

DISERTASI

**KARAKTERISASI MOLEKULER DAN PROFIL PATOGENITAS
VIRUS H5N1 ISOLAT ASAL BURUNG GEREJA (*PASSER MONTANUS*)
SEBAGAI SUMBER PENULARAN ALAMI DI INDONESIA**

PENELITIAN EKSPLORATIF DAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



EMMANUEL DJOKO POETRANTO

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

**KARAKTERISASI MOLEKULER DAN PROFIL PATOGENITAS
VIRUS H5N1 ISOLAT ASAL BURUNG GEREJA (*PASSER MONTANUS*)
SEBAGAI SUMBER PENULARAN ALAMI DI INDONESIA**

PENELITIAN EKSPLORATIF DAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

DISERTASI

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi S3 Ilmu Kedokteran
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari: Senin
Tanggal: 12 November 2012
Pukul: 10.⁰⁰ WIB**

Oleh:

**EMMANUEL DJOKO POETRANTO
090810046D**

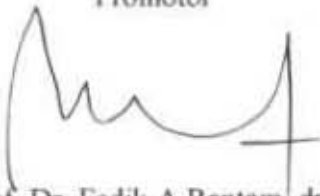
**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

Pengesahan:

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL DESEMBER 2012

Oleh

Promotor



Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh.

NIP.19591003 198701 1001

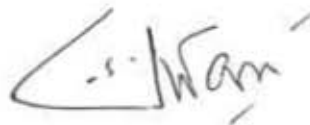
Ko Promotor I



Dr. F. M. Judajana, dr., SpPK (K)

NIP.19490305 197802 1001

Ko Promotor II



Dr. Suwarno, drh., M.Si.

NIP.19610515 198903 1002

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Pada Tanggal 28 September 2012

PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua : Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D.
- Anggota : 1. Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh.
2. Dr. F.M. Judajana, dr. SpPK(K).
3. Dr. Suwarno, drh. M.Si.
4. Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh.
5. Dr. Dady Soegianto Nazar, drh. M.Sc.
6. Prof. Dr. Aulani'am, drh., DES.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

No. 217/H3.1.1/KD/2012 Tanggal: 26 September 2012

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur yang tiada terhingga kehadiran Allah yang Maha Kuasa atas segala berkah, rahmat dan karuniaNya yang luar biasa sehingga disertasi dengan judul: "Karakterisasi Molekuler dan Profil Patogenitas Virus H5N1 Isolat Asal Burung Gereja (*Passer montanus*) Sebagai Sumber Penularan Alami Di Indonesia" dapat terselesaikan.

Disertasi ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari Tim Promotor, karena itu dengan penuh syukur dan dengan kerendahan hati, perkenankanlah saya menghaturkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh., selaku promotor, yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, pikiran, bimbingan, arahan dan bimbingan serta wawasan keilmuan selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor hingga penulisan disertasi ini. Kebaikan budi Bapak akan selalu saya kenang.

Dr. F.M. Judajana, dr., SpPK (K), selaku ko promotor 1, atas segala tenaga dan pikiran untuk membimbing, memberikan tambahan ilmu, saran dan pengarahan serta dorongan selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor hingga penulisan disertasi ini. Ketulusan hati Bapak sangat meresap dalam hati sanubari saya.

Dr. Suwarno, drh., M.Si., selaku ko promotor 2, yang penuh kesabaran memberikan semangat dan dorongan moril serta arahan sehingga terselesaikan disertasi ini. Kesabaran dan semangat bapak menjadikan contoh bagi saya dalam memecahkan setiap problem sepanjang kehidupan.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankanlah saya juga mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

Pemerintah Republik Indonesia cq. Menteri Pendidikan Nasional melalui Proyek BPPS telah memberikan kesempatan dan bantuan dana pendidikan kepada saya dalam mengikuti Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt., selaku rektor Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes. SpPD., K-EMD., FINASIM, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan segenap jajarannya, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Direkur Program Pascasarjana Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS., beserta para pimpinan dan seluruh staf Program Pendidikan Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan, kesempatan dan fasilitas selama masa belajar.

Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr. Sp.A(K), Sp.JP.AKK., selaku ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran dan Prof. Dr. Harjanto J.M., dr. AIFM., selaku mantan Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Pendidikan Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah memberikan asuhan akademik selama masa studi.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. yang telah memberikan ijin dan dorongan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Para pembimbing serta penguji mulai Ujian Kualifikasi, Ujian Proposal Penelitian, Penilaian Naskah Disertasi pada Ujian Kelayakan dan Ujian Disertasi Tahap I : Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh., Dr. F.M. Judajana, dr., SpPK(K), Dr. Suwarno, drh., M.Si., Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D., Dr. Dady Soegianto Nazar, drh., M.Sc., Prof. Dr. Aulani'am, drh., DES.

Pemerintah Daerah Jawa Timur cq. Badan Perencanaan Pembangunan Daerah Provinsi Jawa Timur melalui bantuan dana Hibah 2010 dan Proyek Penelitian I'M HERE 2010 yang banyak membantu pendanaan penelitian ini.

Direktur *Institut Tropical Disease* Universitas Airlangga Prof. Dr. Nasronuddin, yang telah memberikan jalan untuk mendapatkan dana penelitian serta mengizinkan pemakaian fasilitas laboratorium dalam melaksanakan penelitian di lembaga ini.

Seluruh kolega dan staf *Indonesia-Japan Collaborative Research Center for Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases, Institute of Tropical Disease, Airlangga University* khususnya Dr. Masaoki Yamaoka dan Dr. Kyoko Shinya yang banyak membantu dalam pengolahan data dan pembuatan preparat imunohistokimia.

Pimpinan Pusat Veterinaria Farma Endhang Pudjiastuti, drh. M.Kes., beserta staf yang member ijin menggunakan fasilitas dan sarana laboratorium sekaligus bantuan pelaksanaan dimana penelitian ini banyak dilakukan. Secara khusus saya ingin berterimakasih kepada Dr. Rosmelati Situmeang, drh., yang banyak memberi pencerahan dalam penelitian ini dan permohonan maaf bila dalam proses penelitian ada sesuatu yang kurang berkenan.

Seluruh staf Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang tidak bisa disebut satu persatu, karena merupakan nara sumber pertama dan utama serta sumber inspirasi penelitian disertasi ini.

Seluruh staf Patologi Anatomi sebagai tempat pembuatan preparat histopatologi dan imunohistokimia, khususnya Djoko Legowo, drh., M.Kes. yang banyak mendampingi dan mengisi penelitian ini dibidang patologinya.

Semua kolega dan staf di Departemen Klinik Veteriner serta Rumah Sakit Hewan Universitas Airlangga yang tidak hanya membantu secara fisik tetapi juga dorongan moril dan semangat untuk segera menyelesaikan disertasi ini.

Rekan dokter hewan dan mahasiswa di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, diantaranya Agung, drh., Hanif, drh., Alwi, drs. Vet. Med., dan banyak lagi yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Terima kasih yang tidak terbatas kepada Para Tersayang: Ibu dan ayahanda (alm) Djiwopranoto; Ibu dan ayahanda mertua (alm) Soekarso; Serta para kakak dan adik tersayang, berkat restu, doa dan kasih sayangnya saya bisa hidup dan mengenyam pendidikan hingga seperti saat ini.

Spesial buat istri tersayang Elisabeth Roch Sriastuti, anakku Anna Lystia Poetranto dan Laurentia Esthi Poetranto yang tidak pernah berhenti berdoa sehingga Tuhan selalu menerangi jalan dalam penelitian ini, saya ucapkan terima kasih yang tiada batas serta permohonan maaf bila selama mengikuti studi Program Doktor telah banyak mengabaikan kalian.

Terakhir, kepada semua sahabat dan handai taulan yang tidak disebutkan satu persatu saya mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga, semoga amal dan kebaikan budi para sahabat dan handai taulan mendapatkan imbalan yang berlipat ganda dari Tuhan Yang Maha Esa.

