

Kesehatan

**Laporan
Hibah Penelitian Strategis Nasional
Tahun Anggaran 2009**

kk
kkg
LP.05/10
Rac
t



**Tingkat Reassortant Virus Avian Influenza H5N1 Pada Unggas
dan Monyet Sebagai Model Penularan Virus Flu Burung
dari Manusia ke Hewan**

**Kadek Rachmawati, M.Kes., drh
Mia Ika Dewisavitry, drh**

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan surat
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor : 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**Universitas Airlangga
Oktober 2009**

Halaman Pengesahan

Judul Penelitian : Tingkat Reassortant Virus Avian Influenza H5N1 Pada Unggas Dan Monyet Sebagai Model Penularan Virus Flu Burung dari Manusia ke Hewan

2. Ketua Peneliti :
 a. Nama Lengkap : Kadek Rachmawati, M.Kes., drh
 b. Jenis Kelamin : Perempuan
 c. NIP : 132 161 175
 d. Pangkat/Golongan : Penata / IIIc
 e. Jabatan Fungsional : Lektor
 f. Bidang Keahlian : Biologi Molekuler
 f. Fakultas/Jurusan/Puslit : Fakultas Kedokteran Hewan
 g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

No	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Kadek Rachmawati, M.Kes., drh	Biologi Molekuler	FKH	Unair
2.	Mia Ika Dewisavitry, drh	Hewan Coba	Lab AI-ITD	Unair

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :
 a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
 b. Biaya yang diusulkan : Rp 99.350.000,-
 c. Biaya yang disetujui tahun : Rp 90.000.000,-

Mengetahui Surabaya, 26 Oktober 2009

Ketua FFD Unair

Ketua Peneliti,

Dr. Nasronuddin, dr, SpPD-KPTI
 NIP. 140 159 073

Kadek Rachmawati, M.Kes., drh
 NIP. 132 161 175



Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian

Dr. Bambang Sektiari, drh, DEA
 NIP. 131 834 004

RINGKASAN

Sejak akhir tahun 2003, virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004). Tidak kurang dari 336 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza sub tipe H5N1 dan 207 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 113 orang sampai dengan 4 Desember 2007 dan 91 orang diantaranya meninggal (WHO, 2007).

Tujuan Penelitian ini adalah menganalisis model penularan virus Avian Influenza H5N1 dari manusia ke hewan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Animal BSL-3 (ABSL-3) Laboratorium Avian Influenza ITD Unair. *Maccaca fascicularis* diinfeksi dengan virus AI sub tipe H5N1 dari unggas, kemudian ayam diinfeksi virus AI sub tipe H5N1 yang berasal dari monyet, kemudian diambil swab nasal dan nasopharink pada monyet dan swab trakhea dan kloaka pada ayam di hari ketiga, keenam dan kedelapan untuk mengamati pola mutasi fragmen HA dan NA virus AI H5N1 dengan menggunakan teknik PCR dan sekuensing.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen HA dan NA virus AI sub tipe H5N1 yang ditularkan dari ayam ke monyet dan dari monyet ke ayam tidak mengalami perubahan urutan asam amino pada gen HA dan NA.

Kata Kunci : Virus AI, H5N1, Fragmen HA dan NA, mutasi, *Maccaca Fascicularis*

SUMMARY

Infection of avian influenza virus was not only infected to chicken but could be infected to human too. 31 province from 33 province at Indonesia have infected by Avian Influenza virus and until December 2009, avian influenza virus infect to 115 people dan 140 people was died. One way for prevent transmission avian influenza to human and spread between human to human,we must prepare new vaccine from avian influenza virus isolate. According to many research endogen TLR can induce immune respon and many protein such MF59,ASO2 can use for adjuvan.

Purpose of this research was to analysis transmision of Avian Influenza H5N1 virus model from human to animal. *Macaca fascicularis* was infected with Avian Influenza virus H5N1 from chicken, and then the virus from *Macaca fascicularis* was infected to chicken. The result of this research was no change of amino acid sequence of HA and NA gene of Avian Influenza H5N1 virus.

PRAKATA

Sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor :171/SP2H/PP/DP2M/V/2009,Tanggal 30 Juli 2009 bahwa penelitian ini adalah Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia. Penelitian ini berjudul **“Tingkat Reassortant Virus Avian Influenza H5N1 Pada Unggas Dan Monyet Sebagai Model Penularan Virus Flu Burung dari Manusia ke Hewan ”** yang bertujuan untuk menganalisis model penularan virus Avian Influenza sub tipe H5N1 dari manusia ke hewan.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya peneliti ucapkan kepada :

1. Dirjen DIKTI yang telah memberikan kesempatan untuk mengerjakan penelitian ini sehingga bisa terselesaikan dengan baik.
2. Prof. Fasich selaku Rektor universitas Airlangga
3. Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh selaku Ketua LPPM Universitas Airlangga
4. Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan FKH – Unair
5. Dr. Chairul Anwar Nidom, MS., drh selaku Ketua Lab. Avian Influenza – ITD Universitas Airlangga
6. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini hingga selesai

Kami menyadari bahwa laporan penelitian ini masih banyak kekurangannya, oleh karena itu kritik dan saran kami harapkan untuk kesempurnaan hasil penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat dalam upaya pengendalian penyakit Avian Influenza di Indonesia baik pada manusia maupun pada ayam.

Surabaya, Oktober 2009

Peneliti



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
SUMMARY	4
KATA PENGANTAR	5
DAFTAR ISI	6
DAFTAR GAMBAR	7
BAB 1. PENDAHULUAN	8
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	11
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	21
BAB 4. METODA PENELITIAN	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	37
DAFTAR PUSTAKA	38

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Avian Influenza adalah penyakit viral pada unggas, termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza type A. Penyakit ini dikenal juga dengan nama avian flu dan dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahaan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik (Swayne, 2000).

Sejak akhir tahun 2003, virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004).

Selain pada unggas, virus *avian influenza* dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Tidak kurang dari 336 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza sub tipe H5N1 dan 207 diantaranya meninggal

dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 113 orang sampai dengan 4 Desember 2007 dan 91 orang diantaranya meninggal (WHO, 2007).

Virus Avian Influenza memiliki delapan gen yang terdiri dari gen Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) yang merupakan gen eksternal; gen Matriks (M); Nukleoprotein (NP); Polymerase A (PA); Polymerase B2 (PB2) dan gen Non-struktural (NS) yang merupakan gen internal. Ke delapan gen ini masing-masing memiliki *Open Reading Frame* (ORF), sehingga ekspresi proteinnya tidak tergantung satu sama lainnya (Nidom, 2005; Horimoto *et al.*, 2003).

Fragmen HA (Haemagglutinin) dan NA (Neuraminidase) merupakan 2 fragmen dari virus flu burung yang memiliki peranan penting dalam proses infeksi virus Flu Burung baik pada manusia maupun pada hewan. Fragmen HA adalah suatu glikoprotein yang terdapat di permukaan virus merupakan target netralisasi antibodi serta bertanggung jawab untuk pengikatan virus ke reseptor sel inang sehingga virus dapat masuk ke dalam sel melalui proses endositosis. Sedangkan fragmen NA berperanan untuk penempelan virus baru yang terbentuk di dalam inti sel inang yang terinfeksi pada reseptor yang terdapat di dalam sel inang, sehingga virus baru tersebut dapat ke luar dan menginfeksi sel inang yang lain.(Stevens, 2006).

Virus Influenza A mudah bermutasi, terutama pada fragmen Haemagglutinin(HA) dan Neuraminidase(NA). Sampai saat ini telah diketahui terdapat 15 subtipe HA, H1 – H15 dan 9 subtipe NA, N1 – N9 yang disebabkan karena virus ini mampu mengubah diri melalui proses *antigenic*

drift dan *antigenic shift* (Nidom dan Raharjo, 2004). Virus Influenza umumnya secara genetik sangat labil dan mudah beradaptasi untuk menghindari dari pertahanan inang karena virus Influenza yang memiliki genom berupa RNA tidak memiliki mekanisme "*proofreading*" dan perbaikan apabila terjadi kesalahan saat replikasi berlangsung. Hal ini memicu perubahan komposisi genetik virus saat bereplikasi pada manusia maupun hewan sehingga dapat menimbulkan strain virus baru (Ligonus, 2005).

Kajian tentang perubahan virus flu burung pada daerah endemis dan non endemis membutuhkan penelitian lebih lanjut terutama pada fragmen Haemagglutinin dan Neuraminidase.

1.2 Rumusan Masalah :

Berdasarkan latar belakang tersebut maka rumusan masalah yang muncul yaitu :

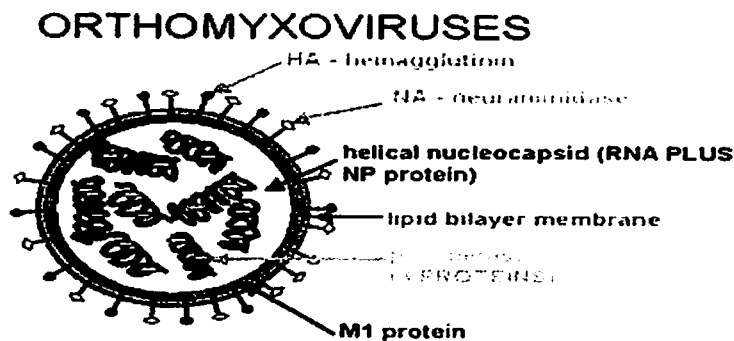
1. Bagaimanakah sekuens asam amino pada gen HA dan NA virus Avian Influenza H5N1 dari unggas yang diinfeksi pada monyet?
2. Bagaimanakah sekuens asam amino pada gen HA dan NA virus Avian Influenza H5N1 dari monyet yang diinfeksi pada unggas?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Flu Burung Subtipe H5N1

Virus Influenza terdapat tiga tipe yaitu tipe A,B dan tipe C. Virus avian influenza atau yang lebih dikenal dengan virus Flu Burung termasuk dalam virus influenza tipe A dan family *Orthomyxoviridae* (Horimoto dan Kawaoka, 2001). Genom virus influenza type A berupa rantai untai tunggal, sense negatif, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 segmen yang menyandi 10 macam protein. Kedelapan segmen tersebut adalah PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M (M1 dan M2) serta NS (NS1 dan NS2) (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001). Virus ini mempunyai amplop dengan *lipid bilayer* yang berasal dari hospes dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktifitas hemaglutinasi dan neuraminidase. Aktifitas ini diperankan oleh 2 glikoprotein utama pada permukaan virus yaitu hemaglutinin (HA) dan (NA) yang berada dalam bentuk homotrimer dan homotetramer. Analisis serologik dan genetik pada virus Flu Burung dapat diketahui adanya 16 macam HA dan 9 macam NA (Donatelli *et al*, 2001; Dybing *et al* 200; Hoffman *et al*, 2000, Swayne, 2004). Diantara virus Flu Burung yang sering menimbulkan penyakit serius pada unggas terutama adalah yang mempunyai hemaglutinin H5,H7 dan kadang-kadang H9. Susunan asam amino protein HA, NA serta protein NS dan PB2 ikut berperan dalam sifat antigenik, virulensi dan spesifitas virus terhadap hospes. Kemampuan virus Flu Burung untuk melakukan mutasi dan rearsori genetik memungkinkan virus untuk berubah sifat antigeniknya, patogenisitasnya serta spesifitas hospesnya (Asmara, 2005).



type A, B, C : NP, M protein
sub-types: HA or NA protein

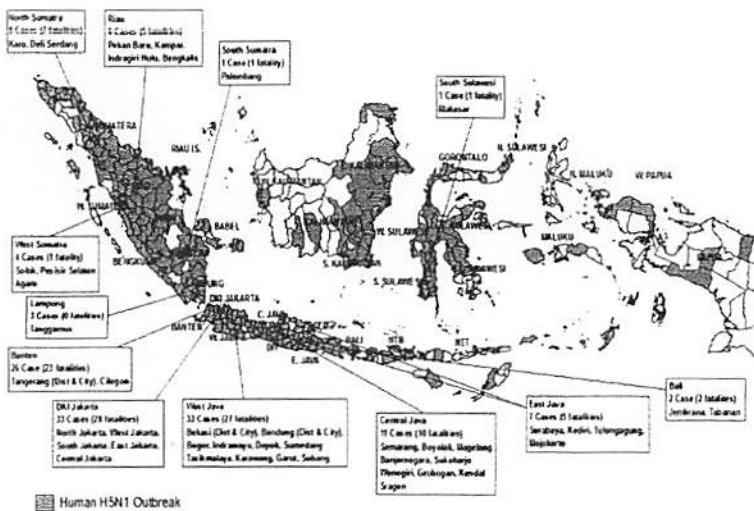
Gambar 2.1 Struktur virus Flu Burung (Suarez, 2004)

Variasi antigenik pada virus Flu Burung dapat ditemukan frekuensi tinggi dan terjadi melalui 2 cara yaitu antigenic shift dan antigenic drift. Antigenic shift dapat timbul akibat gene reassortment (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza type A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang bermanifestasi sebagai sub tipe virus Flu Burung baru. Antigenic shift terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada antigen permukaan H dan atau N. Antigenic drift dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada antigen permukaan H dan atau N dan dapat ditemukan pada virus influenza type A dan B. Antigenic drift berlangsung lambat, tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas pada suatu daerah/domain. Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus, yaitu sekitar 2-3 kali substitusi asam amino per tahun (Capua *et al*, 2000; Tumpey *et al*, 2002; Swayne dan Suarez, 2003).

