

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**PENGEMBANGAN METODE DETEKSI DAN
IDENTIFIKASI MOLEKULER MENUNJANG
PEMANTAUAN BERKALA PENYAKIT INFEKSI
SALURAN PERNAFASAN DAN PNEUMONIA**



Penyusun Laporan :

Dr. dr. Vivi Setiawaty, M.Biomed dan Tim ISPA

**Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
2016**

PERSETUJUAN ATASAN

Jakarta,

2016

MENYETUJUI :

Kepala Bidang Biomedis,

Ketua Pelaksana,

Drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes
NIP. 19591211 1985 032001

Dr. dr. Vivi Setiawaty, MBiomed
NIP. 19710125 2005 012001

DISETUJUI

Ketua Panitia Pembina Ilmiah

Kepala Puslitbang BTDK,

Dra. Sarwo Handayani, MSc
NIP. 19660625 1991 032001

Pretty Multihartina, PhD
NIP. 19630927 1989 012001

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena dengan pertolonganNya kami dapat menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul **PENGEMBANGAN METODE DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER MENUNJANG PEMANTAUAN BERKALA PENYAKIT INFEKSI SALURAN PERNAFASAN DAN PNEUMONIA**. Kami mengucapkan terima kasih kepada seluruh tim, baik di Puskemas sentinel, Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota, Laboratorium Regional yang telah membantu kami dalam mengerjakan kegiatan penelitian ini. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada teman sejawat di lingkungan Kementerian Kesehatan, terutama Sub Direktorat ISPA, Direktorat Penyakit Menular Langsung, Ditjen P2P yang membantu penelitian ini. Kepada seluruh tim dari Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang sudah memberi kontribusi, baik langsung maupun tidak langsung dalam pembuatan laporan penelitian ini dihaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Laporan penelitian ini memberikan gambaran mengenai kasus pneumonia dan kasus Influenza yang beredar di Indonesia selama tahun 2016. Diharapkan hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh pemegang kebijakan dalam pengendalian penyakit Influenza di tingkat nasional, regional, dan global. Karena itu kami berharap semoga hasil penelitian ini dapat menjadi sesuatu yang berguna bagi kita bersama.

Jakarta, Desember 2016

Ketua Pelaksana

RINGKASAN PENELITIAN

Penyakit Influenza adalah suatu infeksi akut pada saluran pernafasan dengan gejala klinis demam dan sakit tenggorokan atau batuk. Influenza merupakan masalah kesehatan di dunia, baik di negara berkembang maupun di negara maju seperti Amerika Serikat (AS), Kanada dan negara-negara di Eropa. Salah satu etiologi kasus Infeksi Saluran Pernafasan adalah virus Influenza, yang berpotensi menjadi penyebab pandemi global sehingga mengakibatkan tingginya angka mortalitas di seluruh dunia.

Sejak tahun 2005, Badan Litbang Kesehatan telah melaksanakan pemantauan berkala Infeksi Saluran Pernafasan Akut yang disebabkan oleh virus Influenza dengan berbasis laboratorium. Pemantauan berkala ini dilakukan secara berkelanjutan setiap tahunnya dengan tujuan umum untuk mendapatkan gambaran karakteristik virologi kasus Influenza di Indonesia. Kegiatan pemantauan berkala infeksi saluran pernafasan dan pneumonia yang disebabkan oleh Influenza hingga tahun 2016 telah dilaksanakan pada 27 sentinel Puskesmas di 26 Provinsi dan 6 rumah sakit di 6 Provinsi dimana pembiayaannya berasal dari pemerintah Indonesia.

Kegiatan pada tahun 2016 (Januari – Desember) melanjutkan pelaksanaan pada tahun 2015 yaitu dilaksanakan pada 27 sentinel di 26 Provinsi, dimana semua kegiatan dibiayai oleh pemerintah (DIPA). Data yang dikumpulkan melalui kuesioner berupa data umum, demografi, gejala klinis, dan riwayat pengobatan. Data etiologi diperoleh dari pemeriksaan spesimen apus tenggorok dan apus hidung di Laboratorium Regional. Pemeriksaan yang akan dilakukan di Laboratorium Virologi Puslitbang BTDK, Jakarta adalah pemeriksaan PCR dan isolasi untuk virus Influenza dan dilanjutkan dengan sekuensing. Sekuensing spesimen positif Influenza akan memberikan data karakterisasi virus Influenza yang beredar pada tahun 2016.

