

I. PENDAHULUAN

Acute Respiratory Infection (ARI) merupakan masalah kesehatan di negara berkembang dengan angka kesakitan dan kematian yang tinggi pada balita dan anak-anak.^{1,2} Berdasarkan laporan WHO, sebanyak lebih dari 700.000 hingga satu juta anak-anak usia kurang dari 5 tahun meninggal setiap tahun karena infeksi bakteri pneumokokus. *Streptococcus pneumonia* merupakan penyebab utama kematian pada anak-anak di Negara-negara berkembang dan juga pada usia dewasa di seluruh dunia.³

Selain bakteri, berbagai virus telah diketahui menyebabkan pneumonia. Virus Influenza, *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), Adenovirus, Rhinovirus, Parainfluenza virus, serta *human Metapneumovirus*, (hMV) merupakan virus yang umumnya ditemukan pada pneumonia.^{1,2} Data terkait etiologi pneumonia di Indonesia hingga saat ini sangat terbatas karena penelitian etiologi pneumonia hanya terbatas pada wilayah tertentu saja.⁴

Deteksi etiologi ISPA berat khususnya yang disebabkan oleh virus merupakan hal yang sangat diperlukan terkait tata laksana kasus-kasus ISPA. Hingga saat ini deteksi virus-virus penyebab pneumonia dilakukan dengan menggunakan teknik biologi molekuler menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Teknik PCR memiliki sensitivitas yang tinggi sehingga teknik ini merupakan teknik yang sangat umum digunakan, akan tetapi penggunaan teknik PCR memerlukan alat *thermal cycler* yang mahal dan diperlukan personel terlatih. Deteksi etiologi pneumonia pada Puskesmas atau Pelayanan Kesehatan di daerah mengalami kesulitan dikarenakan fasilitas *thermal cycler* ataupun personel terlatih belum seluruhnya dimiliki pada Puskesmas atau Pelayanan Kesehatan di daerah.^{5,6}

Tahun 2008 hingga 2009 diketahui setidaknya 6% dari pasien ARI di Indonesia terdeteksi terinfeksi virus Influenza.⁷ Virus influenza musiman cepat berevolusi menyebabkan komposisi vaksin Influenza harus berganti tiap 6 bulan sesuai dengan belahan dunia bagian utara dan selatan (northern dan southern hemisphere), . Perbedaan komposisi vaksin di belahan bumi ini disebabkan oleh berbedanya pola sirkulasi virus Influenza di belahan bumi utara dan belahan bumi selatan.⁸

Virus Corona (CoVs) termasuk ke dalam genus Coronavirus dan keluarga Coronaviridae dengan RNA yang berantai tunggal dan positif-sense. Ada lima sub tipe HCoVs, yaitu 229E, OC43, SARS-CoV, NL63, dan HKU1. HCoV-229E dan -NL63 adalah CoVs kelompok I, dan OC43, SARS-CoV, dan HKU1 adalah kelompok II. HCoV-OC43 dan HCoV-229E diidentifikasi pada pertengahan 1960-an sebagai penyebab ringan infeksi saluran pernafasan atas dan kemudian terbukti menyebabkan sekitar sepertiga penyakit pada orang dewasa. Seperti virus pernapasan lainnya, HCoV-OC43 dan -229E tersebar oleh droplet. Secara keseluruhan, frekuensi kemunculan virus tersebut mencapai 5 sampai 30% dari infeksi saluran pernapasan yang ditemukan. Wabah dapat terjadi dalam interval 3 sampai 4 tahun. HCoV-OC43 dan -229E infeksi dapat hadir dengan berbagai tanda dan gejala mulai dari batuk, pilek, dan demam untuk bronkiolitis atau pneumonia. HCoV-OC43 dan -229E telah dikaitkan dengan infeksi pada saluran pernafasan atas maupun bawah di dalam berbagai pengaturan termasuk nosokomial infeksi pada anak-anak berisiko tinggi, kekebalan rendah, pasien usia lanjut, dan pada bayi baru lahir, anak-anak, dan staf rumah sakit. Perhatian utama praktisi pengendalian infeksi adalah temuan terbaru bahwa HCoV-229E bisa bertahan sampai 3 jam bila dikeringkan pada permukaan padat dan hingga 6 hari di larutan garam pada suhu kamar.⁹

HCoV ketiga yaitu NL63, ditemukan di Belanda pada anak usia 7 bulan dengan konjungtivitis, dan demam yang memiliki temuan X-ray konsisten dengan bronkiolitis. Virus tumbuh dalam sel ginjal monyet tersier, yang membedakannya dari HCoV-OC43 dan -229E. Sequencing genom menunjukkan bahwa virus tersebut merupakan virus rekombinan tetapi secara genetik berbeda dari semua HCoVs yang telah diketahui. Sejak laporan awal dari Belanda, NL63 telah ditemukan di seluruh dunia. Infeksi NL63 terjadi terutama di daerah beriklim sedang di musim dingin, dengan puncaknya pada bulan November. Infeksi juga telah terjadi di musim semi atau musim panas di Hong Kong. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi musiman NL63 mungkin berbeda di iklim tropis dan subtropis. Analisis temuan klinis dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa NL63 menyebabkan penyakit saluran pernapasan yang sering hadir sebagai koinfeksi dengan virus lain dengan frekuensi kemunculan melebihi 50%. Pasien dengan infeksi ganda mungkin menderita

penyakit yang lebih parah atau lebih lama dibandingkan pasien dengan infeksi NL63 tunggal.⁹

Selain Coronavirus, beberapa virus pernafasan lainnya juga perlu dideteksi yaitu RSV termasuk dalam keluarga Paramyxoviridae, begitu juga dengan HPIV. Kedua virus ini merupakan penyebab terbanyak infeksi saluran nafas. HPIV merupakan virus RNA yang terdiri dari empat tipe yaitu tipe I, II, III dan IV. Tipe I, II dan III adalah tipe yang paling sering menyebabkan penyakit saluran pernafasan pada manusia dan menjadi penyebab infeksi nosokomial pada saluran pernafasan. Studi sebelumnya menyebutkan bahwa sebanyak 40% infeksi saluran pernafasan akut berat pada anak disebabkan oleh HPIV dengan 20% diantaranya perlu mendapatkan perawatan di RS.¹⁰

Respiratory syncytial virus (RSV) adalah penyebab utama infeksi saluran pernafasan bawah pada bayi dan anak-anak. Di Amerika Serikat setiap tahun 4-5 juta anak di bawah 4 tahun terinfeksi RSV, dan lebih dari 125.000 dirawat di rumah sakit. RSV merupakan penyebab paling umum dari bronchiolitis (radang saluran napas kecil di paru-paru) dan pneumonia pada anak di bawah usia 1 tahun di Amerika Serikat. Selain itu, RSV juga menyebabkan penyakit pernafasan pada orang lanjut usia. Diagnosis RSV yang cepat sangat penting untuk perawatan pada anak-anak.¹¹

Sejumlah teknik yang tersedia untuk deteksi dan identifikasi berbagai macam virus, diantaranya kultur sel, enzim immunoassay, imunofluoresensi, dan RT-PCR konvensional. Metode kultur sel merupakan proses yang memerlukan waktu yang cukup lama. Selain itu, uji ini memiliki sensitivitas yang rendah, yaitu mampu mendeteksi hanya 50 sampai 60% dari infeksi virus. Immunoassay lebih cepat untuk mendeteksi virus, seperti EIA dan IF, tetapi juga memiliki keterbatasan dalam sensitivitas dan spesifisitas. Konvensional RT-PCR, baru-baru ini dikembangkan untuk mendeteksi virus, merupakan metode diagnostik yang lebih sensitif dan spesifik. Namun, masih membutuhkan waktu analisis post-PCR. Real-time PCR menjadi metode pemeriksaan yang cukup menjanjikan. Selain waktu pemeriksaan yang relatif cepat yaitu tidak memerlukan analisa post PCR seperti halnya PCR konvensional, metode ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi.¹²

Pengembangkan metoda diagnosa cepat untuk mendeteksi virus dapat pula dilakukan melalui metoda serologi.

Pengembangan metode uji diagnosis untuk mendeteksi virus-virus penyebab pneumonia sangat diperlukan untuk dapat digunakan di Puskesmas ataupun Pelayanan Kesehatan di daerah. Diagnostik cepat virus-virus penyebab pneumonia di Puskesmas diharapkan dapat meningkatkan penatalaksanaan pasien pneumonia di daerah sehingga dapat menurunkan angka kesakitan dan kematian karena pneumonia.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Influenza adalah salah satu penyakit yang disebabkan oleh Virus Influenza yang termasuk dalam golongan *Orthomyxoviridae*. Virus Influenza memiliki genom *RNA* untai tunggal bersegmen dengan delapan segmen yang mengkode 10-11 protein virus. Karakteristik Virus Influenza antara lain adanya peristiwa “*Antigenic drift*” pada protein *HA* (*Hemagglutinin*) dan *NA* (*Neuraminidase*) yang menyebabkan terjadinya epidemi Influenza musiman, sedangkan peristiwa “*Antigenic shift*” disebabkan adanya proses “*Re-assortment*” virus Influenza yang bersirkulasi dan dapat memicu terjadinya pandemi Influenza.¹

Kejadian luar biasa dan epidemi terjadi karena adanya perubahan antigen dan keragaman pada salah satu atau kedua glikoprotein dari Virus Influenza, yaitu *HA* dan *NA*. Mutasi yang mengubah situs antigenik pada glikoprotein permukaan menghasilkan strain virus yang tidak dapat dikenali oleh sistem imunitas sel inang.¹ Oleh karena itu, komposisi dari vaksin Influenza musiman perlu diperbaharui secara berkala dengan koordinasi *WHO Global Influenza Programme* dalam rangka menghadapi perubahan Virus Influenza.² Global Influenza surveilans virologi telah dilakukan melalui *WHO Influenza Surveillance Global and Response System (GISRS)* yang sebelumnya dikenal sebagai *Global Influenza Surveillance Network (GISN)*, selama lebih dari setengah abad. *WHO GISRS* memonitor evolusi Virus Influenza dan memberikan rekomendasi di daerah termasuk diagnosa Laboratorium, vaksin, kerentanan antiviral dan penilaian risiko. *WHO GISRS* juga berfungsi sebagai mekanisme peringatan global untuk munculnya Virus Influenza dengan potensi pandemi.

Tipe variasi yang kedua yaitu *Antigenic shift*, menghasilkan Virus Influenza baru dengan karakteristik tidak memiliki atau sedikit pertahanan terhadap imunitas yang telah dipunyai sebelumnya dalam tubuh manusia, mengakibatkan epidemi dan pandemi dengan skala besar secara global.³ *Antigenic shift* diakibatkan oleh proses *gen re-assortment* oleh dua atau lebih strain virus yang berbeda, seperti dari sumber hewan dan manusia yang menginfeksi manusia. *Re-assortment* tersebut difasilitasi oleh sifat alami Virus Influenza yang berpotensi menyebabkan pandemi.¹

Sejarah mencatat tiga kejadian pandemi Influenza di abad ke-20, yaitu pada tahun 1918, 1957, 1968 dan di abad ke-21 yaitu pandemi yang terjadi pada tahun 2009.³ Pandemi Influenza terjadi ketika Virus Influenza dengan *HA* baru muncul dalam populasi manusia, dimana manusia tidak mempunyai kekebalan terhadapnya serta disertai adanya transmisi virus yang efisien dari manusia ke manusia.^{4,6}

Influenza Like Illness (ILI) adalah penyakit dengan kumpulan gejala seperti yang disebabkan oleh Virus Influenza; yaitu; demam $> 38^{\circ}\text{C}$, dengan onset tidak lebih dari 7 hari yang disertai gejala batuk dan sakit tenggorokan.^{7,8} Namun terdapat juga definisi *ILI* yang lain, dimana mengikutsertakan gejala-gejala lain seperti pilek, nyeri otot, dan kelemahan. Virus Influenza baik Influenza A dan B adalah penyebab utama *ILI*, namun *ILI* juga dapat disebabkan oleh patogen lain antara lain Virus Parainfluenza, *Respiratory Syncytial*, and *Mycoplasma Pneumoniae*.⁹ Infeksi Virus Influenza umumnya memberikan gejala demam akut, hidung berair, batuk, sakit kepala, kelemahan, dan peradangan saluran napas atas dan bawah.^{9,10} Gejala klinis ini tidak spesifik dan sulit untuk dibedakan dengan gejala yang disebabkan oleh infeksi virus atau bakteri lain di saluran pernapasan. Beberapa studi telah dilakukan untuk mencari gejala yang paling dapat memberikan petunjuk adanya infeksi virus Influenza, seperti yang dilakukan oleh Monto,dkk dimana gejala demam dan batuk secara bersamaan dianggap sebagai prediktor utama terjadinya infeksi Virus Influenza.¹¹ Menurut Kasper,dkk studi untuk menentukan prediktor utama untuk gejala yang berhubungan dengan infeksi Virus Influenza terfokus pada populasi di negara maju, sedangkan informasi dari negara berkembang masih terbatas.¹²

Kegiatan Surveilans *Influenza like Illness (ILI)* berbasis Laboratorium dilakukan di berbagai negara sebagai upaya untuk mengetahui epidemiologi kasus Influenza dan jenis Virus Influenza yang beredar. Pada saat puncak musim Influenza, diperkirakan sepertiga dari pasien dengan *ILI* akan positif terdeteksi Influenza.⁸

Kejadian epidemi yang disebabkan oleh virus pernapasan termasuk virus Influenza tentu bervariasi tergantung dari masing-masing negara dan wilayah.¹³ Pada mulanya infeksi Influenza dianggap hanya menimbulkan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada negara-negara dengan empat musim.

