

Deteksi Virus Avian Influenza (H5N1) Pada Unggas Air Dengan Uji Haemagglutination Inhibition (HI) Dan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Di Propinsi Lampung

Detection of avian influenza virus by using Haemagglutination Inhibition (HI) and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Lampung Province.

D.D. Putri¹⁾, E. Handharyani²⁾ dan R.D. Soejoedono³⁾

Politeknik Negeri Lampung, Bandar Lampung¹⁾;
Bagian Patologi²⁾, Bagian Mikrobiologi³⁾, Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor

ABSTRACT

The objective of this research is to examine the presence of antibody of avian influenza (AI) H5 and detection of genetic material the subtype of AI virus (H5N1) in water fowls in Lampung Province. Samples consisted of 673 serum and 673 cloacal swabs, and collected from water fowls. Epidemiologically, samples collection were performed by using multistage sampling method. Examination of AI antibodies by Haemagglutination Inhibition test (HI test) demonstrated that H5 antibodies were found at all district in Lampung Province. High frequency of antibodies were noted at district of Tulang Bawang (69.41%). The average of antibody titres of AI were low (under 2⁴) and the lowest antibody titre was found at district of Tulang Bawang (2^{0.92}). Evaluation of genetic material H5N1 individually by using Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was not found among water fowls. The results showed H5 and unknown N subtype (H5Nx); the second subtype was unknown H and N1 (HxN1).

Key words : Avian Influenza, Haemagglutination Inhibition (HI), Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

PENDAHULUAN

Wabah Avian Influenza/AI di Asia mulai merebak sekitar tahun 90-an di Hongkong, dan selanjutnya virus ini telah menyebar ke beberapa negara yaitu Thailand, Malaysia, China, Korea, Kamboja, Jepang, Vietnam, dan termasuk Indonesia (OIE 2005) Infeksi oleh virus AI dapat menyebabkan gejala yang sangat bervariasi pada unggas, mulai dari gejala yang ringan hingga ke penularan yang sangat tinggi dan cepat menjadi penyakit yang fatal (Murphy *et al.*, 1999; Swayne dan Suarez 2000).

Avian Influenza atau "Fowl Plaque" disebabkan oleh virus influenza tipe A dengan diameter 90 sampai 120 nm (Murphy *et al.*, 1999). Semua virus Influenza mempunyai komponen internal (PB1, PB2, PA, NP, M1 dan NS) yang serupa, tetapi komponen amplopnya sangat bervariasi (Whittaker 2005). Virus H5N1 pertama kali di deteksi pada unggas air di Hongkong pada November 2002, yang menyebabkan kematian pada angsa (Sturm-

Ramirez, 2004). Namun HPAI H5N1 juga dapat diisolasi dari itik yang sehat di Cina dari tahun 1999 sampai 2002 (Chen *et al.*, 2004).

Penelitian menunjukkan bahwa 15% itik dan 2% angsa merupakan reservoir virus AI, selain unggas air, burung liar juga dilaporkan sebagai reservoir virus AI (Khawaja *et al.* 2005).

Itik dianggap sebagai sumber virus H5N1 pada outbreak di Cina tahun 2000-2004 (LI *et al.* 2004). Outbreak H5N1 di Hongkong tahun 2001 juga berasal dari reservoir itik dan angsa yang mengalami reassortment dengan virus AI lainnya sehingga muncul virus yang bersifat patogen pada unggas darat (Sturm-Ramirez, 2004). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keberadaan antibodi terhadap virus Avian Influenza (H5) pada unggas air di Propinsi Lampung dengan uji serologis. Selanjutnya mendeteksi dan menentukan sub tipe virus AI (H5N1) pada unggas air di Propinsi Lampung dengan metode RT-PCR

*) Korespondensi : Dwi Desmiyeni Putri, Politeknik Negeri Lampung, Bandar Lampung.

MATERI DAN METODE

Sampel

Sampel serum darah dan usap kloaka (*cloacal swab*) diperoleh dari unggas air (itik, entok, dan angsa) pada peternakan tradisional yang tidak divaksinasi di 6 kabupaten dan 2 kota di Propinsi Lampung meliputi Kabupaten Lampung Timur, Lampung Utara, Lampung Selatan, Lampung Tengah, Tulang Bawang, Tanggamus, Kota Bandar Lampung dan Metro. Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah *Multistage sampling*. Penentuan lokasi pengambilan sampel dilakukan berdasarkan daerah di Propinsi Lampung yang sudah dinyatakan tertular AI. Media Transport yang digunakan adalah PBS gliserol (WHO

2003). Selanjutnya materi lapang dibawa ke Laboratorium

Terpadu, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat (IPHK), Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor untuk dievaluasi.

