

KATA PENGANTAR

Diagnosa Veteriner Vol. 16, No. 1, Tahun 2017

Alhamdulillah, segala puji bagi Tuhan Yang Maha Kuasa. Atas rahmat dan karuniaNya Buletin Diagnosa Veteriner Vol. 16, No. 1, Tahun 2017 dapat diterbitkan. Buletin edisi ini kami menyajikan artikel “Kasus Pertama *Low Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H9N2 pada Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan Indonesia”. Artikel kedua, “aktivitas Beberapa *Chemical Germicide* Golongan *Formaldehyde* dan *Chlorin* terhadap Sampel Darah Anthraks pada Laboratorium”. Artikel terakhir ”Survey Triangulasi pada Hewan Domestik di Pulau Sulawesi : Hasil Pengujian *Round 1* Sulawesi Utara dan Gorontalo Tahun 2016”.

Redaksi membuka kesempatan kepada semua pihak yang berkepentingan dengan dunia veteriner dan peternakan untuk menyampaikan ide atau gagasan berupa karya ilmiah populer pengamatan lapangan, hasil penelitian atau review melalui buletin ini.

Redaksi mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca sebagai bahan pembelajaran untuk pengembangan Buletin Diagnosa Veteriner volume selanjutnya.

Maros, 24 April 2017

Redaksi

DIAGNOSA VETERINER

Buletin Informasi Kesehatan Hewan dan
Kesehatan Masyarakat

International Standard Serial Number (ISSN) : 0216 – 1486

Volume : 16

No : 1

Tahun : 2017

SUSUNAN REDAKSI

Penanggung Jawab : Kepala Balai Besar Veteriner Maros

Pemimpin Redaksi : Kepala Seksi Informasi Veteriner

Penyunting/ editor : Kepala Bidang Pelayanan Veteriner
drh. Dini Marmansari
drh. Titis Furi Djatmikowati
drh. Hadi Purnama Wirawan, M.Kes

Sekretariat : Suryani Gesha Utami, A.Md
Marwati, S. Sos

DAFTAR ISI

Diagnosa Veteriner Vol. 16, No. 1, Tahun 2017

	Halaman
Kata Pengantar	i
Susunan Redaksi	ii
Daftar Isi	iii
Kasus Pertama <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i> Subtipe H9N2 pada Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan Indonesia	1
Aktivitas Beberapa <i>Chemical Germicide</i> Golongan <i>Formaldehyde</i> dan <i>Chlorin</i> terhadap Sampel Darah Anthraks pada Laboratorium	14
Survey Triangulasi pada Hewan Domestik di Pulau Sulawesi : Hasil Pengujian <i>Round 1</i> Sulawesi Utara dan Gorontalo Tahun 2016	22

Kasus Pertama *Low Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H9N2 pada Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan Indonesia

Muflihanah¹, Ernes Andesfha², Hendra Wibawa³, Farida Camallia Zenal⁴, Ferra Hendrawati¹, Siswani¹, Wahyuni¹, Dina Kartini², Irma Rahayuningtyas², Sulaxono Hadi¹, Sri Mukartini², Bagoes Poermadjaja³, Fadjar Sumping Tjatur Rasa⁵

1. Balai Besar Veteriner Maros

2. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

3. Balai Besar Veteriner Wates

4. Food and Agriculture Organization Emergency Centre for Transboundary Diseases Indonesia

5. Direktorat Kesehatan Hewan

muflihd@yahoo.com, ernesandesfha@gmail.com, hi.wibawa@gmail.com, ferradic7@gmail.com, fyca_farida@yahoo.com, siswani.nink@yahoo.com, wahyunipurnama@gmail.com, sulaxonohadi@yahoo.com, bagoes208@yahoo.com

Intisari

Low pathogenic avian influenza subtipe H9N2 virus pertama kali didiagnosa pada peternakan ayam layer di Kabupaten Sidrap Propinsi Sulawesi Selatan Indonesia pada Desember 2016 dengan gejala klinis berupa gangguan pada saluran pernafasan yang ditandai dengan muka bengkak, sesak nafas, *discharge* dari hidung, kurang nafsu makan dan feses berwarna kehijauan. Kejadian penyakit terjadi dalam kurun waktu 3 – 14 hari dengan tingkat mortalitas rata-rata dibawah 5 % dan terjadi penurunan produksi telur sebanyak 50 - 80%.

Dari hasil pengujian laboratorium dengan real time PCR menunjukkan positif *Avian Influenza Type A*, negatif subtype H5 dan H7 serta positif H9. Hasil isolasi virus pada Telur Embrio Bertunas (TAB) dengan uji rapid aglutinasi hasilnya tidak mengaglutinasi sel darah merah. Hasil histopatologi pada jaringan organ menunjukkan hasil *suspect* terhadap virus. Pengujian laboratorium dengan menggunakan teknik isolasi virus dan *real time* PCR. Dari isolasi virus setelah dilakukan penanaman di telur embrio, menunjukkan terjadi kematian embrio, seluruh organ embrio mengalami pendarahan, tetapi cairan allantois tidak mengaglutinasi sel darah merah ayam. Kemudian cairan allantois diambil untuk pengujian *real time* PCR menunjukkan hasil positif tipe A, negatif H5, negatif H7 dan positif H9.

Hasil Sequencing terhadap tiga isolat A/Chicken/Sidrap/07161511-1/2016, A/Chicken/Sidrap/07161511-61/2016, A/Chicken/Sidrap/07170094-44OA/2017 memiliki kesamaan genetik 98% H9N2. Hasil pohon filogenetik menunjukkan sampel yang diuji nampak dari kelompok atau lineage Asia Y280-H9N2.

