

Kesehatan

## LAPORAN

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL Batch II**

**Tahun Anggaran 2009**



**Gambaran Perubahan Patologis Pada *Maccaca fascicularis* Yang Terinfeksi Virus Flu Baru H1N1 (Strain Mexico) Dan Virus Flu Burung Subtipe H5N1**

**Prof. Yoes Prijatna Dachlan, dr, M.Sc**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch II Sesuai Prioritas Nasional Nomor :651//SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juli 2009**

**Universitas Airlangga**

**Desember 2009**

Kesehatan

**LAPORAN**

**HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL Batch II**

**Tahun Anggaran 2009**

KKC  
KK  
LP. 261/10  
Dac  
9



**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Gambaran Perubahan Patologis Pada *Maccaca fascicularis* Yang Terinfeksi Virus Flu Baru H1N1 (Strain Mexico) Dan Virus Flu Burung Subtipe H5N1**

**Prof. Yoes Prijatna Dachlan, dr, M.Sc**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch II Sesuai Prioritas Nasional Nomor :651//SP2H/PP/DP2M/VII/2009, Tanggal 30 Juli 2009**

**Universitas Airlangga**

**Desember 2009**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. 1. Judul Penelitian : Gambaran Perubahan Patologis Pada *Maccaca fascicularis* Yang Terinfeksi Virus Flu Baru H1N1 (Strain Mexico) Dan Virus Flu Burung Subtipe H5N1

## 2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Prof Yoes Prijatna Dachlan, dr, SpPar (K)
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 130359278
- d. Pangkat/Golongan: IV D
- e. Jabatan : Dosen
- f. Bidang Keahlian : Immunology
- g. Pusat Penelitian : Laboratorium Avian Influenza, Institute Of Tropical Disease
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

## Tim Peneliti

No	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr.C.A.Nidom,drh,MS	Biologi Molekuler	FKH dan Lab.Avian Influenza	Universitas Airlangga
2	Kadek Rachmawati,drh,M.Kes	Hewan Coba	FKH dan Lab.Avian Influenza	Universitas Airlangga

## 3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian:

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- b. biaya yang diusulkan ke DIKTI : Rp 150.000.000,-
- c. biaya yang disetujui tahun :Rp.150.000.000,-

Ketua  
Institute Of Tropical Disease  
Universitas Airlangga

Surabaya, 14 DEC 2009  
Ketua Peneliti

Dr.Nasronuddin, dr, SpPD-KPTI  
NIP. 140159073

Prof.Yoes Prijatna Dachlan,dr,SpPar (K)  
NIP. 130359278

Mengetahui  
Ketua LPPM-Unan

Prof Dr.Bambang Sektiari,drh,DEA  
NIP.131834004

## RINGKASAN

Influenza merupakan salah satu penyakit menular yang menyebabkan penyakit dan kematian di seluruh dunia pada saat ini. Selain pada unggas, virus *avian influenza* dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Tidak kurang dari 399 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza subtipe H5N1 dan 251 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 22 Januari 2009 dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009).

Virus Influenza yang menyebabkan tingkat kematian yang tinggi pada manusia pada saat ini adalah H1N1 strain Meksiko. Berdasarkan data dari WHO tanggal 6 Juli 2009 lebih dari 90 ribu orang telah terinfeksi H1N1 strain Meksiko dan 450 orang meninggal dunia. Di Indonesia Menteri Kesehatan menetapkan bahwa virus Flu Baru H1N1 strain Meksiko sebagai penyakit yang dapat menimbulkan wabah.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis perubahan patologis *mix infection* antara virus H1N1 dan H5N1 sehingga bisa diketahui patogenesis kedua infeksi tersebut apabila terjadi pada manusia sehingga bisa dilakukan pencegahan secara preventif dan melakukan tindakan medis lainnya sehingga tingkat kematian terhadap kedua virus tersebut dapat dikurangi.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap koleksi sampel terhadap virus H5N1 dan H1N1v didapatkan virus H5N1 yang memiliki subclade 2.1.3 dari unggas yang dapat memiliki kemampuan untuk menginfeksi pada manusia. Selain itu, hasil surveilliance terhadap virus H1N1v di rumah sakit seluruh Surabaya didapatkan 4 isolat H1N1 yang dapat digunakan untuk penelitian *mix infection* pada *macaca fascicularis*. Selain itu, untuk persiapan inokulasi pada hewan coba yaitu *macaca fascicularis* telah dilakukan karantina selama 1 bulan dan telah diadaptasikan pada laboratorium Animal BSL3 Universitas Airlangga. Berdasarkan hasil uji TB terhadap *macaca fascicularis* didapatkan hasil bahwa *macaca fascicularis* yang akan dijadikan hewan coba layak untuk digunakan sebagai hewan coba untuk menganalisis patogenesis terjadinya *mix infection* antara virus H5N1 dan H1N1v.

### **Summary**

Avian Influenza virus was viral disease on the chicken, wild bird, mammals and also human. More than 399 people infected by avian influenza virus and 251 people was died. Recently, according to WHO H1N1 new virus have more than 90 thousand people infected. Purpose of this research was analysis pathologic change between new influenza H1N1 and H5N1. The result of this reserach was H5N1 virus subclade 2.1.3 could infect to macaca fascicularis and got 4 H1N1v from hospital at Surabaya city. After inoculated with H5N1 and H1N1v and analysis by histopathologic, we got different histopathologic on the lung between H5N1 and H1N1v.



## 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 **Gambaran Perubahan Patologis Pada *Maccaca fascicularis* Yang Terinfeksi Virus Flu Baru H1N1 (Strain Mexico) Dan Virus Flu Burung Subtipe H5N1** Tujuan Penelitian ini adalah menganalisis pathogenesis infeksi virus flu burung subtipe H5N1 dan virus flu baru H1N1 strain Meksiko pada hewan coba yaitu pada *Maccaca fascicularis* sebagai model ko-infeksi pada manusia.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya peneliti ucapkan kepada Dirjen DIKTI yang telah memberikan kesempatan untuk mengerjakan penelitian ini sehingga bisa terselesaikan dengan baik. Dan peneliti menerima saran yang membangun sehingga penelitian-penelitian selanjutnya dapat berjalan lebih baik.

Surabaya, 11 Desember 2009

Peneliti



**DAFTAR ISI**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....i**

**A.LAPORAN HASIL PENELITIAN**

**RINGKASAN DAN SUMMARY..... ii**

**PRAKATA..... v**

**DAFTAR ISI..... vi**

**DAFTAR GAMBAR..... vii**

**I.PENDAHULUAN..... 1**

**II. TINJAUAN PUSTAKA..... 2**

**III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE..... 9**

**IV. METODE PENELITIAN..... 9**

**V. HASIL DAN PEMBAHASAN..... 13**

**VI. KESIMPULAN DAN SARAN..... 17**

**DAFTAR PUSTAKA**

**LAMPIRAN**

**B.DAFTAR ARTIKEL ILMIAH**

**C.SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN**

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 virus flu burung subtipe H5N1 fragmen HA.....	14
Gambar 2 Sel MDCK yang telah diinokulasi dengan sampel positif H1N1v.....	14
Gambar 3 Hasil PCR virus H1N1v.....	15
Gambar 4 TCID50 virus H5N1 dan H1N1v pada sel MDCK.....	16
Gambar 5. Paru-paru yang terinfeksi oleh virus H5N1 terjadi inflamasi.....	16
Gambar 6. Paru-paru yang terinfeksi oleh virus H1N1v.....	17