Epidemi Influenza dikatakan menyebabkan tiga sampai lima juta kasus yang berat dimana angka kematiannya diperkirakan mencapai 250.000-500.000 dan biasanya epidemi Influenza terjadi saat musim semi dan musim dingin. Di negara-negara tropis, Virus Influenza biasanya beredar sepanjang tahun dengan beberapa puncak kejadian pada saat musim hujan. Cepatnya virus influenza musiman berevolusi menyebabkan komposisi vaksin Influenza harus berganti tiap 6 bulan sesuai dengan belahan dunia bagian utara dan selatan (northern dan southern hemisphere), Belahan bumi utara dan belahan bumi selatan mempunyai pola sirkulasi virus influenza yang berbeda yang menyebabkan komposisi vaksin juga berbeda. Beberapa contoh komposisi vaksin yang beredar adalah

1. Komposisi vaksin influenza dengan virus trivalen yang direkomendasikan untuk digunakan tahun 2016–2017 di bumi belahan utara adalah :

- A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus
- A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus
- B/Brisbane/60/2008-like virus

WHO mengeluarkan rekomendasi pada tanggal 25 Februari 2016. Sedangkan untuk vaksin quadrivalen, dimana vaksin influenza terdiri dari 4 subtype virus, maka ketiga virus pada vaksin trivalen ditambah virus influenza B (B/Phuket/3073/2013-like virus).¹⁴

2. Komposisi vaksin influenza dengan virus trivalen yang direkomendasikan untuk digunakan tahun 2016–2017 di bumi belahan utara adalah :

- A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus
- A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus
- B/Brisbane/60/2008-like virus

WHO mengeluarkan rekomendasi pada tanggal 24 September 2016.

Sedangkan untuk vaksin quadrivalen, dimana vaksin influenza terdiri dari 4 subtype virus, maka ketiga virus pada vaksin trivalen ditambah virus influenza B (B/Phuket/3073/2013-like virus).¹⁵

Seiring munculnya kasus Avian Influenza A/H5N1 di Benua Asia, tepatnya di Hongkong pada 1997, memunculkan asumsi bahwa wilayah Asia, khususnya Asia Tenggara merupakan wilayah yang penting dalam evolusi dari Influenza A yang kemudian menyebar secara global.¹⁶ Selain itu, baru-baru ini telah muncul Virus

Influenza baru yang berasal dari golongan Avian Influenza yang ternyata menyebabkan infeksi pada manusia, yaitu kasus Influenza A/H7N9 dan Influenza A/H10N8 di China. Untuk itu, Surveilans *Influenza Like Illness (ILI)* juga dilaksanakan untuk dapat mendeteksi kemunculan Virus Influenza baru yang berpotensi menimbulkan epidemi dan pandemi. Untuk itu, Badan Kesehatan Dunia (*WHO*) menghimbau setiap negara untuk mengembangkan Surveilans Influenza.^{17,18}

Infeksi Virus Influenza dapat terjadi pada semua kelompok umur, namun prevalensi terbanyak menurut berbagai studi adalah pada kelompok anak sekolah, sedangkan kemungkinan Influenza yang parah terjadi pada balita, usia lanjut, dan pasien dengan kondisi kekebalan yang terganggu.⁹

III. TUJUAN

3.1. Tujuan Umum

Mengembangkan metode deteksi molekuler virus dan pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae* yang diperoleh dari pemantauan berkala pada patogen penyebab ISPA yang berpotensi pandemi di Indonesia.

3.2. Tujuan Khusus

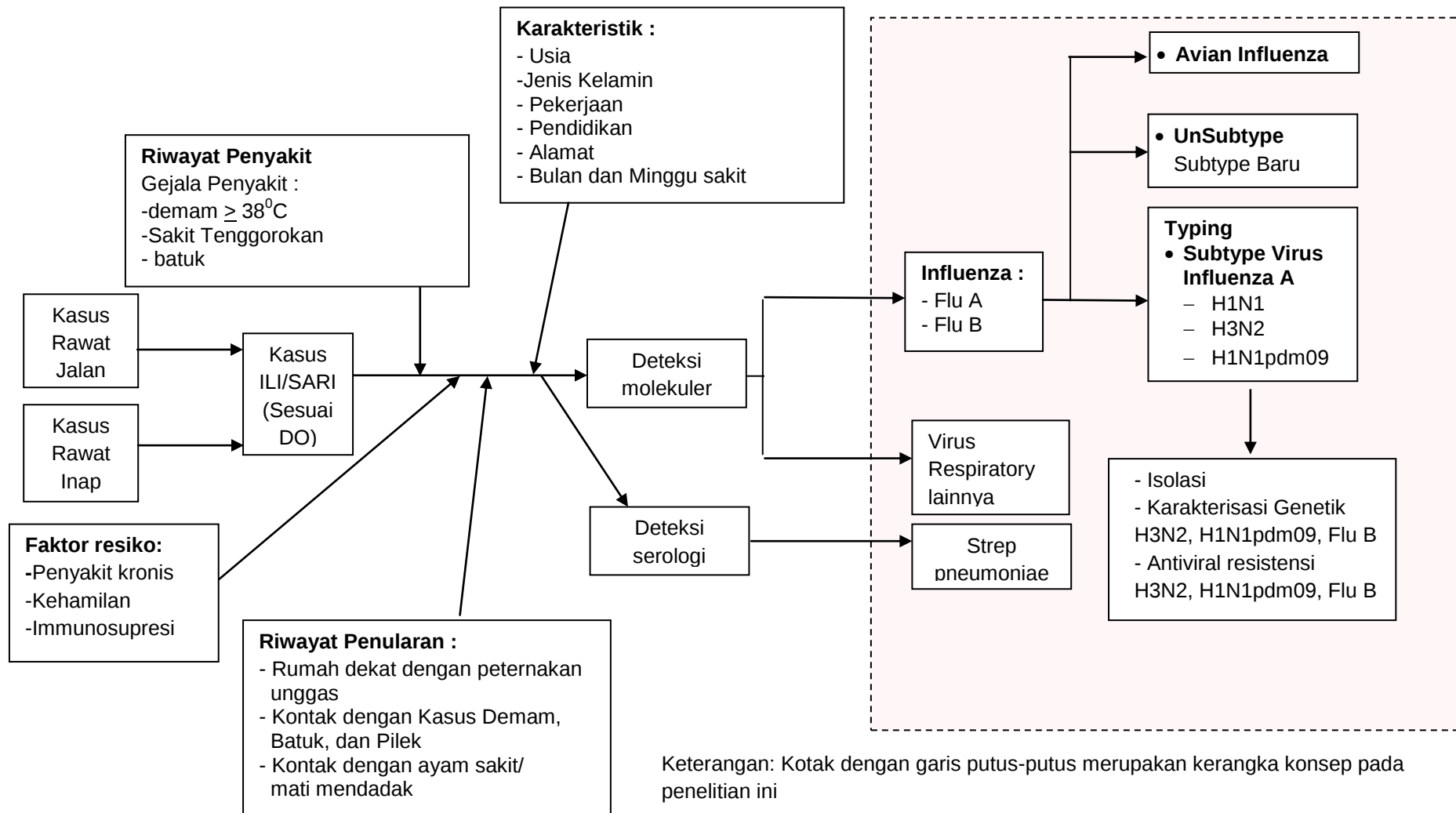
- 3.2.1. Mengidentifikasi virus-virus yang umumnya menyebabkan ISPA.
- 3.2.2. Melakukan pemetaan dan genotyping virus penyebab ISPA.
- 3.2.3. Mendapatkan pola sirkulasi virus-virus penyebab ISPA.
- 3.2.4. Mendapatkan informasi faktor-faktor yang menyebabkan ISPA berat
- 3.2.5. Mengembangkan *mouse monoclonal antibody* (mouse MAb) untuk digunakan dalam deteksi virus Influenza
- 3.2.6. Mengembangkan metode pemeriksaan molekuler untuk dapat digunakan mendeteksi virus penyebab ISPA
- 3.2.7. Mendapatkan informasi pneumonia yang disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae*
- 3.2.8. Mendapatkan informasi evolusi virus influenza H5N1

IV. MANFAAT

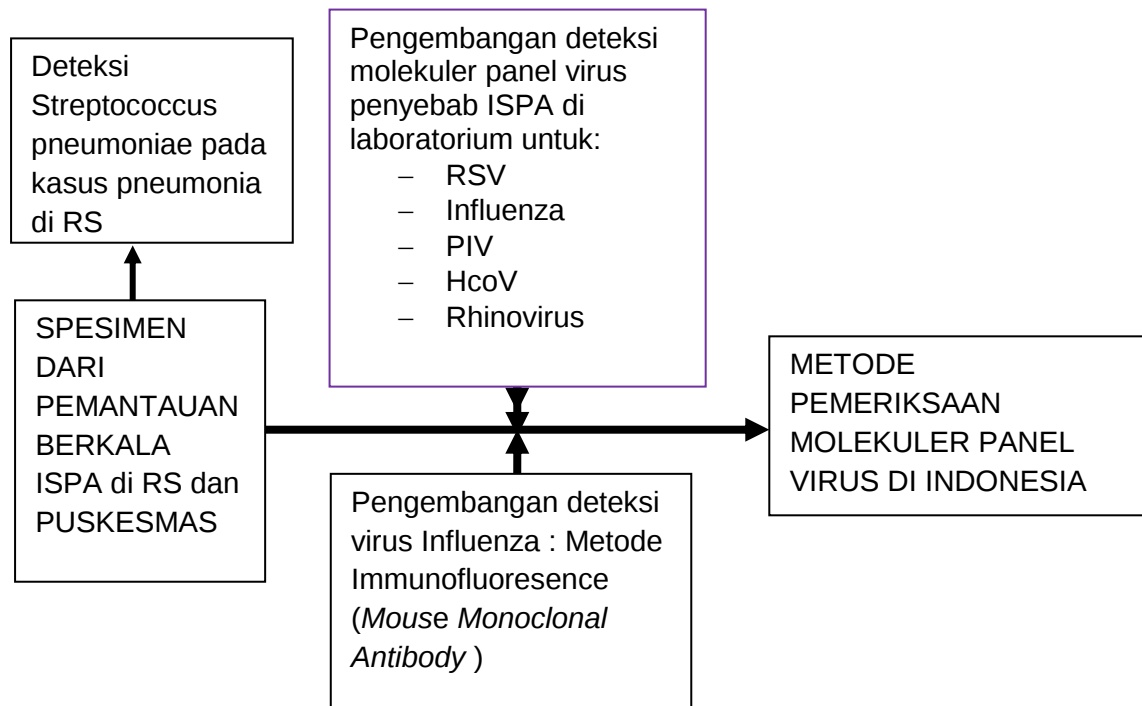
- 4.1. Menyediakan data dan informasi bagi pengembangan kebijakan dan pedoman untuk pencegahan dan pemantauan Influenza.
- 4.2. Memperkuat kesiapsiagaan dan respon pandemi Influenza.
- 4.3. Memberikan informasi untuk pelaksanaan Sistem Kewaspadaan Dini (SKD) dan respon Kejadian Luar Biasa (KLB) Influenza maupun penyakit saluran nafas yang disebabkan virus baru penyebab infeksi saluran nafas.
- 4.4. Memberikan informasi untuk perumusan kebijakan penanggulangan Influenza termasuk pemberian vaksinasi dan tatalaksana kasus.
- 4.5. Memberikan kemudahan akses untuk Program dan Dinas Kesehatan dalam melakukan pemeriksaan virus penyebab infeksi saluran nafas yang dapat berpotensi pandemi.