Kata Kunci : *Avian Influenza, H9N2, Ayam petelur*

Pendahuluan

Virus H9N2 adalah salah satu virus *avian influenza* (AI) yang memiliki sifat keganasan pada unggas yang rendah sehingga digolongkan dalam kelompok *low pathogenic avian influenza* (LPAI) (OIE, 2008). Virus ini telah ditemukan di beberapa negara di wilayah Asia, Timur Tengah dan Afrika, dimana menyebabkan kerugian ekonomi khususnya dari sektor pertanian/peternakan karena terjadi hambatan pertumbuhan dan fertilitas unggas serta penurunan produksi. Meskipun virus H9 di klasifikasikan LPAI, kematian di lapangan pernah dilaporkan lebih dari 50%. Virus ini juga berpotensi zoonotik karena kasus infeksi H9N2 pada manusia pernah dilaporkan di Hongkong, China, Bangladesh dan Mesir, serta telah dibuktikan bahwa virus ini berperan sebagai donor internal gen prekursor subtype virus lain, seperti H5N1 yang menyebabkan kasus flu burung (*bird flu*) pada manusia di Hong kong tahun 2007 atau H7N9 dan H10N8 di Cina pada tahun 2013 dan 2015 (Peacock, *et al.*, 2016)

Pada bulan Desember 2016 telah dilaporkan kasus penyakit pada ayam petelur di Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan Indonesia dengan gejala klinis berupa gangguan pada

saluran pernafasan yang ditandai dengan muka bengkak, sesak nafas, *discharge* dari hidung, kurang nafsu makan dan feses berwarna kehijauan. Kejadian penyakit terjadi dalam kurun waktu 3 – 14 hari dengan tingkat mortalitas rata-rata dibawah 5 % dan terjadi penurunan produksi telur sebanyak 50 - 78%. Investigasi dan pengujian laboratorium dengan teknik *real time* PCR dan isolasi kasus penyakit dilakukan oleh Balai Besar Veteriner Maros (BBVet Maros), dilanjutkan dengan identifikasi agen penyakit dengan teknik virologi dan DNA sequencing bekerja sama dengan laboratorium *Sequencing Partner*, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPM SOH), Bogor dan laboratorium rujukan AI Nasional, Balai Besar Veteriner Wates (BBVet Wates). Hasil investigasi dan identifikasi agen penyakit mengindikasikan bahwa gejala klinis dan patologis berupa penurunan produksi telur dan mortalitas pada ayam petelur disebabkan oleh virus LPAI subtipe H9N2. Peningkatan angka mortalitas kemungkinan bisa terjadi disebabkan oleh adanya infeksi sekunder bakteri sehingga memperparah derajat penyakit pada unggas.

Materi dan Metode

Koleksi Data Kasus

Investigasi dilakukan berdasarkan laporan dari Dinas yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan pada tanggal 15 -17 Desember 2016 di Desa Tanete Kecamatan Maritengngae dan dilakukan penelusuran kembali pada tanggal 2 – 4 Februari 2017 berdasarkan hasil pengujian laboratorium dan laporan dari petugas bahwa kasus yang sama terjadi di Desa Bulu Kecamatan Pancarijang. Kemudian dilakukan pengumpulan data termasuk riwayat penyakit, spesies, gejala klinis, perkembangan tanda-tanda dari waktu ke waktu, lalu lintas, faktor lingkungan, pengambilan spesimen unggas dan lingkungan serta pengujian laboratorium.

Pengujian Laboratorium

Pengujian laboratorium dilakukan dengan pemeriksaan patologi anatomi dan histopatologi, deteksi dan identifikasi agen penyakit dengan teknik *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) dengan algoritma deteksi AI dan isolasi dengan teknik kultur virus pada telur ayam bertunas di BBVet Maros.

Identifikasi dan konfirmasi agen penyakit menggunakan teknik *Sanger dideoxy sequencing* AI dilakukan di BBPM SOH dan selanjutnya dengan teknik *Next Generation Sequencing* (NGS) di BBVet Wates. Prosedur Sanger DNA sequencing AI menggunakan protokol yang telah dikembangkan dan divalidasi oleh laboratorium rujukan OIE Asia Pasifik, *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL) Australia, menggunakan sepasang primer dengan panjang amplikon 682 bp (H9-KD-654F: GACACAACAACGAGTGTGGC, H9-KD-1335R : GCCCATATA TCTTGGATTTGAT). Untuk primer N2 menggunakan reference dari Fereidouni *et al Veterinary Microbiology* 135 (2009) 253–260 dengan panjang amplikon 362 bp (IVA-N2-F : GCATGGTCCAGYTCAAGYTG, IVA-N2-R : CCYTTCCAGTTGTCTCT GCA).

Hasil

Investigasi kejadian penurunan produksi telur dan kematian unggas

Kasus penyakit di Kabupaten Sidrap terjadi pada ayam petelur mulai tanggal 1 Oktober 2016 sampai tanggal 2 Februari 2017. Berdasarkan laporan dan investigasi, kejadian kasus kematian unggas bermula dari Desa Tanete Kecamatan Maritengnga, Desa Bulu dan Desa Cipotakari Kecamatan Pancarijang serta Desa Talawe Kecamatan Watangsidenreng serta laporan terakhir kasus yang sama telah menyebar di sentra peternakan di Desa Allakuang Kecamatan Maritengnga dan Desa Teteaji Kecamatan Tellulimpoe. Laporan kasus penyakit baru di Desa Talawe Kecamatan Sidenreng diperoleh ketika tim berada di Desa Bulu

Dari gambaran kurva epidemik, kematian unggas di mulai pada bulan Oktober 2016. Gambaran kurva epidemik pada kasus penyakit pada ayam petelur tertinggi pada bulan Januari 2017 dengan rata-rata angka mortalitis sebesar 2,73 %. Data kematian unggas dan penurunan produksi secara keseluruhan disimpulkan pada Tabel 2 di bawah ini :

Tabel 2. Data Kematian Ayam Petelur dan Penurunan Produksi Telur di Kecamatan Pancarijang, Kabupaten Sidrap

