

**IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUB
TIPE H3 BERDASARKAN GEN PENYANDI
PROTEIN HA MENGGUNAKAN NEXT
GENERATION SEQUENCER**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh:

ADHITYA YOPPY RO CANDRA
NIM. 061314253007

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

**IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUB
TIPE H3 BERDASARKAN GEN PENYANDI
PROTEIN HA MENGGUNAKAN NEXT
GENERATION SEQUENCER**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**ADHITYA YOPPY RO CANDRA
NIM. 061314253007**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

Identifikasi Virus Avian Influenza Sub Tipe H3 Berdasarkan Gen Penyandi Protein HA menggunakan Next Generation Sequencer

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 02 Februari 2016



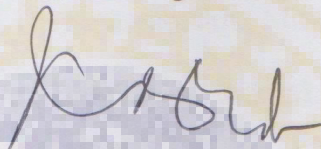
ADHITYA YOPPY RO CANDRA
NIM. 061314253007

Lembar Pengesahan

SEMINAR THESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 02 Februari 2016


Oleh:

Pembimbing Ketua



Dr. Kusnoto, M.Si., drh
NIP. 19631003 199702 1 001

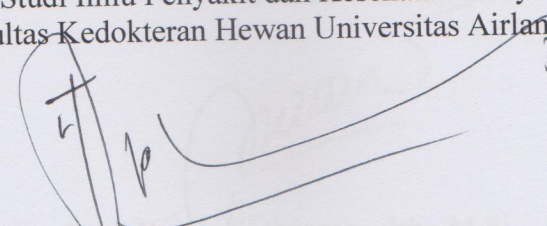
Pembimbing



Dr. E. Bimo Aksono H., M.Kes., drh.
NIP. 19660920 199203 1 003

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP.
NIP. 19620828 198903 2 001

Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 02 Februari 2016

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si.

Anggota : Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes.

: Dr. E. Djoko Poetranto, drh., M.Si.

: Dr. Kusnoto, M.Si., drh.

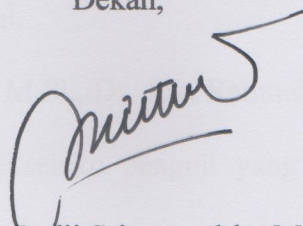
: Dr. E. Bimo Aksono H., M.Kes., drh.

Surabaya, 02 Februari 2016

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianto., drh., M.Si.
NIP. 195601051986011001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas ridho dan karunia-Nya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menulis tesis dengan judul **Identifikasi Virus Avian Influenza Sub Tipe H3 Berdasarkan Gen Penyandi Protein HA menggunakan Next Generation Sequencer.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Pudji Srianto., drh., M.Si. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Tesis ini dapat terselesaikan karena tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan segenap kerendahan hati, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Dr. Kusnoto, M.Si., drh. serta Dr. E. Bimo Aksono H., M.Kes., drh. selaku pembimbing pertama dan kedua yang telah memberikan arahan, dorongan, bimbingan dan petunjuk yang bermanfaat bagi penulis sehingga mampu menyelesaikan penulisan tesis ini.

Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si., Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes. dan Dr. E. Djoko Poetranto, drh., M.Si. selaku penguji yang telah memberikan kritik, arahan, dukungan dan saran demi terselesaikannya tesis ini. Terima kasih atas bantuan yang telah diberikan.

Ucapan terima kasih saya ucapkan kepada Prof. Kazufumi Shimizu, Ph.D. yang telah berkenan memberikan kesempatan kepada saya untuk memakai sampel dalam penelitian ini serta bimbingan, nasihat, saran, dorongan semangat yang telah diberikan. Terima kasih juga saya sampaikan kepada K. Shimizu sensei dan yang telah memberikan banyak masukan dan bimbingan.

Terimakasih atas bimbingan, nasihat, saran, dorongan semangat yang telah diberikan oleh Takahara sensei, Yohko sensei, kak Mareta, Adek Anna, Mbak Edith, DR. Gatot, DR. Lasmi, DR. Landia (alm.), Dr. Retno dan Dr. Resti serta teman sesama pejuang thesis dari ITD, Rury Mega Wahyuni.

Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P. selaku Ketua Program studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu dalam proses pendidikan, pelaksanaan ujian proposal dan tesis. Terimakasih saya ucapkan atas bimbingan dan proses belajar yang telah diberikan dalam perkuliahan dan proses penelitian yang diajarkan.

Seluruh staf pengajar dan staf kemahasiswaan Program Studi Pascasarjana Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ucapan terimakasih kepada Ayahanda Guntoro, S.H., Ibunda Setyarini yang telah memberikan dorongan, semangat, doa dan kasih sayang yang setinggi-tingginya, serta telah memberikan semangat, doa, perhatian dan dorongan yang

sangat luar biasa bagi penulis untuk dapat menyelesaikan pendidikan dan penulisan tesis ini.

Kepada teman-teman Program Studi Pascasarjana Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberi semangat dan doa selama menempuh perkuliahan.

Terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, yang telah memotivasi, mendukung dan membantu hingga tesis ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembimbing/penguji sebagai upaya penyempurnaan penulisan tesis ini. Semoga tesis ini dapat menjadi salah satu informasi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dunia kedokteran hewan. Akhir kata penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya.

Surabaya, 02 Februari 2016

Penulis

RINGKASAN

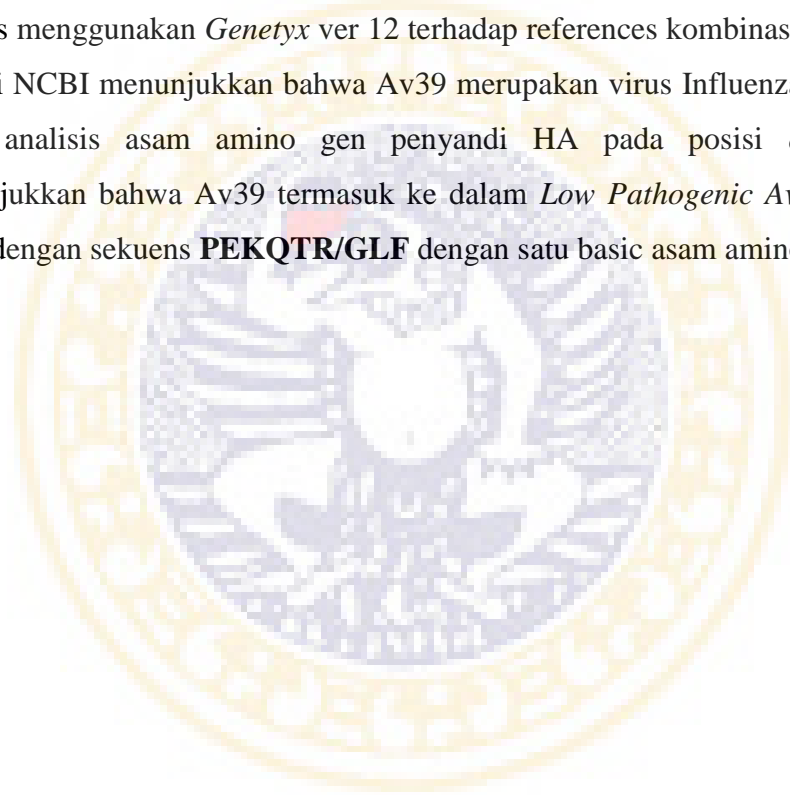
Virus Influenza termasuk ke dalam family *Orthomixoviridae*, merupakan virus beramplop, *single strand* RNA virus dan bersegmen. Virus influenza dibedakan menjadi beberapa tipe berdasarkan dua protein yaitu *Matrix* (M) dan *Nucleoprotein* (NP). Pembagian tipe virus ini digolongkan menjadi empat tipe yaitu A, B, C dan D. Virus Influenza tipe A sangat beragam dan dibagi ke dalam beberapa sub tipe berdasarkan gen penyandi *Hemagglutinin* (HA) dan *Neuraminidase* (NA). Sampai saat ini terdapat HA 1 hingga 18 dan NA 1 hingga 11 yang dapat dijumpai.

Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi virus Influenza isolat lokal dari kelompok study Influenza, CRC-ERID, ITD, Universitas Airlangga menggunakan *Next Generation Sequence* (NGS) terhadap gen penyandi HA. Selain itu menentukan apakah virus influenza tersebut termasuk ke dalam *Low Pathogenic* atau *High Pathogenic* berdasarkan urutan asam amino gen penyandi HA *cleavage site*.

Sampel pada penelitian ini digunakan isolat lokal yang diisolasi pada tahun 2013 yang diperoleh dari kelompok study Influenza, CRC-ERID, ITD, Universitas Airlangga. Sampel tersebut ditanam pada Telur Ayam Bertunas (TAB) untuk memperbanyak jumlah virus. Setelah dipanen akan dilanjutkan dengan uji HA untuk menentukan isolat yang memiliki kemampuan untuk mengaglutinasi sel darah merah ayam. Isolat tersebut kemudian dilakukan deteksi untuk menentukan virus Influenza tipe A dan sub tipe H5 menggunakan POCube dan *One Step Real Time* RT-PCR. Deteksi lanjut sub tipe virus Influenza digunakan *Next Generation Sequencer* (NGS) (MiSeq, Illumina). Hasil sequence dianalisis menggunakan *CLC Workbench* ver. 8.0.2 untuk menentukan gen penyandi protein HA. Analisis homologi, *alignment* dan asam amino terhadap gen penyandi HA *cleavage site* menggunakan *Genetyx* ver. 12. Referensi untuk analisis patogenitas berdasarkan HA *cleavage site* digunakan H5N1 1997 *goose* Guangdong 3 (AF364334) dan H5N1 2007 Indonesia CDC1046 (CY019408) sebagai referensi untuk *High Pathogenic*, sedangkan untuk *Low Pathogenic*

digunakan H3N6 2010 Jiangsu 4 (KC261677) dan H3N6 2009 Guangxi 020P (KM186122).

Hasil identifikasi POCube dengan monoklonal antibodi terhadap influenza tipe A menunjukkan hasil positif dan hasil negatif untuk sub tipe H5. Konfirmasi virus Influenza tipe A menggunakan *One Step Real Time* RT-PCR terhadap gen penyandi virus influenza tipe A dan sub tipe H5 menunjukkan hasil positif tipe A dan negatif H5. Deteksi sub tipe menggunakan NGS dan analisis mapping terhadap gen penyandi HA menggunakan *CLC Workbench* serta filogenetik analisis menggunakan *Genetyx* ver 12 terhadap references kombinasi dari HA H1-18 dari NCBI menunjukkan bahwa Av39 merupakan virus Influenza sub tipe H3. Hasil analisis asam amino gen penyandi HA pada posisi *cleavage site* menunjukkan bahwa Av39 termasuk ke dalam *Low Pathogenic Avian Influenza Virus* dengan sekuens **PEKQTR/GLF** dengan satu basic asam amino.