## 1.1 Pendahuluan

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 399 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus *avian influenza* sub tipe H5N1 dan 251 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 22 Januari 2009 dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009). Influenza baru H1N1 merupakan influenza (flu) yang disebabkan oleh virus influenza tipe A sub tipe H1N1 baru strain Meksiko yang selama ini belum pernah menular antar manusia. Virus ini tidak ada kaitannya dengan virus influenza musiman yang ada selama ini (seasonal influenza). Influenza baru H1N1 cukup berbahaya, mudah menular dan dapat menimbulkan kematian karena virus strain baru influenza H1N1 ini lebih berbahaya dibanding flu musiman seperti virus flu A H1N1, H2N1, H3N1 dan H3N2 yang biasa terdapat pada seseorang yang menderita flu musiman. Penyebaran flu baru H1N1 telah menyebar di 76 negara dengan

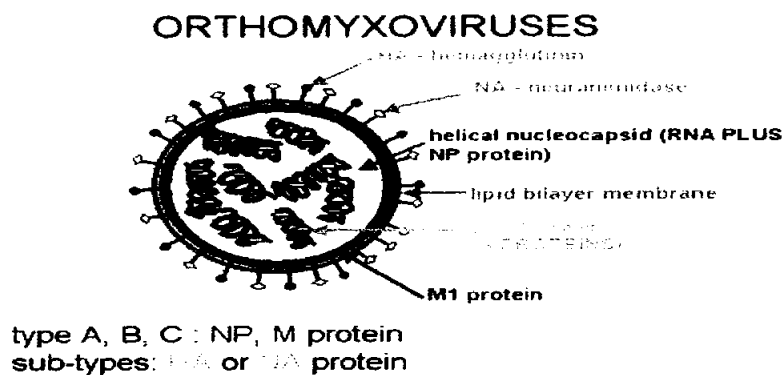
35.928 kasus yang dilaporkan dan 163 kematian, sehingga Badan Kesehatan Dunia (WHO) menaikkan status kewaspadaan pandemi influenza baru A H1N1 dari fase 5 ke fase 6 yang merupakan fase tertinggi. Meskipun angka kematiannya (Case Fatality Rate/CFR) hanya sekitar 0,5% namun flu baru H1N1 ini mudah menular (Depkes RI, 2009). Penelitian patogenesis infeksi virus flu burung pada mencit telah banyak dilakukan namun hasil penelitian tersebut tidak dapat diekstrapolasikan pada infeksi virus flu burung pada manusia sehingga membutuhkan hewan coba yang memiliki kedekatan yang sama dengan manusia (Rimmelzwaan et al, 2001) sehingga kajian patogenesis virus influenza A (H1N1 strain Meksiko dan virus flu burung subtipe H5N1) pada *Mus musculus* dilakukan. CRC-ERID merupakan kerjasama antara Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga dengan ICMRT Kobe University Jepang. Hasil kerjasama antara dua universitas menghasilkan berbagai jurnal ilmiah internasional sejak tahun 2007 sampai dengan 2011.

## II. STUDI PUSTAKA

### 2.1 Virus Influenza A Subtipe H5N1 Dan H1N1

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 tipe 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).



Gambar 2.1 Struktur virus influenza A (Suarez, 2004)

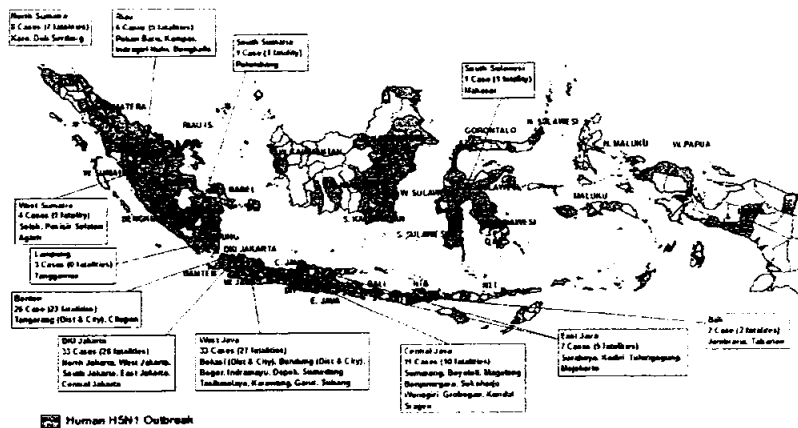
Variasi antigenik pada virus Flu Burung dapat ditemukan frekuensi tinggi dan terjadi melalui 2 cara yaitu antigenic shift dan antigenic drift. Antigenic shift dapat timbul akibat gene reassortment (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza type A sehingga terjadi 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 tipe 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 22 Januari 2009 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 251 orang (WHO, 2009).

Tabel 2.3 Jumlah orang yang terinfeksi oleh virus Flu Burung Sub tipe H5N1 per tanggal 22 Januari 2009

Country	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	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	0	0
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	1	0	0	0
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	4	4	3	1
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	8	4	1	0
Indonesia	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	24	20	0	0
Iraq	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0
Lao People's Democratic Republic	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	6	5	0	0
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	44	33	4	1

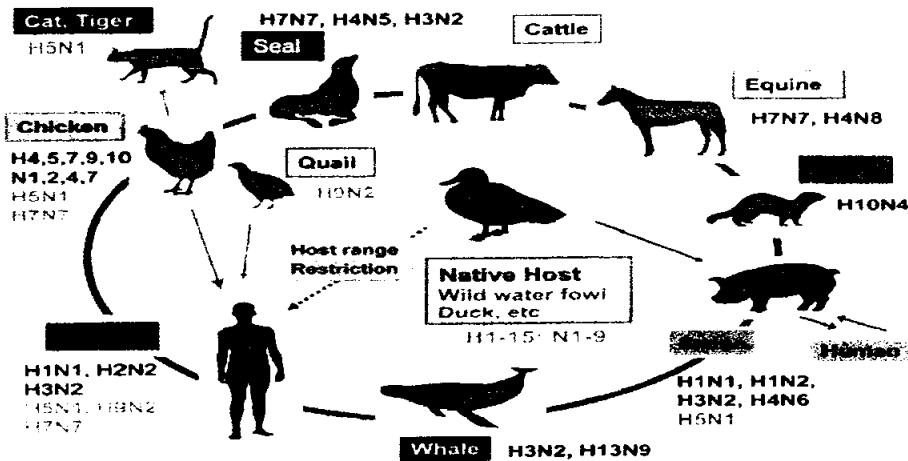
Sumber WHO, 2009

## 2.4 Penularan Penyakit flu burung H5N1 dan H1N1

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 sub tipe H5N1. Ini didasarkan hasil penelitian dari tim FKH-UGM menemukan 2 ekor anjing dan kucing positif terhadap infeksi flu burung sub tipe H5N1 (Asmara, 2007). Selain itu, menurut hasil penelitian yang dilakukan di 6 kota di Indonesia ditemukan prevalensi kucing yang terinfeksi oleh virus flu burung sub tipe 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 influenza pada berbagai spesies dan manusia (Robertson, 2006)

### III. Tujuan dan Manfaat Penelitian

#### 3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian adalah menganalisis pathogenesis infeksi virus flu burung sub tipe H5N1 dan virus flu baru H1N1 strain Meksiko pada hewan coba yaitu pada *Maccaca fascicularis* sebagai model ko-infeksi pada manusia.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah menganalisis patogenesis virus influenza A sub tipe H5N1 dan H1N1 sehingga dapat sebagai masukan untuk penentu kebijakan di dalam penanganan dan pencegahan kasus flu burung dan flu babi.