No	Tahun	Bulan	Desa	Pemilik	Populasi (Ekor)	Jumlah Kematian (Ekor)	Tingkat Mortalitas (%)	Produksi Telur (Rak/Hari)	Penurunan Produksi Telur (Rak/hari)	Tingkat Penurunan Produksi Telur (%)
1	2016	Nop	Tanete	Peternak 1	13800	100	0.72	500	200	60
2		Nop	Bulo	Peternak 1	6000	200	3.33	178	85	52.2
3		Des	Tanete	Peternak 2	6000	80	1.33	27	7	74.1
4		Des	Tanete	Peternak 3	1800	35	1.94	40	9	77.5
5		Jan	Cipotakari	Peternak 1	11000	450	4.09	150	40	73.3
6	2017	Jan	Bulo	Peternak 2	69000	500	0.72	1500	700	53.3
7		Jan	Bulo	Peternak 4	13000	200	1.54	200	100	50
8		Jan	Bulo	Peternak 5	14000	200	1.43	250	105	58
9		Jan	Bulo	Peternak 6	5500	200	3.64	80	53	33.8
10		Jan	Bulo	Peternak 3	20000	950	4.75	250	120	52
11		Jan	Cipotakari	Peternak 2	8000	140	1.75	203	70	65.5
12		Jan	Cipotakari	Peternak 3	8000	600	7.50	130	30	76.9
Rata-rata							2,73 %			60,55%

Gejala Klinis dan Patologi Anatomi

Gejala klinis yang ditemukan pada ayam petelur dari kasus penyakit di beberapa lokasi di atas berupa gangguan pernafasan, muka bengkak, pial dan jengger sianosis, berak hijau, dan penurunan nafsu makan dan minum, hingga tidak mampu berdiri (Gambar 3). Telur yang dihasilkan dari peternakan yang terkena kasus nampak abnormal (ukuran kecil dan kerabang tipis dan mudah pecah) (Gambar 4):