2.1 Epidemiologi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Unggas Dan Manusia

2.1.1 Epidemiologi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Unggas

Flu burung atau juga dikenal sebagai avian influenza merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus influenza tipe A (CDC, 2004; US Department of Labor, 2004; WHO, 2004; Omi, 2005; WHO, 2005; Behrens and Stoll, 2006). Hingga saat ini, wabah flu burung dengan patogenisitas yang tinggi (*highly pathogenic*), disebabkan oleh virus influenza subtipe H5 dan H7 (Swayne and Suarez 2000; Behrens and Stoll, 2006; Harder and Werner, 2006). Flu burung *highly pathogenic* untuk pertama kalinya dikenal sebagai penyakit infeksi yang terjadi pada burung, unggas dan ayam di Itali pada tahun 1878 (Harder and Werner, 2006). Meskipun flu burung *highly pathogenic* jarang sekali ditemukan menginfeksi manusia (US Department of Labor, 2004), akan tetapi WHO (2004) mengemukakan bahwa flu burung juga dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada mamalia dan manusia.



Gambar 2.2 Daerah endemis virus Flu Burung Subtipe H5N1 di Seluruh Indonesia (Sumber WHO, 2008)

Flu burung terjadi di Indonesia sejak pertengahan tahun 2003, akan tetapi baru pada 25 Januari 2004, Pemerintah mengumumkan secara resmi kepada masyarakat Indonesia bahwa telah terjadi wabah flu burung pada ayam dan unggas lainnya seperti ayam petelur, ayam bibit, ayam pedaging, bebek dan burung puyuh. Berdasarkan laporan resmi tersebut, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004)

2.3 Epidemiologi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Manusia

Wabah flu burung pada manusia pertama kali ditemukan di Hongkong. Selama wabah tersebut terjadi, diketahui bahwa terdapat 18 orang pasien menderita flu burung dan 6 orang meninggal karena terinfeksi flu burung. Kemudian pada tahun 2003, terjadi 2 kasus flu burung yang menginfeksi keluarga dari Hongkong yang sedang berada di Cina, dimana 1 orang dilaporkan sembuh sedangkan yang lainnya meninggal (Dybing *et al.*, 2000; US Department of Labor, 2004; WHO, 2004). Kasus infeksi virus flu

burung pada manusia dilaporkan telah menyebar di Azerbaijan, Kamboja, Cina, Mesir, Indonesia, Irak, Thailand, Turki dan Vietnam (CDC, 2004; WHO, 2004; WHO, 2005). Di Indonesia, kasus flu burung pada manusia pertama kali ditemukan di kota Tangerang, propinsi Banten. Berdasarkan hasil konfirmasi dari laboratorium rujukan WHO di Hongkong, Pemerintah Indonesia melaporkan bahwa kejadian meninggalnya keluarga yang terdiri dari Bapak dan 2 orang anak yang berasal dari Tangerang, Propinsi Banten disebabkan oleh infeksi virus flu burung. Menteri Kesehatan mengemukakan bahwa telah terjadi infeksi virus avian influenza H5N1 pada manusia, tiga dari kasus ini berakibat fatal.

Infeksi virus avian influenza H5N1 diketahui menyebar secara geografis. Satu kasus terbaru adalah kasus infeksi yang terjadi pada seorang laki-laki dari propinsi Jawa Timur yang berusia 18 tahun. Pada kasus tersebut, gejala klinis mulai berkembang pada tanggal 6 Mei dan baru dirawat di rumah sakit pada tanggal 17 Mei; saat ini laki-laki tersebut dilaporkan telah sehat kembali. Dua kasus lainnya terjadi pada seorang gadis berusia 10 tahun dan saudara laki-lakinya yang berusia 18 tahun; keduanya berasal dari Bandung. Gejala klinis pada keduanya berkembang pada tanggal 16 Mei, dan kemudian mereka dirawat di rumah sakit pada 22 Mei, dan meninggal pada 23 Mei.

Pada kasus tersebut, kebanyakan individu yang terinfeksi virus avian influenza H5N1 mempunyai hubungan yang dekat dengan ayam atau unggas yang mati di sekitar rumah tempat tinggal mereka sebelum gejala klinis mulai berkembang (Depkes RI, 2006). Berbagai kasus infeksi virus avian

influenza H5N1 terus berkembang dan hingga tanggal 10 Desember 2008 dilaporkan bahwa lebih dari 300 kasus infeksi virus avian influenza H5N1 pada manusia dan jumlah korban yang meninggal akibat infeksi virus Flu Burung sub tipe H5N1 sebanyak 245 orang (WHO, 2008).

Tabel 2.3 Jumlah orang yang terinfeksi oleh virus Flu Burung Sub tipe H5N1 per tanggal 10 Desember 2008

Country	2003		2004		2005		2006		2007		2008		Total	
	cases	Deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Azerbaijan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	0	0	7	7
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	3	3	30	20
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	7	3	50	22
Indonesia	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	20	17	137	112
Iraq	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3	2
Iran people's	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2

Democratic														
Republic														
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	3	1
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	25	17
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	5	5	106	52
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	36	28	387	245

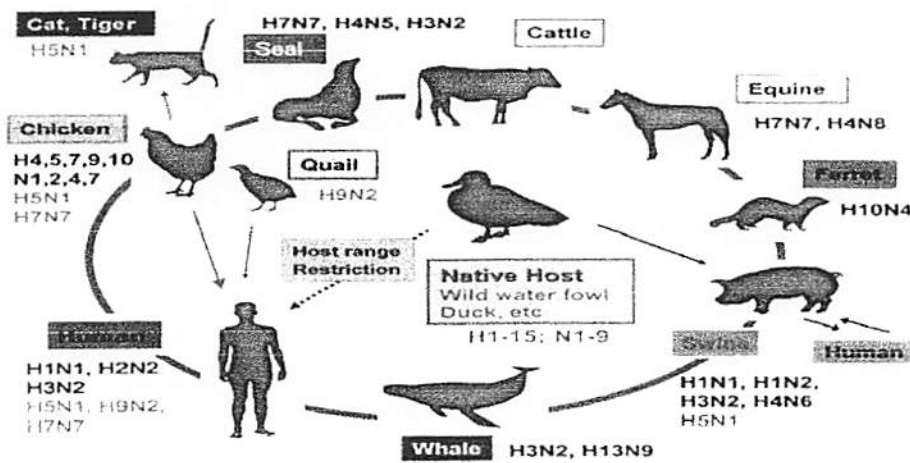
Sumber : WHO, 2008

2.4 Penularan Penyakit flu burung H5N1

Virus flu burung dapat terbawa di dalam saluran gastrointestinal burung liar ke seluruh dunia. Virus ini sangat berbahaya dan dapat menyebar di dalam saliva, cairan yang dikeluarkan melalui hidung dan feses dari burung yang terinfeksi H5N1. Virus flu burung secara normal asimtomatis pada burung liar tetapi dapat menyebabkan kematian pada ayam, bebek dan kalkun. Burung yang dipelihara dapat terinfeksi melalui kontak langsung dengan burung yang terinfeksi (antara burung liar dan burung yang dipelihara) atau melalui kontak dengan tanah yang terkontaminasi, sangkar dan air atau melalui makanan yang terkontaminasi dengan virus flu burung. Sebuah penelitian menemukan bahwa virus flu burung H5N1 dapat disebarkan melalui burung yang bermigrasi di daerah Asia Tenggara (Galwankar dan Clem, 2006). Selain burung liar, anjing dan kucing memiliki

potensi dalam menyebarkan virus flu burung subtipe H5N1. Ini didasarkan hasil penelitian dari tim FKH-UGM menemukan 2 ekor anjing dan kucing positif terhadap infeksi flu burung subtipe H5N1 (Asmara,2007). Selain itu, menurut hasil penelitian yang dilakukan di 6 kota di Indonesia ditemukan prevalensi kucing yang terinfeksi oleh virus flu burung subtipe H5N1 adalah sebesar 19,8 % dari 500 kucing (Nidom, 2006). Virus influenza dapat ditularkan melalui kontak dengan permukaan dan bahan yang terkontaminasi dengan virus flu burung atau melalui hospes perantara seperti babi. Karena manusia jarang terpapar oleh virus flu burung maka manusia memiliki imunitas yang sedikit terhadap partikel virus ini di dalam populasi yang besar. Ini menyebabkan virus flu burung menjadi ganas apabila terjadi penularan antar manusia dan dapat menyebabkan pandemik.

Kasus flu burung pada manusia paling banyak terjadi pada anak-anak dan orang dewasa dan lebih dari separuhnya meninggal akibat komplikasi yang disebabkan oleh virus ini. Ini disebabkan individu yang terinfeksi oleh virus flu burung memiliki gejala klinis yang berbeda dengan gejala yang ditimbulkan oleh virus flu burung (Galwankar dan Clem, 2006).



Gambar 2.3 Jalur penularan virus flu burung pada unggas dan manusia

(Robertson, 2006)

2.5 Fragmen HA dan NA

Untuk terjadinya infeksi virus avian influenza ini berikatan dengan glikoprotein atau glikolipid permukaan sel yang mengandung gugus terminal sialyl-galactosyl (Neu5Ac(I2-3)Gal) atau (Neu5Ac(I2-6)Gal). Virus AI isolat asal ayam cenderung berikatan dengan (Neu5Ac(I2-3)Gal), sedangkan virus isolat asal manusia mempunyai spesifitas terhadap (Neu5Ac(I2-6)Gal). Kondisi ikatan ini ikut berperan dalam spesifitas virus dengan hospes (Matrosovich, 2004). Bagian protein HA yang berikatan dengan reseptor hospes (*Reseptor Binding Site/RBS*) mempunyai susunan asam amino yang khas. Pada RBS virus influenza subtipe H3 isolat asal ayam dengan asam amino posisi 226 Gln dan posisi 228 Gly akan lebih mengenal (Neu5Ac(I2-3)Gal), sedangkan virus isolat asal manusia dengan asam amino 226 Leu dan 228 Ser akan lebih mengenal (Neu5Ac(I2-6)Gal) (Thomson *et al*, 2006). Pada sel epitel permukaan saluran respirasi manusia terutama mengandung (Neu5Ac(I2-6)Gal), sedangkan pada ayam mayoritas adalah (Neu5Ac(I2-3)Gal).

Setelah berikatan dengan reseptor sel hospes, maka virus akan masuk melalui fusi amplop virus dengan membran endosomal sel hospes. Proses ini memerlukan bantuan protease sel hospes untuk mengaktivasi prekursor hemaglutinin (HA₀) menjadi fragmen 1 (HA1) dan fragmen 2 (HA2) yang akan memungkinkan virus melepaskan ribonukleoproteinnya, yang selanjutnya akan terjadi replikasi virus di dalam sel hospes. Oleh karena itu aktivasi proteolitik protein HA merupakan faktor penting untuk infektivitas dan penyebaran virus

ke seluruh tubuh. Perbedaan kepekaan protein HA virus AI terhadap protease hospes akan berhubungan dengan tingkat virulensi. Virus yang termasuk dalam kelompok HPAIV mempunyai hemagglutinin yang sangat peka terhadap protease endogen /seluler hospes, sedangkan pemotongan hemagglutinin pada LPAIV membutuhkan protease ekstra seluler aktif spesifik seperti tripsin (Alexander, 2000; Spackman *et al.*, 2002; Swayne & Suarez, 2000). Analisis molekuler menunjukkan adanya perbedaan susunan asam amino pada *hemagglutinin cleavage site*. Pada HPAIV akan ditemukan adanya *polybasic amino acid region*. Ciri tersebut terlihat pula pada virus AI asal unggas dari beberapa daerah di Jateng dan DIY. Sekuen tersebut mengandung 5 arginin dan 2 lisin (PQRERRRKKRGLF), sama dengan sekuen yang terdapat pada isolat – A/chicken/Hongkong/258/97 (H5N1).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE-1

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Umum Penelitian :

Menganalisis pola mutasi virus Flu Burung Subtipe H5N1 pada fragmen Haemagglutinin dan Neuraminidase pada hewan primata dan unggas

3.1.2 Tujuan Khusus Penelitian :

- 1. Untuk menganalisis sekuen asam amino pada gen HA dan NA virus Avian Influenza H5N1 dari unggas yang diinfeksi ke primata**
- 2. Untuk menganalisis sekuen asam amino pada gen HA dan NA virus Avian Influenza H5N1 dari primata yang diinfeksi ke unggas**

3.2 Manfaat Penelitian

3.2.1 Manfaat Aspek Keilmuan

Dari hasil penelitian ini diharapkan akan memberikan informasi tentang :

- a. Mekanisme penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 dari unggas ke primata**
- b. Mekanisme penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 dari primata ke unggas**

3.2.2 Manfaat Praktis

Dengan tercapainya tujuan penelitian ini, maka dapat diketahui mekanisme penularan virus Avian Influenza subtipe H5N1 dari unggas ke primata, serta dari primata ke unggas sehingga dapat digunakan sebagai landasan ilmiah penelitian-penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan penularan virus AI. Hasil penelitian ini juga dapat dipakai sebagai dasar untuk memberikan

informasi tentang cara pencegahan terbaik penularan virus Avian Influenza sub tipe H5N1 antar spesies sehingga penularan antar manusia dapat dicegah.