### IV. METODE PENELITIAN

#### A) Koleksi sampel

Cotton bud yang steril dioleskan pada bagian nasal dan nasopharink pada manusia, bagian kloaka dan nasal pada unggas kemudian dimasukkan ke dalam tabung

yang telah berisi medium transport dan disimpan di dalam lemari es - 80<sup>o</sup> C sampai digunakan untuk proses PCR.

### **B) Inokulasi Medium Transport pada Telur Ayam Bertunas (TAB)**

Tempatkan telur pada sisi tumpul bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70 % ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan ruang alantois. Ambil 1 ml spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur, 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 0,5 cm dan inokulasikan 100 µl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkubasi telur tersebut pada suhu 33-37<sup>o</sup>C selama 2-3 hari.

### **C) Metode Uji HA**

Masukkan 50 ml PBS pada lubang A2-H12 kemudian masukkan 100 µl control antigen atau isolat lapangan dari A1-F1. Pindahkan 50 ml dari lubang pertama s/d terakhir kemudian tambahkan RBC guinea pig (Marmot) 0,75 %, shake dg mekanikal vibrator dan Inkubasi dalam suhu ruang.

### **D) Uji PCR**

Ekstraksi RNA dari cairan alantois mengikuti prosedur dari Qiagen RNAeasy<sup>TM</sup> RNA Isolation Kit. Reaksi PCR dalam mendeteksi virus Flu Burung subtype H5N1 yaitu untuk proses denaturasi 94<sup>o</sup>C selama 1 menit, annealing 50<sup>o</sup>C selama 1 menit dan extension selama 3 menit. Siklus PCR antara 25 sampai dengan 40 siklus kemudian hasil produk PCR dianalisis di dalam Elektroforesis dan difoto untuk analisis hasil.

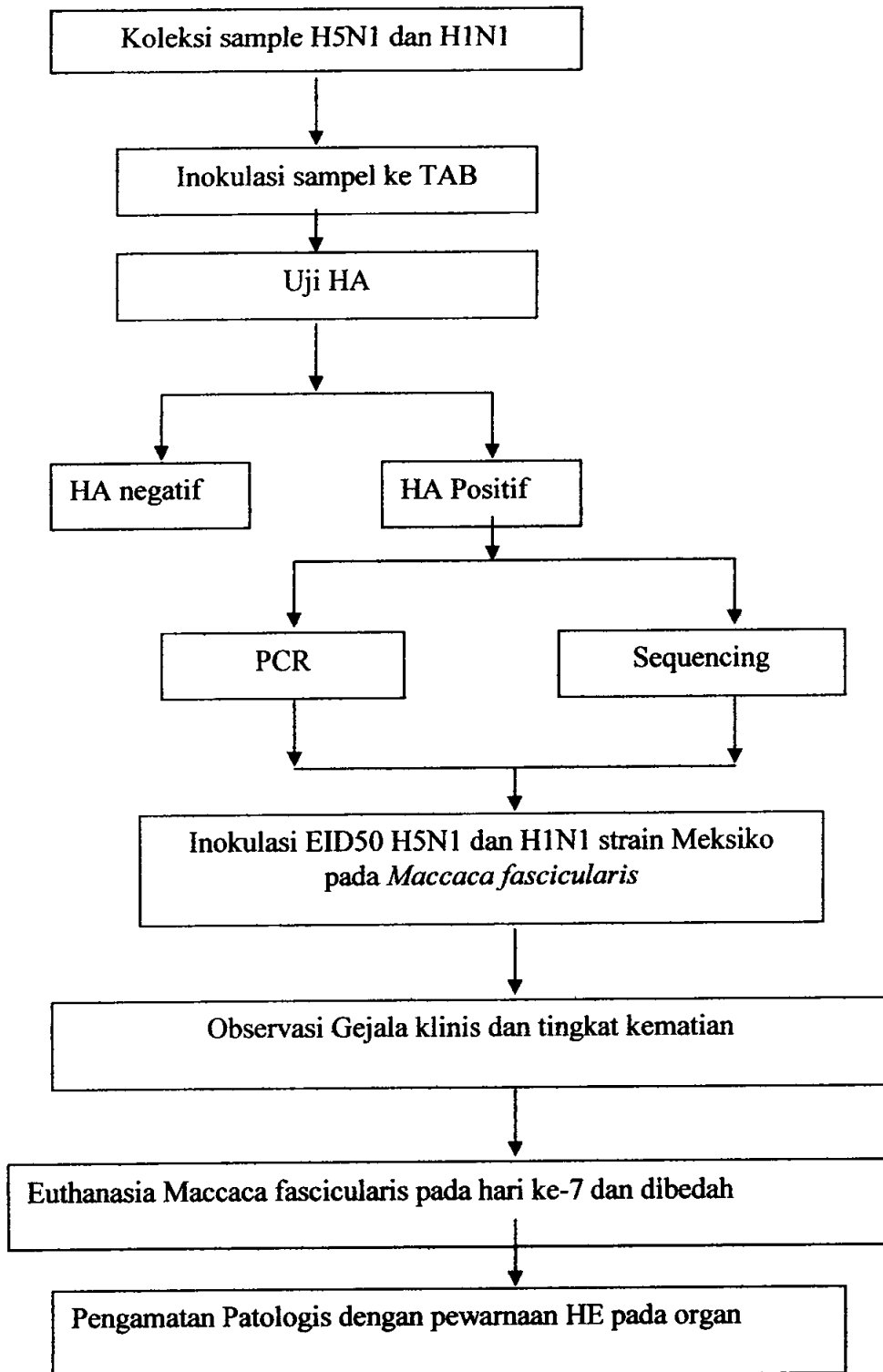
### **E) DNA Sequencing**

DNA dari masing-masing isolat, setelah dimurnikan urutan DNA ditentukan dengan menggunakan mesin ABI Prism 310 Genetic Analyser, yang terdapat di Tropical Disease Center - Universitas Airlangga dengan menggunakan Big Dye Terminator (Perkin Elmer Cetus) dan dinalisa tingkat *homology* dengan menggunakan data dari gen bank.

#### **F) Perlakuan Pada Hewan Coba**

*Macaca fascicularis* diinfeksi dengan virus flu burung dan H1N1 strain meksiko sebanyak TCID50 dan diamati baik gejala klinis yang tampak dan tingkat kematian. Pada hari ke-7 *Macaca fascicularis* dieuthanasia dan dibedah. Organ *Macaca fascicularis* diamati patologis dengan menggunakan mikroskop dan pewarnaan HE.

Alur penelitian ini sebagai berikut :