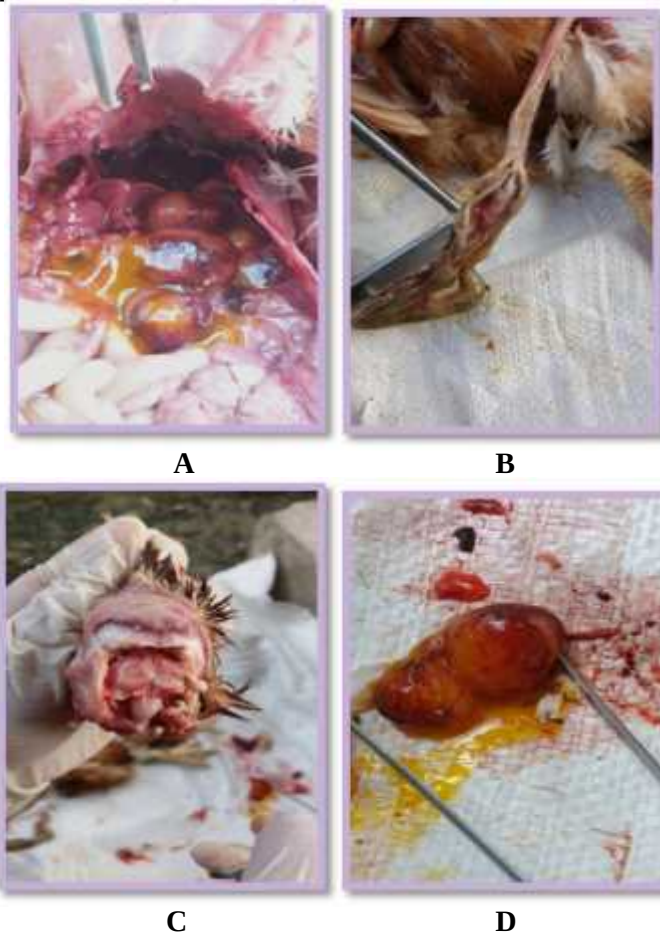


Gambar 3. Gejala Klinis pada Ayam

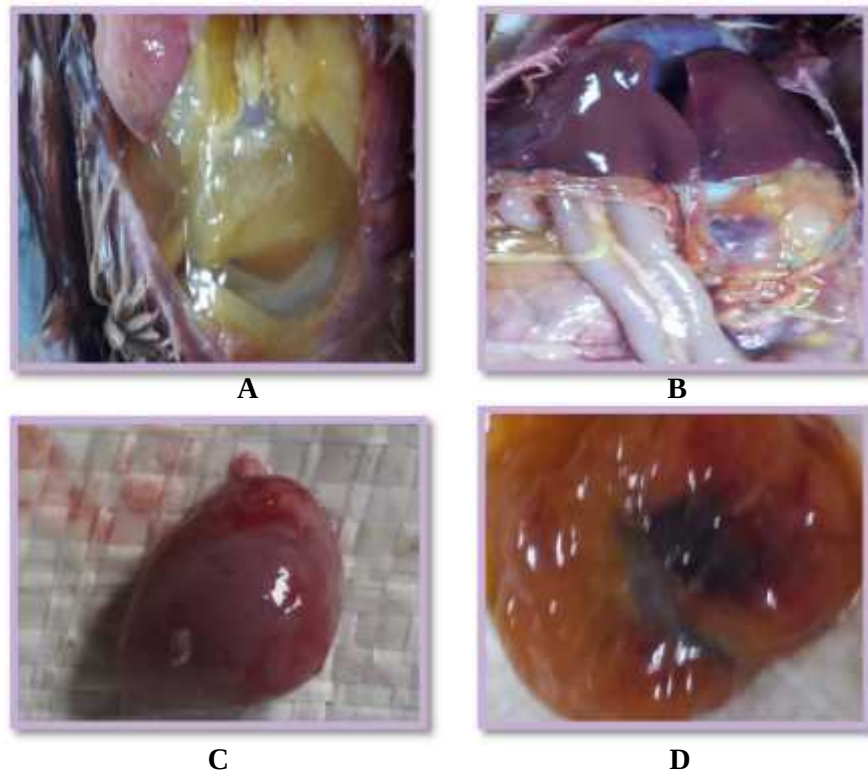


Gambar 4. Ukuran telur di bawah normal dan kerabang yang mudah pecah

Diagnosa awal/sementara dengan gejala klinis tersebut adalah sementara adalah IB (*Infectious Bronchitis*), dengan diagnosa banding adalah *Low Pathogenic AI*, EDS, ND, Colibacillosis, CRD. Namun setelah dilakukan nekropsi dari unggas yang menunjukkan sakit/mati tampak adanya pendarahan pada otot dada, pendarahan terjadi pada beberapa organ, pendarahan pada ovarium dan bentuk folikelnya tidak beraturan serta peradangan juga ditemukan pada saluran pernafasan (Gambar 5). Selain itu juga ditemukan adanya pendarahan dan kongesti pada bagian organ hati, usus, jantung dan otak serta limpa tampak membesar dan adanya titik pendarahan pada ovarium (Gambar 6).



Gambar 6. Perubahan Patologi pada Ayam (A) Pendarahan pada Organ Visceral, (B) Pendarahan pada Usus, (C) Pendarahan pada Otak, (D) Pendarahan pada Ovarium



Gambar 7. Perubahan Patologi pada Ayam Sakit (A) Lapisan jelly pada lemak perut (B) Hati dan serosa usus relatif normal, (C) Limpa membesar , (D) Terjadi titik pendarahan pada ovarium

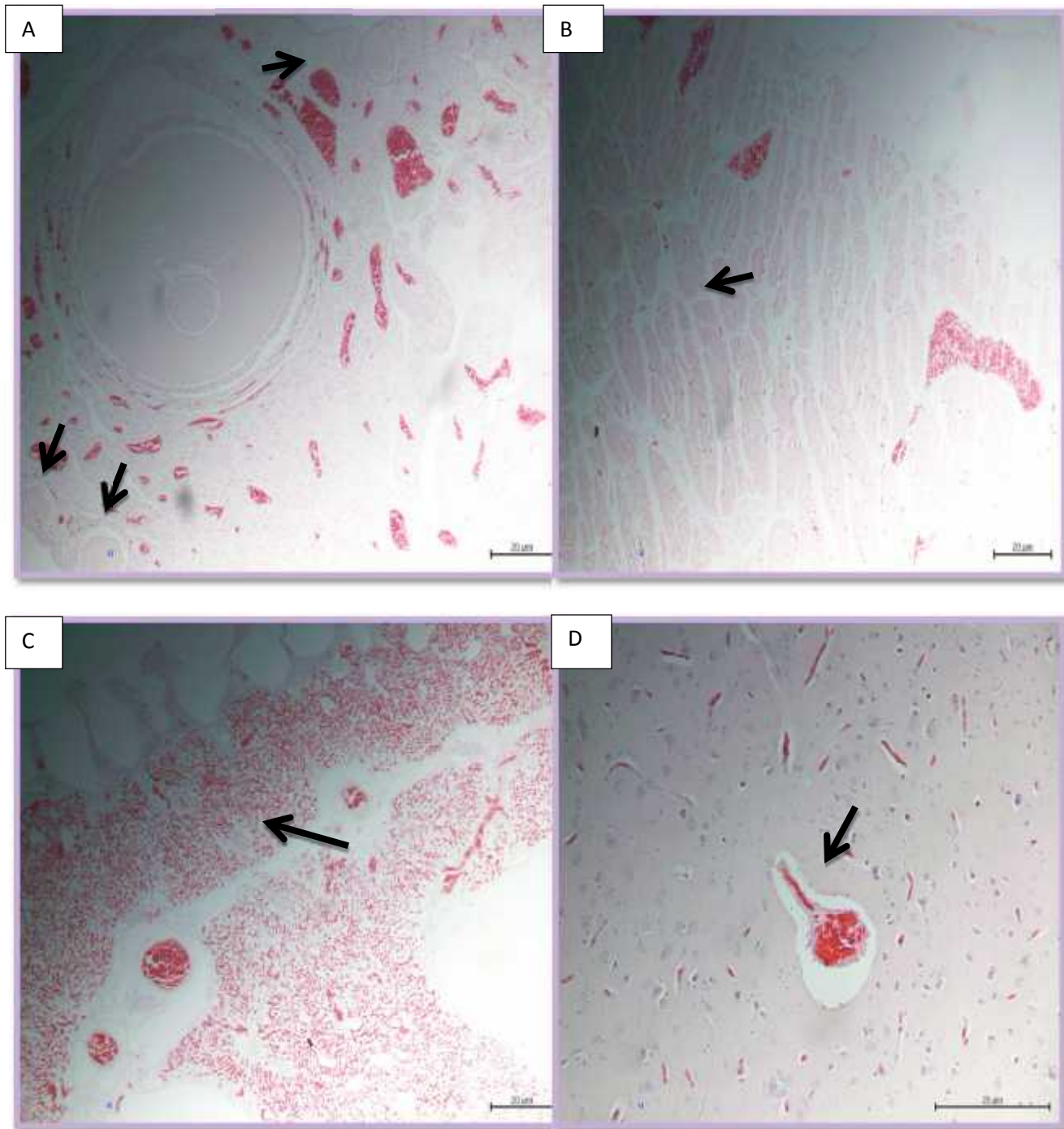
Hasil pengujian Laboratorium : PCR dan Isolasi Agen Penyakit

Untuk mendeteksi keberadaan agen penyakit dari sampel-sampel ayam yang sakit/mati, dilakukan pengujian *realtime* PCR, isolasi agen, dan melihat gambaran histopatologi.