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Koleksi Sampel

Sampel didapat dari swab nasal dan nasopharink *Maccaca fascicularis* serta swab trakhea dan kloaka ayam yang diinfeksi virus AI subtipo H5N1. Sampel yang diperoleh kemudian dimasukkan pada medium transport dan disimpan dalam lemari es -80°C sampai saat digunakan.

4.2. Inokulasi Medium Transport pada Ayam Bertunas (TAB)

Untuk memperbanyak virus yang diperoleh maka sampel diinokulasi pada TAB untuk sampel dari ayam dan pada sel MDCK untuk sampel dari monyet.

Inokulasi sampel pada TAB dilakukan dengan cara menempatkan telur pada sisi tumpul di bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70% ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan alantois. Ambil 1 spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur dan tentukan lokasi embrio dengan menggunakan "egg candler", masukkan jarum ke lubang pada telur menembus membran amnion dan inokulasikan 100 μl spesimen ke ruang amnion. Tarik jarum 0,5cm dan inokulasikan 100 μl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkulasi telur tersebut pada suhu $33-37^{\circ}\text{C}$ selama 2-3 hari. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan telur tersebut pada suhu $33-37^{\circ}\text{C}$ selama 2-3 hari.

Inokulasi sampel pada sel MDCK dilakukan dengan cara memastikan terlebih dulu bahwa sel MDCK dalam keadaan konfluen sebelum inokulasi virus. Sel MDCK dicuci dengan menggunakan media DMEM tanpa FBS sebanyak 2 kali sebelum diinokulasi. Sel yang telah dicuci diinkubasi pada suhu 37°C sebelum diinokulasi dengan virus. Ketika inokulasi virus, media dalam *flask* dibuang dan ditambahkan sekitar 100 μl virus, kemudian *flask* diinkubasi selama 1-2 jam. Setelah inkubasi selama 1-2 jam, ditambahkan 1 ml media DMEM dengan tripsin ke dalam *flask* dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan kandungan 5% CO_2 . Hari berikutnya media dalam *flask* diganti dengan

media baru dengan komposisi yang sama dengan media sebelumnya dan kemudian diinkubasi kembali 2 sampai 4 hari. Hari ketiga inkubasi dilakukan pengamatan apakah telah terjadi CPE dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus M-10). Pembentukan CPE akan teramati umumnya pada hari ketiga, dan pada hari ke-4. Sel dengan CPE positif dapat disimpan pada suhu 4°C, jika akan digunakan langsung dilakukan uji HA atau perlakuan lainnya atau disimpan pada suhu -20°C.

4.3. Metode Uji HA

Uji HA dilakukan untuk skrining awal sampel yang diperoleh. Jika hasilnya positif maka ada kemungkinan sampel tersebut memiliki gen HA, Namun belum bisa dipastikan sampel tersebut mengandung virus AI. Uji HA dilakukan dengan cara memasukkan 50 µl PBS pada lubang A2-H12 dari mikroplate, kemudian masukkan 100µL kontrol antigen atau isolat lapangan dari A1-F1. Pindahkan 50µl dari lubang pertama sampai dengan terakhir kemudian tambahkan RBC *Guinea pig* (marmut) 0,75% untuk sampel dari monyet atau RBC ayam untuk sampel dari ayam, *shake* dengan mekanikal vibrator dan inkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit. Cek timbulnya spot pada bagian dasar mikroplate, jika timbul endapan hasilnya negatif jika timbul spot seperti pasir hasilnya positif.

4.4. Metode PCR

Sebelum dilakukan pengecekan adanya gen HA H5 melalui metode PCR, maka terlebih dulu dilakukan ekstraksi RNA virus dari cairan alantois atau sel MDCK dengan mengikuti prosedur dari *Qiagen RNeasy™ RNA Isolation Kit*. Estela RNA virus berhasil diisolasi, maka reaksi PCR dilakukan untuk mendeteksi virus flu burung subtipe H5N1 (HA H5 dan NA N1). Adapun prosedur PCR yang dilakukan mengikuti prosedur dari WHO dengan menggunakan primer sesuai standar WHO. Kemudian campuran PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*DNA Thermal cycler*) dengan program PCR yaitu : untuk proses denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 50°C selama 1 menit dan *extension* selama 3 menit.

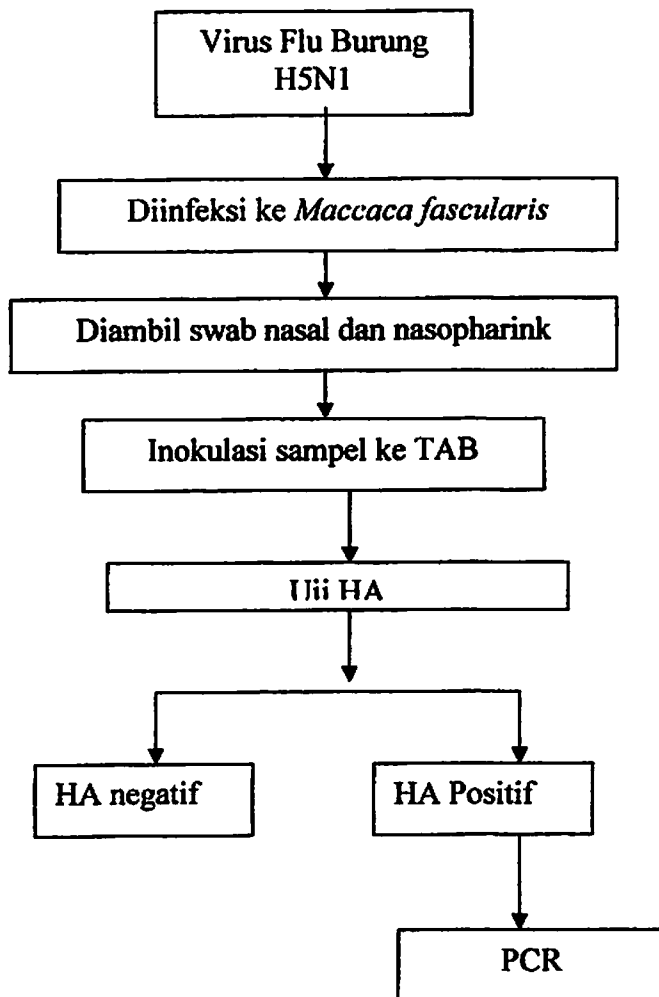
Siklus PCR dilakukan 35 siklus kemudian hasil PCR dianalisis dengan metode elektroforesis.

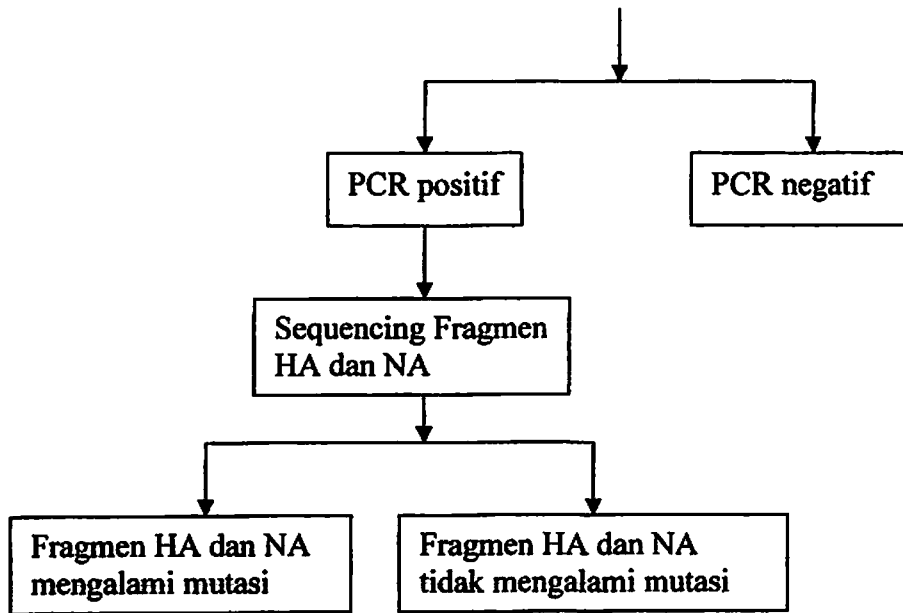
Untuk keperluan ELP (elektroforesis) maka disiapkan gel agarose yang ditambah pewarna *ethidium bromide*. Aplikasikan produk PCR ke dalam lubang pada cetakan gel agarose, kemudian dirunning dengan memakai arus listrik. Hasil ELP divisualisasi di bawah sinar ultraviolet, kemudian didokumentasi dengan kamera digital.

4.5. Sekuensing Virus Flu Burung Subtipe H5N1

Sekuensing dilakukan dengan metoda *indirect sequencing*. Produk PCR dilakukan purifikasi terlebih dahulu, kemudian dilakukan *labelling* dengan primer *forward (sense)* atau *reverse (antisense)* dengan menggunakan *Bigdye Terminator*. Hasil sekuensing selanjutnya akan dilakukan pengujian dengan menggunakan program *Genetic Win V 3.2*.

Alur penelitian ini sebagai berikut :





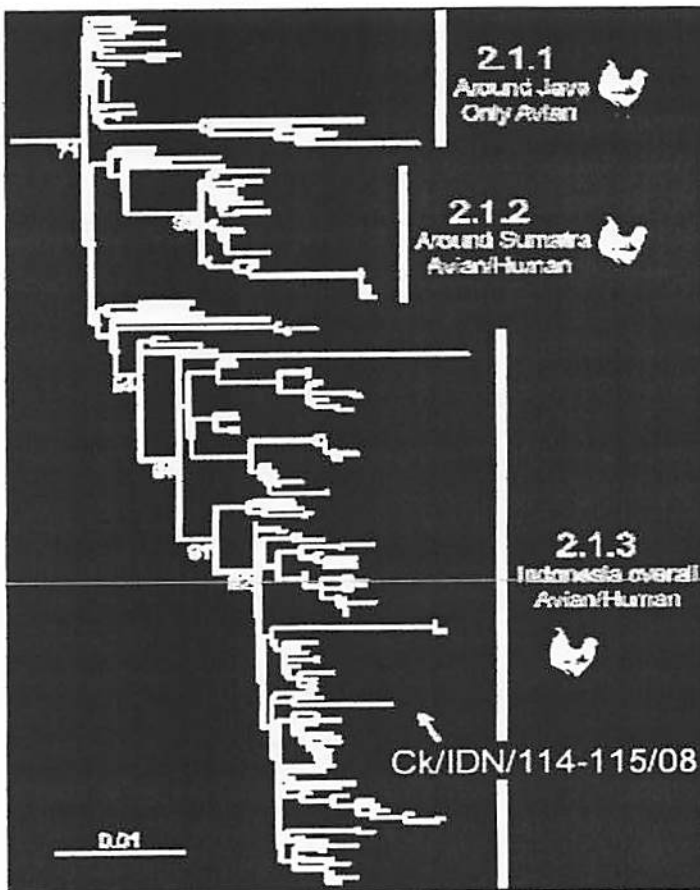
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah dilakukan mulai Juni 2009 sampai dengan Oktober 2009. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Avian Influenza, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Surabaya. Semua kegiatan yang berkaitan dengan Virus hidup dilaksanakan pada fasilitas laboratorium Animal BSL-3 (ABSL-3).