V. METODE

5.1. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori dari Penyakit ISPA



Gambar 2. Alur Subpenelitian Penyakit ISPA

Pemeriksaan dengan cepat merupakan kebutuhan di dalam deteksi penyebab penyakit apalagi untuk daerah-daerah yang memiliki keterbatasan fasilitas. Dengan menggunakan spesimen dari pemantauan berkala ISPA di puskesmas maupun rumah sakit, uji coba pengembangan metode pemeriksaan molekuler untuk deteksi virus yaitu : RSV, Influenza, PIV, HCoV dan Rhinovirus dilakukan. Hal ini sangat terkait dengan sensitifitas dan spesifisitas dari output pemeriksaan molekuler panel yang terintegrasi dalam satu kali pemeriksaan. Pemeriksaan terhadap *Streptococcus pneumoniae* dilakukan di RS sentinel dengan menggunakan Rapid Diagnostic test Uni-Gold® *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card. Pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae* dilakukan untuk mendapatkan informasi penyebab ISPA / pneumonia lainnya pada pasien rawat inap di RS sentinel.

5.2. Lokasi Penelitian

5.2.1. Puskesmas Sentinel

Sebanyak 27 puskesmas di 26 provinsi berperan serta secara aktif untuk mengumpulkan spesimen pada penelitian ISPA. Masing-masing provinsi mempunyai satu sentinel kecuali provinsi Papua, terdapat dua sentinel puskesmas. Nama puskesmas dan lokasinya terdapat pada tabel 1.

Kriteria Puskesmas sentinel

1. Terletak di kota sehingga mudah dalam pengiriman spesimen
2. Puskesmas yang dapat bekerja sama dengan baik
3. Mempunyai tenaga yang cukup dan mampu
4. Mempunyai sistem pencatatan dan pelaporan yang baik
5. Jumlah kunjungan ISPA minimal 10 per-hari

Tabel 1. Lokasi sentinel dan nama Puskesmas

No	Provinsi	Kota/Kabupaten	Puskesmas
1	Nanggroe Aceh Darussalam	Banda Aceh	Banda Raya
2	Sumatera Utara	Medan	Teladan
3	Kepulauan Riau	Batam	Batu Aji
4	Sumatera Selatan	Palembang	Tujuh Ulu
5	Jawa Barat	Bandung	Padasuka
6	Jawa Tengah	Semarang	Pandanaran
7	DI. Yogyakarta	Yogyakarta	Kotagede I
8	Jawa Timur	Malang	Dinoyo
9	Bali	Denpasar	Denpasar Selatan I
10	Nusa Tenggara Barat	Mataram	Karang Taliwang
11	Nusa Tenggara Timur	Kupang	Sikumana
12	Sulawesi Selatan	Makassar	Sudiang
13	Kalimantan Timur	Balikpapan	Klandasan Ilir
14	Kalimantan Selatan	Banjarmasin	Pekauman
15	Papua	Merauke	Mopah
16	Papua	Jayapura	Jayapura Utara
17	Kalimantan Tengah	Palangkaraya	Kayon

18	Sulawesi Tengah	Palu	Birobuli
19	Ambon	Ambon	Waihaong
20	Bengkulu	Bengkulu	Sukamerindu
21	Sulawesi Barat	Mamuju	Tampapadang
22	Lampung	Bandar Lampung	Sumur Batu
23	Jambi	Muaro Jambi	Sungai Duren
24	Sumatera Selatan	Padang	Lubuk Buaya
25	Kepulauan Bangka Belitung	Bangka	Pemali
26	Riau	Pekanbaru	Rumbai
27	Banten	Tangerang Selatan	Serpong 1

5.2.2. Laboratorium Regional

Sebanyak lima laboratorium di daerah yang menjadi laboratorium regional untuk pemeriksaan spesimen ILI. Kelima laboratorium tersebut adalah :

1. Laboratorium Regional BBTCL, Jakarta
2. Laboratorium Regional UI, Jakarta
3. Laboratorium Regional UNHAS, Makassar
4. Laboratorium BBLK Palembang
5. Laboratorium BBLK Makassar

5.2.3. Laboratorium Rujukan

Laboratorium Virologi Puslitbang BTDK menjadi laboratorium rujukan dalam pemeriksaan spesimen dan bertugas melakukan kegiatan isolasi virus, sekuensing, karakterisasi molekuler, resistensi antiviral dan pemeriksaan *Quality Control* terhadap spesimen yang diambil oleh Puskesmas.

5.2.4. Rumah Sakit sentinel di 6 provinsi

Pengambilan spesimen juga dilakukan pada kasus rawat inap, sebanyak enam rumah sakit kabupaten/kota di enam provinsi merupakan rumah sakit sentinel kasus rawat inap, lokasi keenam rumah sakit terdapat pada gambar 3.

Kriteria Rumah Sakit sentinel

a. Kriteria Lokasi:

1. Merupakan Rumah Sakit Kabupaten/Kota
2. Manajemen Rumah Sakit setuju untuk menerapkan sistem surveilans
3. Pasien yang datang dari semua golongan umur
4. Pasien yang datang dari semua tingkat sosial ekonomi
5. Jumlah rata-rata pasien yang dirawat di Rumah Sakit per bulan lebih dari 500 pasien
6. Jumlah populasi di wilayah Rumah Sakit dapat diperkirakan
7. Semua bangsal tempat pasien SIBI dirawat dapat berperan serta dalam kegiatan surveilans ini.

b. Kapasitas Sumber Daya Manusia

1. Memiliki dokter tetap yang dilatih untuk mengidentifikasi kasus ISPA berat
2. Memiliki perawat untuk identifikasi kasus dan mengumpulkan data pasien
3. Memiliki staf laboratorium untuk pengambilan sampel/spesimen
4. Memiliki petugas surveilans atau petugas rekam medis untuk pelaporan dan pengolahan data.

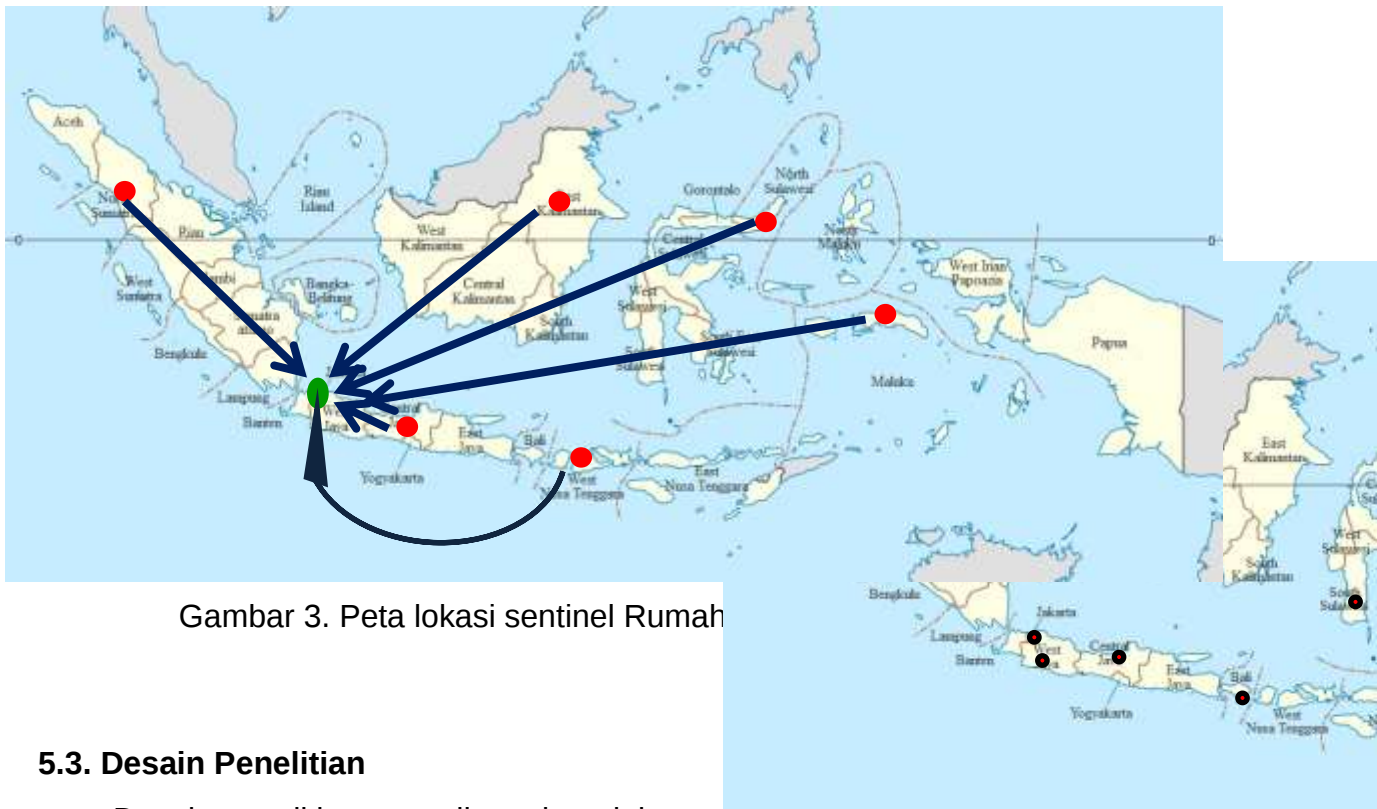
c. Infrastruktur Rumah Sakit

1. Rumah Sakit Umum Pemerintah minimal tipe C.
2. Memiliki prosedur pemeriksaan radiologi untuk pasien dengan penyakit pernafasan.
3. Memiliki fasilitas laboratorium.
4. Spesimen dapat dikirim ke Jakarta satu kali seminggu dengan kurir atau layanan pengiriman lain.
5. Petugas surveilans mempunyai akses ke komputer dan internet.
6. Mempunyai kapasitas penyimpanan spesimen (lemari pendingin 4°C) dengan daya listrik yang memadai.

7. Menyimpan riwayat medis pasien dalam bentuk berkas maupun elektronik.
8. Menggunakan kode ICD 9 atau 10 dalam pelaporan.

Keenam rumah sakit tersebut adalah :

1. Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Wonosari, DI Yogyakarta
2. RSUD Kanujoso Djati, Kalimantan Timur
3. RSUD Bitung, Sulawesi Utara
4. RSUD Deli Serdang, Sumatera Utara
5. RSU dr Haulussy, Ambon
6. RSU Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Barat



Gambar 3. Peta lokasi sentinel Rumah

5.3. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian potong lintang.

5.4. Jenis Penelitian

Penelitian dengan pemeriksaan di laboratorium dan observasi di lapangan.

5.5. Populasi dan Sampel

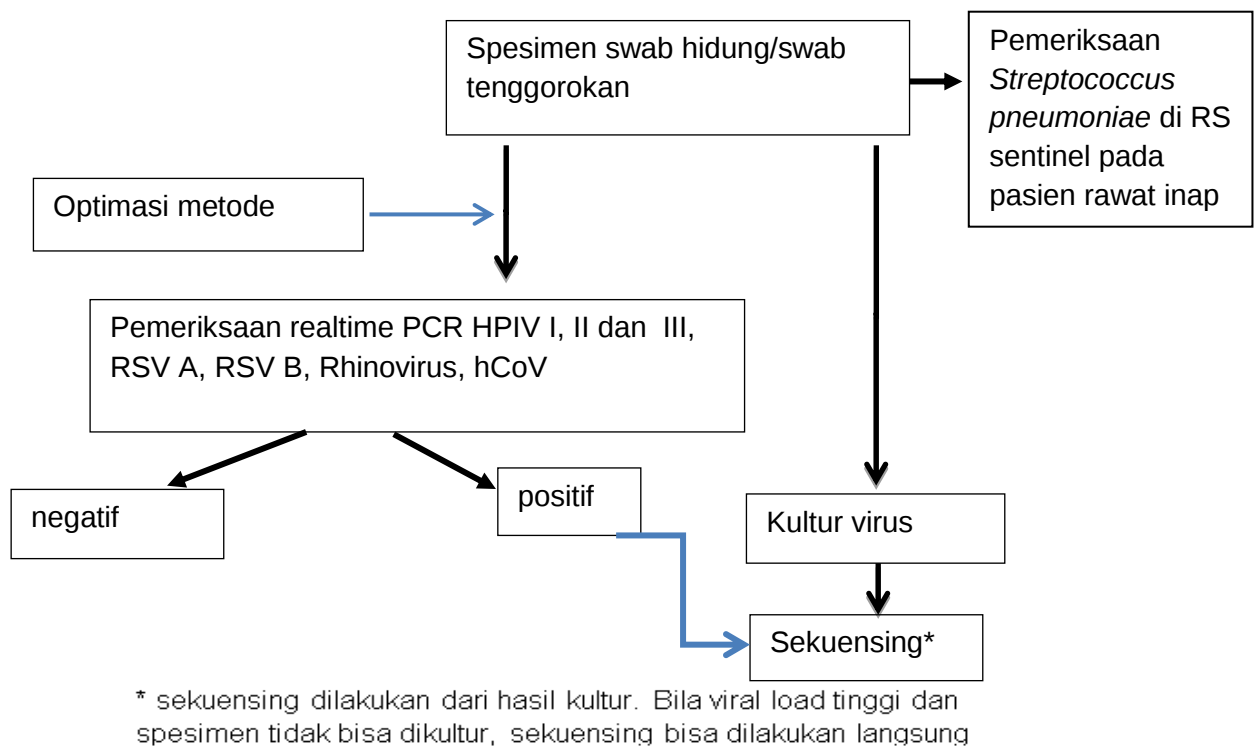
5.5.1. Populasi penelitian adalah seluruh penderita kasus ISPA di Indonesia.