Tabel 3. Hasil Pengujian Real time PCR Kasus Pertama di Desa Tanete Kecamatan Maritenggae

No	No Epi	Kode Sampel	Hewan	Jenis Sampel	Jumlah Smapel	Hasil Uji (Ct Value)			
						MA	H5	H7	H9
1.	7161511	1 sd 5	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	25.17	Undet	Undet	22.27
2.	7161511	6 sd 10	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	28.8	Undet	Undet	28.35
3.	7161511	11 sd 15	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	38.11	Undet	Undet	Undet
4.	7161511	16 sd 20	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	32.05	Undet	Undet	30.35
5.	7161511	22 sd 26	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	37.18	Undet	Undet	38.99
6.	7161511	36 sd 40	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	33.34	Undet	Undet	34.77
7.	7161511	41 sd 45	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	28.32	Undet	Undet	28.5
8.	7161511	51 sd 55	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	5 (pooled)	33.88	Undet	Undet	33.34
9.	7161511	56	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	1	36.81	Undet	Undet	27.66
10.	7161511	57	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	1	22.51	Undet	Undet	22.03
11.	7161511	59	Ayam Layer	Swab Oropharyngeal	1	23.87	Undet	Undet	22.49
12.	7161511	61	Ayam Layer	Organ	1	21.15	Undet	Undet	19.41
Total					44				

Dari hasil pengujian laboratorium dengan real time PCR menunjukkan positif *Avian Influeza Type A*, negatif subtype H5 dan H7 serta positif H9. Hasil isolasi virus pada Telur Embrio Bertunas (TAB) dengan uji rapid aglutinasi hasilnya tidak mengaglutinasi sel darah merah. Hasil histopatologi pada jaringan organ menunjukkan hasil dugaan terhadap infeksi virus ditunjukkan pada Gambar 8 sebagai berikut :



Gambar 8. Hasil pengujian histopatologi (A). ovarium : banyak regresi sel telur dan perdarahan, (B) Jantung mengalami pembengkakan, (C) Paru-paru perdarahan diffuse, (D) Perivascular cuffing pada otak dan gliosis

Dari isolasi virus setelah dilakukan penanaman di telur embrio, menunjukkan terjadi kematian embrio, seluruh organ embrio mengalami pendarahan, tetapi cairan allantois tidak mengaglutinasi sel darah merah ayam.



Gambar 9. Pendarahan Pada Embrio

Kemudian cairan allantois diambil untuk pengujian *real time PCR* menunjukkan hasil positif tipe A, negatif H5, negatif H7 dan **positif H9**. Setelah dilakukan N typing hasilnya negatif N8, N6, N9 dan N1, tetapi positif N2. Hasil pengujian *real time PCR* dapat dilihat pada Tabel 4 di bawah ini:

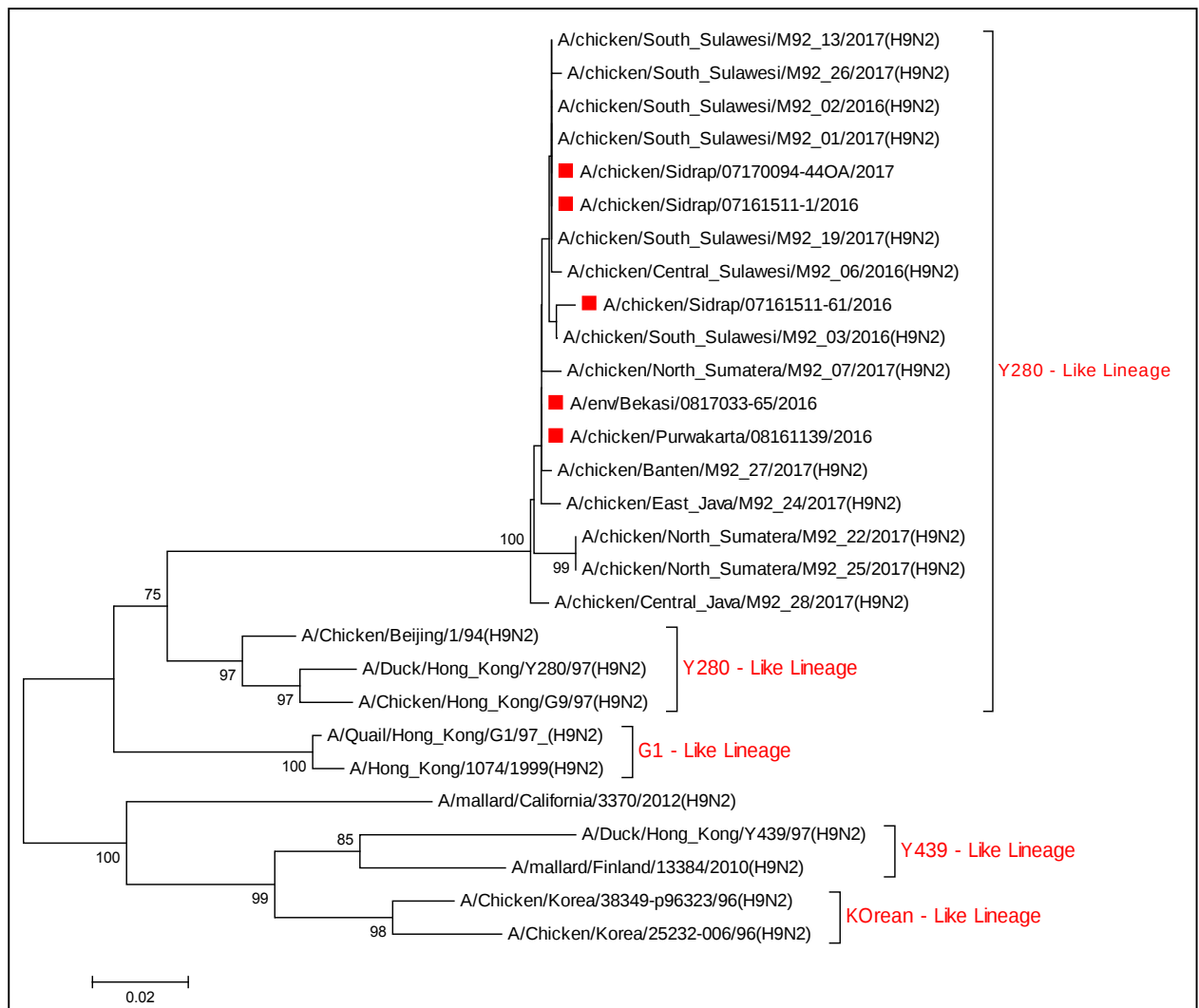
Tabel 4. Hasil Pengujian Real time PCR Cairan Allantois