Semoga hasil penelitian ini mendapat berkah dari Tuhan Yang Maha Esa sehingga dapat bermanfaat bagi kesejahteraan umat manusia.

RINGKASAN

KARAKTERISASI MOLEKULER DAN PROFIL PATOGENITAS VIRUS H5N1 ISOLAT ASAL BURUNG GEREJA (*PASSER MONTANUS*) SEBAGAI SUMBER PENULARAN ALAMI DI INDONESIA

E. DjokoPoetranto

Virus flu burung H5N1 hingga saat ini masih menjadi masalah global serta masih menjadi perhatian dunia. Hal ini dikarenakan kemampuan mutasi virus yang sangat tinggi dan mempunyai kemampuan adaptasi pada jenis hewan yang ditempatinya. Begitu luasnya keberadaan virus ini pada satwa yang dapat diserang, sehingga tidak terbatas pada unggas peternakan, burung liar pun banyak ditemukan positif terpapar virus ini termasuk burung gereja (*Passer montanus*).

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif laboratories untuk mengisolasi virus flu burung H5N1 yang sedang menginfeksi burung gereja di Jawa Timur kemudian melakukan karakterisasi molekuler dan eksperimental laboratories untuk mengetahui profil patogenitas virus yang ditemukan, khususnya pada burung gereja dan pada ayam lokal.

Penelitian dimulai dengan melakukan isolasi dan identifikasi virus asal burung gereja untuk selanjutnya mengukur titernya dalam satuan ELD 50. Karakterisasi molekuler terdiri atas analisis fenotip dan genotip. Analisis fenotip meliputi uji antigenitas terhadap beberapa panel antisera yang dianggap mewakili virus yang ada di Indonesia. Analisis genotip meliputi, sekuensing terhadap gen HA dan NA dilanjutkan dengan analisis pohon filogenetik serta analisis homologi.

Analisis profil patogenitas virus ini dilakukan untuk mengetahui patogenitas virus ini bila menular kembali pada burung gereja atau menular pada ayam kemudian mengamati gejala klinis yang muncul, perubahan patologi anatomi, gambaran histopatologis dan imunohistokimia, serta membandingkan masa inkubasi dan waktu kematian unggas setelah penularan antara kedua jenis unggas ini.

Hasil analisis fenotip menunjukkan bahwa virus yang ditemukan dari seekor burung gereja dari Sidoarjo-Jawa Timur, yang pada inokulasi kedua pada telur ayam bertunas mempunyai titer $10^{6.5}$ ELD₅₀, mempunyai hubungan antigenitas dengan semua panel antisera yang berasal dari *clade* 2.1.3 tetapi tidak dengan panel antisera yang berasal dari *clade* 2.1.1.

Secara genotip, dari hasil sekuensing terungkap bahwa daerah *Cleavage Site* protein HA virus mempunyai sekuen P Q R E S R R K K R//G L dan sekuan *receptor binding site* Q S G. Hal tersebut menunjukkan bahwa meskipun virus initergolong *High Pathogenic Avian Influenza* H5N1 namun tidak bisa menularkan antar manusia karena masih menempati reseptor spesifik unggas yaitu asam sialat α 2,3.

Berdasarkan analisis pohon filogenetik dan uji homologi terungkap bahwa virus yang ditemukan selain dekat dengan isolate asal unggas (tahun 2010) Jawa-Timur juga dekat dengan virus isolat yang menyerang manusia di Indonesia ((A/Indonesia/CDC887/2006(H5N1));(A/Indonesia/CDC1031RE2/2007(H5N1))).

Berdasarkan uji homologi nukleotida dengan beberapa virus hasil isolasi antara tahun 2005-2010 serta hasil gambar diagram cakramnya, dapat disimpulkan

bahwa virus di Indonesia mudah mengalami mutasi dan dari waktu ke waktu mengalami perubahan mutasi *drift* serta diperkirakan virus yang diisolasi dari burung gereja merupakan perkembangan dari virus yang menginfeksi ayam.