Isolat virus Avian Influenza H5N1 yang digunakan untuk menginfeksi hewan coba monyet dalam penelitian ini milik Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga yang berasal dari ayam yang terinfeksi virus AI. Ayam tersebut berasal dari pasar basah di wilayah Surabaya, dan positif terinfeksi virus AI H5N1 berdasarkan hasil analisis sampel yang diambil. Virus yang diperoleh diberi kode : A/Ck/Indonesia/114/2008 (H5N1). Berdasarkan uji keganasannya virus ini mempunyai nilai HA lebih tinggi dibanding yang lainnya, dan dari hasil analisis filogenetiknya termasuk ke dalam *clade* 2.1.3 virus Avian Influenza H5N1 (Reviany, 2008). Menurut Takano (2009), virus AI H5N1 yang menyerang unggas di Indonesia pada umumnya dibagi menjadi tiga *clade* yaitu *clade* 2.1.1, *clade* 2.1.2 dan *clade* 2.1.3. Komposisi *clade* ini dari tahun 2003 sampai dengan tahun 2008 terus mengalami perubahan. Pada awalnya hanya terdapat ketiga *clade* tersebut pada isolat di Indonesia, namun dalam perkembangannya saat ini dijumpai pula *sublineage* baru yang digolongkan menjadi *lineage* IDN/6/05. Lebih jauh dikatakan bahwa proporsi *clade* dari isolat virus H5N1 di Indonesia mengalami perubahan tiap tahun dimana sejak tahun 2005 sampai saat ini *clade* virus 2.1.3 yang menginfeksi unggas dan manusia di pulau Jawa merupakan *clade* dominan di Indonesia, sedangkan *clade* 2.1.1 yang menyerang unggas di pulau Jawa dan *clade* 2.1.2 yang menyerang unggas dan manusia di pulau Sumatra mulai jarang

dijumpai sejak tahun 2005. Penemuan ini menunjukkan bahwa sejak masuknya virus H5N1 ke Indonesia, terjadi evolusi *sublineage* virus yang berbeda dan *clade* virus 2.1.3 merupakan *clade* dominan sejak tahun 2005 dan secara sporadis ditransmisikan ke manusia.

Isolat A/Ck/Indonesia/114/2008 (H5N1) digunakan dalam penelitian ini dengan pertimbangan karena termasuk *clade* 2.1.3 yang dapat menyerang unggas dan manusia. Virus tersebut mempunyai kekerabatan dengan virus yang menginfeksi unggas dan manusia di daerah Jabotabek atau yang menimbulkan kematian pada manusia di daerah Jabotabek.



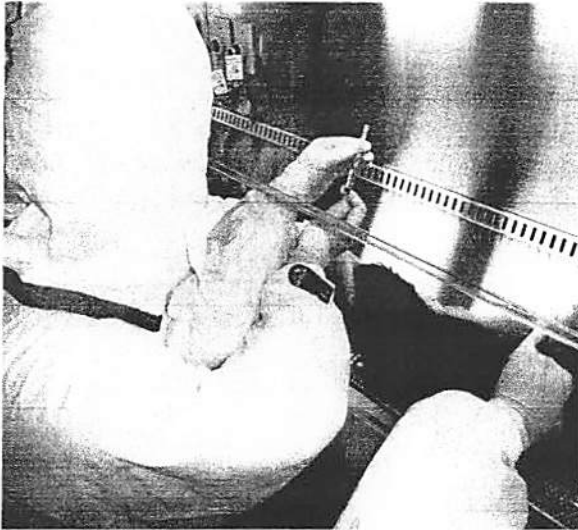
Gambar 4.1 : Isolat virus A/Ck/114/Indonesia/2008 termasuk ke dalam *clade* 2.1.3

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini ada dua jenis yaitu monyet dan ayam, dengan harapan monyet mewakili mamalia dalam hal ini

manusia, sedangkan ayam untuk mewakili bangsa unggas. Hal ini melihat dari penularan virus AI H5N1 yang sudah dapat menular langsung dari ayam ke manusia seperti pada kasus infeksi virus AI H5N1 di Hongkong tahun 1997 telah terjadi penularan langsung virus AI H5N1 dari ayam ke manusia.

Hewan coba monyet (*Macaca fascicularis*) diinfeksi virus AI H5N1 dengan dosis yang sebelumnya diperoleh dari penghitungan hasil EID₅₀ (Egg Infection Dose 50) pada telur yang diinokulasi virus yang diencerkan secara serial, ternyata diperoleh hasil pada pengenceran 10^7 . Dosis ini dipakai sebagai dasar untuk melakukan penghitungan MLD₅₀ (Mice Lethal Dose 50) pada mencit yang diinfeksi virus AI H5N1 dan diperoleh hasil 10^1 (Takano,2008). Hasil MLD₅₀ ini yang digunakan untuk dasar dosis infeksi virus AI H5N1 ke hewan coba monyet. Saat melakukan infeksi maka monyet dianestesi dengan ketamine dengan dosis 0,3ml agar memudahkan penanganan serta mengurangi rasa sakit pada hewan coba (Kobasa, 2007). Setelah infeksi virus maka dilakukan pengamatan gejala klinis yang muncul selama tujuh hari, tetapi pada hari pertama dan kedua setelah infeksi pengamatan dilakukan setiap enam jam. Sampel berupa swab nasal dan nasopharynx diambil pada hari ketiga, keenam dan kedelapan setelah infeksi..

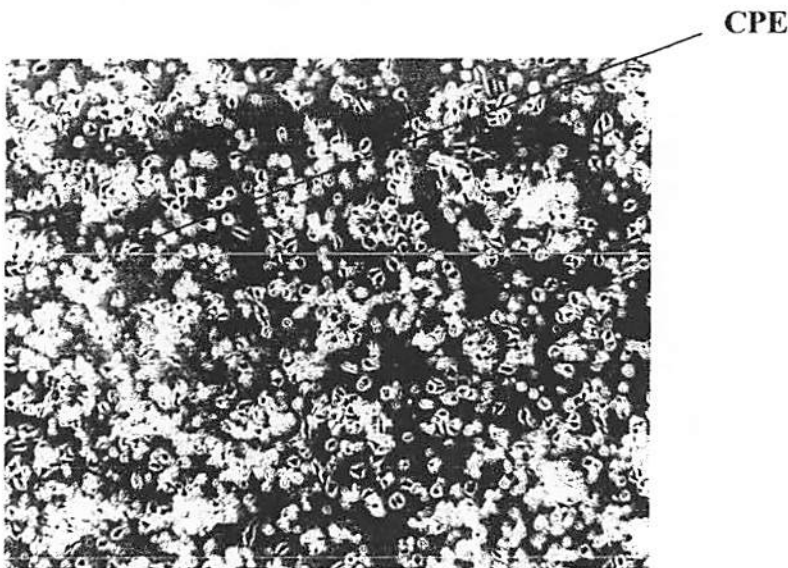
Pada hari ketiga mulai nampak monyet mengalami penurunan nafsu makan dan malas bergerak. Hari ke-6 monyet nampak sedikit batuk dan lemas, tetapi tidak mengalami peningkatan kecepatan pernafasan. Pada hari kedelapan setelah infeksi monyet dibunuh dengan menyuntikkan ketamine dosis 3 ml, dan langsung dilakukan pembedahan untuk mengambil organ tubuh.



Gambar 4.2 : Infeksi virus AI H5N1 pada hewan coba monyet

Sampel yang diperoleh setelah dilakukan uji HA, selanjutnya diinokulasi pada sel MDCK untuk perbanyak virus. Panen virus dilakukan tiga hari setelah inokulasi dengan tanda munculnya CPE (Cyto Pathy Effect) pada sel MDCK. Hasil panen virus ini kemudian setelah dilakukan uji HA, dilanjutkan dengan ekstraksi RNA virus serta PCR gen HA dan NA.

Hasil Inokulasi sampel dari monyet pada sel MDCK akan menimbulkan CPE pada kultur sel MDCK seperti pada gambar 4.3,

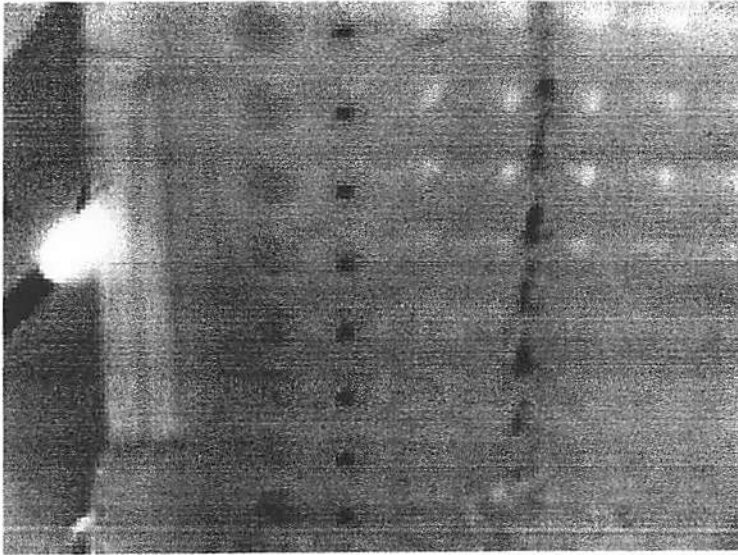


Gambar 4.3 : Sel MDCK mengalami CPE

Hasil panen virus dari sel MDCK dilakukan Uji HA sebagai skrining awal virus di dalam sampel. Pada hasil uji HA positif akan nampak spot pada

dasar plate (plate no 1), sedangkan plate nomor 2 negatif kontrol nampak ada endapan di dasar plate seperti pada gambar 4.4.

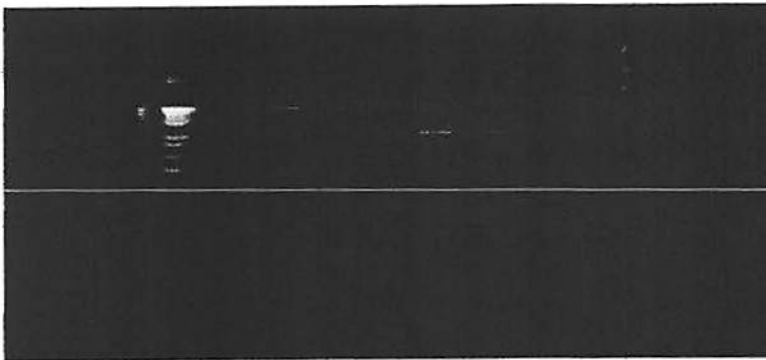
1 2



Gambar 4.4 : Hasil uji HA; 1 (sampel), 2 (kontrol negatif)

Sampel hasil uji HA kemudian dilanjutkan ke pemeriksaan gen HA (H5) dan NA (N!) dengan metode PCR. Hasil PCR gen HA dan NA nampak seperti pada gambar 4.5 dan 4.6.

M 1 3 4



Gambar 4.5 : Hasil PCR gen HA sampel dari monyet.

M(marker), 1 (kontrol negatif), 3 (sampel), 4 (kontrol positif)

Hasil PCR Gen HA spesimen dari monyet menunjukkan hasil positif adanya gen HA dengan menggunakan primer H5 universal yang berasal dari WHO.