Data epidemiologis dan virologis yang diperoleh dianalisa secara deskriptif. Data dari kegiatan ini memberikan gambaran epidemiologi, pola virus dan penyebab ISPA, dan menyediakan informasi yang lebih lengkap mengenai penyakit yang disebabkan Influenza di Indonesia sehingga dapat memberikan masukan bagi program terkait mengenai pengendalian dan penanganan kasus Influenza.

Selama tahun 2016, telah diperoleh 3751 spesimen dari kasus ISPA di Puskesmas dan 804 spesimen dari kasus ISPA di Rumah Sakit. Dari kasus tersebut, sebanyak 20% merupakan kasus Influenza. Virus Influenza yang dominan bersirkulasi adalah Influenza A/H3N2 dan Influenza B. Pola musiman Influenza untuk tahun ini tidak berbeda dengan tahun sebelumnya yaitu virus Influenza beredar sepanjang tahun dengan puncak kasus pada musim penghujan. Hasil karakterisasi virus influenza menunjukkan bahwa secara molekular virus yang bersirkulasi di Indonesia sesuai dengan virus yang bersirkulasi di dunia.

Pada penelitian ini juga dikembangkan metode deteksi pemeriksaan molekuler untuk virus penyebab infeksi saluran nafas lainnya yaitu pengembangan primer multipleks untuk deteksi virus Human Parainfluenza virus, RSV A & B, SARS dan beberapa Human Coronavirus. Design primer telah diuji coba dengan kontrol positif dan tahun berikutnya akan diuji coba digunakan memeriksa spesimen. Metode deteksi virus tidak hanya dengan molekuler namun dapat juga dengan metode immunoassay, untuk itu dikembangkan monoklonal antibodi untuk deteksi influenza A (H3N2, H1N1pdm09) dan Influenza B.

Mitra kerja dalam kegiatan ini meliputi Puskesmas, Dinas Kesehatan Kota/Kabupaten, Dinas Kesehatan Provinsi, Laboratorium Regional yang ikut berpartisipasi dan Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

ABSTRAK

Latar Belakang

Kasus *Influenza Like Illness* (ILI) didefinisikan sebagai demam dengan suhu $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ disertai dengan batuk, dengan onset < 7 hari. Kasus *ILI* dapat disebabkan oleh Virus Influenza yang memiliki sifat mudah berubah dan berpotensi pandemi. Untuk itu pengamatan kasus *ILI* secara spesifik terhadap Virus Influenza dan karakteristiknya dilakukan dalam penelitian ini. Penelitian surveilans berbasis Laboratorium ini dilakukan pada kasus pasien rawat jalan dari 27 Puskesmas sentinel di 26 Provinsi didanai dengan dana DIPA. Kegiatan ini meliputi pengisian kuesioner, pengambilan swab tenggorok/swab hidung dan pemeriksaan laboratorium. Identifikasi Influenza dilakukan dengan pemeriksaan *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), baik di Laboratorium Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK) maupun Laboratorium Regional. Sedangkan, pemeriksaan influenza dengan metode sekuensing serta deteksi virus saluran pernafasan lainnya serta pengembangan primer deteksinya dilakukan di Laboratorium Puslitbang BTDK. Selain dengan tehnik molekuler, deteksi virus influenza juga dikembangkan tehnik imunoassay dengan pengembangan monoklonal antibodi.

Hasil

Pada tahun 2016, telah diperoleh spesimen dari kasus ISPA sebanyak 4555 kasus. Dari kasus tersebut, sebanyak 20% merupakan kasus Influenza. Virus Influenza yang dominan bersirkulasi adalah Influenza A/H3N2 dan Influenza B. Pola musiman Influenza untuk tahun ini tidak berbeda dengan tahun sebelumnya yaitu virus Influenza beredar sepanjang tahun dengan puncak kasus pada musim penghujan. Hasil karakterisasi virus influenza menunjukkan bahwa secara molekuler virus yang bersirkulasi di Indonesia sesuai dengan virus yang bersirkulasi di dunia. Pada penelitian ini juga dihasilkan beberapa set primer yang digunakan untuk menguji adanya virus infeksi saluran pernafasan lainnya dan beberapa sel hibridoma untuk deteksi virus influenza A.