No	No Epi	Kode Sampel	Hewan	Jenis Sampel	Tanggal Uji Type A	Hasil Uji			
						MA	H5	H7	H9
1.	7170094	S2 (44)	Ayam Layer	allantois	8-Feb-17	26.2	Undet	Undet	32.35
2..	7170094	O2 (44)	Ayam Layer	allantois	8-Feb-17	13.79	Undet	Undet	15.42

Untuk konfirmasi pengujian maka dilakukan sequencing terhadap sampel yang memiliki nilai Ct yang tinggi. Sequencing gen hemagglutinin (HA) dilakukan di BBPMSOH Bogor dan *whole genome sequencing* di BBVet Wates. Identifikasi subtype HA telah dilakukan di BBPMSOH bersamaan dengan dengan sampel dari survei pada pasar unggar hidup/*live bird market* (LBM) dari FAO-Project pada LBM di wilayah Jabodetabek dimana telah terdeteksi positif H9N2 dengan teknik PCR. Adapun sampel yang diuji *DNA sequencing* yaitu A/Chicken/Sidrap/07161511-1/2016 (Ct : 22.27), A/Chicken/Sidrap/07161511-61/2016 (Ct : 19.41) dan A/Chicken/Sidrap/07170094-44OA/2017 (Ct : 15.42)

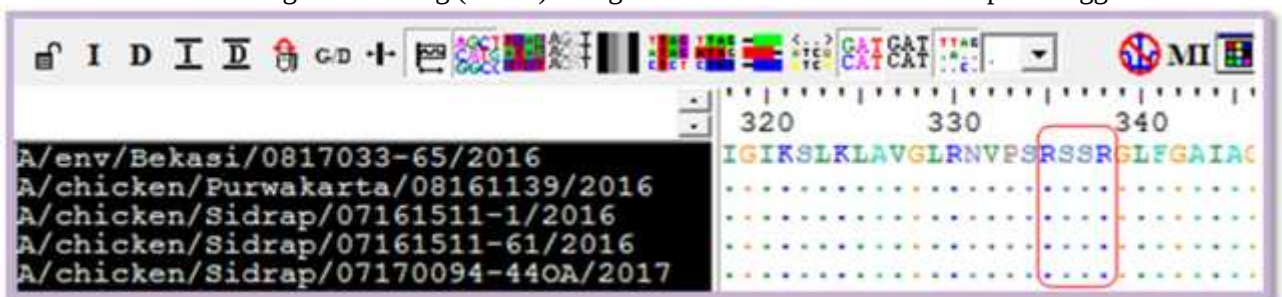
Analisis Filogenetik dan Molekuler Sekuens

Hasil analisa filogenetik gen HA menunjukkan bahwa sampel-sampel yang disequencing terdeteksi dan teridentifikasi sebagai virus AI sub tipe H9 dan diidkasikan memiliki kekerabatan genetik yang tinggi dengan virus-virus yang sebelumnya terdeteksi sebagai virus LPAI H9N2 .



Gambar 10. Pohon filogenetik dari isolat-isolat H9N2 yang diisolasi dari ayam dan sampel lingkungan (sampel diberi tanda kotak merah). Analisis menggunakan NJ tree, dengan model substitusi nukleotida (Tamura-Nei (TN93) dengan 1000 bootstrap replikasi. Empat lineage yang digunakan yaitu Y280, G1, Y439 dan Korean – like lineage.

Motif CS isolat H9N2 Indonesia lainnya yang telah diupload di genbank juga memiliki motif CS yang sama yaitu RSSR. Menurut Li *et al.*, 2003 semua isolat H9N2 sekarang ini memiliki motif Arg-Ser-Ser-Arg (RSSR) sebagai karakteristik virus LPAI H9 pada unggas.



Gambar 11. Motif asam-asam amino pada daerah cleavage site /pemotongan proteolitik (diberi kotak merah) dari isolat H9N2.

Pembahasan

Hasil kegiatan investigasi dan pengujian laboratorium menunjukkan bahwa kasus H9N2 terjadi sangat cepat dan menyebar di beberapa peternakan ayam petelur di Kabupaten Sidrap. Dari wawancara dengan peternak dan pemantauan di lokasi kasus, faktor risiko penyebaran terjadinya penyakit yaitu manajemen biosecurity yang masih rendah (pekerja dan keluarga pekerja yang bebas keluar masuk kandang, mobil pengangkut pakan, pengangkut feces tanpa adanya desinfeksi), banyaknya burung liar di dalam dan sekitar kandang, cuaca yang ekstrim, manajemen vaksinasi khususnya rantai dingin dan kebersihan kandang. Menurut El Houadfi *et al.*, 2016 bahwa kejadian H9N2 di Marocco, burung liar, unggas domestik dan manusia memberikan kontribusi terbesar dalam penyebaran H9N2.