M 1 2 3

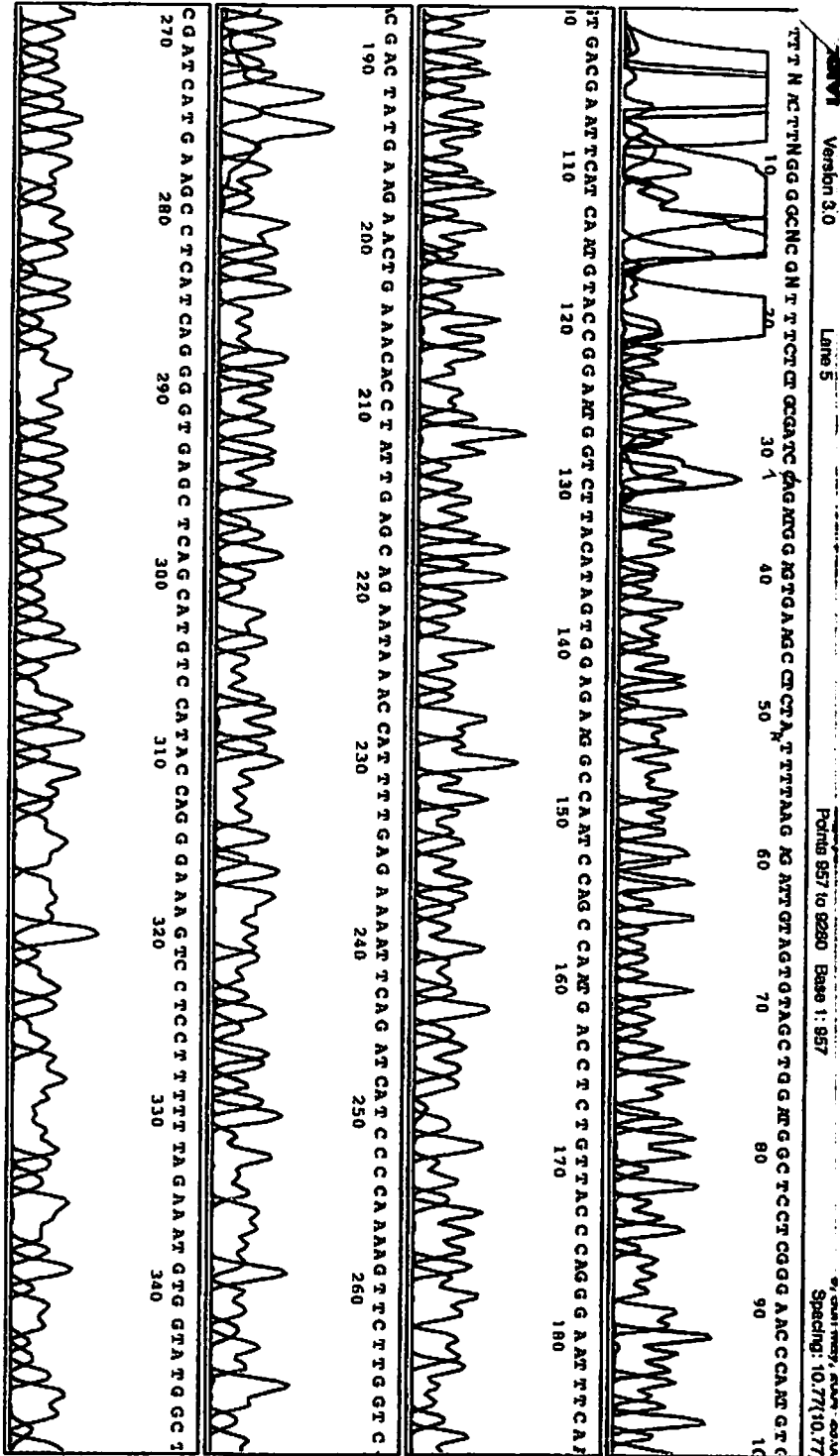


Gambar 4.6 : Hasil PCR gen NA sampel dari monyet

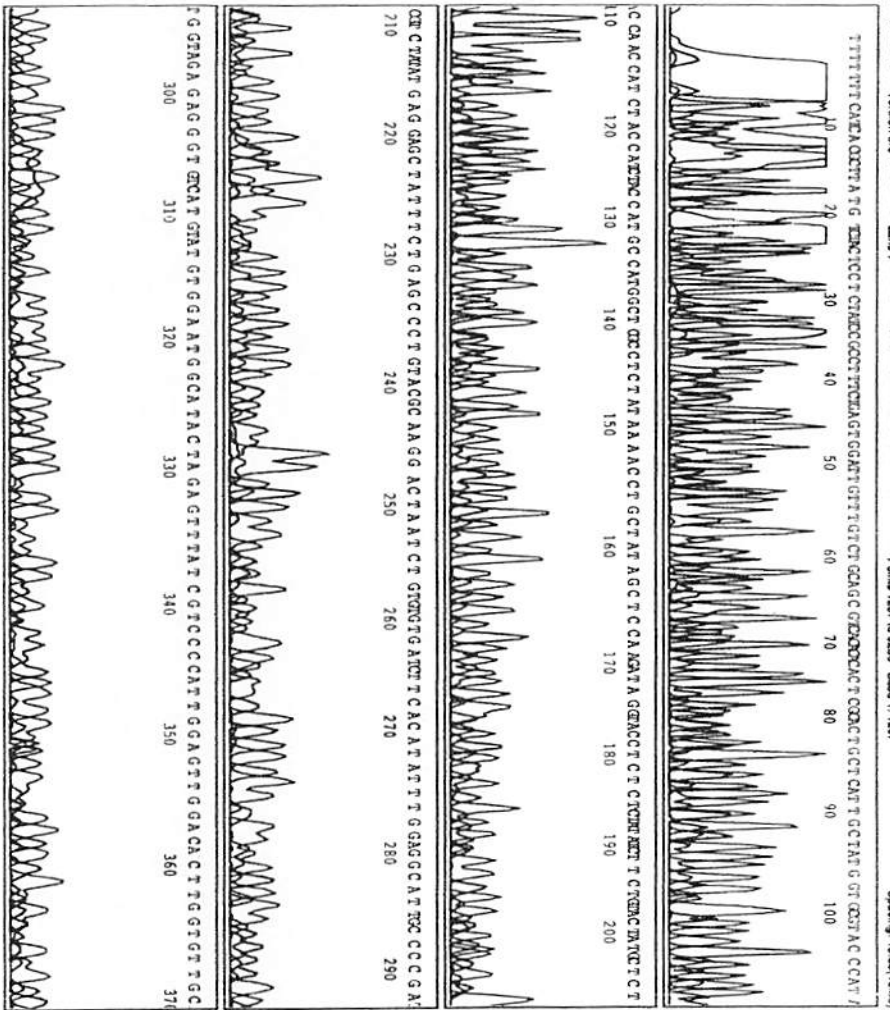
M (marker), 1 (kontrol negatif), 2 (sampel), 3 (kontrol positif)

Hasil PCR gen HA sampel dari monyet menunjukkan hasil positif adanya gen HA dan NA dengan menggunakan primer H5 universal yang berasal dari WHO sehingga dapat dikatakan bahwa hewan coba monyet telah terinfeksi virus AI sub tipe H5N1 yang ditulari virus AI H5N1 clade 2.1.3 yang berasal dari ayam. Untuk mengetahui apakah virus AI H5N1 yang diinfeksi ke monyet telah mengalami mutasi maka dilakukan sekuensing urutan asam amino gen HA dan NA virus.

Hasil sekuensing gen HA dan NA virus AI H5N1 dari hewan coba monyet seperti pada gambar 4.7 dan 4.8.



Gambar 4.7 : Hasil sekuensing gen HA virus AI H5N1 dari monyet



Gambar 4.8 : Hasil Sekuensing gen NA virus AI H5N1 dari monyet

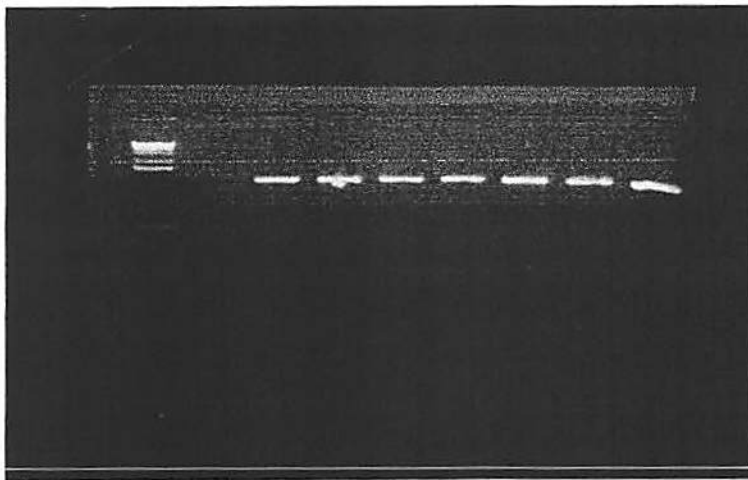
Tahap selanjutnya adalah menganalisis hasil sequencing gen HA dan NA spesimen dari monyet untuk mengetahui tingkat reassortant yang terjadi pada virus Avian Influenza H5N1 yang berasal dari ayam setelah diinfeksi ke monyet dengan memakai *software Bioedit dan Genetic Win V 3.2*.

Berdasarkan hasil analisis ternyata masih belum terjadi perubahan urutan asam amino baik pada gen HA maupun gen NA dari virus AI H5N1 yang diinfeksi pada hewan coba monyet. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis virus yang menginfeksi manusia di Hongkong ternyata ke delapan segmen virusnya sama dengan virus yang menginfeksi ayam di pasar yang mengalami wabah saat itu. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi penularan langsung virus AI H5N1

dari ayam ke manusia tanpa terjadi perubahan urutan asam amino pada gen HA dan NA (Lipatov, 2004).

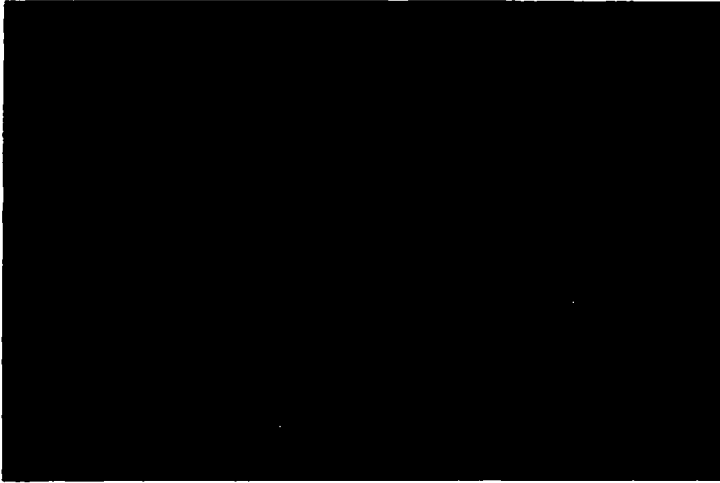
Virus AI H5N1 yang berasal dari monyet kemudian diinfeksi ke hewan coba ayam. Dosis infeksi virus ke ayam diperoleh dari hasil penghitungan konversi dosis dari monyet ke ayam dimana sejumlah 10 ekor ayam diinfeksi virus melalui intratrakheal. Pengamatan gejala klinis yang muncul dilakukan selama tujuh hari dan sampel diambil pada hari ketiga, keenam dan kedelapan melalui swab trakhea dan kloaka. Sampel yang diperoleh kemudian diinokulasikan ke TAB umur 10 hari, setelah empat hari dilakukan panen virus melalui cairan alantois. Seperti pada sampel dari monyet, maka sampel dari ayam juga dilakukan uji HA yang dilanjutkan dengan isolasi gen HA dan NA dengan metode PCR. Hasil PCR gen HA dan NA virus yang diambil dari ayam nampak seperti pada gambar 4.9 dan 4.10.

M N 1 1 1 1 1 P P



Gambar 4.9 : Hasil PCR gen HA virus dari ayam

M (marker), N (kontrol negatif), 1 (sampel dari ayam),
P (kontrol positif)



Gambar 4.10 : Hasil PCR gen NA sampel dari ayam

Hasil PCR gen HA dan NA dilanjutkan dengan sekuensing urutan asam amino gen HA dan NA virus yang kemudian dianalisis dengan program Bioedit dan Genetic Win ver 3.2. Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan urutan asam amino pada gen HA dan NA virus yang berasal dari ayam. Hal ini menunjukkan bahwa virus AI H5N1 dapat menular dari monyet ke ayam tetapi virusnya tidak mengalami perubahan. Untuk mengetahui kemampuan mamalia (manusia) mengadaptasi virus AI H5N1 maka perlu dilakukan uji spesifisitas reseptor. Karena jika terjadi perubahan spesifisitas reseptor dari SA α -2,3 menjadi SA α -2,6 maka hal ini memungkinkan virus untuk menular antar manusia sehingga dapat memicu terjadinya pandemi influenza.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penellitian yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Tidak terjadi perubahan sekuens asam amino pada gen HA dan NA virus yang ditularkan dari ayam ke monyet
2. Tidak terjadi perubahan sekuens asam amino pada gen HA dan NA virus yang ditularkan dari monyet ke ayam

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji spesifisitas reseptor virus AI sub tipe H5N1 yang ditularkan dari ayam ke monyet dan virus AI H5N1 yang ditularkan dari monyet ke ayam
- 2.