Sampel serum dan usap kloaka yang digunakan pada penelitian ini masing-masing berjumlah 673 yang terdiri dari 352 sampel itik, 267 sampel entok dan 54 sampel angsa. Sampel unggas air diperoleh dari 8 daerah tertular AI di Propinsi Lampung dengan distribusi jumlah sampel pada tiap-tiap daerah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi jumlah sampel pada tiap kabupaten/kota di Propinsi Lampung.

No	Kabupaten	Jumlah Ternak (ekor)			Jumlah (ekor)
		Itik	Entok	Angsa	
1	Kabupaten Tulang Bawang	140	29	1	170
2	Kabupaten Lampung Selatan	34	22	27	83
3	Kabupaten Lampung Timur	96	76	7	179
4	Kabupaten Lampung Utara	11	59	6	76
5	Kabupaten Lampung Tengah	12	53	4	69
6	Kabupaten Tanggamus	45	21	5	71
7	Kota Metro	4	3	-	7
8	Kota Bandar Lampung	10	4	4	18
	Jumlah (ekor)				673

Uji Serologis

Uji serologis yang digunakan adalah uji HI (*Haemagglutination Inhibition*) cepat dan uji mikrotiter HI (*Haemagglutination Inhibition*) sesuai dengan prosedur standar yang berlaku. Sumur 1 – 12 dari *microplate U bottom* diisi dengan suspensi virus standar H5N1 (4 HAU) masing-masing 25 µl dengan mikropipet kapasitas 10-100 µl. Serum yang telah diencerkan dengan PBS (perbandingan yang digunakan adalah 10µl : 80µl) diambil sebanyak 25 µl dan masukkan ke dalam sumur yang telah ditandai dengan nomor sampel uji. Selanjutnya dilakukan pencampuran serum dengan suspensi virus dengan cara mengambil dan mengeluarkan cairan tersebut dengan mikropipet (paling sedikit 5 kali). Campuran itu dikocok dengan menggoyang-goyangkannya *microplate* dan kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit, dan kemudian ditambahkan 25 µl suspensi sel darah merah ayam 0.5 % ke dalam seluruh sumur. Tahap terakhir dilakukan pengocokan *microplate* dengan menggoyang-goyangkannya, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama kurang lebih 30 menit. Pembacaan

hasil uji dapat dilakukan apabila eritrosit pada tabung kontrol telah mengendap ke dasar sumur. Sampel dinyatakan positif apabila sel darah merah pada sumur sampel mengendap.

Ekstraksi RNA virus

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan Qiagen RNAeasy TM Total RNA Isolation Kit (Qiagen, Jerman) dengan menggunakan metode sesuai instruksi pembuatan. Sebanyak 140 µl sampel dicampur dengan 560 µl buffer AVL (yang mengandung *carrier RNA*) ke dalam *microtube* 1,5 ml dan dicampur hingga homogen sebelum diinkubasi selama 10 menit dalam temperatur ruang. Setelah itu larutan disentrifus dengan kecepatan 6 000 g selama 1 menit dan kemudian ditambahkan etanol (96 – 100%) sebanyak 560 µl dan kemudian dicampurkan hingga homogen lalu kembali disentrifugasi dengan kecepatan 6 000 g selama 1 menit. Sebanyak 630 µl sampel + buffer + etanol dimasukkan ke QIAamp spin kolom (pada tabung koleksi 2 ml), kemudian sentrifus dengan kecepatan 6 000 g selama 1 menit. Sisa campuran sampel, buffer dan etanol pada *microtube* kembali dimasukkan ke QIAamp spin kolom (pada

tabung koleksi 2 ml), kemudian sentrifus dengan kecepatan 6 000 g selama 1 menit. Selanjutnya pada QIAamp spin kolom ditambahkan buffer AW1 sebanyak 500 µl, dan kemudian disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 6 000 g. Setelah QIAamp spin kolom dipindahkan ke tabung koleksi ditambahkan 500 µl buffer AW2 dan disentrifus dengan kecepatan 20 000 g selama 3 menit. Setelah QIAamp spin kolom dipindahkan ke *microtube* 1.5 ml, ditambahkan 60 µl buffer AVE, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifus dengan kecepatan 6 000 g selama

1 menit. Selanjutnya sampel disimpan pada suhu -20 °C atau -70 °C sampai akan digunakan.

