

# SEROLOGI DAN VIROLOGI VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1 PADA KUCING JALANAN DI KOTA BOGOR

## (SEROLOGICAL AND VIROLOGICAL STUDY OF AVIAN INFLUENZA H5N1 IN STRAY CATS IN BOGOR)

Sri Murtini<sup>1\*)</sup>, R.Susanti<sup>2)</sup>, Ekowati Handharyani<sup>3)</sup>

### ABSTRACT

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus is a known pathogen in birds. Recently, the virus has been reported to cause sporadic fatal disease in tigers, leopards, and other exotic felids as well as domestic cats in Thailand. The present study was carried out to investigate the presence of AI H5N1 virus infection in stray cats roaming around residential, traditional and chicken farms in Bogor, West Java. Ninety serum samples were tested using HI test to screened for the presence of antibody to AI H5N1. Virus isolation was done in SPF embryonated chicken eggs and identify using HI, AGP and RT-PCR. The results showed that 18,9% of stray cats developed antibodies against H5 with geometric mean titre  $2^{3,1}$ . Stray cats lived in traditional markets 18–40% developed antibodies in the titre ranging from  $2^{2,8}$  to  $2^{4,5}$ . Only two out of nine stray cats which lived in chicken farm developed low antibody titres again H5 ( $2^1$ ). None of the stray cats lived in residential area have developed antibodies against H5. This study revealed that stray cats have been contact with AI H5. Avian influenza H5 viruses were isolated in eight out of 33 pooled of rectal swab samples. The viral cleavage site sequences are CCTCAAAGAGAGAGC AGAAGAAAGAAGAGAGGT which represent amino acid sequences of PQRESRRKRG. Based on the cleavage site sequence, the isolates are similar with the AI H5 virus subtype isolated from human in Indonesia during 2005–2007.

**Keywords :** cat, avian influenza, HPAI.

### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui status serologis dan keberadaan virus AI pada kucing jalanan di kota Bogor. Sebanyak 90 contoh serum dan usap rektal diambil dari kucing jalanan yang berkeliaran di sekitar pasar tradisional, lingkungan pemukiman, serta peternakan ayam di daerah Bogor. Uji penghambatan aglutinasi (HI) dilakukan untuk mendeteksi adanya antibodi anti H5N1. Keberadaan virus diperiksa dari contoh usap rektaldan dilakukan isolasi virusnya. virus diisolasi pada telur ayam berembrio bebas patogen tertentu (SPF) dan diidentifikasi dengan uji HI dan AGPT serta RT-PCR. Seroprevalensi virus AI H5N1 pada kucing di Bogor sebesar 18,9% dengan rata-rata titer antibodi  $\log 2^{3,1}$  yang menunjukkan adanya paparan virus AI pada kucing. Tingkat keterpaparan kucing asal pasar tradisional berkisar antara 18–40% dengan rata-rata titer antibodi antara  $\log 2^{2,8}$ – $2^{4,5}$ , rata-rata tertinggi terjadi pada serum asal kucing di Pasar Gunung Batu dan terendah di Pasar Baru Bogor. Tingkat keterpaparan kucing yang hidup di sekitar peternakan yang diperiksa 22,2% dengan rata-rata titer antibodi  $\log 2^1$ . Tidak ditemukan adanya antibodi anti AI H5N1 pada serum kucing jalanan di wilayah pemukiman. Hasil isolasi virus a ditemukan delapan isolat virus AI H5N1. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa isolat-isolat virus asal kucing ini secara molekuler memiliki *cleavage site* dengan urutan CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAGAAGAGAGGT dengan urutan asam aminonya PQRESRRKRG. Berdasarkan sekuen gen dan asam amino daerah cleavage sitenya isolat-isolat asal kucing liar/jalanan di Bogor ini termasuk dalam golongan virus HPAI dan mempunyai struktur yang sama dengan isolat asal manusia di Indonesia tahun 2005–2007.

**Kata kunci:** Avian influenza, kucing, HPAI.

<sup>1)</sup> Dep. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

<sup>2)</sup> Jurusan Biologi, F-MIPA Universitas Negeri Semarang

<sup>3)</sup> Dep. Klinik Reproduksi Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

\* Penulis korespondensi: Telp./Fax (0251) 629466

### PENDAHULUAN

Penyakit flu pada manusia dan hewan disebabkan oleh virus dalam famili *Orthomyxoviridae*, memiliki amplop (*envelope*), bersegmen dan memiliki *negative-single strand* RNA. Virus influenza terdiri dari 3 tipe, yaitu tipe A, B, dan C. Virus influenza tipe