Gambar 12. Faktor risiko penyebaran penyakit dari lingkungan (A) Burung Liar dalam Kandang, (B) Kebersihan di Bawah Kandang, (C) Lingkungan terbuka, (D) Akses lalu lintas

Tindakan yang dilakukan peternak yaitu pengobatan dengan antibiotik dan pemberian vitamin. Peternak ada yang memberikan antibiotik manusia ke masing-masing ayam. Bahkan beberapa peternak melaporkan bahwa ketika kasus penyakit terjadi ada yang melakukan vaksinasi AI, IB, ILT dan ND sehingga immunosupresif. Menurut Gu *et al.*, 2017 virus H9N2 akan mengakibatkan perubahan pada organ tubuh dan immunosupresif pada unggas yang terinfeksi. Vaksin AI yang digunakan sebagian besar menggunakan clade 2.3.2.1 dan beberapa peternak menggunakan clade 2.1.3. Ketika terjadi perbaikan kondisi ayam, produksi telur mulai meningkat tetapi telur yang dihasilkan ukurannya di bawah normal dan kerabang yang mudah pecah.

Hasil pohon filogenetik menunjukkan 5 sampel yang diuji nampak dari kelompok atau lineage Asia Y280-H9N2, demikian pula isolat H9N2 Indonesia yang telah diupload di genbank. Sebagaimana diketahui H9N2 lineages Y280 dan G1 banyak ditemukan pada unggas Asia terutama di ayam dan puyuh (Guan *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2003). A/quail/Hongkong/G1/97 (G1-like) termasuk dalam menghasilkan *pathogenic* tinggi virus H5N1 pada tahun 1997 (Guan *et al.*, 1999) dan menjadi donor gen internal ke-6 pada unggas dan manusia isolasi virus H5N1 (Guan *et al.*, 2000). Virus A/duck/Hongkong/Y280/97 (Y280-like) terutama berhubungan dengan infeksi pada ayam yang menyebabkan gejala klinis ringan (Guan *et al.*, 2000) dan telah berhasil diisolasi pada babi di China Selatan (Peiris *et al.*, 2001).

Namun, jika diperhatikan lebih lanjut ada kecenderungan bahwa virus-virus LPAI H9N2 asal Indonesia membentuk *cluster* filogenetik tersendiri yang unik. Konfirmasi lebih lanjut apakah virus-virus H9N2 merupakan *cluster* lain dari lineage Y280 dapat dibuktikan setelah terkumpul beberapa isolat baru yang lebih lengkap sehingga *cluster* H9N2 Indonesia tersebut dapat didukung dengan data statistik dan jarak genetik yang signifikan.

Homologi nukleotida (nt) dan asam amino (aa) kelima sampel positif H9N2 yaitu 99.3 - 100% dan 98.9 - 100%. Sedangkan homologi nt dan aa terhadap sampel H9N2 Indonesia yang telah diupload di Genbank sebesar 98.6 - 100% dan 98.2 - 100%. Homologi kelima sampel terhadap lineage Y280 sebesar 88.2 - 89.5% (nt) dan 88.4-91.9% (aa), sedangkan terhadap lineage lainnya (G1, Korean dan Y439) yaitu 76.9-86.7% (nt) dan 84.2-88.4% (aa).

Hasil analisis asam amino pada bagian *cleavage site* (CS) bersifat *monobasic* yaitu RSSR (aa 335 - 338) (Gambar 10), dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sampel-sampel yang diuji baik dari unggas dan LBM termasuk dalam kelompok *low pathogenic avian influenza*

Receptor binding site (RBS) adalah hal yang penting bagi spesifisitas reseptor sel dan menentukan variasi host (Gambaryan *et al.*, 2002, Ha *et al.*, 2001), residu asam amino pada posisi 110, 161, 163, 191, 198, 234, 235 dan 236 molekul HA. Dari lima sampel positif H9N2, terdapat satu sampel (A/chicken/Sidrap/07161511-61/2016) yang tidak dapat dianalisa asam amino bagian RBS dikarenakan hasil sequencing pada bagian awal kurang optimal. Hasil analisis asam amino keempat sampel lainnya yaitu pada asam amino 234 terdapat mutasi asam amino dari Q (Glutamine) menjadi L (Q234L, sedangkan asam amino tidak mengalami perubahan yaitu glycine (G236G). Substitusi Q234L pada HA protein pada virus kelompok HPAI berkontribusi terhadap patogenesitas pada mamalia dan meningkatnya afinitas virus AI terhadap $\alpha 2, 6$ sialic acid reseptor yang ditemukan banyak terdapat pada saluran respirasi tikus dan manusia (Matrosovich *et al.*, 2001). Kajian Wan *et al* menyatakan substitusi Q234L ditemukan pada lineage G1, Y280 dan G9 yang diisolasi di Hongkong, memungkinkan virus H9N2 lebih mudah menginfeksi sel-sel yang tidak bersilia dan tumbuh lebih efisien di kultur sel epitel saluran nafas manusia sehingga meningkatkan keparahan infeksi pada manusia (Wan *et al.*, 2007). Perlu dikaji lebih lanjut dengan uji tantang pada beberapa spesies, termasuk mamalia, untuk membuktikan apakah perubahan asam-asam amino yang ditemukan berpengaruh pada peningkatan atau perubahan sifat pengikatan reseptor virus pada sel dan berpotensi patogenik pada mamalia.

Kajian Jakhesara *et al* 2014 tentang infeksi H9N2 pada layer ditemukan gejala klinis seperti kesulitan bernafas, kepala bengkak, *nasal discharge*, penurunan nafsu makan, jengger *cyanotic* dan *flock* yang terkena infeksi H9N2 gejala klinisnya terlihat selama 3-4 minggu dengan penurunan produksi sampai 40%. Persentase kematian 2-3% dan 10-30% pada *flock* unggas yang terkena di fase *grower* dan layer. Pemeriksaan *post mortem* ditemukan *fibrinocaseative* pada *sinus infraorbitalis*, kongesti pada mukosa trachea dengan material *caseos*, *edema* pada dinding *oviduct*, *fibrine plaques* pada ovarium dan sumbatan *caseos* pada percabangan Jakhesara *et al.*, 2014).