Amplifikasi Gen Virus dengan RT-PCR

Amplifikasi gen virus dilakukan dengan teknik *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* menggunakan GeneAmp PCR System 9700. Pada penelitian ini digunakan primer HAR, HA-1144F, dan H5-1735R (WHO 2003) serta primer CU-N1F dan CU-N1R (Payungporn *et al.* 2004) dengan urutan basa sbb :

HAR	: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT
HA-1144F	: GGA ATG ATA GAT GGN TGG TAY GG
H5-1735R	: GTG TTT TTA AYT MCA ATC TGR ACT MA
CU-N1F	: GTT TGA GTC TGT TGC TTG GTC
CU-N1R	: TGA TAG TGT CTG TTA TTA TGC C

RT-PCR dilakukan dengan SuperScript™ III One-Step RT-PCR System dengan Platinum *Taq* (Invitrogen). Reaksi RT-PCR dibuat sebanyak 50 µl dengan komposisi : 25 µl 2X *Reaction Mix*, pasangan primer masing-masing (10 µM) 1 µl, 2 µl Superscript III RT/Platinum *Taq* Mix, 3 µl sampel RNA, dan *distilled water RNase free* hingga volume 50 µl. Program RT-PCR yang digunakan adalah sebagai berikut 45 °C selama 60 menit (*reverse transcription*), 94 °C selama 5 menit (*predenaturasi*) dan kemudian 94 °C selama 30 detik (*denaturasi*), 54 °C selama 1 menit (*annealing*), 68 °C selama 1 menit (*ekstensi*). Siklus amplifikasi yang digunakan adalah 40 siklus dan selanjutnya 68 °C selama 5 menit (*ekstensi final*).

Analisis DNA Hasil RT-PCR pada Agarose Gel Elektroforesis 1.5 %

DNA hasil PCR yang diperoleh dianalisa dengan teknik elektroforesis menggunakan Agarose biologi molekuler (Biorad) 1.5%. Sebanyak 1.5 gram dilarutkan dalam 100 buffer TBE 1x dengan cara dididihkan. Kemudian agarose dicetak dan dibiarkan sampai membeku dan dimasukkan ke bak elektroforesis (Biorad) yang telah diisi larutan buffer TBE 1x. DNA target sebanyak 5 µl dicampur dengan 2 µl *loading dye* dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada agarose. Kemudian dilalukan dengan tegangan 100 volt selama 120 menit. Selanjutnya agarose diwarnai dalam larutan ethidium bromide (0.5 µl/ml) selama 15 menit. Kemudian diamati diatas UV *transluminator* (UV *luminescence*). Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita berwarna jingga pada agarose.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini jenis sampel diambil berupa serum dan usap kloaka berasal dari unggas air yang belum pernah mendapat vaksinasi AI dan dipelihara bersama dengan unggas lain misalnya ayam. Unggas air (*waterfowl*) adalah anggota dari ordo *Anseriformes* seperti, itik, entok dan angsa yang dapat hidup baik di air maupun di darat (Blood dan Studdert 1988). Unggas air merupakan reservoir semua subtipe virus Influenza A, tetapi infeksi pada spesies ini secara umum tidak menunjukkan gejala klinis, namun unggas air dapat menularkan virus ke ayam dan menyebabkan akibat yang fatal (Tumpey *et al.*, 2002).

Uji Serologis

Dari uji HI cepat didapatkan antibodi terhadap H5 pada unggas air di Kabupaten Tulang Bawang adalah itik (67%), entok (75.86%) dan angsa (100%); untuk Kabupaten Lampung Selatan, itik (8.82%), entok (13.63%) dan angsa (11.11); untuk Kabupaten Lampung Timur, itik (16.67%), entok (21.05%) dan angsa (100%); untuk Kabupaten Lampung Utara, itik (45.45%), entok (1.69%) dan angsa (33.33%); untuk Kabupaten Lampung Tengah, itik (50%), entok (9.43%) dan angsa (50%); untuk Kabupaten Tanggamus, itik (8.88%), entok (14.28%), dan angsa (60%); untuk Kota Metro, itik (0%), entok (100%), dan angsa (0%); untuk Kota Bandar Lampung, itik (0%), entok (0%), dan angsa (25%), yang secara rinci dijelaskan pada tabel 2.