A dapat menginfeksi bermacam jenis hewan mamalia darat, mamalia laut, serta jenis unggas; dan termasuk manusia. Penelitian terhadap infeksi virus influenza A pada kucing pertama kali dilakukan pada tahun 1970an. Pada waktu itu diamati terjadinya infeksi virus influenza A subtype H3N2 dari manusia pada kucing peliharaan. Infeksi virus influenza A subtype H7N3 dari kalkun maupun H7N7 dari singa laut pada kucing menyebabkan peningkatan suhu tubuh (demam), namun tidak menunjukkan gejala klinis yang berat. Sejak terjadinya wabah infeksi virus avian influenza H5N1 pada unggas di Asia pada tahun 2003, dilaporkan bahwa kucing dan hewan kelompok felidae lain dapat pula terinfeksi oleh virus ini. Di beberapa negara (Austria, Thailand, dan Belanda) diketahui bahwa kucing dapat tertular oleh virus avian influenza dan terinfeksi oleh virus flu burung ini. Berdasarkan catatan European Centre for Prevention and Control di Stockholm, beberapa jenis hewan dapat terinfeksi oleh virus influenza tipe A. Salah satu hewan yang dapat terinfeksi adalah kucing. Pada bulan Desember 2003, ketika terjadi wabah flu burung di Thailand, beberapa jenis kucing besar seperti harimau dan leopard di kebun binatang Thailand mengalami kematian akibat infeksi virus H5N1 (FAO 2006). Pemberian pakan berupa ayam yang terinfeksi oleh H5N1 pada kucing terbukti menyebabkan kucing tertular virus H5N1 (Thiry *et al.*, 2007).

Tiensen *et al.*, (2005) melaporkan bahwa sejak terjadinya wabah AI H5N1 pada unggas di Thailand Januari 2004, mulai ditemukan adanya infeksi virus tersebut pada manusia dan hewan lain termasuk kucing. Penelitian Rimmelzwaan *et al.*, (2004) menunjukkan bahwa kucing peliharaan dapat terinfeksi virus AI H5N1 dan menunjukkan adanya gejala klinis serta menularkan virus tersebut pada kucing lain yang dipelihara dalam tempat yang sama. Potensi penularan antarkucing tampak terjadi pada penelitian tersebut.

Pada bulan Oktober 2004 kebun binatang Thailand kembali melaporkan adanya wabah AI H5N1 pada harimau, dimana 147 ekor harimau dari seluruh populasi 441 ekor mati karena adanya infeksi virus H5N1. Infeksi tersebut kembali terjadi setelah hewan diberi pakan karkas ayam (FAO 2006). Songserm *et al.*, (2006) melaporkan bahwa kucing peliharaan yang memakan burung merpati yang terinfeksi virus AI H5N1 terbukti terinfeksi virus AI H5N1 juga. Berdasarkan isolasi virus yang dilakukan pada kucing maupun merpati menunjukkan bahwa virus kedua hewan tersebut merupakan satu cluster virus yang sama. Gambaran tersebut memungkinkan adanya

transmisi virus dari unggas ke kucing yang menyebabkan infeksi pada kucing.

Hasil Pemeriksaan terhadap empat ekor kucing yang berasal dari daerah tertular berat AI (Lampung) yang dilakukan di Bagian Mikrobiologi Medik, Fakultas Kedokteran Hewan IPB, seekor kucing terinfeksi virus AI H5. Hal ini dibuktikan dengan uji RT-PCR dari ulas trachea (tidak dipublikasi). Hal tersebut mendorong untuk melihat adanya virus AI pada kucing di daerah lain.

Kucing liar tanpa pemeliharaan yang jelas mencari makan dari sisa makanan manusia atau memakan bangkai hewan. Di pasar tradisional yang menjual unggas/ayam hidup dan ayam potong juga banyak terdapat kucing liar. Kucing-kucing liar tersebut dapat saja memakan bangkai dari ayam yang terinfeksi avian influenza, sehingga sangat mungkin terjadi penularan virus dari ayam ke kucing liar. Hubungan manusia dengan kucing sejak zaman dahulu tidak dapat dipisahkan. Kucing diposisikan pada tempat yang "istimewa", khususnya di Indonesia. Masyarakat akan sulit menerima, jika dilakukan pemusnahan terhadap kucing, maka dari itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui status serologis dan keberadaan virus AI pada kucing. Dengan mengetahui keberadaan virus flu burung di kucing dapat diketahui pula peran kucing dan potensinya sebagai reservoir dan penular virus avian influenza (VAI) ke manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status serologis dan keberadaan virus avian influenza H5N1 pada kucing liar di wilayah Bogor dan karakter virus yang diisolasi dari kucing jalanan di Bogor.

## BAHAN DAN METODE

### Desain Penelitian

Pengambilan contoh darah dan usap rektal dari kucing jalanan dilakukan di daerah perumahan yang tidak berhubungan langsung dengan unggas, di daerah peternakan ayam dan di pasar tradisional di Kota Bogor yang mempunyai aktivitas perdagangan unggas potong maupun unggas hidup. Contoh darah diperiksa keberadaan antibodi anti H5N1 yang akan memberikan gambaran seroprevalensi *avian influenza* (AI) H5N1 pada kucing di Bogor. Contoh usap rektal dari kucing jalanan diambil untuk dilakukan isolasi virus AI yang disekresikan melalui saluran cerna.