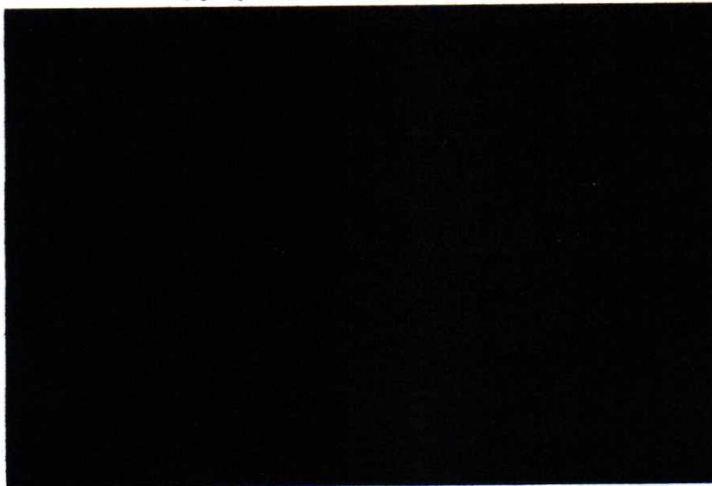




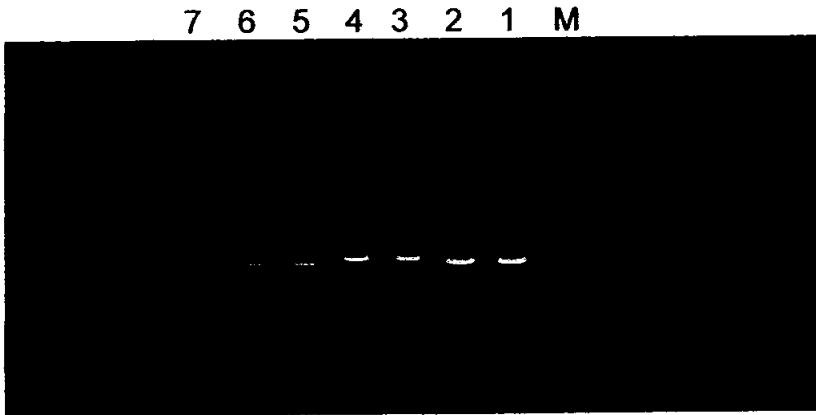
## V. Hasil Dan Pembahasan

Pada penelitian ini menggunakan virus flu burung sub tipe H5N1 dan virus H1N1v yang merupakan dua virus yang memiliki karakteristik yang berbeda. Virus H5N1 merupakan virus yang berasal dari unggas tetapi mampu menginfeksi berbagai macam spesies dan termasuk manusia dengan tingkat kematian atau CFR sebesar 80 %. Sedangkan virus H1N1v memiliki karakteristik mampu menginfeksi antar manusia dengan sangat cepat sehingga Who pada bulan Juni 2009 mengumumkan bahwa telah terjadi pandemi di seluruh belahan dunia. Oleh sebab itu, penelitian untuk menguji kedua virus tersebut pada hewan coba sangat dibutuhkan untuk mengetahui patogenesis kedua virus tersebut apabila terjadi *mix infection*. Berdasarkan hasil surveilance yang telah dilakukan dari tahun 2008 sampai dengan sekarang terhadap virus H5N1 didapatkan virus H5N1 yang memiliki subclade 2.1.3 yaitu virus flu burung yang dapat menginfeksi unggas dan manusia. Hasil PCR virus H5N1 adalah sebagai berikut :

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 M

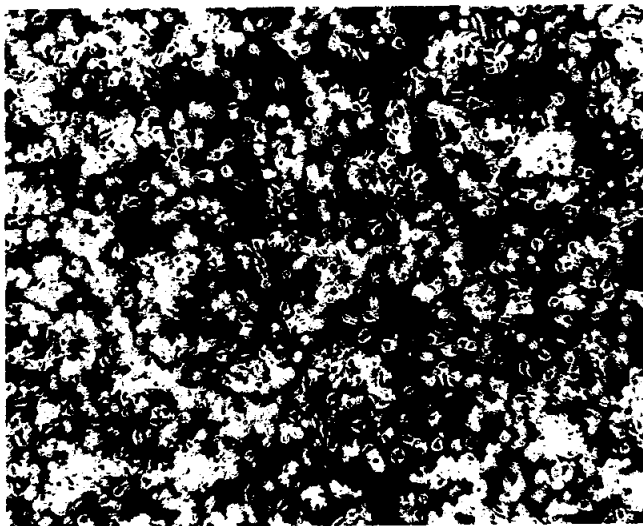


Gambar 1 virus flu burung sub tipe H5N1 fragmen HA



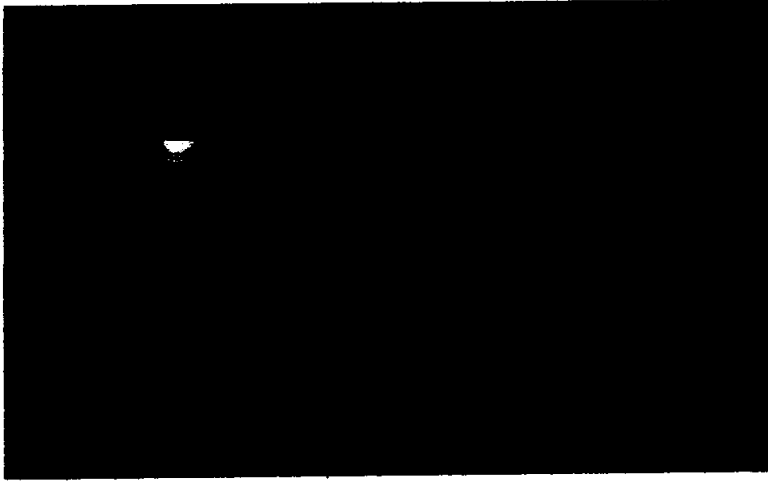
**Gambar 2 virus flu burung sub tipe H5N1 fragmen NA**

Untuk virus H1N1v telah dilakukan surveillence di rumah sakit dan puskesmas seluruh kota surabaya mulai bulan Juni sampai dengan bulan Agustus 2009. Dari hasil surveillence didapatkan 53 sampel yang berasal dari swab nasal dan nasopharink. Berdasarkan hasil inokulasi pada sel MDCK dan hasil PCR didapatkan 4 sampel positif virus H1N1v. Gambaran sel MDCK yang mengalami CPE setelah diinokulasi dengan sampel yang positif terhadap virus H1N1v adalah sebagai berikut



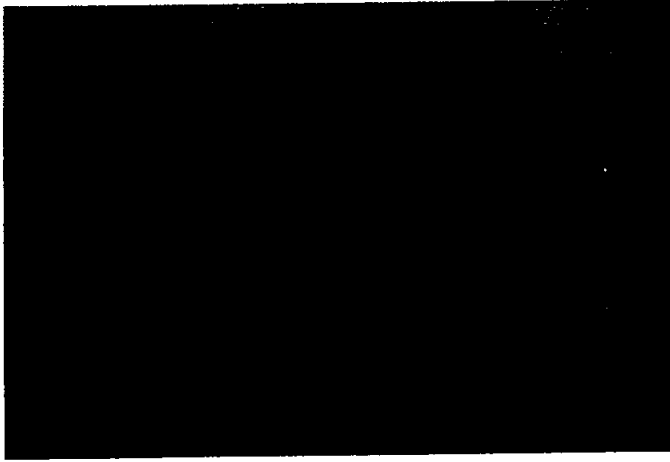
**Gambar 3 Sel MDCK yang telah diinokulasi dengan sampel positif H1N1v**

M 1 2 3 4 5 6 7



Gambar 4 Hasil PCR virus H1N1v

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah macaca fascicularis. Ini disebabkan hewan ini memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan manusia sehingga analisa terhadap patogenesis mix infection antara virus H1N1v dan H5N1 dilakukan secara lebih detail. Hewan *Macaca fascicularis* yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 4 ekor dan diambil dari CV Inquatex dan bersifat SPF (*Specific Pathogenic Free*). *Macaca fascicularis* telah dilakukan karantina selama 2 minggu dan telah dilakukan uji TB (dapat dilihat pada lampiran). Selain itu, hewan coba *Macaca fascicularis* telah diadaptasikan di dalam Laboratorium Animal BSL3 Universitas Airlangga. Untuk persiapan virus yang akan diinokulasi pada hewan coba telah dilakukan pengujian terhadap TCID 50 baik H5N1 maupun H1N1v. Gambaran hasil TCID tersebut adalah sebagai berikut :

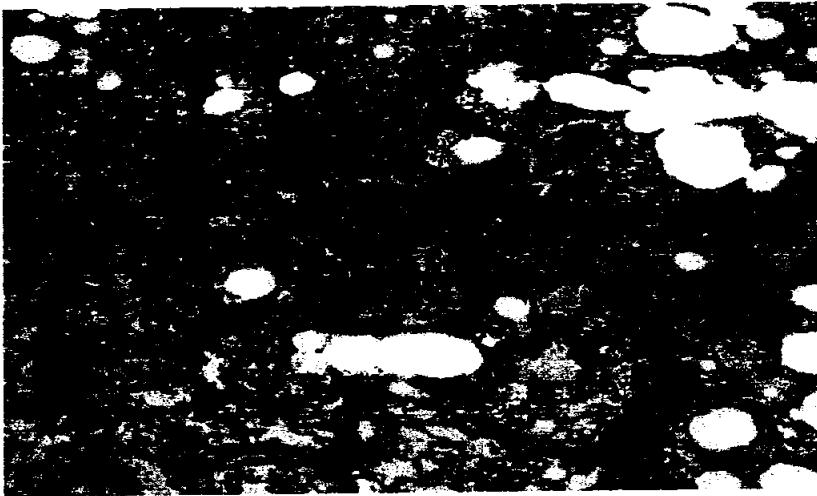


Gambar 5 TCID50 virus H5N1 dan H1N1v pada sel MDCK.