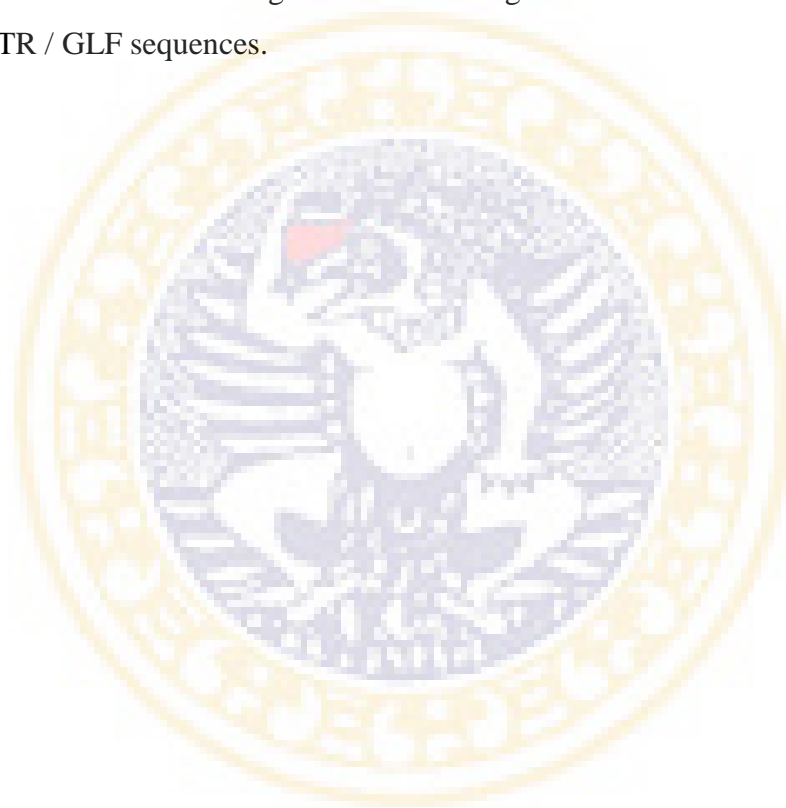
SUMMARY

Influenza viruses belong to Orthomyxoviridae, is an enveloped virus, single strand RNA viruses and segmented. The influenza virus can be divided into several types based on two proteins, namely Matrix (M) and nucleoprotein (NP). Influenza virus classified into four types: type A, B, C and D. Influenza A Viruses (IAV) are very diverse and are divided into subtypes based on gene Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA). Until now there are 1 to 18 HA and NA 1 to 11 that can be found.

This study aims to identify local isolated Influenza virus from the Influenza study group, CRC-ERID, ITD, Airlangga University using Next Generation Sequencer (NGS) (MiSeq, Illumina) of the gene encoding HA. Additionally determine whether the influenza virus belonging to the Low Pathogenic or High Pathogenic based on the amino acid sequence of the gene encoding HA cleavage site.

Samples used in this study were local isolated samples in 2013 that were obtained from Influenza, CRC-ERID, ITD, Airlangga University. The samples grown in chicken eggs sprout to increase the number of viruses. Once harvested will be followed by HA test to determine isolates that have the ability to agglutinate chicken red blood cells. Isolates were then carried out to determine type A subtype H5 Influenza virus using POCube and One Step Real Time RT-PCR. Further detection of influenza virus sub-type is used NGS. Sequence results were analyzed using CLC Workbench ver. 8.0.2 to determine the HA protein-coding genes. Homology, alignment and amino acids analysis of the gene encoding the HA cleavage site using Genetyx ver. 12. References for the pathogenicity analysis based on the HA cleavage site used H5N1 1997 Guangdong goose 3 (AF364334) and the 2007 H5N1 Indonesia CDC1046 (CY019408) as a reference for the High Pathogenic, while for 2010 H3N6 Low Pathogenic used Jiangsu 4 (KC261677) and H3N6 2009 Guangxi 020P (KM186122).

POCube identification results with monoclonal antibodies against IAV showed positive results and negative results for H5. Confirmation of IAV was used One Step Real Time RT-PCR showed positive IAV and negative H5. Detection of sub-type using the NGS and mapping analysis of the gene encoding the HA using CLC Workbench and phylogenetic analysis using Genetyx ver 12 against references combinations of HA H1-18 from NCBI showed that Av39 an IAV subtype H3. Amino acid analysis results of gene encoding HA cleavage site indicates that Av39 belongs to Low Pathogenic Avian Influenza Virus with PEKQTR / GLF sequences.



H3 SUBTYPE IDENTIFICATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS BASED ON HA USING NEXT GENERATION SEQUENCER

Adhitya Yoppy Ro Candra

ABSTRACT

Influenza virus is an enveloped, single stranded RNA virus and segmented. This virus belongs to *Orthomyxoviridae*. This virus divided into three types, A, B, C and D, based on antigenicity of two protein, Matrix (M) and Nucleoprotein (NP). Type A influenza virus divided into several subtypes based on two surface proteins, Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA). Until now there are 1-18 HA and 1-11 NA. In this study we identify influenza virus H3 subtype using Next Generation Sequencer.

Sample used in this study were local isolated viruses from ducks in 2013. Samples were inoculated in embryonated eggs. After harvested and showed agglutination positive by HA test, then carried out to determine type A and H5 subtype using POCube and One Step Real Time RT-PCR. Deep analysis for subtype identification by Next Generation Sequencer. Sequence analysis using CLC Workbench and Genetyx ver. 12 software.