Contoh diambil dari wilayah perumahan penduduk di Kelurahan Bantarjati Kota Bogor dan Kelurahan Babakan Kecamatan Darmaga Kabupaten Bogor, pasar tradisional di Kota Bogor, yaitu Pasar

Gunung Batu, Pasar Kebon Jahe Merdeka, Pasar Baru Bogor, Pasar Warung Jambu dan kucing jalanan yang ada disekitar peternakan ayam di Kabupaten Bogor.

### Pengambilan Darah untuk Uji Serologis

Darah diambil dari vena femoralis kaki kucing menggunakan spuit 1ml. Darah yang telah diambil disimpan dalam lemari pendingin semalam untuk mendapatkan serumnya. Serum yang telah diperoleh diinaktivasi terlebih dahulu dengan pemanasan pada pemanas air 56°C selama 30 menit dan didiamkan beberapa saat sebelum digunakan. Serum yang telah diinaktivasi diberi perlakuan haemabsorbtion dengan 100% sel darah ayam. Serum yang telah diberi perlakuan tersebut selanjutnya diuji keberadaan antibodinya terhadap AI H5N1. Keberadaan antibodi anti-H5N1 pada serum kucing dievaluasi menggunakan uji penghambatan aglutinasi menurut OIE (2005) menggunakan virus standar dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.

### Pengambilan Contoh Usap Rektal/Anus

Ujung *cotton bud* diusapkan pada anus kucing, kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf 1,5ml yang telah diisi medium transport. Medium transport terdiri atas PBS dan gliserol steril (1:1) dan ditambah sterptomisin 200mg.l<sup>-1</sup> dan penisiline G 2×10<sup>6</sup> U.l<sup>-1</sup>. Contoh usap rektal selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan ekstraksi RNA virus.

### Pengolahan Contoh Usap Rektal

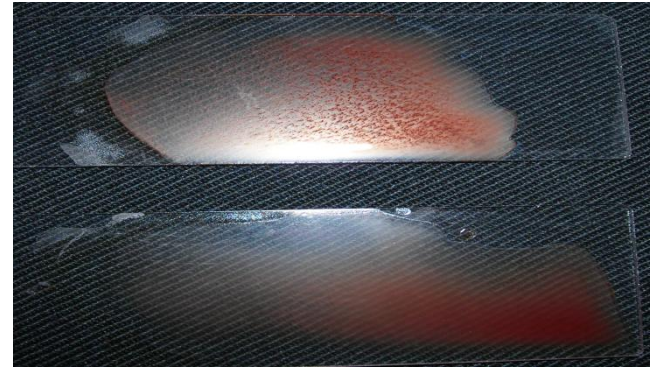
Usap rektal kucing yang diperoleh dari setiap lokasi selanjutnya diolah untuk dilakukan isolasi virus, dengan cara sebagai berikut: (1) usap rektal yang telah berada didalam media transport dihomogenkan dengan larutan bufer (PBS/Hank's) sehingga larutan menjadi 20%, (2) kemudian tambahkan antibiotik penstrep dengan dosis 1.000 IU pencilin dan 1.000µg streptomycin tiap milliliter suspensi virus, (3) suspensi tersebut siap diinokulasikan.

### Isolasi Virus

Usap rektal kucing yang diambil dari setiap lokasi diisolasi dengan menumbuhkan virus pada telur ayam berembrio bebas patogen tertentu (*specific pathogen free*, SPF) mengacu pada OIE (2005). Telur SPF diperoleh dari PT Vaksindo Bogor.

### Identifikasi Isolat

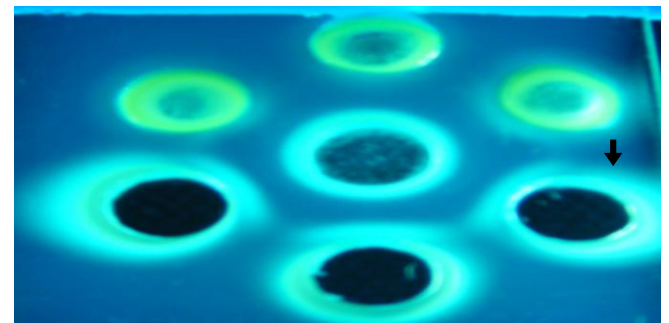
Usap rektal yang telah ditumbuhkan pada telur ayam berembrio SPF diambil cairan alantois dan embriononya. Selanjutnya cairan alantois diidentifikasi dengan uji aglutinasi cepat untuk menentukan adanya pertumbuhan virus pada telur ayam berembrio tersebut (Gambar 1).