Setelah didapatkan TCID 50 dilakukan inokulasi pada hewan coba dengan menggunakan ketamine sebesar 0,1 ml sehingga inokulasi sesuai dengan peraturan *animal welfare*. Virus dimasukkan pada hewan coba melalui jalur intranasal sebanyak 500 ul untuk nasal kiri dan 500 ul nasal kanan. Observasi terhadap hewan coba dilakukan setiap hari dan pada hari ke 7 hewan coba dimatikan. Kemudian dilakukan pembedahan dan pengambilan organ pernafasan untuk mengetahui perubahan secara histopatologi. Perbedaan gambaran antara virus H5N1 dan H1N1v adalah sebagai berikut :



Gambar 5. Paru-paru yang terinfeksi oleh virus H5N1 terjadi inflamasi



Gambar 6. Paru-paru yang terinfeksi oleh virus H1N1v

## VI. Kesimpulan Dan Saran

### 6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah didapatkan perbedaan antara patogenesis virus flu burung sub tipe H5N1 dan H1N1v dengan menggunakan analisis Histopatologi pada organ paru-paru *Maccaca fascicularis*.

### 6.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lanjutan tentang jumlah virus yang bereplikasi pada masing-masing organ dan gen yang bertanggung jawab terhadap infeksi H5N1 dan H1N1v.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alamudi MY, et al.2008. H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Serosurvey on Poultry Workers In Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16,2008 Sapporo Japan
- Alshawsh MA, et al. 2007. Assessment of antimalarial activity against Plasmodium falciparum and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants eCAM p 1-4
- De Jong,M.D,et al.2005.Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection .N Engl J Med Vol. 353: 2667-72

- 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
- Elfahmi.2006. Phytochemical and Biosynthetic Studies of Lignans with a Focus on Indonesian Medicinal Plants. *Facilitair Bedrijf, University of Groningen, the Netherlands*.thesis.
- Hao L., Sakurai A., Watanabe T., Sorencen E., Nidom C..A., Newton,M.A., Kawaoka Y. 2008. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature*.,vol.524.:64-73.
- 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.
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*
- 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.
- Raharjo J. dan Nidom CA., 2004. Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. *Gita Pustaka.*
- Revianny V. Nidom, et al. 2008. Surveillance of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Indonesia. *Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection*, December 15-16,2008 Sapporo Japan
- 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.*
- 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
- 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
- WHO, 2009, Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO March 11 2009 <http://www.who.int>

## **Lampiran**

### **Sarana Dan Prasarana yang digunakan pada penelitian**

Sarana dan fasilitas laboratorium yang diperlukan lengkap dan menunjang seratus persen kegiatan penelitian ini.

#### **Laboratorium :**

Laboratorium Avian Influenza, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.

#### **Peralatan Utama yang dimiliki :**

1. Ultra Centrifuge
2. Centrifuge
3. Inkubator CO<sub>2</sub>
4. Lemari Es -80° C dan -20° C
5. Mikropipet
6. PCR
7. Mesin Sequencing
8. BSL-3 dan Animal BSL-3

**BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI****BIODATA PENELITI**

**Nama Lengkap** : Prof Yoes Prijatna Dachlan,dr,M.Sc  
**N IP** : 130359278  
**Tempat/Tanggal Lahir** : Denpasar, October 28, 1943  
**Jenis Kelamin** : Laki-laki  
**Bidang Keahlian** : **Imunologi Dan Patogenesis Mikroorganisme**  
**Kantor/Unit Kerja** : **FK dan ITD-Laboratorium Avian Influenza**

**Universitas Airlangga**

**Alamat Kantor** : **ITD Kampus C Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo**

**Kota** : **Surabaya**      **Kode Pos : 60155**  
**Telepon** : ( (031) 031-5993015)  
**Faksimile** : ( (031) 031-5993015 )  
**E-Mail** : tdrcua@rad.net.id

**Alamat Rumah** : **Jl. Jalan Dukuh Kupang Barat XVI / 1 – 3, Surabaya**  
**Kota** : **Surabaya**  
**Telepon** : (031- 5671569 )  
**Faksimile** : ( - )  
**E-Mail** : tdrcua@rad.net.id

**No. Telepon Genggam** : 0818313096

**4.2. Pendidikan (S1 Keatas)**

Tahun 1972	Institusi FK-Unair	Gelar dr
Tahun 1980	University of Amsterdam,Belanda	Gelar M.Sc
1990	Pasca Sarjana Unair	DR

**Pengalaman Riset**

- International Journals**

1. Mosquito species (Diptera: Culicidae) from Lombok Island, Indonesia. Mosquito Systematics, 26(1): 19-24, 1994. (Penulis Pembantu)
2. Contamination of soil with parasite eggs in Surabaya, Indonesia. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth., 26, 730-734, 1995. (Penulis Pembantu)
3. Deletion of twenty seven nucleotides within exon 11 of the band 3 gene identified in ovalocytosis In Lombok Island, Indonesia. Japan J Human Genet 42, 233-236, 1997. (Penulis Pembantu)

4. Current condition and prospective role of the TDC (Tropical Disease Center) Airlangga University in the application of health and technology for accelerating the tropical infections disease elimination. *Tropical Medicine*, Vol. 40, No. 4, December 1998. ISSN 0385-5643. (Penulis Utama)
5. Field trials of a rapid test for G6PD deficiency in combination with a rapid diagnosis of malaria. *Journal of Tropical Medicine and International Health*, Vol. 4 No. 4 pp. 245-250, April 1999. (Penulis Pembantu)
6. High prevalence of Antibody to *Toxoplasma gondii* among Humans in Surabaya, Indonesia. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 53, 238-241, 2000. (Penulis Pembantu)
7. Distribution of Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in South Asia. *Hum. Genet.* (2001) 108: 445-449. DOI 10.1007/s004390100527. 2001. (Penulis Pembantu)
8. Synergistic enhancement of a Copper Chelator, Bathocuproine Disulphonate, and Cysteine on *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Erythrocytes. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Vol. 34, No. 2, June 2003. (Penulis Pembantu)
9. Malaria endemic patterns on Lombok and Sumbawa Islands, Indonesia. *J. Tropical Medicine and Health*, Vol. 33 No. 2, 2005, pp 105-113. (Penulis Utama)
10. Further investigations of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Flores Island, Eastern Indonesia. *J Hum Genet* (2006) 51:952-957 DOI 10.1007/s10038-006-0044

### BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI

**Nama Lengkap** : Dr. C.A. Nidom, drh, MS  
**NIP** : 131406056  
**Tempat/Tanggal Lahir** : Pasuruan, 8 Maret 1958  
**Jenis Kelamin** : Laki-laki  
**Bidang Keahlian** : Biologi Molekuler  
**Kantor/Unit Kerja** : TDC-Laboratorium Avian Influenza dan FKH Universitas Airlangga  
**Alamat Kantor** : Kampus C Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo  
**Kota** : Surabaya **Kode Pos** : 60155  
**Telepon** : ( (031) 5992445-6 )  
**Faksimile** : ( (031) 5992445 )  
**E-Mail** : tdrca@rad.net.id  
**Alamat Rumah** : Jl. Klampis Semolo Timur V/6  
**Kota** : Surabaya **Kode Pos** :-  
**Telepon** : (031-5922577 )  
**Faksimile** : ( - )  
**E-Mail** : nidomca@sby.centrin.net.id  
**No. Telepon Genggam** : 0811372683

#### Pendidikan (S1 ke atas)

No.	Perguruan Tinggi	Kota & Negara	Tahun Lulus	Bidang Studi
1	Universitas Airlangga	Surabaya, Indonesia	2005	S3 Ilmu Kedokteran Dasar
2	Universitas Airlangga	Surabaya, Indonesia	1986	S2 Ilmu Kedokteran dasar
3	IPB	Bogor, Indonesia	1982	S1-FKH

**PENGALAMAN RISET**

No.	Judul Riset	Tahun
1	Analisis sekuens asam amino protein Haemagglutinin virus Avian Influenza di Indonesia	2004
2	Analisis Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia.	2005
3	Analisis Filogenetik Haemagglutinin Virus Avian Influenza Yang Menginfeksi Babi Di Indonesia	2006
4	Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 dengan Real Time PCR dan Novel Rapid Test pada sampel Unggas, Babi dan Manusia	2006
5	Deteksi Antibodi Terhadap Virus Avian Influenza H5N1 Pada Serum Kucing ( <i>Felis silvestris catus</i> ) Dengan Menggunakan Kombinasi Uji Serologis	2007
6	Isolasi dan Karakterisasi Virus Avian Influenza H5N1 pada Kucing liar ( <i>Felis silvestris catus</i> ) dengan Novel Rapid Test dan Real-Time PCR	2007
7	Clinical Evaluation of Conventional and Reverse Genetic Vaccines For Chicken Against H5N1-HPAI Viruses	2007
8	Development of Rapid Diagnostic For Avian Influenza Virus	2007
8	Surveillance of HPAI on the wet market at Surabaya 2008	2008
9	Sero-survey HPAI on the poultry worker at Surabaya 2008	2008

**KARYA ILMIAH**

No.	Judul Karya Ilmiah
1	Molecular Analysis H5N1 Subtype of Avian Influenza Virus Genome in Indonesia. CAS-JSPS Asian Science.Dec.2005:48
2	Analisis Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi. Universitas Airlangga.
3	Haemagglutinin mutation responsible for the binding of H5N1 Influenza A Viruses for human type receptor. Nature Vol.444. 2006.



**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**

<b>No.</b>	<b>Judul Riset</b>	<b>Tahun</b>
1	Analisis Filogenetik Haemagglutinin Virus Avian Influenza Yang Menginfeksi Babi Di Indonesia	2006
2	Clinical Evaluation of Conventional and Reverse Genetic Vaccines For Chicken Against H5N1-HPAI Viruses	2007
3	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
4	Perbandingan Titer Antibodi Ayam Setelah Pemberian Vaksin Avian Influenza H5N1 Konvensional Dengan Vaksin Avian Influenza H5N1 Reverse Genetik	2008

**Draft untuk Publikasi Internasional (Clinical Virology atau Pathology Journal)**  
**Gambaran Perubahan Patologis Pada *Maccaca fascicularis* Yang Terinfeksi**  
**Virus Flu Baru H1N1 (Strain Mexico) Dan Virus Flu Burung Subtipe H5N1**

**Yoes Prijatna Dachlan<sup>13)</sup>, Kadek Rachmawati<sup>1,2)</sup>, C.A. Nidom<sup>1,2)</sup>**

<sup>1)</sup> *Avian Influenza Research Center Universitas Airlangga*, <sup>2)</sup> *Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga*<sup>3)</sup> *Fakultas Kedokteran-Universitas Airlangga*

[nidomca@sby.centrin.or.id](mailto:nidomca@sby.centrin.or.id)

**ABSTRAK**

Influenza merupakan salah satu penyakit menular yang menyebabkan penyakit dan kematian di seluruh dunia pada saat ini. Selain pada unggas, virus *avian influenza* dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Tidak kurang dari 399 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus *avian influenza* subtipe H5N1 dan 251 diantaranya meninggal dunia. Virus Influenza yang menyebabkan tingkat kematian yang tinggi pada manusia pada saat ini adalah H1N1 strain Meksiko. Berdasarkan data dari WHO tanggal 6 Juli 2009 lebih dari 90 ribu orang telah terinfeksi H1N1 strain Meksiko dan 450 orang meninggal dunia. Di Indonesia Menteri Kesehatan menetapkan bahwa virus Flu Baru H1N1 strain Meksiko sebagai penyakit yang dapat menimbulkan wabah.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis perubahan patologis *mix infection* antara virus H1N1 dan H5N1 sehingga bisa diketahui patogenesis kedua infeksi tersebut apabila terjadi pada manusia sehingga bisa dilakukan pencegahan secara preventif dan melakukan tindakan medis lainnya sehingga tingkat kematian terhadap kedua virus tersebut dapat dikurangi.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap koleksi sampel terhadap virus H5N1 dan H1N1v didapatkan virus H5N1 yang memiliki subclade 2.1.3 dari unggas yang dapat memiliki kemampuan untuk menginfeksi pada manusia. Selain itu, hasil surveilliance terhadap virus H1N1v di rumah sakit seluruh Surabaya didapatkan 4 isolat H1N1 yang dapat digunakan untuk penelitian *mix infection* pada *macaca fascicularis*. Pewarnaan terhadap organ paru hewan coba yang telah diinfeksi oleh H5N1 dan H1N1v telah dilakukan.

**Pendahuluan**

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). Selain pada unggas, virus *avian influenza* dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Tidak kurang dari 399 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza subtipe H5N1 dan 251 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 22 Januari 2009 dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009). Influenza baru H1N1 merupakan influenza (flu) yang disebabkan oleh virus influenza tipe A subtipe H1N1 baru strain Meksiko yang selama ini belum pernah menular antar manusia. Virus ini tidak ada kaitannya dengan virus influenza musiman yang ada selama ini (seasonal influenza). Influenza baru H1N1 cukup berbahaya, mudah menular dan dapat menimbulkan kematian karena virus strain baru influenza H1N1 ini lebih berbahaya dibanding flu musiman seperti virus flu A H1N1, H2N1, H3N1 dan H3N2 yang biasa terdapat pada seseorang yang menderita flu musiman. Penyebaran flu baru H1N1 telah menyebar di 76 negara dengan 35.928 kasus yang dilaporkan dan 163 kematian, sehingga Badan Kesehatan Dunia (WHO) menaikkan status kewaspadaan pandemi influenza baru A H1N1 dari fase 5 ke fase 6 yang merupakan fase tertinggi. Meskipun angka kematiannya (Case Fatality Rate/CFR) hanya sekitar 0,5% namun flu baru H1N1 ini mudah menular (Depkes RI, 2009). Penelitian patogenesis infeksi virus flu burung pada mencit telah banyak dilakukan namun hasil penelitian tersebut tidak dapat diekstrapolasikan pada infeksi virus flu burung pada manusia sehingga membutuhkan hewan coba yang memiliki

kedekatan yang sama dengan manusia (Rimmelzwaan et al, 2001) sehingga kajian patogenesis virus influenza A (H1N1 strain meksiko dan virus flu burung subtipe H5N1) pada *Maccaca fascicularis*

## **METODE PENELITIAN**

### **A) Koleksi sampel**

Cotton bud yang steril dioleskan pada bagian nasal dan nasopharink pada manusia, bagian kloaka dan nasal pada unggas kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi medium transport dan disimpan di dalam lemari es - 80<sup>0</sup> C sampai digunakan untuk proses PCR.