5.5.2. Sampel penelitian adalah penderita kasus ISPA sesuai kriteria yang datang ke Puskesmas dan terdiagnosis oleh dokter di Puskesmas dan yang datang ke Rumah Sakit dan terdiagnosis oleh RS.

5.6. Tempat dan Waktu Kegiatan

5.6.1. Tempat

- Kegiatan penelitian terdiri dari pengambilan dan pemeriksaan spesimen dengan alur pada gambar 4.
- Kegiatan pengambilan spesimen dilakukan di 27 Puskesmas dan 6 rumah sakit sentinel ISPA.
- Kegiatan pemeriksaan spesimen dari puskesmas dilakukan di Laboratorium Regional di Jakarta, Bali, Palembang, Makassar.
- Kegiatan pemeriksaan spesimen dari rumah sakit dilakukan di Lab. Virologi Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan - Jakarta.



Gambar 4. Alur Pemeriksaan Spesimen

5.6.2. Waktu Kegiatan

Januari 2016 – Desember 2016

5.7. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

5.7.1. Kriteria Inklusi

- a. Pasien rawat jalan yang didiagnosis ILI
- b. Pasien rawat inap yang didiagnosis SARI
- c. Memenuhi kriteria ILI/SARI dan definisi klinis kasus ILI/SARI
- d. Setuju untuk berpartisipasi dalam studi

5.7.2. Kriteria Eksklusi

- a. Keadaan dimana tidak pengambilan spesimen dimungkinkan misalkan anak memberontak pada saat diambil spesimen, trauma pada wajah atau memakai alat bantu pernafasan.
- b. Pasien dengan kondisi waktu masuk rawat inap seperti di bawah ini juga dikeluarkan dari skrining awal:
 - c. Trauma/luka dengan berbagai kondisi
 - d. Dirawat untuk prosedur tertentu
 - e. Kondisi bedah (contoh obstruksi usus, appendicitis, dll)
 - f. Kondisi urologic atau gynecologic
 - g. Persalinan
 - h. Gangguan jiwa
 - i. Anak memberontak pada saat diambil spesimen, dll.

5.8. Definisi operasional

Kasus ISPA adalah kasus dengan demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ dengan batuk yang rawat jalan di Puskesmas dan/atau rawat inap di Rumah Sakit.

a. *Influenza Like Illness* (ILI) :

Penyakit seperti Influenza dengan gejala demam mendadak ($\geq 38^{\circ}\text{C}$, suhu aksila) disertai batuk, dengan onset demam tidak lebih dari tujuh hari.

b. *Severe Acute Respiratory Infection (SARI)* :

Penyakit infeksi saluran pernafasan berat dengan gejala demam mendadak ($\geq 38^{\circ}\text{C}$, suhu aksila) disertai batuk, dengan onset demam tidak lebih dari sepuluh hari dan memerlukan rawat inap.

c. Kasus Influenza (Konfirmasi):

Kasus ISPA dengan konfirmasi Laboratorium Influenza secara pemeriksaan molekuler menggunakan metode *polimerase chain reaction* (PCR).

5.9. Perkiraan Jumlah Subyek

Berdasarkan hasil penelitian tahun 2015, dimana untuk 12 bulan kegiatan dengan 26 sentinel puskesmas, kasus ISPA rawat jalan dengan gejala ILI yang dideteksi sejumlah 4234 kasus, sehingga untuk tahun 2016 dengan jumlah sentinel sebanyak 27, diharapkan diperoleh paling sedikit 12 subyek/minggu/Puskesmas selama 12 bulan : 3888 subyek/spesimen.

Sedangkan untuk kasus ISPA rawat inap dengan gejala SARI, berdasarkan hasil penelitian tahun 2015, dimana untuk 12 bulan kegiatan dengan 6 sentinel rumah sakit, kasus ISPA yang dideteksi sejumlah 980 kasus, sehingga untuk tahun 2016 diharapkan diperoleh 10-12 subyek SARI setiap bulannya dari setiap sentinel, sehingga secara perhitungan dari 6 sentinel diharapkan diperoleh 60 – 72 subyek / bulan. Perkiraan jumlah subyek/spesimen dari Rumah Sakit selama 12 bulan adalah : 720 - 864 subyek/spesimen.

5.10. Spesimen / Bahan Pemeriksaan

Spesimen untuk pemeriksaan real time PCR berupa apus tenggorok atau apus hidung akan diambil oleh petugas Puskesmas / Rumah sakit yang telah dilatih. Apus tenggorok dan apus hidung dimasukkan dalam *Viral Transport Media* (VTM)/*Media Transport Hanks* untuk dilakukan pemeriksaan *Reverse Transcriptase (RT)-Polymerase Chain Reaction* (PCR) ,isolasi virus Influenza, dan sekuensing. Spesimen dikirim ke

Laboratorium Regional dan Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK) di Jakarta.

Spesimen untuk pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae* berupa urin yang diambil oleh petugas Rumah Sakit yang telah dilatih. Pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae* pada pasien rawat inap dilakukan di RS sentinel dengan menggunakan Rapid Diagnostic test Uni-Gold® *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card.

5.11. Jenis Kegiatan

5.11.1. Puskesmas

Dokter/paramedis Puskesmas melakukan pemeriksaan terhadap semua pasien yang datang berobat dan disertai gejala sesuai definisi ILI. Semua pasien yang memenuhi kriteria ILI setiap hari akan dicatat dalam buku register, kemudian ditanyakan kesediaannya untuk ikut serta dalam pemantauan berkala ILI setelah diberi penjelasan. Bila pasien bersedia untuk berpartisipasi, dokter/petugas terlatih akan mengambil spesimen usap hidung (kiri atau kanan) serta usap tenggorok. Jika hanya salah satu dari spesimen di atas tetap diperbolehkan. Spesimen apus hidung dan tenggorok dimasukkan dalam tabung VTM yang sama, sesuai dengan prosedur penanganan spesimen (lihat buku petunjuk Laboratorium) dan disimpan di kulkas dengan suhu 4-8°C.

Dokter/petugas Puskesmas melakukan wawancara terhadap pasien dengan menggunakan Formulir Pengamatan/Kuesioner Kasus *Influenza Like Illness* (ILI) sekaligus mengisinya, rangkap 3 yaitu putih, hijau, merah jambu (formulir terlampir). Setiap 1 minggu 1 kali (sesuai dengan hari yang disepakati), maka kurir/ekspedisi yang akan mengambil spesimen disertai dengan formulir pengamatan yang berwarna putih dan merah jambu. Sedangkan, formulir hijau untuk arsip di Puskesmas. Puskesmas juga melaporkan jumlah pasien ILI yang datang per-minggunya di Puskesmas menggunakan Formulir Laporan Mingguan.

Puskesmas juga akan mengirimkan laporan rata-rata pemakaian logistik untuk pengambilan spesimen ke BTDK melalui fax atau email dengan tembusan ke Dinas Kesehatan Kab/Kota setiap satu bulan sekali.

5.11.2. Rumah Sakit

Untuk mendapatkan subyek penelitian dimulai dari petugas surveilans/rekam medis memberikan informasi atau data/daftar pasien yang di rawat, (diberi tanda pada pasien dengan panas atau ada gejala penyakit saluran pernapasan) kepada perawat tim SIBI yang ditunjuk. Perawat mengidentifikasi semua pasien yang sesuai definisi kasus ISPA Berat berdasarkan daftar pasien baru yang dirawat rumah sakit (dalam 24 jam terakhir) dan mengunjungi setiap bangsal/ lantai di rumah sakit untuk menanyakan kepada kepala perawat yang bertugas apakah ada pasien yang dirawat dalam 24 jam terakhir dengan gejala demam atau penyakit saluran pernapasan lain. Selanjutnya menentukan apakah pasien sesuai definisi kasus ISPA Berat.

Perawat juga mengidentifikasi pasien lain yang telah dirawat selama tidak lebih dari 72 jam atau 3 hari (untuk menghindari kasus nosokomial) untuk mengidentifikasi apakah selama dalam perawatan timbul gejala yang memenuhi kriteria ISPA Berat. Kemudian perawat menyimpan daftar pasien yang telah diidentifikasi.

Pasien dengan kriteria eksklusi dikeluarkan dari skrining awal. Di luar itu, semua pasien yang dirawat karena semua gangguan pernapasan (contoh: pneumonia, bronchitis, exacerbation of chronic bronchitis, asthma, dll) akan dilihat perawat untuk diidentifikasi sebagai kasus ISPA Berat jika sesuai definisi kasus. Perawat kemudian melaporkan kepada dokter penanggungjawab SARI untuk mengkonfirmasi pasien ISPA Berat. Perawat kemudian mencatat dalam buku register harian kasus SARI. Dokter

selanjutnya menjelaskan tujuan dari surveilans dan mendapatkan *Informed Consent* / Persetujuan Tindakan untuk melakukan wawancara dan pengambilan spesimen dari pasien (atau dari orang tua pasien). Setelah mendapat Persetujuan Tindakan, perawat surveilans melanjutkan dengan mengisi formulir laporan kasus SIBI berdasarkan informasi langsung dari pasien (atau orang tua atau anggota keluarga jika pasien tidak dapat berkomunikasi) dan dari kartu status pasien. Satu rangkap dikirimkan ke Subdit ISPA, satu pertinggal dan satu untuk pasien.

Perawat menghubungi petugas laboratorium untuk pengumpulan spesimen. Petugas laboratorium akan menyiapkan kit pengambilan spesimen dan ke ruangan pasien untuk mengambil swab hidung dan tenggorok sesuai SOP dan menyimpan dalam suhu 4°C.

Petugas Laboratorium mengisi formulir pengumpulan spesimen 3 rangkap, 1 rangkap dikirimkan ke Subdit ISPA, 1 rangkap ke Puslitbang BTDK dan 1 pertinggal untuk RS. Spesimen yang telah dikumpulkan pada minggu itu harus dikemas dan dikirim untuk pemeriksaan laboratorium melalui kurir, bersama dengan formulir pengumpulan spesimen 2 rangkap. Spesimen tidak boleh disimpan di kulkas lokasi sentinel (4°C) lebih dari 96 jam. Formulir laporan kasus SARI diberikan ke petugas surveilans/rekam medis untuk dimasukkan data dan direkap dalam formulir data agregat mingguan.

Pada hari pengiriman, satu rangkap formulir laporan kasus SARI dan formulir data agregat mingguan dikirim ke Pusat oleh kurir bersamaan dengan pengiriman spesimen. Rumah sakit menyimpan salinan formulir untuk dokumentasi. Setiap bulan, petugas laboratorium mengisi tiga rangkap formulir laporan logistik dan dikirim satu rangkap ke Subdit ISPA, satu rangkap ke Puslitbang BTDK, dan satu rangkap pertinggal untuk rumah sakit.

5.11.3. Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota

Petugas Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota mendapatkan salinan formulir pengamatan pasien ILI dan laporan mingguan ILI. Bersama-sama dengan petugas Puskesmas, petugas Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota akan menganalisa data epidemiologi berdasarkan formulir pengamatan dan laporan mingguan.

Melakukan analisis standar (variabel epidemiologi) terhadap data yang sudah di-*entry* sekurang-kurangnya setiap bulan satu kali. Petugas kemudian menyebarluaskan hasil analisis kepada program terkait dan memberikan umpan balik ke Puskesmas. Untuk selanjutnya, petugas Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota akan melakukan asistensi teknis ke Puskesmas.

5.11.4. Dinas Kesehatan Provinsi

Dinas Kesehatan Provinsi menerima umpan balik hasil Laboratorium Puslitbang BTDK dan analisa epidemiologi dari Dinas Kab/Kota.