Tabel 2. Distribusi hasil serologis menurut wilayah dan jenis ternak

Kabupaten/Kota	Itik			Entok			Angsa			% Total**
	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	
Tulang Bawang	140	95	67.0	29	22	75.8	1	1	100.0	69.4
Lampung Selatan	34	3	8.8	22	3	13.6	27	3	11.1	10.8
Lampung Timur	96	16	16.7	76	16	21.1	7	7	100.0	21.8
Lampung Utara	11	5	45.5	59	1	1.7	6	2	33.3	10.5
Lampung Tengah	12	6	50.0	53	5	9.4	4	2	50.0	18.8
Tanggamus	45	4	8.9	21	3	14.3	5	3	60.0	14.1
Metro	4	0	0.0	3	3	100.0	0	0	0.0	42.8
Bandar Lampung	10	0	0.0	4	0	0.0	4	1	25.0	5.5
	352	129	36.6*	267	53	19.8*	54	19	35.2*	

Keterangan : (*) Persentase sampel unggas air serologis positif dari sampel unggas air pada satu kabupaten/kota
 (***) Persentase sampel jenis unggas air tertentu serologis positif dari seluruh sampel unggas air sejenis di Propinsi Lampung

Dari kelompok serologis positif sebagian sampel diuji kembali dengan uji mikrotiter HI untuk mengetahui titer antibodi serum pada kelompok tersebut. Berdasarkan uji mikrotiter HI diperoleh hasil rata-rata titer antibodi pada Kabupaten Tulang bawang 0.9 (log 2); Kabupaten Lampung Selatan 4.6 (log 2); Kabupaten Lampung Timur 3.4 (log 2); Kabupaten Lampung Utara 2 (log 2); Kabupaten Lampung Tengah 1.5 (log 2); Kabupaten Tanggamus 2.1 (log 2); Kota Metro 3.3 (log 2); dan Kota Bandar Lampung 3 (log 2) (Tabel 3). Titer antibodi paling rendah ditemukan pada Kabupaten Tulang Bawang. Dari hasil uji mikrotiter HI tersebut dapat diketahui bahwa, kekebalan terhadap virus AI pada sampel di Kabupaten Tulang Bawang, Kabupaten Lampung Timur, Kabupaten Lampung Utara, Kabupaten

Lampung Tengah, Kabupaten Tanggamus, Kota metro dan Kota Bandar Lampung masih rendah, kecuali di Kabupaten Lampung Selatan. Uji serologis HI sangat penting untuk memeriksa titer antibodi terhadap keterpaparan virus AI di lapang atau pada ayam yang telah melakukan vaksinasi AI. Dari hasil uji mikrotiter HI juga banyak ditemukan sampel yang positif HI cepat tetapi nilai titernya hanya 2⁰. Hal ini disebabkan karena kandungan antibodi pada sampel serum tersebut sangat sedikit sekali. Pada penelitian ini virus standar yang digunakan 4 HAU (setara dengan 4 x 10⁶ partikel virus), jika antibodi yang ada pada serum tidak dapat menetralsir semua virus standar, maka virus yang tidak ternetralsasi akan mengaglutinasi sel darah merah sehingga pada sumur tersebut kita tetap akan menemukan sel darah merah yang teraglutinasi.

Tabel 3. Nilai Rata-rata Titer Antibodi terhadap H5 Virus Avian Influenza.

No	Kabupaten	Rata-rata Titer Antibodi (Log 2)			Total
		Itik	Entok	Angsa	
1	Kabupaten Tulang Bawang	1.2	0.5	0	0.9
2	Kabupaten Lampung Selatan	4.3	6.0	4.0	4.6
3	Kabupaten Lampung Timur	3.9	2.6	4.2	3.4
4	Kabupaten Lampung Utara	-	-	2.0	2.0
5	Kabupaten Lampung Tengah	1.7	0.3	3.0	1.5
6	Kabupaten Tanggamus	0	2.7	3.7	2.1
7	Kota Metro	-	3.3	-	3.3
8	Kota Bandar Lampung	-	-	3.0	3.0

Deteksi Virus AI (H5N1) dengan RT-PCR

Hampir sebagian besar sub tipe virus influenza A selain bereplikasi pada saluran pernafasan juga bereplikasi pada saluran pencernaan (Tumpey *et al.*, 2002). Dari hasil uji serologis dapat diperoleh sebanyak 201 sampel HI positif dan 472 sampel yang HI negatif. Sampel usap kloaka, baik yang

berasal dari HI positif dan HI negatif masing-masing di *pool* 10 sampai 11 sampel untuk diuji keberadaan materi genetik virus AI (H5N1) pada sampel tersebut. Sehingga diperoleh 64 *pool* yang terdiri dari 19 *pool* HI positif dan 45 *pool* HI negatif.