### **B) Inokulasi Medium Transport pada Telur Ayam Bertunas (TAB)**

Tempatkan telur pada sisi tumpul bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70 % ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan ruang alantois. Ambil 1 ml spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur, 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 0,5 cm dan inokulasikan 100 µl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkubasi telur tersebut pada suhu 33-37<sup>0</sup>C selama 2-3 hari.

### **C) Metode Uji HA**

Masukkan 50 ml PBS pada lubang A2-H12 kemudian masukkan 100 µl control antigen atau isolat lapangan dari A1-F1. Pindahkan 50 ml dari lubang pertama s/d terakhir kemudian tambahkan RBC guinea pig (Marmot) 0,75 %, shake dg mekanikal vibrator dan Inkubasi dalam suhu ruang.

#### D) Uji PCR

Ekstraksi RNA dari cairan alantois mengikuti prosedur dari Qiagen RNAeasy<sup>TM</sup> RNA Isolation Kit. Reaksi PCR dalam mendeteksi virus Flu Burung sub tipe H5N1 yaitu untuk proses denaturasi 94°C selama 1 menit, annealing 50°C selama 1 menit dan extension selama 3 menit. Siklus PCR antara 25 sampai dengan 40 siklus kemudian hasil produk PCR dianalisis di dalam Elektroforesis dan difoto untuk analisis hasil.

#### E) DNA Sequencing

DNA dari masing-masing isolat, setelah dimurnikan urutan DNA ditentukan dengan menggunakan mesin ABI Prism 310 Genetic Analyser, yang terdapat di Tropical Disease Center - Universitas Airlangga dengan menggunakan Big Dye Terminator (Perkin Elmer Cetus) dan dinalisa tingkat *homology* dengan menggunakan data dari gen bank.

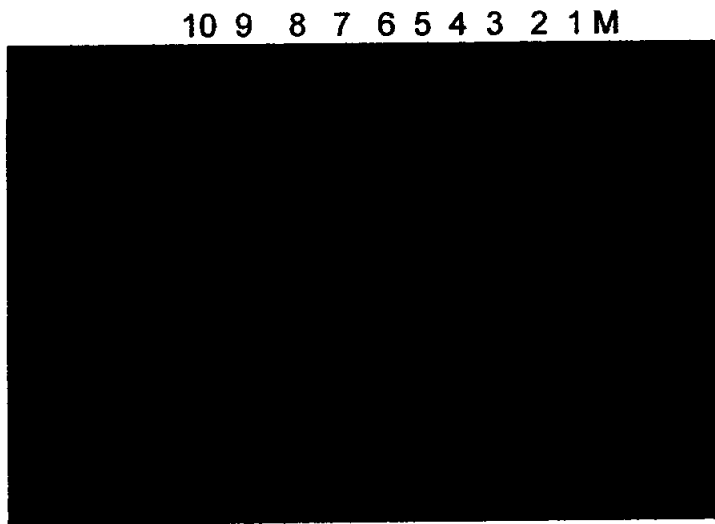
#### F) Perlakuan Pada Hewan Coba

*Macaca fascicularis* diinfeksi dengan virus flu burung dan H1N1 strain meksiko sebanyak TCID50 dan diamati baik gejala klinis yang tampak dan tingkat kematian. Pada hari ke-7 *Macaca fascicularis* dieuthanasia dan dibedah. Organ *Macaca fascicularis* diamati patologis dengan menggunakan mikroskop dan pewarnaan HE.

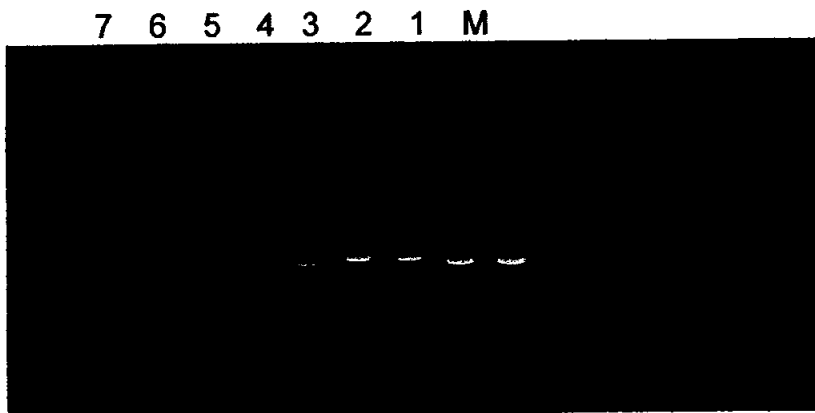
#### Hasil Dan Pembahasan

Pada penelitian ini menggunakan virus flu burung sub tipe H5N1 dan virus H1N1v yang merupakan dua virus yang memiliki karakteristik yang berbeda. Virus H5N1 merupakan virus yang berasal dari unggas tetapi mampu menginfeksi berbagai macam spesies dan termasuk manusia dengan tingkat kematian atau CFR sebesar 80 %. Sedangkan virus H1N1v memiliki karakteristik mapu menginfeksi antar manusia dengan sangat cepat sehingga Who pada bulan Juni 2009 mengumumkan bahwa telah

terjadi pandemi di seluruh belahan dunia. Oleh sebab itu, penelitian untuk menguji kedua virus tersebut pada hewan coba sangat dibutuhkan untuk mengetahui patogenesis kedua virus tersebut apabila terjadi *mix infection*. Berdasarkan hasil surveilance yang telah dilakukan dari tahun 2008 sampai dengan sekarang terhadap virus H5N1 didapatkan virus H5N1 yang memiliki subclade 2.1.3 yaitu virus flu burung yang dapat menginfeksi unggas dan manusia. Hasil PCR virus H5N1 adalah sebagai berikut :



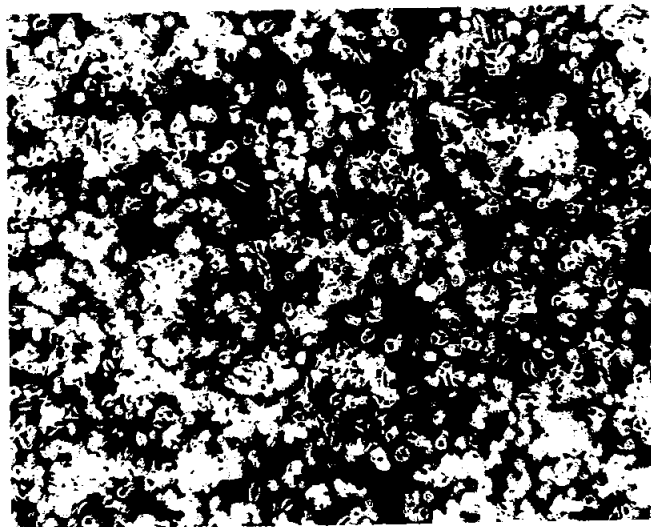
Gambar 1 virus flu burung subtipe H5N1 fragmen HA