5.11.5. Laboratorium Regional

Laboratorium Regional menerima kiriman spesimen dan formulir pengamatan dari Kabupaten/Kota. Kemudian, Lab.Regional akan mengirimkan formulir pengamatan dan formulir laporan mingguan ke Sekretariat ILI, melakukan prosedur pemeriksaan spesimen sesuai dengan prosedur, mengirimkan aliquot spesimen ke Laboratorium Rujukan (BTDK), mengirimkan hasil pemeriksaan ke Supervisor Laboratorium Regional yang ada di Laboratorium Rujukan (BTDK), mengirimkan laporan pemakaian bahan pemeriksaan setiap bulan ke Supervisor Laboratorium Regional yang ada di Laboratorium Rujukan (BTDK) dan mengirimkan umpan balik kondisi spesimen dan suhu pengiriman ke Puskesmas tembusan ke Supervisor Laboratorium Regional ILI di BTDK.

5.11.6. Laboratorium Rujukan (Puslitbang BTDK)

Laboratorium Virologi (Puslitbang BTDK) menerima aliquot spesimen dari Laboratorium Regional, kemudian melakukan *Quality Control* dengan melakukan pemeriksaan spesimen dari Laboratorium regional secara random 10% dari seluruh spesimen sesuai dengan prosedur, baik pada spesimen dengan hasil positif maupun negatif dan secara periodik mengirimkan spesimen untuk profisiensi tes kepada Laboratorium Regional setahun sekali.

Laboratorium Virologi akan melakukan pemeriksaan PCR untuk karakterisasi virus, isolasi virus Influenza, melakukan pemeriksaan sekuensing Influenza, melakukan pemeriksaan resistensi antiviral terhadap H1N1pdm09, menganalisis hasil pemeriksaan, mengirimkan hasil pemeriksaan ke Sekretariat ISPA dan melakukan asistensi bidang teknis Laboratorium. Laboratorium Virologi juga akan menyediakan bahan bahan pengambilan dan pengiriman sampel untuk Puskesmas dan Rumah Sakit serta menyediakan bahan pemeriksaan Laboratorium untuk Laboratorium Regional.

5.11.7. Sekretariat

Sekretariat di Pusat BTDK akan memfasilitasi dukungan operasional mencakup logistik kebutuhan Laboratorium, formulir dan alat-alat lain yang dibutuhkan termasuk honorarium bagi semua petugas, mengkoordinasikan semua kegiatan sehingga kegiatan dapat berjalan optimal. Sekretariat akan melakukan kompilasi dan mengolah data termasuk analisis data pemantauan berkala maupun hasil Laboratorium serta mengirimkan umpan balik setiap bulan ke Laboratorium Regional dan Puskesmas. Tembusan ke Dinas Kab/Kota dan Dinas Kesehatan Provinsi.

Sekretariat akan membuat laporan teknis secara berkala kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan, Dirjen P2P, membuat laporan

administrasi secara berkala kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan dan melakukan asistensi teknis administratif.

5.11.8. Balitbangkes dan Ditjen P2P

Badan Litbang Kesehatan dan Ditjen Pencegahan dan Pengendalian Penyakit memiliki fungsi koordinasi di tingkat nasional dengan mengoptimalkan Jejaring Pemantauan berkala Influenza di tingkat nasional dan berkomunikasi dengan regional dan internasional.

5.12. Pelaksanaan Kegiatan

5.12.1. Pelatihan

Pelatihan telah dilakukan di Puskesmas yang bersangkutan pada saat monitoring dan evaluasi. Dokter dan perawat atau analis yang ditunjuk di lokasi sentinel dilatih dalam penggunaan definisi kasus, penjangkaran subyek dan cara pengumpulan data. Seluruh dokter dan perawat/analis sentinel dilatih juga cara pemakaian alat perlindungan diri, cara mengambil spesimen apus tenggorok dan apus hidung, cara penyimpanan, pengemasan dan pengiriman spesimen.

Setiap sentinel telah dilengkapi dengan perlengkapan pengambilan dan pengiriman spesimen, formulir kuesioner, formulir penjelasan dan *Informed Consent*, formulir pengiriman spesimen dan formulir logistik. Setiap Puskesmas sentinel harus memiliki satu orang personel yang bertindak sebagai koordinator.

5.12.2. Pengambilan spesimen dan data kasus ILI

a. Persiapan

Persiapan pengambilan spesimen harus dilakukan dengan memperhatikan *universal precaution* atau kewaspadaan universal untuk mencegah terjadinya penularan, meliputi:

i. Penggunaan alat pelindung diri:

- Jas laboratorium

- Sarung tangan karet
 - Masker *disposable*
- ii. Mencuci tangan dengan menggunakan desinfektan sebelum dan setelah tindakan
 - iii. Menjaga kebersihan ruangan dengan menggunakan desinfektan sebelum dan setelah tindakan

Pengambilan spesimen dilakukan oleh petugas Puskesmas atau tenaga laboratorium yang terampil dan berpengalaman atau sudah dilatih sesuai dengan kondisi dan situasi setempat.

b. Alat dan bahan pengambilan spesimen

- Swab yang terbuat dari Dacron/rayon steril dengan tangkai plastik
- Cryotube (tabung tahan pendinginan) berisi Media transport virus (Hanks BSS + antibiotika) 1.5 ml
- Tongue depressor/Tongue spatel
- Label
- Formulir ILI (3 rangkap)

c. Semua kasus yang memenuhi kriteria ILI diambil spesimennya.

d. Jenis sampel

Spesimen sekret saluran napas, yaitu usap hidung kiri/kanan dan usap tenggorok.

5.12.3. Cara pengambilan spesimen

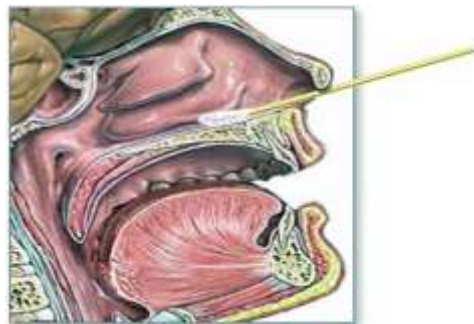
1. Persiapkan cryotube yang berisi 1,5 ml media transport virus (Hanks BSS + Antibiotika), berikan label yang berisi kode nomer spesimen. Jika label bernomer tidak tersedia maka kode spesimen ditulis dengan pensil 2B pada bagian berwarna putih di dinding cryotube. Jangan gunakan Medium Hanks Bila telah berubah warna menjadi Kuning.
2. Gunakan swab yang terbuat dari Dacron/rayon steril dengan tangkai plastik. Jangan menggunakan kapas yang mengandung *Calcium Alginat* atau kapas dengan tangkai kayu, karena mungkin mengandung substansi yang dapat menghambat

pertumbuhan virus tertentu dan dapat menghambat pemeriksaan PCR.

3. Saat pengambilan swab perlu dilakukan tekanan pada lokasi dimana spesimen diambil agar swab tersebut harus disertai dengan epitel. Spesimen dari swab yang valid adalah spesimen yang pada pemeriksaan RT-PCR didapatkan hasil pemeriksaan *RNP gene* dan atau *B-actine gene* positif, artinya dimana swab tersebut diambil mengandung epitel saluran napas.

Untuk usap nasal:

Masukkan swab ke dalam lubang hidung sejajar dengan rahang atas (gambar 5). Biarkan beberapa detik agar cairan hidung terhisap. Putarlah swab sekali atau dua kali. Lakukan usapan pada kedua lubang hidung, berikan sedikit penekanan pada lokasi dimana swab diambil.



Gambar 5. Pengambilan spesimen melalui nasal (Sumber: Spaltelhoz)

Untuk usap tenggorok:

Lakukan usap pada bagian belakang pharynx dan hindarkan menyentuh bagian lidah (gambar 6).



Swab diusapkan pada bagian belakang pharinx

Sumber: www.adam.com

Gambar 6. Pengambilan spesimen Usap Tenggorok

4. Kemudian, masukkan swab hidung dan swab tenggorok se-segera mungkin ke dalam cryotube yang sama (gambar 7).



Gambar 7. Swab dimasukkan ke dalam cryotube

5. Putuskan tangkai plastik di daerah mulut cryotube agar cryotube dapat ditutup dengan rapat (gambar 8).



Gambar 8. Cara mematahkan tangkai swab

6. Cryotube kemudian diberi label sesuai kode nomer penderita lalu selanjutnya dililit dengan parafilm (gambar 9.a dan b).

9.a.



9.b.



Gambar 9.a dan 9.b. Penempelan label pada cryotube dan pelilitan parafilm

7. *Cryotube* yang sudah berisi swab disimpan dalam suhu 4-8°C sebelum dikirim. Jangan dibekukan dalam *Freezer*.
8. Formulir 3 rangkap diisi secara lengkap, lalu ketiganya diberi label pada bagian kanan atas. (format formulir bisa dilihat pada lampiran).
9. Kuesioner terdiri dari 3 rangkap (gambar 10)
 - a. Lembar **putih** utk dikirim ke Litbangkes
 - b. Lembar **merah** utk dikirim ke Dinas Kota
 - c. Lembar **hijau** utk pertinggal Puskesmas



Gambar 10. Lembar kuesioner rangkap 3

5.12.4. Pengemasan dan Pengiriman Spesimen

5.12.4.1. Bahan-bahan yang diperlukan untuk pengemasan:

1. Plastik Klip (*ziplock*)
2. Tissue
3. Wadah pengiriman primer (*paralon*)
4. Parafilm
5. Wadah pengiriman primer (*cool box*) dan *ice pack* nya
6. Kertas pengganjal bisa digunakan kertas koran/kertas bekas
7. Termometer

5.12.4.2. Pengiriman dari Puskesmas ke Lab Regional

Cara pengemasan dan pengiriman spesimen untuk keperluan diagnostik harus mengikuti ketentuan WHO dengan menggunakan bahan-bahan tersebut di atas. Adapun pengemasan spesimen ISPA adalah sebagai berikut:

1. Bungkus cryotube yang sudah berisi sampel dengan tisu bersih dan masukkan ke dalam plastik klip (*zip lock*) pada gambar 11.



Gambar 11. Spesimen dilapisi dengan tisu

2. Masukkan plastik klip ke dalam tabung pengiriman primer (*biobottle*). Lalu, masukkan kedalam *cool box* yang berisi *Ice pack* yang terlebih dahulu dibekukan. Minimal *Ice pack* yang digunakan adalah enam buah. *Ice pack* ditempatkan pada sisi kiri-kanan dan atas-bawah *cool box*. Gambar 12.a dan b.

12.a.



12.b.



Gambar 12.a. dan b. Spesimen dimasukkan kedalam wadah primer dan wadah sekunder

3. Ke dalam *cool box* juga dimasukkan termometer dan kertas pengganjal (bisa berupa kertas koran yang diremas-remas) pada gambar 13.



Gambar 13. *Cool box* dipadatkan dengan kertas dan diletakkan termometer

4. Tambahkan *ice pack* diatas wadah primer dan tutup *cool box* pada gambar 14. Jangan lupa masukkan juga formulir kuisisioner yang telah diisi dan diberi label kedalam *cool box* dengan terlebih dahulu dimasukkan dalam wadah plastik.



Gambar 14. Formulir kuesioner didalam plastik diletakkan diatas *cool box*

5. Tutup *cool box* dengan selotip dan beri label pada sisi kanan dan kiri *cool box*, yang ditujukan kepada Lab. Regional masing-masing sentinelnya pada gambar 15 dan 16.
(Daftar Lab. Regional dan sentinelnya lihat pada Lampiran)

PEMERIKSAAN LABORATORIUM KESEHATAN	
 JANGAN DIBALIK  HANDLE WITH CARE	<u>Kepada:</u> Laboratorium Regional ILI Alamat Diisi dengan alamat laboratorium rujukan sesuai daerah masing-masing (lihat Lampiran)
	<u>Pengirim:</u> Dr..... Puskesmas..... (Kota.....) Telp:.....

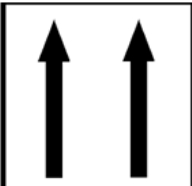
Gambar 15. Label alamat lab regional



Gambar 16. Box yang telah diberi label alamat lab regional

5.12.4.3. Pengiriman dari Lab. Regional ke Lab. Rujukan

Cara pengepakan dan pengiriman spesimen sama seperti pengepakan dari Puskesmas ke Lab. Regional. Hanya pemberian label saja yang berbeda.