DAFTAR PUSTAKA

- Asmara W, 2007. Peran Biologi Molekuler Dalam Pengendalian Avian Influenza Dan Flu Burung. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta 12 Maret 2007
- Asmara ,W. 2005. Mutasi dan reassortasi genetic, shift dan drift antigen virus AI serta pengaruhnya pada patogenisitas dan spesifitas hospes. Prosiding Seminar dan Diskusi Interaktif Flu Burung, 21-28. Medika Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
- Beaglahole R, Bonita R, Kjellstrom. 1993. Basic Epidemiology. WHO. Geneva
- Behrens G. and Stoll M., 2006. Pathogenesis and Immunology of Avian Influenza A (H5N1). Bernd Sebastian Kamps, Christian Hoffmann and Wolfgang Preiser.
- CDC, 2004. Questions and Answers About Avian Influenza (Bird Flu) and Avian Influenza A (H5N1) Virus. Department of Health and Human Servicez Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC. 2004 Up date on Avian Influenza A (H5N1). [http:// www.cdc.gov/flu/Avian/profesional/han081304.htm](http://www.cdc.gov/flu/Avian/profesional/han081304.htm)
- De Jong, M.D dan Hien T.T., 2006. Review Avian Influenza A (H5N1). Journal Of Clinical Virology 35 pp 2-13
- Dybing JK., Schultz S-Cherry, Swayne DE., Suarez DL. and Perdue ML., 2000. Distinct Pathogenesis of Hong Kong-Origin H5N1 Viruses in Mice Compared to That of Other Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Viruses. Journal of Virology. South East Poultry Research Laboratory. Georgia.
- Donateli, L., Campitelli, L., and Trani, L., 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian Poultry, J. Gen. Virol. 82 : 623-630
- Hoffman E, *et al.* 2005. Role Of Specific Hemagglutinin Amino Acids In The Immunogenicity And Protection Of H5N1 Influenza Virus Vaccine. PNAS Vol 102 No 36 pp 12915-12920.
- Harder TC. and Werner O., 2006. Avian Influenza. N. Engl. J. Med.
- He Q, Velumany S, Du Q, Lim CW, Ng Kheong F, Donis R, Kwang J. 2007. Detection of H5 Avian Influenza Viruses by Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using H5-Specificc Monoclonal Antibody. Clinical And Vaccine Immunology Vol.14 No5 pp 617-623

Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. Clin. Microbiol. Rev.

Kobasa D., Jones S.M., Sinya K., Kash J.C., Copps J., Ebihara H., Hatta Y., Kim J.H., Halfmann P., Hatta M., Feldmann F., Alimonti J.B., Fernando L., Li Y., Katze M.G., Feldmann H., and Kawaoka Y. 2007. Aberrant Innate Immune Response In Lethal Infection of Manages with the 1918 Influenza Virus. Nature. Vol445 18 Jan 2007

Ligonus ,B.L. 2005. Avian Influenza Virus H5N1 : A Review of Its History and Information Regarding Its Potential Cause Next Pandemic. Pedriatic Infectious Diseases Seminar.

Lipatov A.S., Govorkova E.A., Webby R.J., Ozaki H., Peiris M., Guan Y., Poon L., and Webster R.G. 2004. Influenza : Emergence and Control. J.Virol.78:8951-8959

Nidom C.A. 2005. Analisis Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi. Universitas Airlangga.

Nidom CA., Dachlan YP., Zarkasie K.2006. Surveilans of Avian Influenza Virus subtype H5N1 on the Pig and Cat, Phylogenetic analysis of Avian Influenza virus which infected on the chicken and human, National Education Ministry.

Radji M. 2006. Avian Influenza A (H5N1) : Patogenesis, Pencegahan dan Penyebaran Pada Manusia. Majalah Ilmu Kefarmasian Vol III No 2 hal 55-65

Raharjo J. dan Nidom CA., 2004. Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka.

Sandbuite M, Jimenez GS, Boon ACM, Smith LR, Treanor JJ. 2007. Cross Reactive Neuraminidase Antibodies Afford Partial Protection against H5N1 in Mice and are present in Unexposed Humans. Plos Medicine Vol 4 pp 0265-0272

Suarez DL., Perdue ML., Cox N., Rowe T., Bender C., Huang J. and Swayne DE., 1998. Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza Viruses Isolated from Humans and Chickens from Hong Kong. J. Virol.

Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taunberger, J.K., Paulson, J.C. and Wilson, L.A. 2006. Structure and receptor specificity of hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. Science, 312:404-10

Swayne, D.E. 2004. Avian influenza, vaccine and control. Poultry Sci.83:79-81

Swayne, D.E., and Suarez, D.L. 2003. Biology of avian influenza especially the change of low pathogenicity virus to high pathogenicity. Proc.Latin American Poultry Congress. Oct.7, 2003

Takano R., Nidom C.A., Kiso M., Muramoto Y., Yamada S., Tagawa Y.S., Macken C., Kawaoka Y. 2009. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003–2007. *Virology* 390 (2009) 13–21.

Takano R., Nidom C.A., Kiao M., Muramoto Y., Yamada S., Shinya K., Tagawa Y.S., and Kawaoka Y. 2009. Comparison of the Pathogenicity of Avian and Swine H5N1 Influenza Virus in Indonesia. *Virol* 154 : 677-681.

Taubenberger JK., 1998. Influenza Virus Hemagglutinin Cleavage into HA1, HA2: No Laughing Matter. *Proc Natl Acad Sci USA*. <http://amedeo.com/lit.php?id=9707539>

Tumpey, T.M., Suarez, D.L., Perkin, L., L., L., Senne, D.A., Lee, J.G., Lee, Y.J., Mo, L.P., H.W., and Swayne, D.E., 2002. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *J.Virol* 76 (12):6344-6255

US Department of Labor, 2004. Avian Influenza Protecting Poultry Workers at Risk. Occupational Safety and Health Administration Directorat of Science, Technology and Medicine. USA.

WHO, 2004. WHO International Guidelines on Clinical Management of Humans Infected by Influenza A (H5N1). http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/Guidelines_Clinical%20Management_H5N1_rev.pdf

WHO, 2008, Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO 10 September 2008 <http://www.who.int>

4

Anggota Peneliti

BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI

BIODATA PENELITI

Nama Lengkap : Kadek Rachmawati, Drh,M.Kes
N IP : 132 161 175
Tempat/Tanggal Lahir : Denpasar,25 Juli 1968
Jenis Kelamin : Perempuan
Bidang Keahlian : Biologi Molekuler
Kantor/Unit Kerja : FKH dan ITD-Laboratorium Avian Influenza

Universitas Airlangga

Alamat Kantor : FKH Kampus C Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo

Kota : Surabaya **Kode Pos : 60155**

Telepon : (031) 031-5993015)

Faksimile : (031) 031-5993015)

E-Mail : fkh@ unair ac.id

Alamat Rumah : Jl.

Kota : Surabaya **Kode Pos :**

Telepon : (031- 031-8721325)

Faksimile : (-)

E-Mail : kadekrachmawati@yahoo.co.id

No. Telepon Genggam : 08123294525

4.2. Pendidikan (S1 Keatas)

Tahun 1995	Institusi FKH-Unair	Gelar Drh
Tahun 2003	Institusi Program Pasca Sarjana- Unair	Gelar M.Kes

PENGALAMAN RISET

Judul Riset	Tahun
Analisis Filogenetik Haemagglutinin Virus Avian Influenza Yang Menginfeksi Babi Di Indonesia	2006
Clinical Evaluation of Conventional and Reverse Genetic Vaccines For Chicken Against H5N1-HPAI Viruses	2007
Antibody Titre Of Domestic Chicken (<i>Gallus Domesticus</i>) Post Vaccination Of Avian Influenza With Homolog H5N1 Vaccine and Heterolog H5N2 Vaccine, diseminarkan di Permi Cabang Surabaya Tanggal 12 Juli 2008	2008
Perbandingan Titer Antibodi Ayam Setelah Pemberian Vaksin Avian Influenza H5N1 Konvensional Dengan Vaksin Avian Influenza H5N1 Reverse Genetik	2008

BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI

4.1. Nama lengkap dan gelar : Mia Ika Dewisavitry, drh
Tempat / tanggal lahir : Malang, 19 Mei 1984

4.2. Pendidikan

NO	UNIVERSITAS / INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG STUDI
1.	S1 Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga	S.KH	2007	Kesehatan
2.	Profesi Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga	DRH	2008	Kesehatan

4.3. Pengalaman kerja dalam penelitian.

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA
Laboratorium Avian Influenza, ITD UNAIR	Peneliti	Agustus 2008- sekarang

4.4. Daftar publikasi penelitian.

NO	JUDUL	TAHUN	DITERBITKAN
1.	Deteksi Antibodi Avian Influenza H5N1 Pada Kucing (<i>Felis silvestris catus</i>) di Jakarta	2007	Skripsi
2.	Detection of Antibodi of H5N1 Avian Influenza Virus In Cat (<i>Felis silvestris catus</i>) Serum by Using Combination of Serologis Assay	2007	Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia Banjarmasin, 31 Agustus – 1 September 2008
3.	Highly Pathogenic Avian Influenza Survaillance of Various Animal in Surabaya,	2008	Microbiological Meeting, Hanoi, Vietnam, 5 Oktober 2008
4.	The Capability of Flutect Mask Against Avian Influenza Virus Subtype H5N1 Infection (Pre-	2009	Second Conference Airlangga University – USM Malaysia

Draft untuk Publikasi Internasional (Clinical Virology atau Pathology Journal)

**Tingkat Reassortant Virus Avian Influenza H5N1 Pada Unggas
dan Monyet Sebagai Model Penularan Virus Flu Burung
dari Manusia ke Hewan**

Kadek Rachmawati, Mia Ika Dewisavitry

ABSTRAK

Sejak akhir tahun 2003, virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004). Tidak kurang dari 336 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza subtipe H5N1 dan 207 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 113 orang sampai dengan 4 Desember 2007 dan 91 orang diantaranya meninggal (WHO, 2007).

Tujuan Penelitian ini adalah menganalisis model penularan virus Avian Influenza H5N1 dari manusia ke hewan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Animal BSL-3 (ABSL-3) Laboratorium Avian Influenza ITD Unair. *Maccaca fascicularis* diinfeksi dengan virus AI subtipe H5N1 dari unggas, kemudian ayam diinfeksi virus AI subtipe H5N1 yang berasal dari monyet, kemudian diambil swab nasal dan nasopharink pada monyet dan swab trakhea dan kloaka pada ayam di hari ketiga, keenam dan kedelapan untuk mengamati pola mutasi fragmen HA dan NA virus AI H5N1 dengan menggunakan teknik PCR dan sekuensing.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen HA dan NA virus AI subtipe H5N1 yang ditularkan dari ayam ke monyet dan dari monyet ke ayam tidak mengalami perubahan urutan asam amino pada gen HA dan NA.

Pendahuluan

Avian Influenza adalah penyakit viral pada unggas, termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza type A. Penyakit ini dikenal juga dengan nama avian flu dan dapat menimbulkan penyakit dengan derajat

keparahaan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik (Swayne, 2000).

Sejak akhir tahun 2003, virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004).

Selain pada unggas, virus *avian influenza* dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Tidak kurang dari 336 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus *avian influenza* sub tipe H5N1 dan 207 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 113 orang sampai dengan 4 Desember 2007 dan 91 orang diantaranya meninggal (WHO, 2007).

Virus *Avian Influenza* memiliki delapan gen yang terdiri dari gen Hemaglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) yang merupakan gen eksternal;

gen Matriks (M); Nukleoprotein (NP); Polymerase A (PA); Polymerase B2 (PB2) dan gen Non-struktural (NS) yang merupakan gen internal. Ke delapan gen ini masing-masing memiliki *Open Reading Frame* (ORF), sehingga ekspresi proteinnya tidak tergantung satu sama lainnya (Nidom, 2005; Horimoto *et al.*, 2003).

Fragmen HA (Haemagglutinin) dan NA (Neuraminidase) merupakan 2 fragmen dari virus flu burung yang memiliki peranan penting dalam proses infeksi virus Flu Burung baik pada manusia maupun pada hewan. Fragmen HA adalah suatu glikoprotein yang terdapat di permukaan virus merupakan target netralisasi antibodi serta bertanggung jawab untuk pengikatan virus ke reseptor sel inang sehingga virus dapat masuk ke dalam sel melalui proses endositosis. Sedangkan fragmen NA berperanan untuk penempelan virus baru yang terbentuk di dalam inti sel inang yang terinfeksi pada reseptor yang terdapat di dalam sel inang, sehingga virus baru tersebut dapat ke luar dan menginfeksi sel inang yang lain.(Stevens, 2006).

Virus Influenza A mudah bermutasi, terutama pada fragmen Haemagglutinin(HA) dan Neuraminidase(NA). Sampai saat ini telah diketahui terdapat 15 subtipe HA, H1 – H15 dan 9 subtipe NA, N1 – N9 yang disebabkan karena virus ini mampu mengubah diri melalui proses *antigenic drift* dan *antigenic shift* (Nidom dan Raharjo, 2004). Virus Influenza umumnya secara genetik sangat labil dan mudah beradaptasi untuk menghindari dari pertahanan inang karena virus Influenza yang memiliki genom berupa RNA tidak memiliki mekanisme "*proofreading*" dan perbaikan apabila terjadi kesalahan saat replikasi berlangsung. Hal ini memicu

perubahan komposisi genetik virus saat bereplikasi pada manusia maupun hewan sehingga dapat menimbulkan strain virus baru (Ligonus, 2005).