Ket. (a) : hasil uji positif; (b) : hasil uji negatif

Gambar 1. Hasil uji aglutinasi cepat

Isolat yang menunjukkan adanya aglutinasi (positif dengan uji aglutinasi cepat) selanjutnya dikarakterisasi secara konvensional metode OIE (2005) dan molekuler menggunakan metode Slomka (2007). Karakterisasi kon-vensional meliputi uji hemaglutinasi (*HA test*), uji haema-glutinasia inhibisi (*HI test*) metode alfa menggunakan antibodi standar anti-H5N1 yang diperoleh dari Bagian Mikrobiologi Medis, Departemen IPHK IPB dan uji agar gel presipitasi (AGPT) menggunakan antibodi standar yang sama pada uji HI.



Gambar 2. Hasil uji AGPT ( → ) : presipitasi Ag virus isolat kucing dengan Ab anti H5N1

Karakterisasi molekuler dari isolat yang diperoleh dilakukan dengan uji RT-PCR. Ekstraksi RNA virus avian influenza dilakukan dengan QIAamp kit (QIAGEN).

Virus AI H5N1 diidentifikasi dengan *multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dengan instruksi penggunaan dengan mesin GeneAmp PCR System 9.700 (Applied Biosystem). Amplifikasi gen H5 dari virus AI dilakukan dengan menggunakan urutan basa primer menurut Slomka (2007) :

*Forward* : J3 5' GAT AAA TTC TAG CAT GCC ATT CC3'  
*Reverse* : B2a 5' TTT TGT CAA TGA TTG AGT TGA CCT TAT TTG3'

Reaksi PCR dibuat sebanyak 25  $\mu$ l dengan komposisi: 12,5 $\mu$ l *AccesQuick RT-PCR System* (Promega), 5 U *RNase inhibitor*, 5 U AMV *Reverse transcriptase*, Primer M, H5 dan N1 masing-masing 0,5 $\mu$ M primer, 1,0mM MgCl<sub>2</sub> dan *RNase-free distilled water* sampai volume 25  $\mu$ l. Mesin PCR diprogram dengan kondisi 48°C selama 45 menit (*reverse transcription*), predenaturasi 95°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 0,5 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 0,5 menit, *extension* pada 72°C selama 0,5 menit. Siklus amplifikasi yang digunakan adalah 40 siklus dan final *extension* 72°C selama 10 menit. Besaran produk PCR diestimasi sepanjang 300bp (H5).

### Agarose Gel Elektroforesis

Hasil amplifikasi gen HA dari virus AI H5 divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5% (Difco). Gel dimasukkan bak elektroforesis (Bio-Rad) yang telah diisi larutan TAE (Sigma), sampai semua gel terendam. Contoh produk PCR sebanyak 6  $\mu$ l ditambah dengan 2  $\mu$ l *loading dye* (Amersham, Pharmacia), setelah dicampur kemudian dimasukkan dalam sumuran gel. *Running* dilakukan pada 100 volt selama 90 menit. Setelah direndam dalam etidium bromida (Sigma) selama 10 menit, hasilnya dilihat dengan luminator uv dan didokumentasikan dengan cara difoto.

### Analisis Sekuensing

Hasil amplifikasi dipurifikasi dengan menggunakan microprint™ S-400 HR Columns (Amersham, Pharmacia), kemudian dilakukan sekuensing. Analisis sekuensing di-lakukan oleh PT Promega Indonesia.

### Analisis Data

Analisisa filogenetik sekuen gen hemaglutinin (HA) dari masing-masing isolat menggunakan metode *neighbor-joining* dengan program MEGA 3.1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Gambaran Umum Lokasi Pengambilan Contoh

Kucing yang diambil contoh darah dan usap rektalnya hidup pada lingkungan yang berbeda. Tingkat kontak kucing-kucing tersebut dengan unggas berbeda-beda Kucing liar yang hidup dipasar-pasar tradisional yang memiliki aktivitas penjualan unggas hidup (Pasar Gunung Batu, Pasar Kebon Jahe, dan Pasar Baru Bogor) mengalami kontak dengan unggas hidup lebih besar dibanding kucing liar yang hidup di lingkungan pemukiman. Dibandingkan dengan kucing liar yang hidup di sekitar peternakan, kucing liar di ketiga pasar juga lebih banyak berkontak dengan unggas hidup, karena kucing liar pada sekitar peternakan hanya mendekati kandang unggas bila sedang mencari mangsa untuk dimakan. Sebaliknya, kucing liar di pasar tradisional setiap waktu berada di pasar dan tinggal di areal penjualan unggas.

Kontak antara kucing dengan unggas hidup mem-pengaruhi kemungkinan keterpaparan virus, karena sangat mungkin unggas yang diperdagangkan merupakan unggas pembawa virus (*carrier*) yang menyebarkan virus ke lingkungan. Menurut Shorthigade (1999), pasar unggas merupakan pusat penularan virus antarspesies, karena bila ada unggas/ayam yang terinfeksi virus AI tetapi tidak menunjukkan gejala klinis maka dianggap sehat oleh masyarakat dan dijual di pasar. Selama masa penjualan, unggas subklinis tersebut menyebarkan virus ke lingkungan /hewan lain di sekitarnya yang menyebabkan hewan lain akan terpapar.