PEMERIKSAAN LABORATORIUM KESEHATAN	
 JANGAN DIBALIK  HANDLE WITH CARE	Kepada: Dr. Krisnanur AP, MS (ILI) Laboratorium Virologi Pusat Biomedis Dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbang Kesehatan Jalan Percetakan Negara 23 A Jakarta Pusat 10560 Telp : 021-42887583/ 021-42881745 Pengirim: Laboratorium Regional ILI Diisi dengan alamat laboratorium regional ILI

Gambar 17. Label untuk pengiriman box ke laboratorium regional

5.12.5. Pemeriksaan Laboratorium

a. Deteksi Influenza dengan realtime RT-PCR

Seluruh spesimen yang diperoleh pada penelitian ini diperiksa dengan metode realtime RT-PCR. Pemeriksaan realtime RT-PCR untuk identifikasi virus influenza tipe dan subtipe menggunakan primer khusus, hanya dilakukan di laboratorium regional dan laboratorium virologi puslitbang BTDK. Bila dideteksi adanya Influenza tipe A, maka akan dilanjutkan dengan pemeriksaan untuk menentukan subtype virus seasonal Influenza A yaitu H1N1pdm09 dan H3N2. Bila dideteksi adanya Influenza tipe B, maka akan dilanjutkan dengan pemeriksaan untuk menentukan subtype Virus Influenza B yaitu Yamagata dan Victoria. Subtype virus Influenza B hanya dilakukan di laboratorium Virologi Pusat BTDK.

b. Isolasi virus Influenza dan identifikasi

Dilakukan pemeriksaan kultur virus influenza dari seluruh spesimen yang positif influenza. Sebanyak 20-30% dari seluruh kasus ILI memberikan hasil positif influenza. Spesimen yang positif influenza ini kemudian dikultur di sel *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK)

dan hasil kultur yang positif dengan uji *Hemagglutination Inhibition* (HI) menggunakan darah kalkun dilanjutkan pemeriksaan karakteristik genetik dengan sekuensing. Isolat yang tumbuh juga diidentifikasi untuk mengetahui strain virus. Isolasi dan identifikasi strain virus dilakukan di laboratorium virologi Pusat BTDK.

c. Sekuensing isolat virus Influenza H3N2 dan H1N1pdm09

Hasil pemeriksaan yang diperoleh secara PCR akan dilakukan konfirmasi dengan metode sekuensing dari isolat virus yang telah ditumbuhkan. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan reagen *Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA -USA). Produk hasil PCR sekuensing dibersihkan dengan menggunakan reagen *Big Dye X Terminator Kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA -USA) dan disekuensing dengan alat *Genetic Analyzer 16 kapiler 3130xl* (Applied Biosystem, Foster City, CA - USA). Hasil sekuensing akan dikompilasi dan diedit dengan menggunakan program Bioedit dan Sequencher untuk menentukan kesamaan sekuens dengan gen referensi lainnya yang telah dipublikasi secara ilmiah atau database virus lainnya di dunia. Perbandingan filogenetika dari gen virus tersebut akan dianalisa dengan menggunakan analisis *neighbour joining* (NJ) dengan program MEGA 5. Pemeriksaan sekuensing dan analisisnya dilakukan di laboratorium Virologi Pusat BTDK

d. Pemeriksaan PCR Multipleks

Pemeriksaan Multipleks PCR menggunakan reagen deteksi Seeplex RV16 ACE (Seegene Inc. Seoul, South Korea) yang dapat mendeteksi 16 virus infeksi saluran pernafasan sekaligus. Ke 16 virus tersebut termasuk Influenza A dan B, Respiratory Syncytial Virus (RSV) A dan B, Adeno virus (AdV), human Metapneumovirus (HMPV), Parainfluenza virus (PIV) 1-4, human Rhinovirus (hRV), human Enterovirus (hEV), coronavirus 229E/NL63, dan OC43 serta human Bocavirus (hBoV). RNA hasil ekstraksi di sintesis menjadi cDNA menggunakan random hexamer dan dilakukan pemeriksaan

PCR menggunakan mesin CFX 96 Real Time Thermal Cycles. Hasil positif akan terlihat sebagai elektroferogram dan dibandingkan dengan kontrol positif.

e. Pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae*

Pemeriksaan *Streptococcus pneumoniae* dilakukan dengan menggunakan Uni-Gold *S. pneumoniae*, rapid diagnostic kit untuk mendeteksi antigen *S. pneumoniae* di dalam urin pasien pneumonia dan di dalam cairan otak pasien meningitis. Satu reaksi pemeriksaan terdiri dari satu *test device* dan memerlukan Reagen A dan Kontrol positif dan negatif. Seluruh reagen dibiarkan pada suhu kamar sebelum digunakan. Swab steril dimasukkan ke dalam urin sampel dan kemudian dimasukkan ke dalam lubang sampel pada *test device*. Ke dalam lubang sampel ditambahkan 3 tetes Reagent A, *test device* ditutup dan diinkubasi selama 15 menit. Hasil negatif bila hanya terdapat 1 garis merah pada kontrol. Hasil positif bila terdapat 2 garis merah pada kontrol dan sampel. Hasil invalid bila tidak terdapat garis merah pada control dan sampel ataupun hanya terdapat 1 garis merah ada sampel.

f. Pengembangan metode deteksi virus infeksi saluran pernafasan lainnya

Desain primer

Sekuen gen hemagglutinin-neuraminidase virus HPIV I, II dan III, RSV A dan B, Rhinovirus, HCoV yang diperoleh dari Gen Bank di-align menggunakan software BioEdit. *Conserved region* yang didapatkan dari proses *alignment* kemudian dijadikan bahan untuk menyusun sekuen primer untuk mendeteksi virus HPIV I, II dan III, RSV, Rhinovirus, HCoV. Primer tersebut didesain menggunakan software Primer3 untuk mendapatkan kondisi optimal untuk pemeriksaan PCR (real time atau konvensional). Pemilihan primer dilakukan pada primer yang tidak membentuk *secondary structure*, *hairpin*, dan *primer dimer*. Dalam penelitian ini akan disusun 7 set primer untuk masing-masing sub tipe virus HPIV, RSV, Rhinovirus

dan HCoV. Uji sensitifitas dilakukan dengan melakukan real time RT-PCR menggunakan pengenceran kontrol positif.

Uji coba primer

Uji coba primer dilakukan pada kontrol positif yang diperoleh dari *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) Atlanta untuk memastikan *repeatability* dan *reproducibility* metode yang digunakan. Uji *repeatability* ini dilakukan oleh 1 orang operator dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Sedangkan untuk memastikan *reproducibility* uji coba dilakukan pada sampel yang sama oleh 2 operator yang berbeda tanpa pengulangan. Bila kontrol positif tidak dapat diperoleh, maka akan dilakukan design kontrol positif dengan menggunakan nukleotida sintetik.

Deteksi virus dengan pemeriksaan PCR

Pemeriksaan terhadap RNA hasil ekstraksi spesimen swab hidung dan/atau tenggorok kasus ISPA yang terkumpul dari selama tahun 2015-2019. Pemeriksaan dilakukan dengan mengamplifikasi gen target menggunakan metode PCR menggunakan primer yang telah dioptimasi sebelumnya. RNA (ribonucleic acid) diekstraksi dari 140 µl spesimen klinik dengan menggunakan kit ekstraksi QiAMP Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA) berdasarkan prosedur pabrik yang bersangkutan. RNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik dengan proses RT-PCR dengan reagen *Superscript III Reverse Transcriptase PCR with Platinum Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA - USA).

Konfirmasi PCR dengan sekuensing

Hasil pemeriksaan yang diperoleh secara PCR akan dilakukan konfirmasi dengan metode sekuensing dari isolat virus yang telah ditumbuhkan. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan reagen *Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA -USA). Produk hasil PCR sekuensing dibersihkan dengan menggunakan reagen *Big Dye X Terminator Kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA -USA) dan disekuensing dengan alat

Genetic Analyzer 16 kapiler 3130xl (Applied Biosystem, Foster City, CA - USA). Hasil sekuensing akan dikompilasi dan diedit dengan menggunakan program Bioedit dan Sequencher untuk menentukan kesamaan sekuens dengan gen referensi lainnya yang telah dipublikasi secara ilmiah atau database virus lainnya di dunia. Perbandingan filogenetika dari gen virus tersebut akan dianalisa dengan menggunakan analisis *neighbour joining* (NJ) dengan program MEGA 4.

g. Pengembangan *mouse monoclonal antibody* (mouse Mab)

Persiapan sel hibridoma *mouse monoclonal antibody*

Mencit Balb/C yang berusia 6 minggu diinfeksi dengan virus Influenza melalui suntikan *peritoneal*. Penyuntikan dilakukan 3 kali dengan selang waktu 1 minggu yang bertujuan untuk meningkatkan sistem imunitas mencit, kemudian limpa mencit diambil untuk isolasi splenosit. Darah mencit diambil dari jantung untuk digunakan dalam proses screening. Sel-sel splenosit yang diisolasi dari limpa didifusi dengan sel PAI sebagai sel partner untuk menghasilkan hibridoma. Sel limfosit dicuci dengan medium 10mL DMEM (-) sebanyak 3 kali lalu ditambahkan suspensi sel PAI dalam 10ml DMEM (-). Campuran kedua sel disentrifugasi 1.400rpm selama 5 menit. PEG 1500 ditambahkan kedalam tabung berisi pelet campuran sel PAI dan splenosit sebanyak 0,6ml sambil diputar perlahan-lahan selama 1 menit. Dilanjutkan dengan memutar tabung perlahan selama 1 menit, kemudian ditambahkan 10ml DMEM (-). Untuk menghentikan proses fusi, ditambahkan 10ml medium 15%FCS DMEM kedalam tabung berisi sel kemudian disentrifugasi 1.000rpm selama 5 menit. Proses dilanjutkan dengan pencucian sel menggunakan 10ml 15% FCS DMEM sebanyak dua kali. Supernatant dibuang lalu ditambahkan 10ml medium HAT DMEM untuk meresuspensi pelet sel fusi. Empat puluh lima mililiter medium HAT medium ditambahkan ke dalam tabung, lalu 200µl larutan dibagi kedalam masing-masing well 96-well plate. Sel diinkubasi pada 37°C dengan kondisi 5%

CO₂. Medium diganti setiap 3-4 hari hingga terbentuk koloni sel. HAT medium digunakan untuk seleksi hibridoma, hanya sel hibridoma gabungan yang akan bertahan hidup, sedangkan sel-sel lainnya akan terdegradasi. Setelah terbentuk *single colony* sel, sel diambil dan diencerkan untuk di-*cloning*. *Cloning* sel dilakukan dengan metode dilusi, dimana sel diencerkan dan ditempatkan kedalam well baru. Untuk monoclonal *antibody*, satu *well* hanya berisi 1 sel saja.

Karakterisasi sel hibridoma

Karakterisasi sel hibridoma yang menghasilkan antibodi dilakukan dengan metode *immunofluorescence* (IFA) dan *western blotting* (WB)¹⁵. Untuk karakterisasi dengan metode IFA, sel MDCK diinfeksi dengan virus Influenza selama 20hpi, lalu difiksasi. Supernatant dari sel hibridoma ditambahkan ke dalam well sebanyak 100µl, diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang, dilanjutkan dengan pencucian dengan PBS selama 3 kali. Kemudian ditambahkan antibody Anti mouse IgG (H+L) F(ab')₂ fragment alexa fluor 488 in goat sebanyak 100µl dan diinkubasi selama 30 menit suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS 3 kali., Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluorescence. Apabila hasil pengamatan positif, yaitu ditandai dengan warna hijau, maka proses *cloning* diteruskan ke proses *scale-up* dimana sel hibridoma diperbanyak.

Setelah sel hibridoma mencapai 75 cm flask sebanyak 25 dishes, supernatant diambil dan disimpan dalam tabung 50ml, lalu ditambahkan medium Hybridoma SFM 10ml kemasing-masing flask. Sel diinkubasi selama 4 hari lalu supernatant diambil untuk dilakukan purifikasi dengan Hi Trap Protein G HP (GE Healthcare). Antibodi yang sudah dipurifikasi lalu dikarakterisasi dengan menggunakan metode Western Blotting. Sel MDCK yang telah diinfeksi dengan virus influenza diambil dan dilisiskan dengan menggunakan buffer lisis. Sampel lisis ini dibagi dua, yaitu yang

ditambahkan mercaptoethanol dan tanpa mercaptoethanol. Sampel dimasukkan ke dalam SDS-Page gel, dilanjutkan dengan proses transfer protein ke membran. Membran kemudian diinkubasi dengan menggunakan antibodi yang telah dipurifikasi dalam suhu 4°C overnight, dicuci lalu diinkubasi dengan HRP anti-mouse IgG dan dilakukan observasi hasil WB.¹⁹

h. Pemeriksaan Quasispecies Influenza A (H5N1)

Virus akan ditumbuhkan pada telur yang bebas pathogen (usia 10 hari) dan sel MDCK (*madine-darby canine kidney*) di lab BSL 3 Badan Litbang Kesehatan.