Kajian tentang perubahan virus flu burung pada daerah endemis dan non endemis membutuhkan penelitian lebih lanjut terutama pada fragmen Haemagglutinin dan Neuraminidase.

METODE PENELITIAN

4.1 Koleksi Sampel

Sampel didapat dari swab nasal dan nasopharink *Maccaca fascicularis* serta swab trakhea dan kloaka ayam yang diinfeksi virus AI subtipo H5N1. Sampel yang diperoleh kemudian dimasukkan pada medium transport dan disimpan dalam lemari es -80°C sampai saat digunakan.

4.2. Inokulasi Medium Transport pada Ayam Bertunas (TAB)

Untuk memperbanyak virus yang diperoleh maka sampel diinokulasi pada TAB untuk sampel dari ayam dan pada sel MDCK untuk sampel dari monyet.

Inokulasi sampel pada TAB dilakukan dengan cara menempatkan telur pada sisi tumpul di bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70% ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan alantois. Ambil 1 spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur dan tentukan lokasi embrio dengan menggunakan "egg candler", masukkan jarum ke lubang pada telur menembus membran amnion dan inokulasikan 100 µl spesimen ke ruang amnion. Tarik jarum 0,5cm dan inokulasikan 100 µl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkulasi telur tersebut pada suhu 33-37°C selama 2-3 hari. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan telur tersebut pada suhu 33-37°C selama 2-3 hari.

Inokulasi sampel pada sel MDCK dilakukan dengan cara memastikan terlebih dulu bahwa sel MDCK dalam keadaan konfluen sebelum inokulasi virus. Sel MDCK dicuci dengan menggunakan media DMEM tanpa FBS sebanyak 2 kali sebelum diinokulasi. Sel yang telah dicuci diinkubasi pada suhu 37°C sebelum diinokulasi dengan virus. Ketika inokulasi virus, media dalam *flask*

dibuang dan ditambahkan sekitar 100 µl virus, kemudian *flask* diinkubasi selama 1-2 jam. Setelah inkubasi selama 1-2 jam, ditambahkan 1 ml media DMEM dengan tripsin ke dalam *flask* dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan kandungan 5% CO₂. Hari berikutnya media dalam *flask* diganti dengan media baru dengan komposisi yang sama dengan media sebelumnya dan kemudian diinkubasi kembali 2 sampai 4 hari. Hari ketiga inkubasi dilakukan pengamatan apakah telah terjadi CPE dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus M-10). Pembentukan CPE akan teramati umumnya pada hari ketiga, dan pada hari ke-4. Sel dengan CPE positif dapat disimpan pada suhu 4°C, jika akan digunakan langsung dilakukan uji HA atau perlakuan lainnya atau disimpan pada suhu -20°C.

4.3. Metode Uji HA

Uji HA dilakukan untuk skrining awal sampel yang diperoleh. Jika hasilnya positif maka ada kemungkinan sampel tersebut memiliki gen HA, Namun belum bisa dipastikan sampel tersebut mengandung virus AI. Uji HA dilakukan dengan cara memasukkan 50 µl PBS pada lubang A2-H12 dari mikroplate, kemudian masukkan 100µL kontrol antigen atau isolat lapangan dari A1-F1. Pindahkan 50µl dari lubang pertama sampai dengan terakhir kemudian tambahkan RBC *Guinea pig* (marmut) 0,75% untuk sampel dari monyet atau RBC ayam untuk sampel dari ayamj, *shake* dengan mekanikal vibrator dan inkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit. Cek timbulnya spot pada bagian dasar mikroplate, jika timbal endapan hasilnya negatif jika timbal spot seperti pasir hasilnya positif.

4.4. Metode PCR

Sebelum dilakukan pengecekan adanya gen HA H5 melalui metode PCR, maka terlebih dulu dilakukan ekstraksi RNA virus dari cairan alantois atau sel MDCK dengan mengikuti prosedur dari *Qiagen RNAeasy TM RNA Isolation Kit*. Setelah RNA virus berhasil diisolasi, maka reaksi PCR dilakukan untuk mendeteksi

virus flu burung subtipe H5N1 (HA H5 dan NA N1). Adapun prosedur PCR yang dilakukan mengikuti prosedur dari WHO dengan menggunakan primer sesuai standar WHO. Kemudian campuran PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*DNA Thermal cycler*) dengan program PCR yaitu : untuk proses denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 50°C selama 1 menit dan *extension* selama 3 menit. Siklus PCR dilakukan 35 siklus kemudian hasil PCR dianalisis dengan metode elektroforesis.

Untuk keperluan ELP (elektroforesis) maka disiapkan gel agarose yang ditambah pewarna *ethidium bromide*. Aplikasikan produk PCR ke dalam lubang pada cetakan gel agarose, kemudian dirunning dengan memakai arus listrik. Hasil ELP divisualisasi di bawah sinar ultraviolet, kemudian didokumentasi dengan kamera digital.

4.5. Sekuensing Virus Flu Burung Subtipe H5N1

Sekuensing dilakukan dengan metoda *indirect sequencing*. Produk PCR dilakukan purifikasi terlebih dahulu, kemudian dilakukan *labelling* dengan primer *forward (sense)* atau *reverse (antisense)* dengan menggunakan *Bigdye Terminator*. Hasil sekuensing selanjutnya akan dilakukan pengujian dengan menggunakan program *Genetic Win V 3.2*.

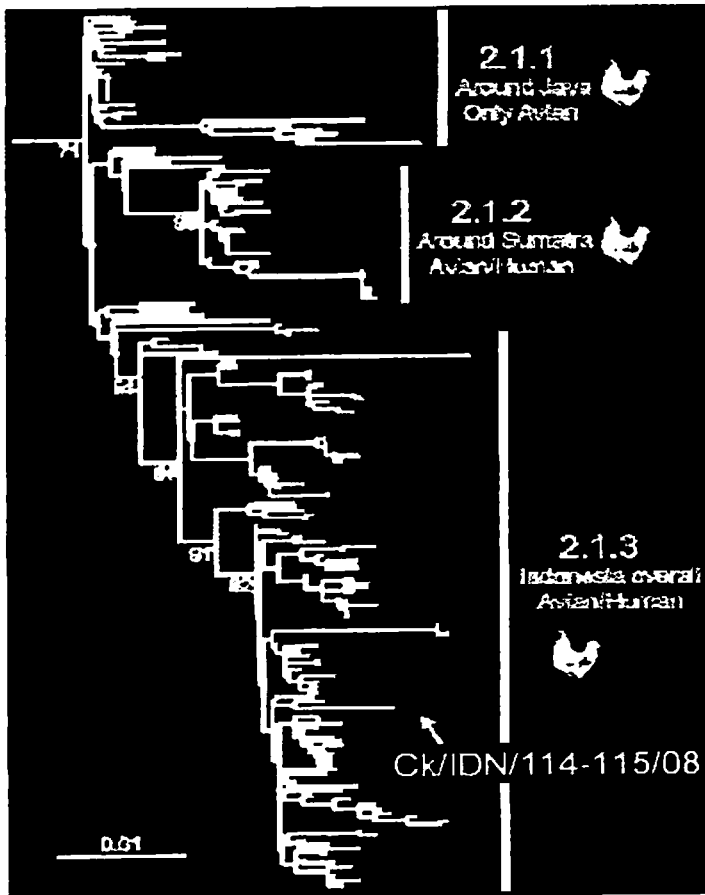
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah dilakukan mulai Juni 2009 sampai dengan Oktober 2009. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Avian Influenza, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Surabaya. Semua kegiatan yang berkaitan dengan Virus hidup dilaksanakan pada fasilitas laboratorium Animal BSL-3 (ABSL-3).

Isolat virus Avian Influenza H5N1 yang digunakan untuk menginfeksi hewan coba monyet dalam penelitian ini milik Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga yang berasal dari ayam yang terinfeksi virus AI. Ayam tersebut berasal dari pasar basah di wilayah Surabaya, dan positif terinfeksi virus AI H5N1 berdasarkan hasil analisis sampel yang diambil. Virus yang diperoleh diberi kode : A/Ck/Indonesia/114/2008 (H5N1). Berdasarkan uji keganasannya

virus ini mempunyai nilai HA lebih tinggi dibanding yang lainnya, dan dari hasil analisis filogenetiknya termasuk ke dalam *clade* 2.1.3 virus Avian Influenza H5N1 (Reviany, 2008). Menurut Takano (2009), virus AI H5N1 yang menyerang unggas di Indonesia pada umumnya dibagi menjadi tiga *clade* yaitu *clade* 2.1.1, *clade* 2.1.2 dan *clade* 2.1.3. Komposisi *clade* ini dari tahun 2003 sampai dengan tahun 2008 terus mengalami perubahan. Pada awalnya hanya terdapat ketiga *clade* tersebut pada isolat di Indonesia, namun dalam perkembangannya saat ini dijumpai pula *sublineage* baru yang digolongkan menjadi *lineage* IDN/6/05. Lebih jauh dikatakan bahwa proporsi *clade* dari isolat virus H5N1 di Indonesia mengalami perubahan tiap tahun dimana sejak tahun 2005 sampai saat ini *clade* virus 2.1.3 yang menginfeksi unggas dan manusia di pulau Jawa merupakan *clade* dominan di Indonesia, sedangkan *clade* 2.1.1 yang menyerang unggas di pulau Jawa dan *clade* 2.1.2 yang menyerang unggas dan manusia di pulau Sumatra mulai jarang dijumpai sejak tahun 2005. Penemuan ini menunjukkan bahwa sejak masuknya virus H5N1 ke Indonesia, terjadi evolusi *sublineage* virus yang berbeda dan *clade* virus 2.1.3 merupakan *clade* dominan sejak tahun 2005 dan secara sporadis ditransmisikan ke manusia.

Isolat A/Ck/Indonesia/114/2008 (H5N1) digunakan dalam penelitian ini dengan pertimbangan karena termasuk *clade* 2.1.3 yang dapat menyerang unggas dan manusia. Virus tersebut mempunyai kekerabatan dengan virus yang menginfeksi unggas dan manusia di daerah Jabotabek atau yang menimbulkan kematian pada manusia di daerah Jabotabek.



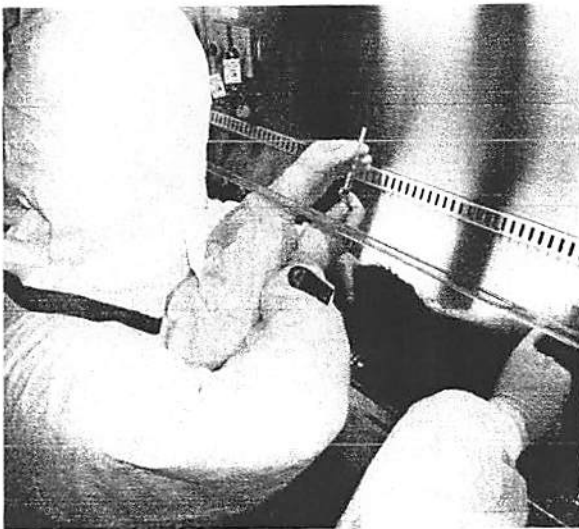
Gambar 4.1 : Isolat virus A/Ck/114/Indonesia/2008 termasuk ke dalam clade 2.1.3

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini ada dua jenis yaitu monyet dan ayam, dengan harapan monyet mewakili mamalia dalam hal ini manusia, sedangkan ayam untuk mewakili bangsa unggas. Hal ini melihat dari penularan virus AI H5N1 yang sudah dapat menular langsung dari ayam ke manusia seperti pada kasus infeksi virus AI H5N1 di Hongkong tahun 1997 telah terjadi penularan langsung virus AI H5N1 dari ayam ke manusia.