### Seroprevalensi Antibodi anti-H5N1 pada Kucing

Gambaran umum kondisi lingkungan tempat kucing diambil contohnya dan keberadaan unggas tercermin juga dari hasil pemeriksaan keberadaan antibodi anti AI H5N1 (Tabel 1). Dari total 90 contoh serum kucing yang terkumpul dalam penelitian ini, antibodi anti AI H5N1 ditemukan pada 17 ekor (18,9%) dengan rata-rata titer anti-bodi contoh yang positif sebesar log 2<sup>3,1</sup>

Uji serologis ini juga memperlihatkan bahwa kucing liar di pasar tradisional maupun kucing liar sekitar peternakan ayam pernah terpapar oleh virus AI H5N1. Pada 27 contoh serum kucing yang berasal dari kedua wilayah pemukiman yang diperiksa tidak ditemukan adanya antibodi anti AI H5N1. Tingkat keterpaparan kucing yang berasal dari keempat pasar tradisional berkisar antara 18–40% dengan tingkat

keterpaparan tertinggi dan terendah masing-masing adalah kucing yang ada di Pasar Kebon Jahe dan Pasar Warung Jambu. Rataan titer antibodi contoh positif dikeempat pasar berkisar  $\log 2^{2,8} - 2^{4,5}$ , dengan rata-rata tertinggi pada serum dari kucing di Pasar Gunung Batu dan terendah di Pasar Baru Bogor. Tingkat keterpaparan kucing yang hidup di sekitar peternakan yang diperiksa 22,2% dengan rata-rata titer antibodi  $\log 2^1$

Tabel 1. Hasil pemeriksaan keberadaan antibodi anti H5N1 dengan uji penghambatan aglutinasi (HI test) pada serum kucing dari berbagai lokasi

Asal contoh	Jumlah contoh	Hasil pemeriksaan Ab. H5N1		Rataan titer Ab. Positif (log 2)
		Positif	Negatif	
Pasar Gunung Batu	8	2 (25%)	6 (75%)	4,50
Pasar Kebon Jahe	15	6 (40%)	9 (60%)	3,67
Pasar Baru Bogor	20	5 (25%)	15 (75%)	2,8
Pasar Warung Jambu	11	2 (18%)	9 (82%)	3
Kelurahan Bantarjati	8	0 (0%)	8 (100%)	0
Kelurahan Babakan	19	0 (0%)	19 (100%)	0
Sekitar Peternakan ayam	9	2 (22,2%)	7 (77,8%)	1
Jumlah total	90	17 (18,9%)	73 (81,1%)	3,1

Kondisi tersebut sejalan dengan tingkat kontak kucing dengan unggas hidup. Pasar Kebon Jahe merupakan pasar tradisional yang memperdagangkan berbagai jenis unggas (itik, entok, burung kicauan, merpati dan ayam) dalam satu tempat dan unggas tersebut berada di pasar dalam waktu yang cukup lama, karena bila tidak laku dijual unggas tetap dipelihara dalam kandang penampungan di pasar. Keadaan tersebut memungkinkan virus AI H5N1 berbiak dan beredar di lingkungan pasar sehingga memapar kucing yang tinggal di pasar tersebut. Kucing yang hidup di daerah pemukiman sangat sedikit berkontak dengan unggas. Pada kucing yang tinggal di pemukiman Bantarjati meskipun di daerah tersebut ada penduduk yang memelihara ayam dan burung kicauan. Kucing tidak mendekati kandang mereka, umum-nya kucing berkeliaran ke dapur ataupun tempat pembuangan sampah. Dengan demikian tingkat keterpaparan kucing daerah tersebut dengan unggas terinfeksi sangat kecil. Kucing yang hidup di daerah pemukiman kelurahan Babakan umumnya mendapat makanan dari sisa makanan arung makan yang banyak di daerah

tersebut. Sisa makanan merupakan pakan yang telah dimasak, kucing dapat tertular oleh virus dari karkas unggas yang terinfeksi virus AI, sehingga kemungkinan penularan pada kucing-kucing tersebut juga rendah. Latar belakang kondisi kehidupan kucing-kucing tersebut yang menyebabkan perbedaan keterpaparan virus AI sehingga seroprevalensi dari masing-masing tempat berbeda-beda.