Kesimpulan

Pola musiman influenza Indonesia tahun 2016, dominasi virus yang beredar mengalami perubahan serta diperoleh metode deteksi virus saluran pernafasan selain influenza tahap pertama serta sel hibridoma untuk deteksi virus influenza A secara imunoassay.

Kata Kunci : Pemantauan berkala, Karakterisasi, Virologi, Influenza

DAFTAR ISI

SURAT KEPUTUSAN (SK) PENELITIAN	
SUSUNAN TIM PENELITI	
SURAT PERSETUJUAN ETIK (<i>ETHICAL APPROVAL</i>)	
PERSETUJUAN ATASAN	
KATA PENGANTAR	
RINGKASAN PENELITIAN	
ABSTRAK	
DAFTAR ISI	
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
III. TUJUAN	8
2.1. Tujuan Umum	8
2.2. Tujuan Khusus	8
IV. MANFAAT	9
V. METODE	10
5.1 Kerangka Teori	10
5.2 Lokasi Penelitian	12
5.3 Desain Penelitian	15
5.4 Jenis Penelitian	15
5.5 Populasi dan Sampel Penelitian	16
5.6 Tempat dan Waktu Penelitian	16
5.6.1. Tempat	16
5.6.2. Waktu Kegiatan	16
5.7 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	17
5.7.1. Kriteria Inklusi	17
5.7.2. Kriteria Eksklusi	17
5.8 Definisi Operasional	17
5.9 Perkiraan Jumlah Subyek	18
5.10 Spesimen dan Bahan Pemeriksaan	18

5.11	Jenis Kegiatan	19
5.11.1.	Puskesmas	19
5.11.2.	Rumah Sakit	20
5.11.3.	Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota	22
5.11.4.	Dinas Kesehatan Provinsi	22
5.11.5.	Laboratorium Regional	22
5.11.6.	Laboratorium Rujukan	23
5.11.7.	Sekretariat	23
5.11.8.	Balitbangkes dan Ditjen P2P	24
5.12	Pelaksanaan Kegiatan	24
5.13	Indikator Kegiatan	40
5.14	Pengolahan dan Analisa Data	40
VI.	HASIL	41
6.1	Kasus ISPA Rawat Jalan (ILI) di Puskesmas	41
6.2	Kasus Influenza	48
6.3	Kasus ISPA di Rumah Sakit	50
6.4	Karakteristik virus Influenza	53
6.5	Pemeriksaan Resistensi Oseltamivir	61
6.6	Virus lain penyebab ISPA	62
6.7	Monoklonal Antibodi	63
6.8	Pengembangan Metode Deteksi Virus ISPA lain	66
6.9	Deteksi Streptococcus pneumoniae pada kasus pneumonia	87
6.10	Quasispesies influenza A	88
VII.	PEMBAHASAN	89
VIII.	KESIMPULAN DAN SARAN	98
8.1	Kesimpulan	98
8.2	Saran	99
IX.	DAFTAR PUSTAKA	100
X.	UCAPAN TERIMA KASIH	104
XI.	JADWAL KEGIATAN	105
XII.	BIODATA KETUA PELAKSANA	106
XIII.	PERSETUJUAN PENELITIAN	109
XIV.	PERSETUJUAN ETIK	109

XV. LAMPIRAN 111.

- Kuesioner Surveilans *ILI (Influenza Like Illness)*
- Naskah Penjelasan *Informed Consent* .
- Formulir Persetujuan Mengikuti Penelitian ISPA
- Buku Register Harian SARI
- Form Kasus SARI
- Form Pengambilan dan Pengiriman Spesimen SARI
- Form Laporan Mingguan RS
- Laporan Bulanan Logistik RS
- Formulir Keluar RS
- Kode Penomoran Spesimen ISPA di Puskesmas
- Tabel Alamat Laboratorium Regional ILI
- Daftar Laboratorium Regional dan Sentinel ILI ampuannya
- Label Pengiriman Puskesmas ke Labreg
- Label Pengiriman Labreg ke Laboratorium Rujukan
- Dokumentasi
- Contoh Buletin ISPA Berat
- Draft Artikel Publikasi