Hewan coba monyet (*Macaca fascicularis*) diinfeksi virus AI H5N1 dengan dosis yang sebelumnya diperoleh dari penghitungan hasil EID50 (Egg Infection Dose 50) pada telur yang diinokulasi virus yang diencerkan secara serial, ternyata diperoleh hasil pada pengenceran 10^7 . Dosis ini dipakai sebagai dasar untuk melakukan penghitungan MLD50 (Mice Lethal Dose 50) pada mencit

yang diinfeksi virus AI H5N1 dan diperoleh hasil 10^1 (Takano,2008). Hasil MLD50 ini yang digunakan untuk dasar dosis infeksi virus AI H5N1 ke hewan coba monyet. Saat melakukan infeksi maka monyet dianestesi dengan ketamine dengan dosis 0,3ml agar memudahkan penanganan serta mengurangi rasa sakit pada hewan coba (Kobasa, 2007). Setelah infeksi virus maka dilakukan pengamatan gejala klinis yang muncul selama tujuh hari, tetapi pada hari pertama dan kedua setelah infeksi pengamatan dilakukan setiap enam jam. Sampel berupa swab nasal dan nasopharynk diambil pada hari ketiga, keenam dan kedelapan setelah infeksi..

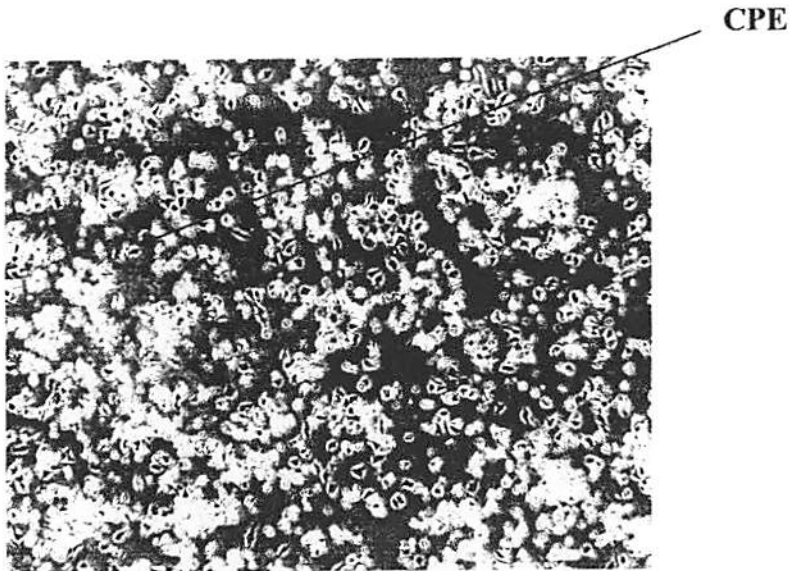
Pada hari ketiga mulai nampak monyet mengalami penurunan nafsu makan dan malas bergerak. Hari ke-6 monyet nampak sedikit batuk dan lemas, tetapi tidak mengalami peningkatan kecepatan pernafasan. Pada hari kedelapan setelah infeksi monyet dibunuh dengan menyuntikkan ketamine dosis 3 ml, dan langsung dilakukan pembedahan untuk mengambil organ tubuh.



Gambar 4.2 : Infeksi virus AI H5N1 pada hewan coba monyet

Sampel yang diperoleh setelah dilakukan uji HA, selanjutnya diinokulasi pada sel MDCK untuk perbanyak virus. Panen virus dilakukan tiga hari setelah inokulasi dengan tanda munculnya CPE (Cyto Pathy Effect) pada sel MDCK. Hasil panen virus ini kemudian setelah dilakukan uji HA, dilanjutkan dengan ekstraksi RNA virus serta PCR gen HA dan NA.

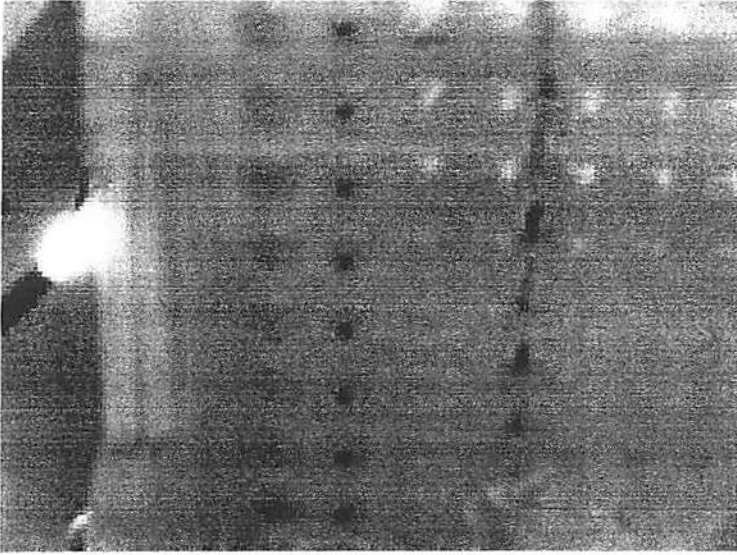
Hasil Inokulasi sampel dari monyet pada sel MDCK akan menimbulkan CPE pada kultur sel MDCK seperti pada gambar 4.3,



Gambar 4.3 : Sel MDCK mengalami CPE

Hasil panen virus dari sel MDCK dilakukan Uji HA sebagai skrining awal virus di dalam sampel. Pada hasil uji HA positif akan nampak spot pada dasar plate (plate no 1), sedangkan plate nomor 2 negatif kontrol nampak ada endapan di dasar plate seperti pada gambar 4.4.

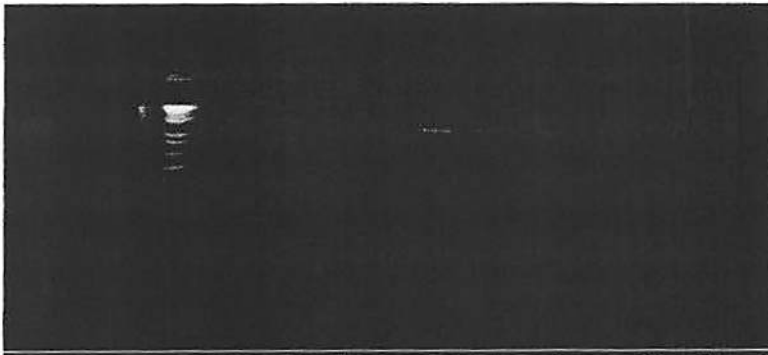
1 2



Gambar 4.4 : Hasil uji HA; 1 (sampel), 2 (kontrol negatif)

Sampel hasil uji HA kemudian dilanjutkan ke pemeriksaan gen HA (H5) dan NA (N!) dengan metode PCR. Hasil PCR gen HA dan NA nampak seperti pada gambar 4.5 dan 4.6.

M 1 3 4



Gambar 4.5 : Hasil PCR gen HA sampel dari monyet.

M(marker), 1 (kontrol negatif), 3 (sampel), 4 (kontrol positif)

Hasil PCR Gen HA spesimen dari monyet menunjukkan hasil positif adanya gen HA dengan menggunakan primer H5 universal yang berasal dari WHO.

M 1 2 3



Gambar 4.6 : Hasil PCR gen NA sampel dari monyet

M (marker), 1 (kontrol negatif), 2 (sampel), 3 (kontrol positif)

Hasil PCR gen HA sampel dari monyet menunjukkan hasil positif adanya gen HA dan NA dengan menggunakan primer H5 universal yang berasal dari WHO sehingga dapat dikatakan bahwa hewan coba monyet telah terinfeksi virus AI sub tipe H5N1 yang ditulari virus AI H5N1 clade 2.1.3 yang berasal dari ayam. Untuk mengetahui apakah virus AI H5N1 yang diinfeksi ke monyet telah mengalami mutasi maka dilakukan sekuensing urutan asam amino gen HA dan NA virus.

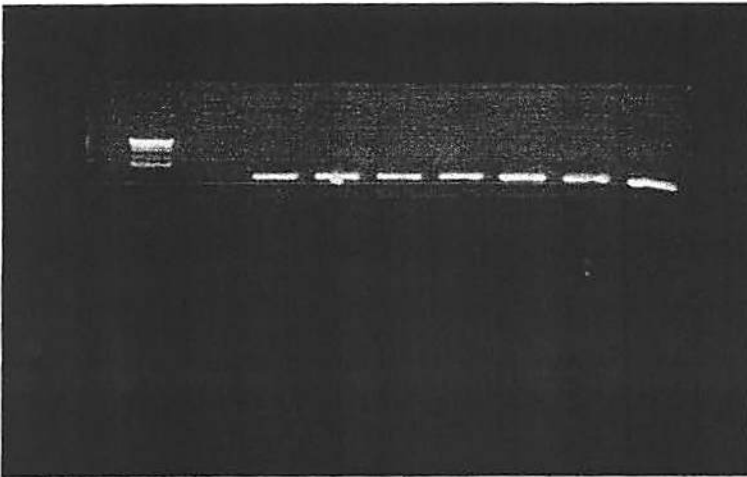
Berdasarkan hasil analisis ternyata masih belum terjadi perubahan urutan asam amino baik pada gen HA maupun gen NA dari virus AI H5N1 yang diinfeksi pada hewan coba monyet. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis virus yang menginfeksi manusia di Hongkong ternyata ke delapan segmen virusnya sama dengan virus yang menginfeksi ayam di pasar yang mengalami wabah saat itu. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi penularan langsung virus AI H5N1 dari ayam ke manusia tanpa terjadi perubahan urutan asam amino pada gen HA dan NA (Lipatov, 2004).

Virus AI H5N1 yang berasal dari monyet kemudian diinfeksi ke hewan coba ayam. Dosis infeksi virus ke ayam diperoleh dari hasil penghitungan konversi dosis dari monyet ke ayam dimana sejumlah 10 ekor ayam diinfeksi virus melalui intratrakheal. Pengamatan gejala klinis yang muncul dilakukan

selama tujuh hari dan sampel diambil pada hari ketiga, keenam dan kedelapan melalui swab trakhea dan kloaka. Sampel yang dipeoleh kemudian diinokulasikan ke TAB umur 10 hari, setelah empat hari dilakukan panen virus melalui cairan alantois. Seperti pada sampel dari monyet, maka sampel dari ayam juga dilakukan uji HA yang dilanjutkan dengan isolasi gen HA dan NA dengan metode PCR. Hasil PCR gen HA dan NA virus yang diambil dari ayam nampak seperti pada gambar 4.9 dan 4.10.

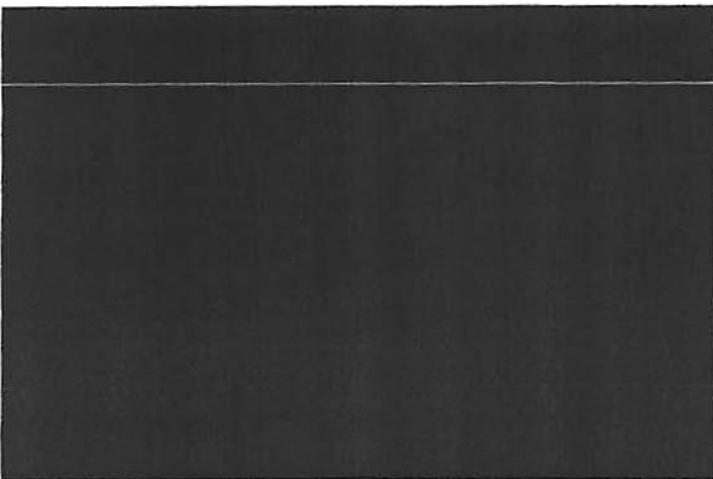
.10.

M N 1 1 1 1 1 P P



Gambar 4.9 : Hasil PCR gen HA virus dari ayam

M (marker), N (kontrol negatif), 1 (sampel dari ayam),
P (kontrol positif)



Gambar 4.10 : Hasil PCR gen NA sampel dari ayam

Hasil PCR gen HA dan NA dilanjutkan dengan sekuensing urutan asam amino gen HA dan NA virus yang kemudian dianalisis dengan program Bioedit dan Genetic Win ver 3.2. Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan urutan asam amino pada gen HA dan NA virus yang berasal dari ayam. Hal ini menunjukkan bahwa virus AI H5N1 dapat menular dari monyet ke ayam tetapi virusnya tidak mengalami perubahan. Untuk mengetahui kemampuan mamalia (manusia) mengadaptasi virus AI H5N1 maka perlu dilakukan uji spesifisitas reseptor. Karena jika terjadi perubahan spesifisitas reseptor dari SA α -2,3 menjadi SA α -2,6 maka hal ini memungkinkan virus untuk menular antar manusia sehingga dapat memicu terjadinya pandemi influenza.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Tidak terjadi perubahan sekuens asam amino pada gen HA dan NA virus yang ditularkan dari ayam ke monyet
2. Tidak terjadi perubahan sekuens asam amino pada gen HA dan NA virus yang ditularkan dari monyet ke ayam

Saran

Dari hasil penelitian maka saran yang diajukan yaitu perlu dilakukan uji spesifisitas reseptor virus AI sub tipe H5N1 yang ditularkan dari ayam ke monyet dan virus AI H5N1 yang ditularkan dari monyet ke ayam