Sampel usap kloaka yang berasal dari unggas air yang menunjukkan reaksi HI positif dan HI

negatif digunakan untuk mendeteksi keberadaan virus AI (H5N1). Deteksi dilakukan dengan teknik RT-PCR terhadap gen HA, H5 dan N1 dengan menggunakan rancangan primer HAR dan HA-1144F, HA-1144F dan H5-1735R, CU-N1F dan CU-N1R. Keberadaan virus AI (H5N1) dalam sampel akan ditunjukkan dengan adanya pita

fragmen yang berukuran ~600 bp untuk gen HA (universal), ~591 bp untuk gen H5, dan ~131 bp untuk gen N1. Deteksi virus AI dilakukan secara bertahap, dari deteksi gen HA (*universal*), dan apabila menunjukkan reaksi yang positif maka dilanjutkan dengan penentuan subtype dengan deteksi gen H5 dan N1.

Tabel 4. Hasil pemeriksaan material genetik dengan RT-PCR pada *pool* sampel unggas air serologis positif.

No.	Kode Sampel (Propinsi/Kabupaten)	Asal Hewan	Hasil RT-PCR		
			Universal	H5	N1
1	TB1I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
2	TB2I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
3	TB3I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
4	TB4I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
5	TB5I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
6	TB6I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	-	-	-
7	TB7I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	-	-	-
8	TB8I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
9	TB9I (Lampung/Tulang Bawang)	Itik	+	+	-
10	Angsa (Lampung/Tulang Bawang; Tanggamus; Lampung Selatan; Lampung Utara; Lampung Tengah; Bandar Lampung)	Angsa	+	+	-
11	TB1E (Lampung/Tulang Bawang)	Entok	-	-	-
12	TB2E (Lampung/Tulang Bawang)	Entok	+	+	-
13	LTI (Lampung/Lampung Timur)	Itik	+	+	-
14	LTE (Lampung/Lampung Timur)	Entok	+	+	+
15	LTA (Lampung/Lampung Timur)	Angsa	-	-	-
16	LSTgLTgI (Lampung/Lampung Selatan; Tanggamus; Lampung Tengah)	Itik	+	+	-
17	LSTgLTgE (Lampung/Lampung Selatan; Tanggamus; Lampung Tengah)	Entok	+	+	-
18	LUI (Lampung/Lampung Utara)	Itik	+	-	-
19	LUME (Lampung/Lampung Utara; Metro)	Entok	-	-	-

Dari 19 *pool* sampel yang HI positif diperoleh 14 *pool* yang positif RT-PCR terhadap gen HA, dan dari 14 *pool* yang positif HA tersebut hanya 1 *pool* yang menunjukkan reaksi RT-PCR yang negatif terhadap gen H5 (Tabel 4). Sampel dari HI positif dan RT-PCR positif gen H5 virus AI ditemukan pada jenis unggas itik, entok, dan angsa dari *pool* sampel yang berasal dari 7 kabupaten/kota di Propinsi Lampung (kecuali Metro) (Tabel 4). Hasil RT-PCR dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

Tidak ditemukannya reaksi positif RT-PCR pada sebagian sampel unggas air yang HI positif dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain, 1) antibodi yang ada sebagai akibat unggas pernah terpapar dengan virus AI dan tidak menimbulkan sakit, atau terpapar virus pada waktu yang sudah lama sehingga virus tidak ditemukan lagi dalam

feses, 2) jumlah virus yang ada pada usap kloaka sangat kecil sehingga tidak terdeteksi pada saat melakukan uji RT-PCR. Menurut Tumpey (2002), virus AI dapat ditemukan pada kloaka 1 minggu *post* infeksi, namun sangat sedikit virus yang dapat ditemukan dari usap kloaka.

Dari hasil RT-PCR terhadap gen HA dan H5 (WHO 2003), ditemukan adanya pita-pita yang ukurannya berbeda dengan kontrol (H5N1) (Gambar 2). Untuk diketahui dengan pasti urutan nukleotida pada daerah yang dapat teramplifikasi oleh primer spesifik tersebut perlu dilakukan sequencing terhadap sampel tersebut.