Hasil eksperimental laboratories meyakinkan bahwa virus ini dapat menularkan pada sesama burung gereja dan pada ayam. Masa inkubasi pada burung gereja antara 3 -5 hari. Gejala klinis yang tampak adalah lesu, bulu mulai tampak kusam, leher mulai ditarik (bhs Jawa *nyekukruk*), beberapa diantaranya tortikolis dan akhirnya semua mati antara 5-9 hari setelah penularan. Sedangkan pada ayam, 2 hari setelah penularan semua ayam kelihatan lemas, lesu, leher ditarik (bhs Jawa-*nyekukruk*) dan sesak nafas (*dispneu*) dan pada siang harinya semuanya mati dengan kepala tampak sianotis. Dengan membandingkan (Uji t) masa inkubasi dan waktu terjadinya kematian antara pada burung gereja dan ayam, secara nyata terbukti bahwa ayam lebih peka daripada burung gereja terhadap virus ini.

Berdasarkan pengamatan patologi anatomi, perubahan yang paling menonjol dan terjadi pada semua ayam dan burung gereja adalah perdarahan paru-paru dan pada otak. Perbedaannya adalah hampir semua kerusakan paru-paru pada ayam jauh lebih parah dibandingkan pada burung gereja. Paru-paru burung gereja nampak haemorrhagis, pada ayam paru-paru sudah mengalami kolaps dan berair.

Gambaran hisopatologis menunjukkan rata-rata paru-paru burung gereja nampak adanya *conghesti* pada arteri pulmonalis, infiltrasi sel radang yang berlebihan, serta adanya kerusakan sel alveolaris maupun sel endothel. Hal ini

juga terjadi pada ayam namun terlihat lebih parah dengan sebagian besar alveoli mengalami degenerasi dan kolaps.

Perubahan pada otak yang menonjol adalah adanya jumlah sel glia yang meningkat (gliosis), adanya neuronekrosis dan adanya kerusakan sel endothel. Kemungkinan besar hal ini yang memicu munculnya gejala tortikolis pada burung gereja. Pada ayam gejala tortikolis belum sempat nampak mungkin disebabkan ayam sudah terlebih dulu mati karena kerusakan pada paru-parunya.

Gambaran imunohistokimia menunjukkan adanya virus pada sel/jaringan yang mengalami kerusakan, ini membuktikan bahwa kerusakan sel/jaringan disebabkan oleh virus H5N1 yang ditularkan.

Berdasarkan karakter fenotip dan genotip serta profil patogenitasnya disimpulkan bahwa virus isolat burung gereja tergolong *High Pathogenic Avian Influenza* namun tidak bisa menularkan antar manusia karena masih menempati reseptor spesifik unggas yaitu asam sialat α 2,3 galaktosa, dapat saling menular antara burung gereja dan ayam dengan potensi penyebaran virus oleh burung gereja lebih tinggi dibandingkan ayam, gen HA dan NA mempunyai kedekatan (97%) dengan beberapa isolat virus asal ayam Jawa Timur maupun dengan isolat asal manusia Indonesia tahun 2006-2007.

SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY PROFILE OF H5N1 VIRUS ISOLATED FROM A LOCAL TREE SPARROW (*PASSER MONTANUS*) AS SOURCE NATURAL RESERVOIR IN EAST JAVA- INDONESIA

E. Djoko Poetranto

H5N1 avian influenza virus is still a global problem and is still the world's attention. This is because the ability of mutations is very high and has the ability to adapt to the type of animal they occupy. Once the extent of the presence of this virus in animals that can be attacked, so it is not only limited in poultry farms, but also wild birds are found positive exposed to this virus, including sparrows (*Passer Montanus*).

This research was laboratories exploratory research to isolate the H5N1 avian influenza virus that was infecting sparrows in East Java then did the characterization of molecular and experimental laboratories to determine pathogenicity profiles of virus that were found, especially on the sparrow and the chickens.