Tabel 2. Hasil isolasi virus dari contoh usap *rectal* kucing yang berasal dari sampling

Asal contoh	Kode Contoh	Pooling / Individual	Kode isolat	Hasil Uji Aglutinasi cepat
Pasar Gunung Batu	Gb1, Gb2, Gb3, Gb4, Gb6, Gb8	Pooling	A	Negatif
	Gb5	Individual	B	Negatif
	Gb7	Individual	C	Negatif
Pasar Kebon Jahe	M1	Individual	D	Positif
	M2	Individual	E	Negatif
	M3, M5, M7, M8	Pooling	F	Positif
	M9, M10, M12, M14, M15	Pooling	G	Negatif
	M4	Individual	H	Positif
Pasar Warung Jambu	J1, J2, J3, J4	Pooling	L	Negatif
	J5, J8, J10, J11	Pooling	M	Negatif
	J6	Individual	N	Negatif
Pasar Bogor	J7	Individual	O	Positif
	B1, B2, B3, B4	Individual	P	Negatif
	B5, B7, B8, B9	Individual	Q	Negatif
	B6	Individual	R	Positif
	B10	Individual	S	Negatif
	B11, B12, B13, B14	Pooling	T	Positif
	B15, B17, B20	Pooling	U	Negatif
	B16	Individual	V	Negatif
	B18	Individual	W	Positif
B19	Individual	X	Negatif	
Kelurahan Bantarjati	I1, I2, I3, I4	Pooling	Y	Positif
	I5, I6, I7, I8	Pooling	Z	Negatif
Kelurahan Babakan	Br1, Br2	Pooling	Bk1	Negatif
	Br3, Br4	Pooling	Bk2	Negatif
	Br5, Br6, Br7	Pooling	Bk3	Negatif
	Br8, Br9, Br10	Pooling	Bk4	Negatif
	Br11, Br12, Br13	Pooling	Bk5	Negatif
	Br14, Br15, Br16	Pooling	Bk6	Negatif
	Br17, Br18, Br19	Pooling	Bk7	Negatif
Sekitar peternakan ayam	Pt1, Pt2, Pt3	Pooling	P1	Positif
	Pt4, Pt5	Pooling	P2	Negatif
	Pt6, Pt7	Pooling	P3	Negatif
	Pt8, Pt9	Pooling	P4	Positif

Berdasarkan hasil isolasi virus dari usap rektal sebanyak 33 contoh baik contoh *pooling* maupun individual diperoleh delapan isolat yang tumbuh (Tabel 2). Kedelapan isolat tersebut mampu mengaglutinasi sel darah merah unggas. Selain virus influenza ada beberapa jenis virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah misalnya distemper dan parvovirus

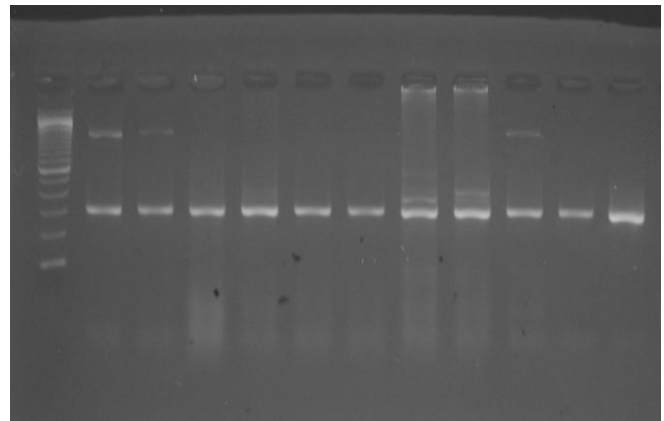
Secara konvensional dilakukan identifikasi dengan uji Haemaglutinasi, uji penghambatan agglutinasi dan agar gel presipitasi menggunakan serum standar H5N1. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa kedelapan isolat tersebut memiliki identitas sebagai virus AI subtipe H5N1 (Tabel 3). Dari delapan isolat tiga isolat berasal dari kucing yang diambil dari pasar Baru Bogor, tiga isolat dari pasar Kebon Jahe, satu isolat dari Pasar Warung Jambu, dan satu isolat dari kucing yang hidup di sekitar peternakan ayam komersial.

Tabel 3. Hasil karakterisasi konvensional isolat yang diperoleh dari berbagai contoh kucing

Asal isolat	Kode isolat	Hasil karakterisasi dengan uji			
		Uji aglutinasi cepat	Titer virus dgn Uji Hemaglutinasi (log 2)	Uji agar gel presipitasi	Uji penghambatan aglutinasi dengan antibodi anti H5N1 metode alpha
Pasar Baru Bogor	W	Positif	4	Positif	Positif
Pasar Kebon Jahe	D	Positif	5	Positif	Positif
Pasar Baru Bogor	T	Positif	4	Positif	Positif
Pasar Kebon Jahe Sekitar	F	Positif	3	Positif	Positif
Peternakan ayam	P4	Positif	5	Positif	Positif
Pasar Warung Jambu	O	Positif	5	Positif	Positif
Pasar Baru Bogor	R	Positif	4	Positif	Positif
Pasar Kebon Jahe	H	Positif	5	Positif	Positif