RNA akan diekstraksi dari 200ul spesimen klinis dan supernatan sel telur/MDCK menggunakan kit *High Pure RNA isolation* (Roche) berdasarkan protokol kit yang bersangkutan. RNA yang didapatkan kemudian direaksikan dengan primer Uni12 M (AGCRAAAGCAGG) untuk dibuat cDNA. Setelah cDNA terbentuk, kemudian diperbanyak dengan metoda amplifikasi PCR dengan menggunakan kit *Platinum Taq Polimerase PCR* (Invitrogen) dengan kondisi sebagai berikut : denaturasi 95°C untuk 5 menit, amplifikasi sebanyak 40 kali untuk 95°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, 68°C selama 1 menit, dan kondisi akhir 68°C selama 5 menit.

Sekuensing dengan metoda *deep sequencing* akan dilakukan dengan menggunakan mesin *next generation sequencing* (NGS) Roche GS FLX 454 dengan ukuran produk basa yang dihasilkan yaitu 400-600 bp. Sebanyak 5 ul setiap produk PCR digabung dan diukur konsentrasi DNA nya dengan menggunakan kit *qubit dsDNA* (Invitrogen). Sampel diencerkan sampai konsentrasi DNA menjadi 50 ng / ml, diikuti oleh proses ligasi dengan menggunakan sekuensing adaptor 454 dan label molekuler (*molecular identifier*, MID) menggunakan *SPRIworks fragment library Sistem II DNA Sequencer* (Beckman Coulter). Kuantitas fragmen kemudian ditentukan dengan menggunakan FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). Emulsi PCR dan proses selanjutnya akan dilakukan

secara manual berdasarkan protokol mesin sekuensing yang akan dipakai.

Analisis hasil sekuensing evolusi virus influenza A/H5N1

Format file yang dihasilkan dari mesin sekuensing yaitu berupa file .sff akan dikonversi menjadi format fastq menggunakan software **QUASR package version 7.0** dan dipisahkan berdasarkan identitas molekularnya masing-masing. Selanjutnya, kualitas data akan diperiksa menggunakan script komputer yang dirancang khusus: pertama, masing-masing nukleotida diberi skor berdasarkan presentasi nukleotida yang benar. Koreksi terhadap kualitas data akan dilakukan berdasarkan skor rata-rata kualitas dan panjang basa yang dihasilkan. Jika skor rata-rata kualitas dibawa nilai batas yang ditentukan, panjang basa akan dipotong pada bagian 3' sampai mencapai skor kualitas yang diharapkan. Setelah itu dilakukan koreksi data dengan cara menghilangkan kontaminan lain seperti primer, label molekuler (MID). Selanjutnya dilakukan analisis yang paling krusial yaitu pemetaan hasil sekuensing terhadap genom referensi menggunakan software Burrows-Wheeler Aligner (BWA) version 0.6.1-r104. Setelah itu akan dilakukan kembali analisis pemetaan ulang terhadap referensi yang sama untuk mendapatkan data yang lebih valid.

Setelah dilakukan langkah pemetaan ulang, konsensus basa sekuens akan dibentuk dan dilakukan analisis mendalam untuk setiap nukleotida. Posisi variasi nukleotida dapat diidentifikasi dan proporsinya akan diukur pada tingkat nukleotida dan asam amino.

5.12.6. Supervisi Puskesmas dan Rumah Sakit Sentinel serta

Laboratorium Regional

Supervisi dilakukan untuk menilai proses kegiatan di sentinel, baik di Puskesmas, Rumah Sakit maupun di Laboratorium Regional. Pada saat supervisi ini diketahui apakah semua proses pengambilan spesimen di Puskesmas dan Rumah Sakit serta pemeriksaan spesimen di Laboratorium Regional, termasuk cara packing dan

pengiriman spesimen berjalan sesuai prosedur yang telah ditetapkan atau tidak. Selain itu, dengan dilakukan supervisi pendekatan dalam menyelesaikan suatu masalah atau kendala yang terjadi di sentinel menjadi lebih objektif dan mengena. Supervisi dilakukan setahun sekali. Supervisi ini meliputi supervisi teknis laboratorium maupun supervisi administratif.

5.13. Indikator Kegiatan

Sebagai indikator keberhasilan kegiatan pemantauan berkala ILI adalah sebagai berikut:

- 5.13.1. Terkumpulnya dan terkirimnya spesimen kasus ILI di setiap Puskesmas sentinel.
- 5.13.2. Minimal 90% kondisi spesimen yang diterima Laboratorium Regional masih adekuat.
- 5.13.3. Adanya hasil pemeriksaan spesimen ILI oleh Laboratorium Regional. Selambat-lambatnya 1 minggu terhitung sejak spesimen diterima Laboratorium Regional.
- 5.13.4. Adanya umpan balik di setiap jenjang sekurang-kurangnya satu bulan satu kali.
- 5.13.5. Adanya data besaran masalah Influenza di Indonesia.
- 5.13.6. Adanya data mengenai kejadian dan kecenderungan Influenza.
 - i. Berdasarkan distribusi epidemiologi (umur, tempat, dan waktu).
 - ii. Adanya data tipe dan sub tipe virus Influenza yang beredar di Indonesia.
 - iii. Terdeteksinya KLB Influenza secara dini untuk respon cepat dan tepat.
- 5.13.7. Adanya diseminasi informasi hasil pemantauan berkala di tingkat nasional dan internasional (flunet, national website (www.litbang.depkes.go.id/pemantauan_berkala, publikasi).

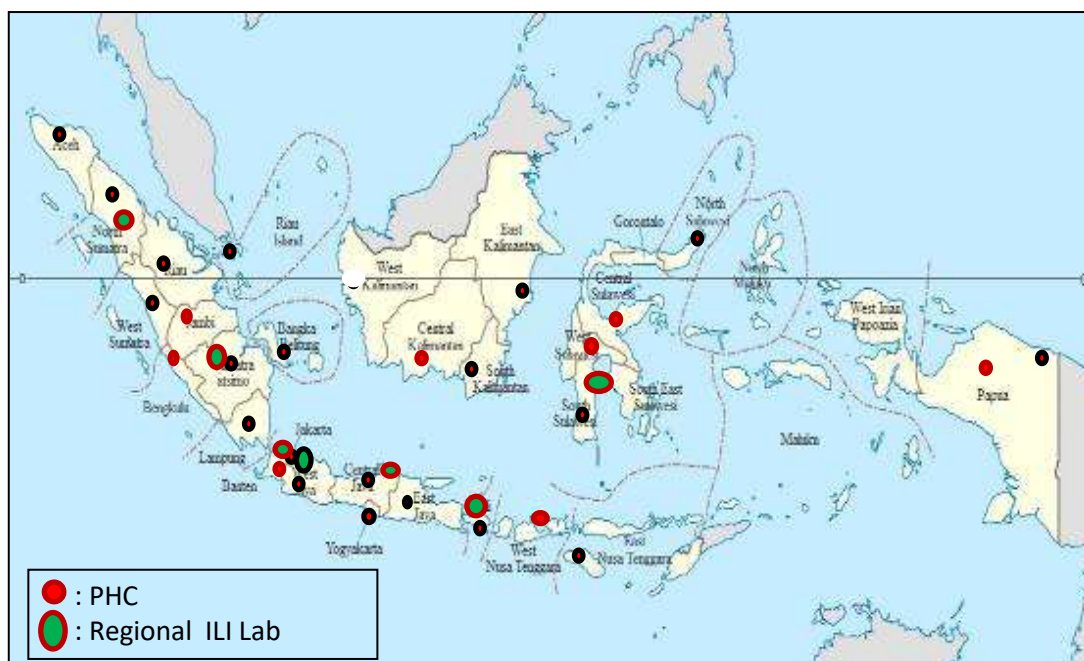
5.14. Pengolahan dan Analisis Data

Analisis untuk klinis, epidemiologis, data hasil PCR dan Isolasi akan dilakukan menggunakan *software* STATA versi 09 secara deskriptif.

Sedangkan, data hasil sekuensing akan dilakukan dengan menggunakan *software Sequencher, Bioedit, dan MEGA 5*.

VI. HASIL

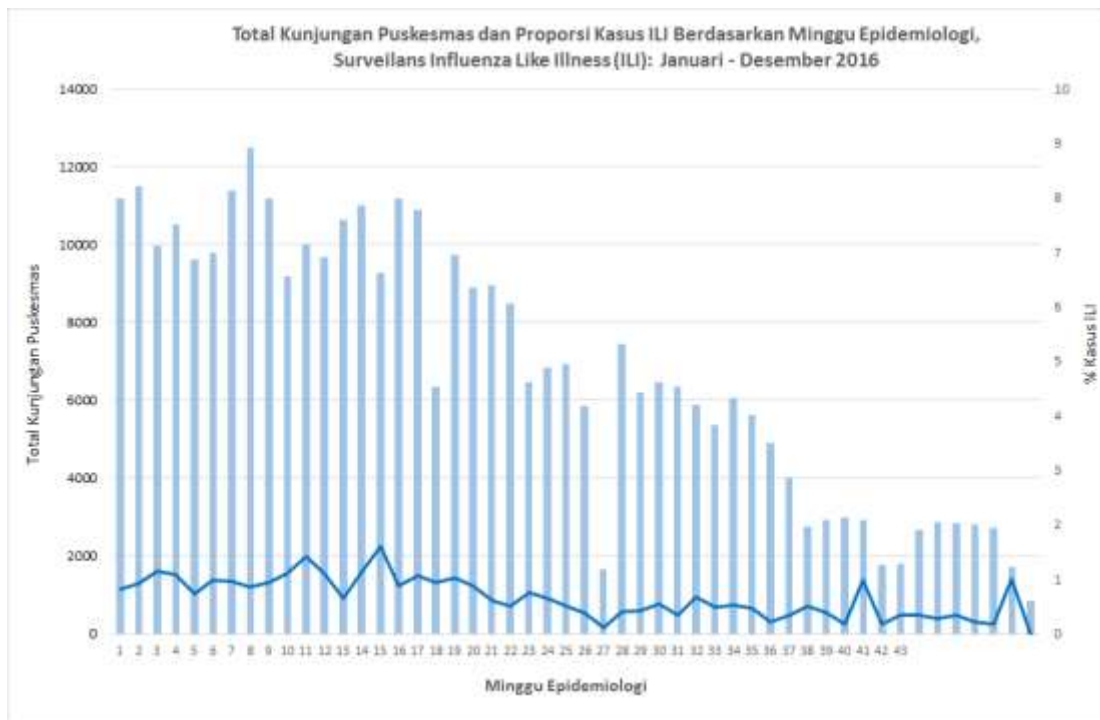
Kegiatan penelitian Pengembangan Metode Deteksi dan Identifikasi Molekuler Menunjang Pemantauan Berkala Penyakit Infeksi Saluran Pernafasan dan Pneumonia di Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan pada tahun 2016 dilaksanakan secara keseluruhan pada 27 Puskesmas dan 6 Rumah Sakit di 27 Provinsi di Indonesia dengan pendanaan dari DIPA Puslitbang BTDK. Kegiatan ini juga melibatkan enam Laboratorium Regional yang telah terlatih untuk melakukan pemeriksaan spesimen dari kasus ISPA rawat jalan. Data yang disampaikan dalam laporan ini merupakan data keseluruhan dari seluruh sentinel. Gambar 18 menunjukkan lokasi sentinel Puskesmas dan Laboratorium Regional.