Gambar 2 virus flu burung subtipe H5N1 fragmen NA

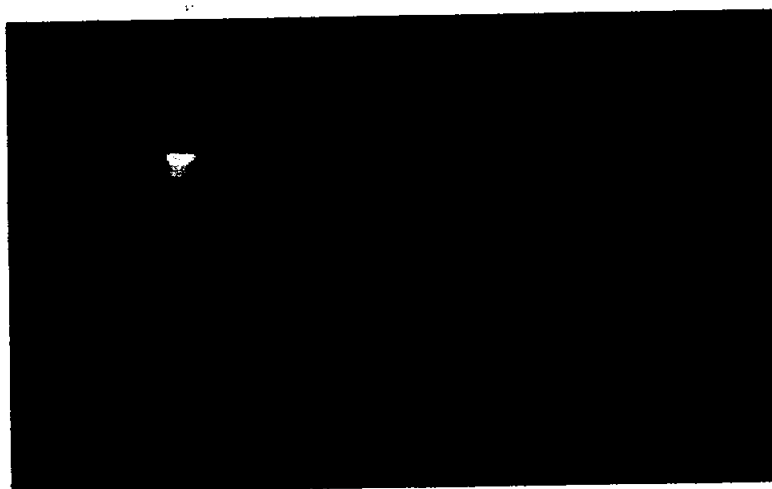
Untuk virus H1N1v telah dilakukan surveilance di rumah sakit dan puskesmas seluruh kota surabaya mulai bulan Juni sampai dengan bulan Agustus 2009. Dari hasil

surveillance didapatkan 53 sampel yang berasal dari swab nasal dan nasopharink. Berdasarkan hasil inokulasi pada sel MDCK dan hasil PCR didapatkan 4 sampel positif virus H1N1v. Gambaran sel MDCK yang mengalami CPE setelah diinokulasi dengan sampel yang positif terhadap virus H1N1v adalah sebagai berikut



Gambar 3 Sel MDCK yang telah diinokulasi dengan sampel positif H1N1v

M 1 2 3 4 5 6 7

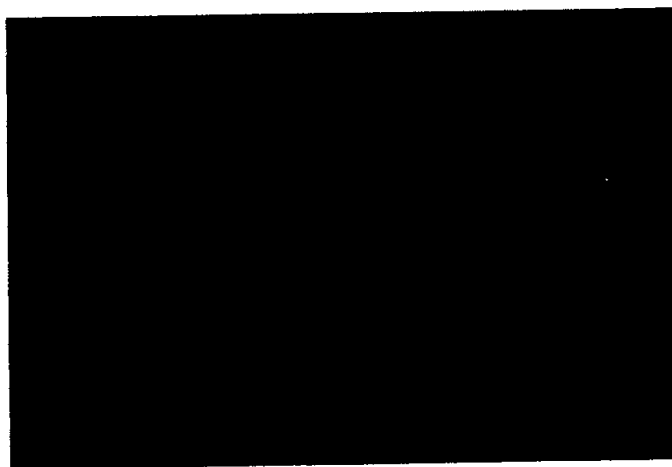


Gambar 4 Hasil PCR virus H1N1v

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah macaca fascicularis. Ini disebabkan hewan ini memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan manusia



sehingga analisa terhadap patogenesis mix infection antara virus H1N1v dan H5N1 dilakukan secara lebih detail. Hewan *Macaca fascicularis* yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 4 ekor dan diambil dari CV Inquatex dan bersifat SPF (*Specific Pathogenic Free*). *Macaca fascicularis* telah dilakukan karantina selama 2 minggu dan telah dilakukan uji TB (dapat dilihat pada lampiran). Selain itu, hewan coba *Macaca fascicularis* telah diadaptasikan di dalam Laboratorium Animal BSL3 Universitas Airlangga. Untuk persiapan virus yang akan diinokulasi pada hewan coba telah dilakukan pengujian terhadap TCID 50 baik H5N1 maupun H1N1v. Gambaran hasil TCID tersebut adalah sebagai berikut :



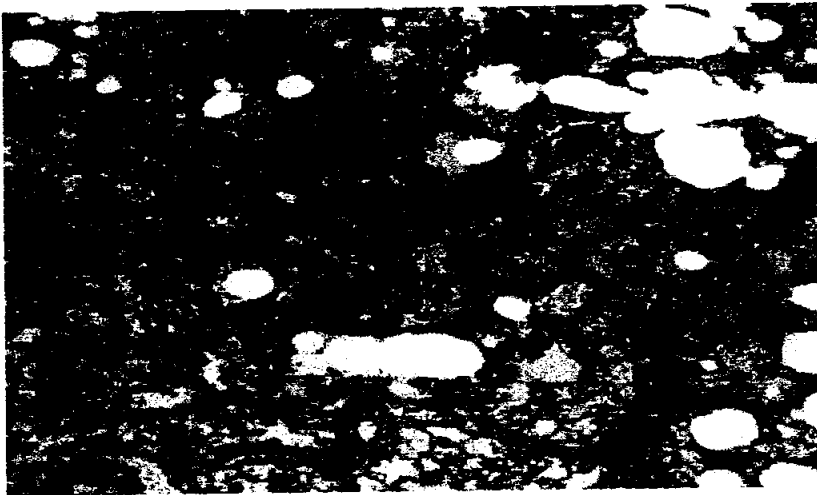
Gambar 5 TCID50 virus H5N1 dan H1N1v pada sel MDCK.

Setelah didapatkan TCID 50 dilakukan inokulasi pada hewan coba dengan menggunakan ketamine sebesar 0,1 ml sehingga inokulasi sesuai dengan peraturan *animal welfare*. Virus dimasukkan pada hewan coba melalui jalur intranasal sebanyak 500 ul untuk nasal kiri dan 500 ul nasal kanan. Observasi terhadap hewan coba dilakukan setiap hari dan pada hari ke 7 hewan coba dimatikan. Kemudian dilakukan pembedahan dan pengambilan organ pernafasan untuk mengetahui perubahan secara histopatologi. Perbedaan gambaran antara virus H5N1 dan H1N1v adalah sebagai

berikut :



Gambar 5. Paru-paru yang terinfeksi oleh virus H5N1 terjadi inflamasi



Gambar 6. Paru-paru yang terinfeksi oleh virus H1N1v

## VI. Kesimpulan Dan Saran

### 6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah didapatkan perbedaan antara patogenesis virus flu burung subtipe H5N1 dan H1N1v dengan menggunakan analisis Histopatologi pada organ paru-paru *Maccaca fascicularis*.

## 6.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lanjutan tentang jumlah virus yang bereplikasi pada masing-masing organ dan gen yang bertanggung jawab terhadap infeksi H5N1 dan H1N1v.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alamudi MY, et al.2008. H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Serosurvey on Poultry Workers In Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16,2008 Sapporo Japan
- Alshawsh MA, et al. 2007. Assessment of antimalarial activity against Plasmodium falciparum and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants eCAM p 1-4
- De Jong,M.D,et al.2005.Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection .N Engl J Med Vol. 353: 2667-72
- 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
- Elfahmi.2006. Phytochemical and Biosynthetic Studies of Lignans with a Focus on Indonesian Medicinal Plants. Facilitair Bedrijf, University of Groningen, the Netherlands.thesis.
- Hao L., Sakurai A., Watanabe T., Sorencen E., Nidom C..A., Newton,M.A., Kawaoka Y. 2008. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. Nature.,vol.524.:64-73.
- 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.
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. Clin. Microbiol. Rev.

- 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.
- Raharjo J. dan Nidom CA., 2004. Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka.
- Revianny V. Nidom, et al. 2008. Surveillance of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16,2008 Sapporo Japan
- 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.
- 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
- 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
- WHO, 2009, Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO March 11 2009 <http://www.who.int>