Hasil identifikasi menggunakan primer J3 dan B2a menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh merupakan isolat virus avian influenza subtipe H5 yang ditandai dengan munculnya pita hasil amplifikasi dengan ukuran 320 bp (Gambar 3). Isolat yang menunjukkan hasil positif merupakan virus AI H5 selanjutnya dilakukan sekuensing untuk mengetahui urutan basa pada daerah *cleavage sitenya*. Urutan basa daerah *cleavage sitenya* dari gen HA sangat penting untuk membedakan apakah virus termasuk golongan virus dengan patogenitas tinggi (HPAI) atau patogenitas rendah (LPAI). Sebagai kontrol digunakan virus isolat BBVet Yogyakarta yang merupakan isolat virus AI H5N1 asal ayam yang diisolasi di Bantul tahun 2005 (Tabel 4 dan 5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Keterangan : (1) Marker (2) Isolasi W (3) Isolasi D (4) Isolasi T (5) Isolasi T2 (isolasi T yang dipasase ke 2) (6) Isolasi F (7) Isolasi F2 (isolasi F yang dipasase ke 2) (8) Isolasi P4<sub>1</sub> (isolasi P4 yang dipasase ke 2) (9) Isolasi P41 (10) Isolasi O (11) Isolasi R (12) Isolasi H

Gambar 3 Hasil uji PCR dari masing-masing isolat menggunakan primer J3 dan B2a

Hasil sekuensing dari daerah *cleavage site* menunjukkan bahwa isolat virus AI H5 yang diperoleh merupakan isolat yang berasal dari virus dengan patogenitas tinggi (*Highly Pathogenic Avian Influenza*). Bila dibandingkan dengan isolat virus AI asal ayam tahun 2005 sekuen asam amino dari virus asal kucing yang ditemukan sedikit berbeda. Pada daerah *cleavage site* virus AI isolat tahun 2005 terdapat tiga arginin (R) terangkai, virus isolat asal kucing ini salah satu asam amino argininnya digantikan dengan serin (S) (Tabel 5).

Berdasarkan analisa filogeni isolat asal kucing ini mempunyai kesamaan urutan asam aminonya di daerah *cleavage site* dengan virus-virus AI isolat asal manusia di Indonesia tahun 2005 sampai 2007. Isolat virus asal kucing ini termasuk didalam kelompok virus Avian Influenza golongan HPAI subtipe H5N1 *clade 2 subclade 1*. Menurut Nidom (2008) berdasarkan analisis terhadap virus AI subtipe H5N1 yang beredar di Indonesia dari tahun 2003 sampai 2007 berdasarkan filoanalisis fragmen Hema-glutininnnya terdapat tiga *clade*, yaitu *clade 2.1.1*; *2.1.2* dan *2.1.3*. isolat asal kucing ini termasuk dalam *clade 2.1.1*.

Tabel 4. Urutan gen pada daerah pemecahan (*cleavage site*) HA dari masing-masing isolat

Kode Isolat	Urutan basa
Isolat BANTUL "Influenza A virus (A/chicken/Bantul/BBVet-I/2005(H5N1) sebagian gen hemagglutinin (HA)	<b>CCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAA AAAAGAGAGGA</b>
Isolat W	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat D	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat T	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat T2	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat F	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAACAGAGGT</b>
Isolat F2	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat P4	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat O	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat R	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AGAAGAGAGGT</b>
Isolat H	<b>CCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAA AAAAGAGAGGA</b>

Tabel 5. Urutan asam amino pada daerah pemecahan (*cleavage site*) HA dari masing-masing isolat

Kode Isolat	Urutan asam amino
Isolat BANTUL "Influenza A virus (A/chicken/Bantul/ BBVet-I/2005(H5N1)	PQRERRRKKRG
Isolat W	PQRESRRKKRG
Isolat D	PQRESRRKKRG
Isolat T	PQRESRRKKRG
Isolat T2	PQRESRRKKRG
Isolat F	PQRESRRKN RG
Isolat F2	PQRESRRKKRG
Isolat P4	PQRESRRKKRG
Isolat O	PQRESRRKKRG
Isolat R	PQRESRRKKRG
Isolat H	PQRESRRKKRG

Temuan ini menunjukkan bahwa secara filogeni virus isolat dari kucing sama dengan virus asal isolat manusia. Penularan dari kucing ke kucing sampai saat ini belum ditemukan demikian juga penularan dari kucing ke manusia belum pernah dilaporkan. Namun temuan ini menunjukkan perlunya kewaspadaan kemungkinannya kucing sebagai sumber penularan. Kewaspadaan lainnya yang perlu ditingkatkan adalah penyebaran virus ini ke hewan mamalia lain di lingkungan pasar tradisional yang menjual unggas dan produk unggas. Beberapa penelitian menunjukkan pasar merupakan tempat

beredarnya virus dari berbagai tempat asal hewan dan daerah yang sangat tinggi cemaran virusnya. Menurut Shorthigade (1999), pasar unggas merupakan pusat penularan transmisi/ penularan virus antar spesies, karena bila ada unggas/ayam yang terinfeksi virus AI tetapi tidak menunjukkan gejala klinis maka dianggap sehat oleh masyarakat dan dijual dipasar. Selama masa penjualan unggas subklinis tersebut menyebarkan virus kelingkuhan/ hewan lain disekitarnya yang menyebabkan hewan lain akan terpapar.