Beberapa laporan di negara lain menyebutkan bahwa virus LPAI H9N2 telah ditemukan pada unggas dan menyebabkan wabah penyakit AI dengan kerugian ekonomi yang tidak sedikit. Selama tahun 1990 outbreak di poultry yang disebabkan oleh subtype H9 terutama H9N2 telah dilaporkan di Jerman, Itali, Ireland, Afrika Selatan, USA, China dan Timur Tengah, Saudi Arabia dan Pakistan (Alexander, 2000, Banks, 2000). Pada tahun 1997 virus H9N2 telah diisolasi dari beragam spesies unggas termasuk ayam, bebek, kalkun, puyuh, angsa, merpati di wilayah Asia, Timur Tengah, Eropa dan Afrika dan untuk pertama kali dari manusia di Hong Kong dan China tahun 1999 (Peiris *et al.*, 1999, Peiris *et al.*, 2001, Guo *et al.*, 1999). H9N2 dapat muncul sebagai patogen pada manusia melalui reassortment pada host antara seperti babi (Peiris *et al.*, 2001). Virus H9N2 menyebabkan masalah penyakit yang signifikan pada unggas sehingga merugikan ekonomi yang besar karena terjadi penurunan produksi telur atau angka kematian yang tinggi dengan *co-infeksi* dengan infeksi patogen seperti *infectious bronchitis virus* (Haghighat Jahromi *et al.*, 2008), *Staphylococcus aureus*, *Avibacterium paragallinarum*, *Escherichia coli* atau tekanan imunitas (Kishida *et al.*, 2004).

Kesimpulan

Berdasarkan gejala klinis yang ditemukan, persentase mortalitas yang rendah, penurunan produksi yang sangat signifikan hingga 80%, kondisi dan kualitas telur yang ditemukan, status dan jenis vaksinasi yang telah dilakukan, serta pengujian laboratorium dengan teknik PCR dan hasil DNA sequencing dengan analisis BLAST, asam amino pada CS, dan filogenetik dapat disimpulkan bahwa kasus yang terjadi pada unggas di peternakan layer di Kabupaten Sidrap disebabkan oleh infeksi **virus AI dari golongan LPAI subtype H9N2**.

Daftar Pustaka

- AAHL (2016). In House Australian Animal Health Laboratory (AAHL), Geelong, Australia.
- Alexander, D.J. (2000) A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74: 3-13.
- Banks, J., Speidel, E.C., Harris, P.A. and Alexander, D.J. (2000). Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol.* 29: 353-360.
- Chaipan, C., Kobasa, D., Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Solomon Tsegaye, T., Takeda, M., Bugge, T., Kim, S., Park, Y., Marzi, A., & Pohlmann, S. (2009). Proteolytic Activation of the 1918 Influenza Virus Hemagglutinin *Journal of Virology*, 83 (7), 3200-3211 DOI: [10.1128/JVI.02205-08](https://doi.org/10.1128/JVI.02205-08)
- El Houadfi, M., Siham F., Saadia N., Jean-Luc G., Mariette F. D., 2016. First outbreaks and phylogenetic analyses of Avian Influenza H9N2 viruses isolated from poultry flock in Morocco. *Virology Journal* 13:140
- Fereidouni S.R, Starick E, Grund C, Globig A, Mettenleiter T.C, Beer M, Harder T (2009). 260 Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Veterinary Microbiology* 135 (2009) 253–260.
- Gambaryan A, Webster R, Matrosovich M (2002) Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken. *Arch Virol* 147: 1197–1208. 36.
- Gu, M., Lijun X, Xiaoquan, W., Xiufan, L.. 2017. Current situation of H9N2 subtype Avian Influenza in China. *Veterinary Research* DOI 10.1186/s13567-017-0453-2
- Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss, P. S. Chin, K. C. Dyrting, T. M. Ellis, R. G. Webster, and M. Peiris. 2000. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* 74:9372–9380
- Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss, and R. G. Webster. 1999. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9363–9367.
- Guo YJ, Li JW, Cheng I: Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus. *Chin J Exp Clin Virol* 1999, 15:105-108.
- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC (2001) X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11181–11186.
- HaghighatJahromi M, Asasi K, Nili H, Dadras H, Shooshtari AH: Coinfection of avian influenza virus (H9N2 subtype) with infectious bronchitis live vaccine. *Arch Virol* 2008, 153:651-655

- Hall, T (1999). Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Jakhesara, SJ, Bhatt VD, Patel NV, Prajapati KS, Joshi CG. 2014. Isolation and characterization of H9N2 influenza virus isolates from poultry respiratory disease outbreak. SpringerPlus 2014, 3:196.
- Kawaoka, Y., S. Krauss, and R. G. Webster. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 63:4603–4608.
- Kida, H., T. Ito, J. Yasuda, Y. Shimizu, C. Itakura, K. F. Shortridge, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* 75:2183–2188.
- Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Kida H: Co-infection of Staphylococcus aureus or Haemophilus paragallinarum exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch Virol* 2004, 149:2095-2104.
- Li, K. S., K. M. Xu, J. S. M. Peiris, L. L. M. Poon, K. Z. Yu, K. Y. Yuen, K. F. Shortridge, R. G. Webster, and Y. Guan. 2003. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *J. Virol.* 77:6988–6994.
- Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG: H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 2001, 281:156-162.
- Peiris M, Yuen KY, Leung KH, Chan PL, Lai SIp, RW M, Orr K, Shortridge KF: Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999, 354:916-917.
- Peiris S, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF: Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol* 2001, 75:9679-9686.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Wan H, Perez DR: Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *J Virol* 2007, 81:5181-5191..