Molecular Characterization consisted of analysis of phenotype and genotype. Before analysis of the phenotype did , the isolate titer was measured in units ELD50 and phenotype analysis did with antigenicity test against some of the antisera panels that were considered representation of the virus in Indonesia. Genotype analyzes include, sequencing of the HA and NA genes followed by phylogenetic tree and homology analysis.

Virus pathogenicity profile analysis was conducted to determine the pathogenicity of this virus when its were transmitted back to a sparrow and chickens and then observed the clinical symptoms, a prominent anatomical pathological changes, histopathological and immunohistochemical picture, and compared the incubation period and time of death after infection

The results of phenotype analysis showed that the virus recovered from a sparrow from Sidoarjo, East Java, on the second inoculation in the chicken eggs, virus have sprouted ELD50 titer $10^{6.5}$, and have antigenicity relationships with all the antisera panel derived from clade 2.1.3 but not with a panel of antisera derived from clade 2.1.1.

In genotyping, the results of sequencing revealed that the HA protein cleavage site sequence of the virus have PQRESRRKKR // GL and sequenced receptor binding site QSG. This shows that although the virus is classified as High Pathogenic Avian Influenza H5N1, but it can not transmit among humans because it still occupies a specific fowls receptor sialic acid $\alpha 2, 3$.

Based on phylogenetic tree and homology analysis revealed that the virus found was close to chicken isolate (in 2010) of East Java and was also close to the virus isolates that infect humans in Indonesia in 2006-2007 ((A/Indonesia/CDC887/2006 (H5N1)); A/Indonesia/CDC1031RE2/2007 (H5N1)).

Based on nucleotide homology test with multiple virus isolation results between the years 2005-2010 and the diagram picture disks, it can be concluded that the virus in Indonesia from time to time happened to do *drift* mutations and it

is also predicted that the virus found is the development of viruses that infect birds.

The results of experimental laboratories ensured that this virus can infect others sparrow and the chickens. The incubation period on the sparrow between 3-5 days. Clinical symptoms appear is sluggish, the fur began to seem dull, the neck started to be withdrawn, some of which torticollis and eventually all died between 5-9 days after infection. Whereas in chickens, two days after the transmission of all the chicken looks weak, lethargic, withdrawn neck and shortness of breath (dyspnoea) and in the afternoon it all off with his head looks cyanotis. By compared (t test) and the incubation time of death between the sparrow and chicken, actually proven that the chicken was more sensitive than a sparrow against this virus.

Based on anatomical pathology observation, the most prominent changes occurred and happened in all the chickens and sparrows were bleeding in the lungs and brain. The difference was almost of all lung damage in chickens is much more severe than the sparrow. The lungs of sparrow appeared hemorrhagic and for chicken has experienced lung collapse and watery.

Histopathology picture showed that most of lung of sparrow could be seen a congestat the pulmonary artery, excessive infiltration of inflammatory cells, and the damage to alveolar cells and endothelial cells. It also happened to chickens but it looked even worse with most degenerated and collapsed alveoli.

Prominent Changes in the brain were the increased number of glial cells (gliosis), the neuronecrosis and endothelial cell damage. Most likely these

triggered the emergence of symptoms of torticollis on the sparrow. In chicken symptoms of torticollis had not been visible it probably happened because the chickens had already died because of damage to their lungs.

Immunohistochemistry showed a picture of the virus in cell / tissue damage suffered, it proved that the destruction of cells / tissues caused by the H5N1 virus is transmitted.

The sequencing revealed that the HA protein cleavage site sequence was PQRESRRKKR and sequence of receptor binding site was QSG. Its showed that the virus was classified as High Pathogenic Avian Influenza H5N1, but it could not transmit among human. Based on phylogenetic tree and homology analysis revealed that its hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) were genetically similar (97%) with chicken isolated virus of East Java in 2010 and human isolated virus of Indonesia in 2006-2007. Based on pathogenicity profile was concluded that the virus can be transmitted between tree sparrow and chicken along with tree sparrow more potential to spread it.