Kucing terinfeksi dapat dikarenakan memakan karkas, limbah karkas ayam maupun bangkai ayam yang terinfeksi virus AI. Hal ini terbukti pada kasus di kebun binatang Sriracha, Chonburi Thailand. Di tempat tersebut yang kemungkinan terinfeksi HPAI H5N1. Diduga penularan virus AI H5N1 secara horisontal juga terjadi di kebun binatang tersebut sebab setelah 12 hari pemberian pakan karkas ayam mentah dihentikan infeksi virus AI diantara harimau di tempat tersebut masih berlangsung (Poovorawan 2007). Pencegahan penularan virus ke hewan non unggas lain maupun manusia dari unggas yang ada dipasar penting dilakukan. Menurut Poovorawan (2007) di propinsi Suphanburi, Thailand dilaporkan adanya infeksi fatal pada anjing yang memakan itik yang terinfeksi virus AI H5N1, bahkan virus dapat diisolasi dari spesimen organ (paru-paru, hati, ginjal) dan urin.

Kasus pada hewan lain sampai saat ini di Indonesia belum pernah dilaporkan. Namun laporan pada hewan lain selain unggas di Thailand menunjukkan kemungkinannya penularan yang sama terjadi di Indonesia sehingga perlu dilakukan tindakan pencegahan. Pencegahan dapat dilakukan tindakan membersihkan pasar.

## KESIMPULAN

Kucing liar yang hidup di pasar tradisional maupun sekitar peternakan ayam di Bogor pernah terpapar oleh virus AI H5N1. Tidak ditemukan adanya kucing liar di wilayah pemukiman yang terpapar virus AI H5N1.

Tingkat keterpaparan kucing yang berasal dari keempat pasar tradisional berkisar antara 18–40% dengan tingkat keterpaparan tertinggi dan terendah masing-masing adalah kucing yang ada di Pasar Kebon Jahe dan Pasar Warung Jambu.

Seroprevalensi virus AI H5N1 pada kucing di Bogor sebesar 18,9% dengan rata-rata titer antibodi contoh yang positif sebesar log 2<sup>3,1</sup>.

Berdasarkan hasil isolasi virus dari contoh usap kloaka ditemukan delapan isolat dengan identifikasi konvensional maupun molekuler menunjukkan sebagai virus AI H5N1.

Isolat-isolat virus asal kucing ini secara molekuler memiliki *cleavage sit* dengan urutan asam amino PQRESRRKKRG.

Berdasarkan sekuen gen dan asam amino daerah cleavage sitnya isolat-isolat asal kucing liar/jalanan di Bogor ini termasuk dalam golongan virus HPAI dan mempunyai struktur yang sama dengan isolat asal manusia di Indonesia tahun 2005–2007.

### DAFTAR PUSTAKA

- [FAO] Food Agricultural Organization. 2006. *Animal Health Special Report ; H5N1 in Cats*. [http://www.fao.org/subjects/en/health/disease-s-cards/avian\\_cats.html](http://www.fao.org/subjects/en/health/disease-s-cards/avian_cats.html)
- Nidom, C.A. 2008. *Perkembangan Virus Flu Burung di Indonesia*, Workshop Sehari Penelitian Avian Influenza di Indonesia, LIP! Jakarta 4 September 2008
- [OIE]. 2005. *Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines*. <http://www.oie.int/html>.
- Poorawan, Y. 2007. Molecular Epidemiology of Avian Influenza H5N1 in Thailand. *ScienceAsia* 33 Supplement 1 (2007): 87–90
- Rimmelzwan, G.F. *et al.*, 2006. *Influenza A Virus (H5N1) Infection in Cats Causes Systemic Disease with Potential Novel Routes of Virus Spread Within and Between Hosts*. *Am. J. Pathol.* 168: 176–183.
- Shortridge, K.F. *et al.*, 1999. Interspecies Transmission of Influenza Viruses: a Hong Kong Perspective. Symposium On Animal Influenza Viruses, Gent. Belgium 16<sup>th</sup>–18<sup>th</sup> May 1999.
- Slomka, M.J. *et al.*, 2007. *Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized In The European Union*. *Avian Dis.* 51: 227–234
- Thiry, E. *et al.*, 2007. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus in Cats and Other Carnivores. *Vet Microbiol.* 122 :25–31.
- Tienson, T, *et al.*, 2005. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1, Thailand, 2004 Emerging Infectious Diseases • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) •11 : 1664–1672.