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Lokasi Sentinel dan nama Puskesmas	12
Tabel 2. Distribusi Riwayat Kontak Unggas yang Mempunyai Gejala ILI	46
Tabel 3. Perbandingan Proporsi Gejala Klinis dari Kasus <i>ILI</i> dan Kasus Positif Influenza	50
Tabel 4. Perbandingan Proporsi Riwayat Kontak Pada Kasus <i>ILI</i> dan Kasus Positif Influenza	50
Tabel 5. Kumulatif data virologi ISPA Berat	51
Tabel 6. Proporsi Kasus ISPA Berat berdasarkan data demografi, gejala, riwayat medis, dan kondisi saat keluar	52
Tabel 7. Spesimen klinis yang diisolasi	54
Tabel 8. Virus-virus Saluran Pernafasan Penyebab ISPA di Puskesmas	62
Tabel 9. Virus-virus Saluran Pernafasan Penyebab ISPA di RS	63
Tabel 10. Jumlah koloni hibridoma yang terbentuk dan tingkat keberhasilan fusi	64
Tabel 11. Daftar sel hibridoma yang mengenali virus influenza A	66
Tabel 12. Sekuens primer HPIV	67
Tabel 13. Uji sensitifitas <i>multiplex assay</i> pada berbagai pengenceran sampel ...	72
Tabel 14. Hasil uji spesifitas <i>multiplex assay</i> HPIV dengan berbagai panel virus saluran pernapasan	73
Tabel 15. Susunan nukleotida primer dan probe RSV A, RSV B, SARS.....	74
Tabel 16. Kondisi suhu RT-PCR	75
Tabel 17. Nilai <i>Cycle Threshold</i> (Ct) uji <i>duplex</i> RSV A dan RSV B	77
Tabel 18. Nilai Cycle Treshold (Ct) uji <i>trioplex</i> RSV A, RSV B, dan SARS	78
Tabel 19. Hasil uji sensitivitas <i>multiplex</i>	79
Tabel 20. Hasil Uji Spesifisitas <i>Multiplex</i>	80
Tabel 21. Sekuens set primer Human coronavirus	81
Tabel 22. Uji sensitifitas set primer HCoV-OC43 dan HCoV-229E	86
Tabel 23. Spesifisitas pengujian PIV, RSV, Coronavirus	86
Tabel 24. Hasil pengujian <i>S. pneumoniae</i> dengan RDT	87

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Teori Penyakit ISPA	17
Gambar 2. Alur Sub Penelitian Penyakit ISPA	11
Gambar 3. Peta Lokasi Sentinel RS di 6 Provinsi	15
Gambar 4. Alur Pemeriksaan Spesimen	16
Gambar 5. Pengambilan spesimen usap hidung	26
Gambar 6. Pengambilan spesimen usap tenggorokan	26
Gambar 7. Cara memasukkan ke dalam cryotube	27
Gambar 8. Cara mematahkan tangkai swab	27
Gambar 9.a dan 9.b. Penempelan label pada cryotube dan pelilitan parafilm	27
Gambar 10. Lembar kuesioner rangkap 3	28
Gambar 11. Cara Membungkus Spesimen dengan tisu	29
Gambar 12a. dan b. Spesimen dimasukkan kedalam wadah sekunder dan tersier	29
Gambar 13. <i>Cool box</i> dipadatkan dengan kertas dan dilengkapi termometer	30
Gambar 14. Cara Pengemasan Formulir kuesioner	30
Gambar 15. Label alamat laboratorium regional	31
Gambar 16. Box yang telah diberi label alamat lab regional	31
Gambar 17. Label alamat laboratorium rujukan	32
Gambar 18. Puskesmas Sentinel dan Laboratorium <i>ILI</i>	41
Gambar 19. Grafik total kunjungan Puskesmas per minggu.....	42
Gambar 20. Grafik Sebaran Kasus <i>ILI</i> Per-sentinel.....	42
Gambar 21. Grafik Sebaran Kasus <i>ILI</i> per minggu	43
Gambar 22. Grafik Distribusi Kasus <i>ILI</i> berdasarkan kelompok umur	44
Gambar 23. Distribusi Kasus <i>ILI</i> berdasarkan kelompok umur perminggu	44
Gambar 24. Grafik Distribusi Kasus <i>ILI</i> berdasarkan kelompok umur	45
Gambar 25. Grafik Distribusi Gejala Kasus <i>ILI</i>	45
Gambar 26. Hasil Pemeriksaan PCR Influenza dari Kasus <i>ILI</i>	47
Gambar 27. Distribusi Subtype Virus Influenza dari Kasus <i>ILI</i>	47
Gambar 28. Distribusi Subtype Virus Influenza dari Kasus <i>ILI</i> per Pulau.....	48
Gambar 29. Grafik Distribusi Type dan Subtype Virus Influenza dari Kasus <i>ILI</i> per minggu	49

