetic reassortment), yang mengarah pada timbulnya evolusi virus. Sehingga sangat perlu dilakukan pembuktian lanjutan terhadap gen neuraminidase (NA) atau melalui pengurutan pada gen HA untuk mengetahui adanya mutasi pada basa nukleotida dan asam amino. Konfirmasi yang paling tepat untuk menentukan subtipe virus AI adalah melalui penggunaan primer yang tepat baik primer H5 untuk amplifikasi gen HA maupun primer N1 untuk amplifikasi gen NA, atau dengan melakukan pengurutan untuk mengetahui urutan nukleotida pada kedua gen yang menyandi subtipe tersebut.

1. **Kesimpulan**

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa identifikasi virus AI dapat dilakukan dengan dua metode konvensional yaitu uji HA/HI dan secara molekuler yaitu melalui amplifikasi gen dengan metode RT-PCR.. Melalui penelitian ini dapat dibuktikan bahwa virus yang menyebabkan kematian berbagai jenis unggas (ayam, itik, dan puyuh) di Indonesia, khususnya di Provinsi Aceh selama ini adalah akibat dari infeksi virus AI tipe A dan subtipe H5.