Dari 45 *pool* sampel usap kloaka yang HI negatif, terdapat 13 *pool* yang menunjukkan reaksi RT-PCR positif terhadap gen HA, dan dari 13 *pool* yang positif HA terdapat 1 *pool* yang negatif H5

. Ditemukannya materi genetik AI pada unggas yang HI negatif dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain, 1) materi genetik dari virus AI dapat dijumpai pada unggas sehat dan tidak harus menunjukkan respon pembentukan antibodi spesifik, sehingga hewan sehat potensial sebagai reservoir virus AI, 2) Awal infeksi. Dimana pada tahap ini belum terbentuk antibodi atau masih dalam jumlah yang sedikit. Menurut Bellanti (1993), antibodi dapat dideteksi empat sampai lima hari sesudah infeksi.

Sampel yang menunjukkan hasil RT-PCR terhadap HA yang positif tetapi negatif terhadap gen H5 menunjukkan bahwa unggas tersebut terinfeksi atau terpapar oleh virus AI selain subtipe H5. Unggas air dan burung pantai merupakan reservoir untuk

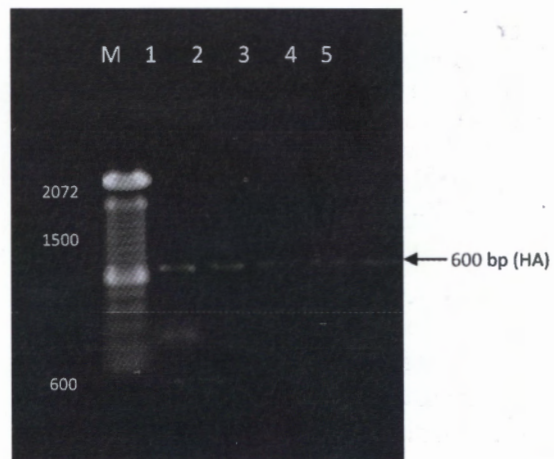
semua subtipe HA, tetapi infeksi pada spesies ini biasanya tidak menimbulkan gejala klinis (Tumpey *et al.*, 2002).

Dari *pool* yang menunjukkan reaksi positif secara konsisten terhadap gen HA dan H5 dilanjutkan RT-PCR terhadap gen N1. Dari 13 *pool* yang HI positif dan menunjukkan reaksi positif terhadap gen HA dan H5, hanya ditemukan 1 *pool* yang positif terhadap N1 (Tabel 5). Hasil RT-PCR yang menunjukkan hasil positif gen H5N1 dilihat pada Gambar 3. Hasil N1 yang negatif pada *pool* yang positif gen HA dan H5 menunjukkan bahwa adanya H5 selain N1 yang terdapat pada unggas air tersebut. Pada *pool* yang menunjukkan hasil RT-PCR yang konsisten terhadap gen HA, H5, dan N1, dilanjutkan dengan pemeriksaan sampel secara individu terhadap gen H5 dan N1 (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil pemeriksaan material genetik dengan RT-PCR pada sampel serologis positif *pool* 14 secara individu

No.	Kode Sampel (Propinsi/Kabupaten)	Asal Hewan	Hasil RT-PCR	
			H5	N1
1	LTE no sampel 001	Entok	-	
2	LTE no sampel 002	Entok	-	
3	LTE no sampel 034	Entok	-	
4	LTE no sampel 084	Entok	-	
5	LTE no sampel 086	Entok	-	
6	LTE no sampel 100	Entok	+	-
7	LTE no sampel 102	Entok	+	-
8	LTE no sampel 124	Entok	-	
9	LTE no sampel 129	Entok	-	
10	LTE no sampel 131	Entok	-	
11	LTE no sampel 132	Entok	-	

Berdasarkan hasil penelitian AI di Propinsi Lampung ditemukan bahwa antibodi terhadap H5 dapat ditemukan pada semua jenis unggas air di 8 kabupaten/kota di Propinsi Lampung. Materi genetik virus yang ditemukan bukan H5N1, melainkan H5 dengan N yang belum terdeteksi (H5Nx) dan pasangan antara H yang belum diketahui dengan N1 (HxN1).



Gambar 1. Contoh hasil RT-PCR dielektroforesis pada gel agarose 1.5%, diwarnai dengan ethidium bromida. Hasil Positif ditunjukkan dengan adanya pita hasil amplifikasi fragmen gen HA sebesar ~600bp. M= Marker, 1: kontrol positif (HA), 2: swab entok Lampung Timur, 3 : swab itik Lampung Timur, 4: swab itik Lampung Utara.