Gambar 30. Grafik Distribusi Minggua Type dan Subtype Virus Influenza per Pulau	49
Gambar 31. Persentase spesimen klinis yang diisolasi	54
Gambar 32. Pohon Filogenetik gen HA A/H3N2	56
Gambar 33. Pohon Filogenetik gen NA A/H3N2	57
Gambar 34. Alignment gen NA H3N2	58
Gambar 35. Analisis residu gen NA A(H1N1)pdm09	59
Gambar 36. Pohon Filogenetik gen HA A/H1N1pdm09	60
Gambar 37. Plot diskriminasi alel resistensi oseltamivir dengan realtime RT-PCR.....	61
Gambar 38. Antibodi yang diekspresikan sel hibridoma 1h1.4.D3 (clone C5.10 Berikatan dengan sel MDCK dan memberikan sinyal warna fluorescens dideteksi dengan metode IFA	64
Gambar 39. Antibodi yang diekspresikan sel hibridoma 1h5.1B7 (clone 88) mampu berikatan dengan virus A/H5N1 yang menginfeksi sel MDCK dideteksi dengan metode IFA	65
Gambar 40. Single koloni dari sel hibridoma yang ditumbuhkan dalam medium HT	66
Gambar 41. Kurva amplifikasi set primer HPIV secara singleplex	69
Gambar 42. Gambaran Melt curve produk PCR primer HPIV 1,2,3,4 yang diprediksi menggunakan software U-melt v.2.02	70
Gambar 43. Kurva amplifikasi set primer secara multipleks	71
Gambar 44. Hasil singleplex RSV A dengan konsentrasi kontrol positif 1ng/ml hingga 10^{-3} ng/ μ l	76
Gambar 45. Hasil <i>singleplex</i> RSV B dengan konsentrasi kontrol positif 1 ng/ μ l hingga 10^{-8} ng/ μ l	76
Gambar 46. Hasil <i>singleplex</i> SARS dengan konsentrasi kontrol positif 1 ng/ μ l hingga 10^{-8} ng/ μ l	76
Gambar 47. Hasil <i>duplex</i> RSV A dan RSV B pada kontrol positif konsentrasi 10^{-5} ng/ μ l dan 10^{-6} ng/ μ l	77
Gambar 48. Hasil <i>Trioplex</i> RSV A dan RSV B dengan kontrol positif	78

Gambar 49. Kurva amplifikasi optimasi singleplex pada kondisi suhu PCR 1 (a) OC43, (b) 229E, (c) NL63, (d) HKU-1A pada konsentrasi 1 ng/ μ L sampai 10^{-8} ng/ μ L	84
Gambar 50. Kurva amplifikasi optimasi singleplex pada kondisi suhu PCR 2 (a) OC43, (b) 229E pada konsentrasi 1 ng/ μ L sampai 10^{-8} ng/ μ L	85
Gambar 51. Kurva amplifikasi optimasi set primer secara duplex HCoV-OC43 dan HCoV-229E.....	86
Gambar 52. Persentase jumlah hasil sekuensing per genom.....	87
Gambar 53. Pola Sirkulasi Virus Influenza di Indonesia 2012 – 2016	90
Gambar 54. Pola musiman Influenza di belahan bumi utara	91
Gambar 55. Pola musiman Influenza di belahan bumi selatan	92