POCube detection showed positive results for type A and negative result for H5 subtype. Detection of influenza virus using One Step Real Time RT-PCR showed positive result for Influenza type A virus and negative for H5. Subtype detection using Next Generation Sequencer showed that this virus belongs to H3 subtype based on mapping analysis to HA references. Amino acids sequence analysis of HA cleavage site showed that this virus belongs to Low Pathogenic virus.

Keywords : Influenza A virus, identification, Next Generation Sequencer.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PRASYARAT GELAR	ii
PERNYATAAN	iii
LEMBAR PERSETUJUAN	iv
PANITIA PENGUJI THESIS	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.1 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Hasil Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Influenza virus	6
2.1.1 Type A Influenza virus	6
2.1.2 Type B Influenza virus	8
2.1.3 Type C Influenza virus	9
2.1.4 Type D Influenza virus	9
2.2 Gen-gen penyandi Influenza A Virus	10
2.2.1 Hemagglutinin	10
2.2.2 Neuraminidase	11
2.2.3 Kompleks Polimerase	12
2.2.4 Protein Matriks	13
2.2.3 Non-Struktural Protein	13
2.3 Polymarase Chain Reaction (PCR)	14
2.3.1 Komponen PCR	16
2.3.2 Agarose Gel Elektroforesis	17
2.4 POCube	18
2.5 Next Generation Sequence	20

BAB 3 KERANGKA KONSEP	23
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	27
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	27
4.2 Materi Penelitian	27
4.2.1 Bahan Penelitian	27
4.2.2 Alat Penelitian	28
4.3 Metode	29
4.3.1 Perbanyak virus	29
4.3.2 Hemaglutinasi Tes	29
4.3.3 POCube	30
4.3.4 Ekstraksi RNA	31
4.3.5 One Step Real Time RT – PCR	32
4.3.6 Next Generation Sequence	33
4.3.6.1 Purifikasi dan Fragmentasi mRNA	33
4.3.6.2 Sintesis First Strand cDNA	34
4.3.6.3 Sintesis Second Strand cDNA	34
4.3.6.4 End Repair	35
4.3.6.5 Adenylate 3' Ends	35
4.3.6.6 Ligate Adapters	35
4.3.6.7 Enrich DNA Fragments	36
4.3.6.8 Validasi Sample Library	37
4.3.6.9 Normalisasi dan Pool Sample Library	37
4.3.7 Analisis Data	37
4.4 Kerangka Operasional	39
BAB 5 HASIL PENELITIAN	40
5.1 Hasil Identifikasi dengan Uji HA, POCube dan One Step Real Time RT-PCR	40
5.2 Hasil Identifikasi Sub Tipe Virus Isolat Lokal Av39	42
5.3 Hasil Analisis Filogenetik dan Homologi Av39 dengan Reference	43
5.4 Hasil Analisis Asam Amino HA Cleavage Site	47
BAB 6 PEMBAHASAN	48
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	57
7.1 Kesimpulan	57
7.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Virus Influenza	7
2.2 Skematik RT-PCR	16
2.3 Prinsip sistem POCube	18
2.4 Preparasi DNA	20
2.5 Prinsip amplifikasi <i>template</i> pada Illumina	21
2.6 <i>Cluster</i> amplifikasi pada mesin Illumina	22
3.1 Kerangka konseptual penelitian	23
4.1 Kerangka Operasional	39
5.1 Hasil AGE gen penyandi tipe A	41
5.2 Hasil AGE gen penyandi tipe H5	41
5.3 Hasil mapping gen penyandi HA	42
5.4 Hasil analisis filogenetik gen penyandi HA	43
5.5 Hasil sekuens nukleotida gen penyandi HA <i>cleavage site</i> Av39	46
5.6 Sekuens asam amino HA <i>cleavage site</i>	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Daftar <i>Primer Forward</i> dan <i>Reverse</i> serta <i>Probe</i> pada deteksi virus influenza tipe A	30
4.2 Daftar <i>Primer Forward</i> dan <i>Reverse</i> serta <i>Probe</i> pada deteksi virus influenza sub tipe H5	30
5.1 Hasil Identifikasi Virus Influenza	40
5.2 Nilai homologi Av39 terhadap isolat lain	44