Gambar 18. Puskesmas Sentinel dan Laboratorium Regional ILI

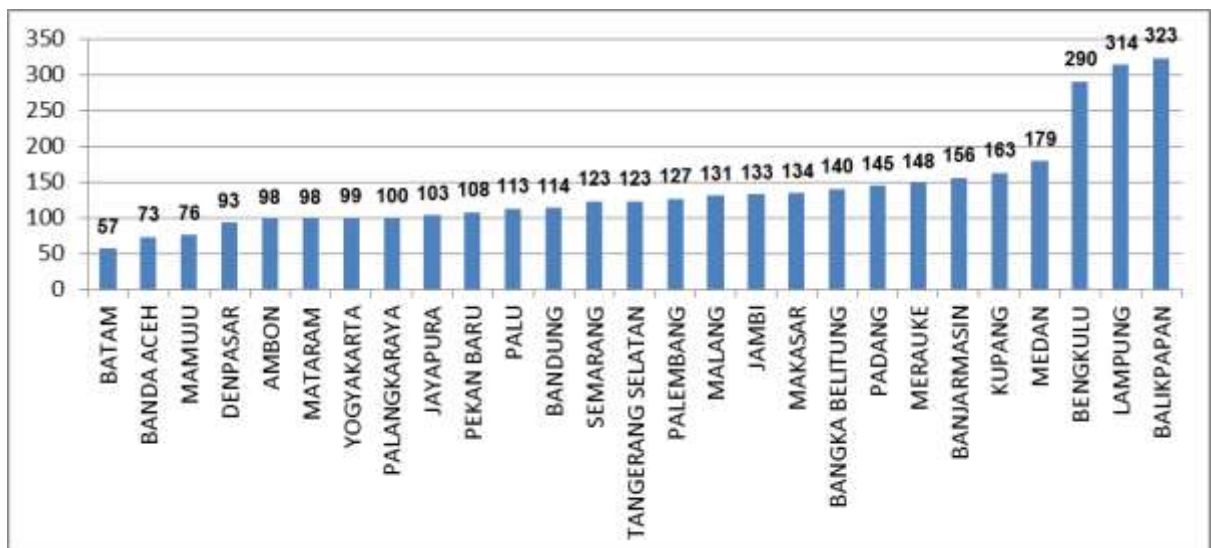
6.1. Kasus ISPA rawat jalan (ILI) di Puskesmas

Sampai dengan bulan November 2016, terdapat 3761 kasus ILI dari 27 sentinel dengan total kunjungan dan distribusi kasus berdasarkan Puskesmas terlihat pada gambar 19.



Gambar 19. Grafik total kunjungan Puskesmas per minggu tahun 2016

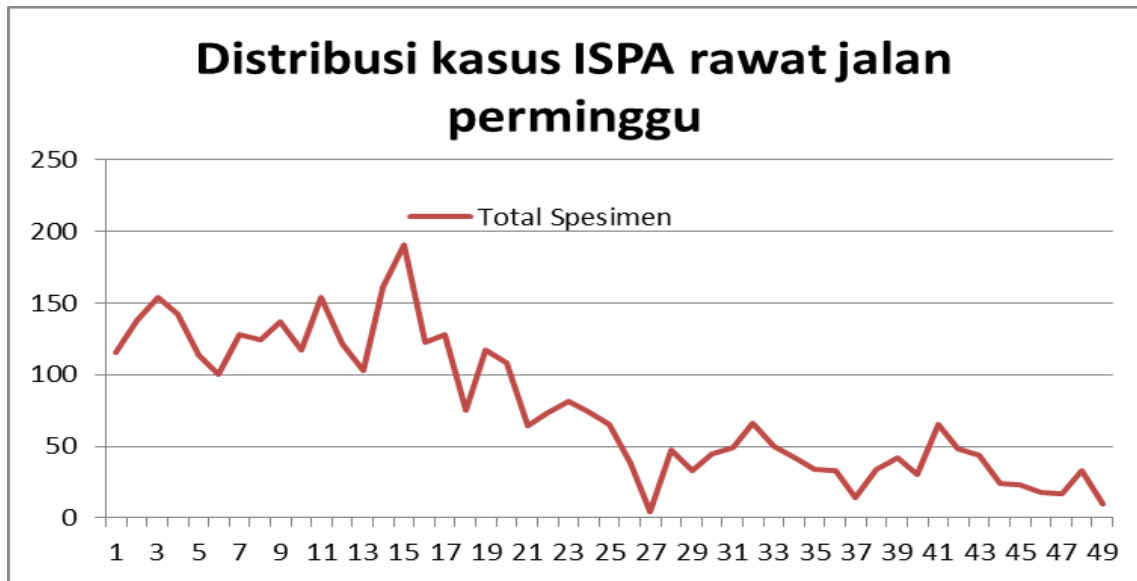
Jumlah kasus ILI terbanyak berasal dari Puskesmas Klandasan Ilir, Balikpapan, Kalimantan Timur sebanyak 323 kasus dan paling sedikit adalah dari Puskesmas Batu Aji, Batam, Kepulauan Riau hanya 57 kasus.



Gambar 20. Grafik sebaran kasus ILI per-sentinel tahun 2016

Keterangan: X Axis merupakan Kota, Y Axis menunjukkan Jumlah Kasus ILI

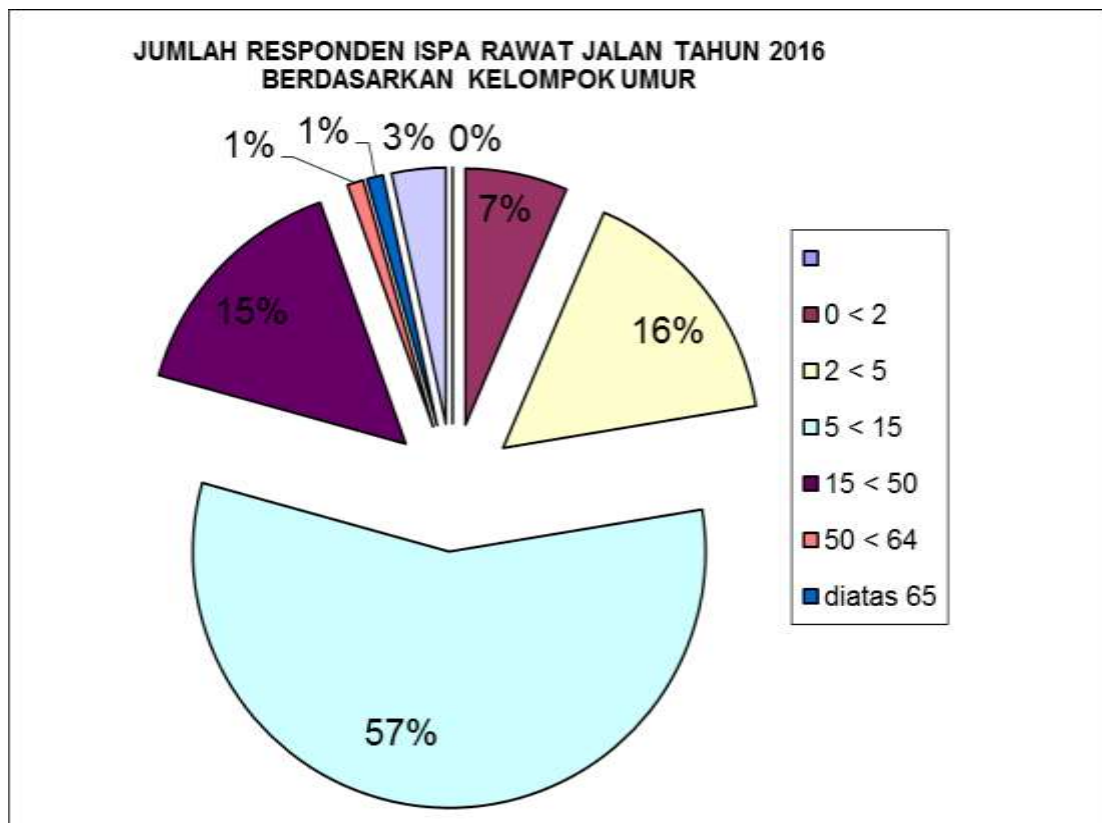
Bila melihat dari sebaran kasus, sebagaimana yang diperlihatkan pada gambar 21, tampak bahwa kasus ILI muncul sepanjang tahun dengan puncak pada minggu ke 15 – bulan Maret dan paling rendah pada minggu ke 48 – bulan November. Pada minggu ke 27 - bulan Juli terlihat adanya penurunan jumlah kasus yang sangat menonjol namun kasus meningkat kembali pada bulan berikutnya.



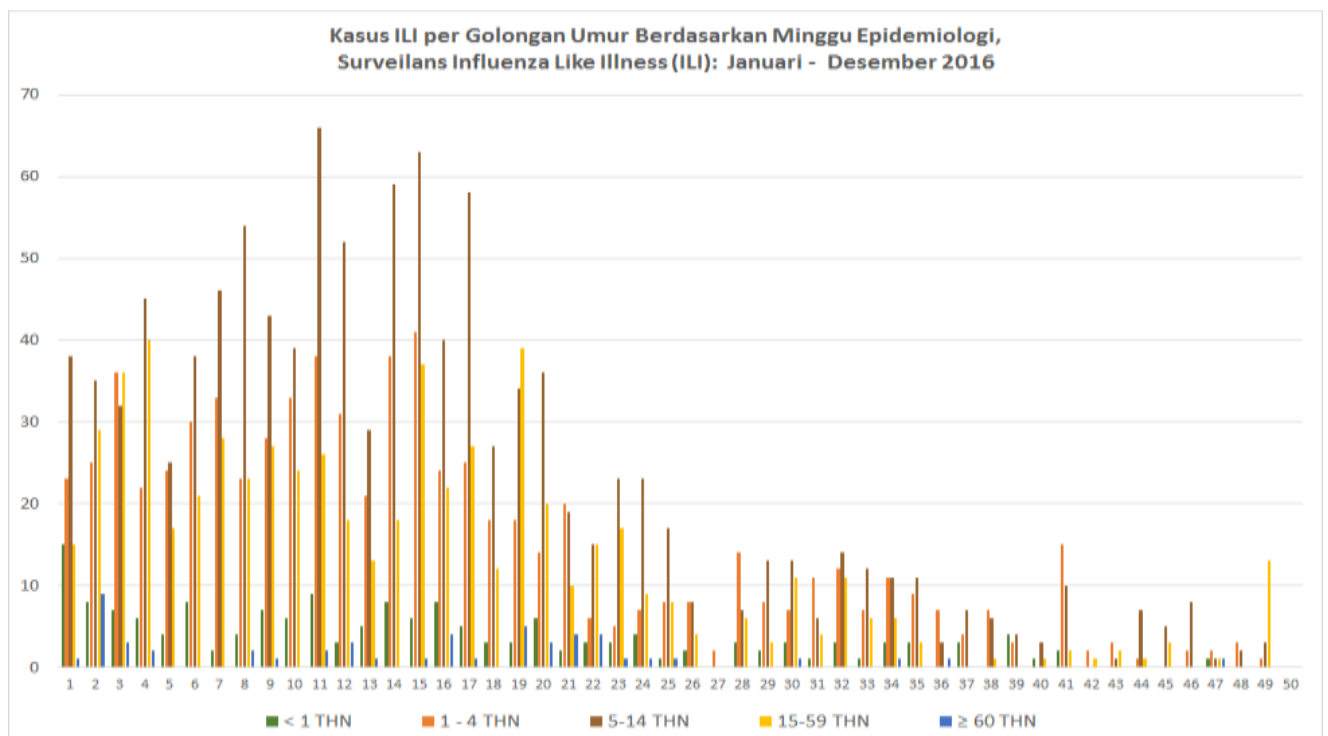
Gambar 21. Grafik sebaran kasus ISPA rawat jalan (ILI) per-minggu.

Keterangan: X Axis merupakan Minggu, Y Axis menunjukkan Jumlah Kasus ILI

Karakteristik kasus ILI berdasarkan umur dapat dilihat pada gambar 22 dan 23, secara berturut-turut. Proporsi terbesar kasus ILI pada tahun 2016 adalah pada usia anak-anak (5 - <15 tahun) yaitu 57%, diikuti oleh kelompok usia 2 - <5 tahun (16%). Sedangkan, proporsi terkecil kasus ILI, pada usia yang lebih tua yaitu ≥ 50 tahun sebesar 1%.

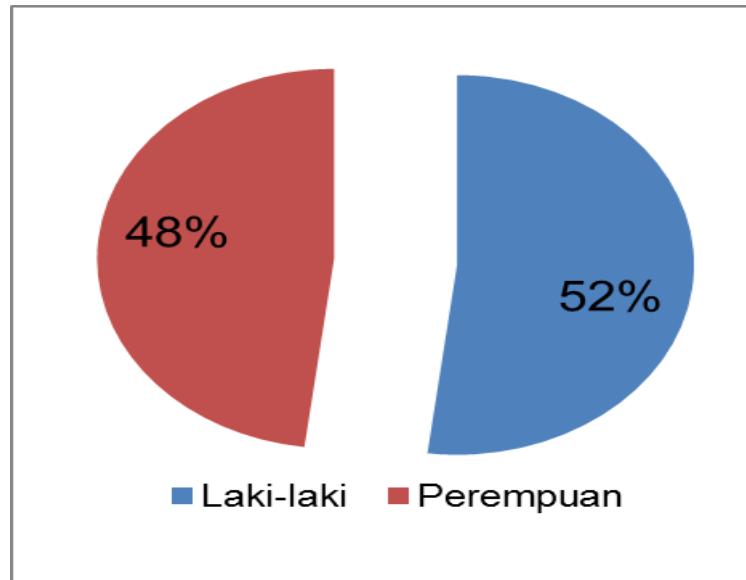


Gambar 22. Grafik distribusi kasus ISPA rawat jalan (ILI) berdasarkan kelompok umur.



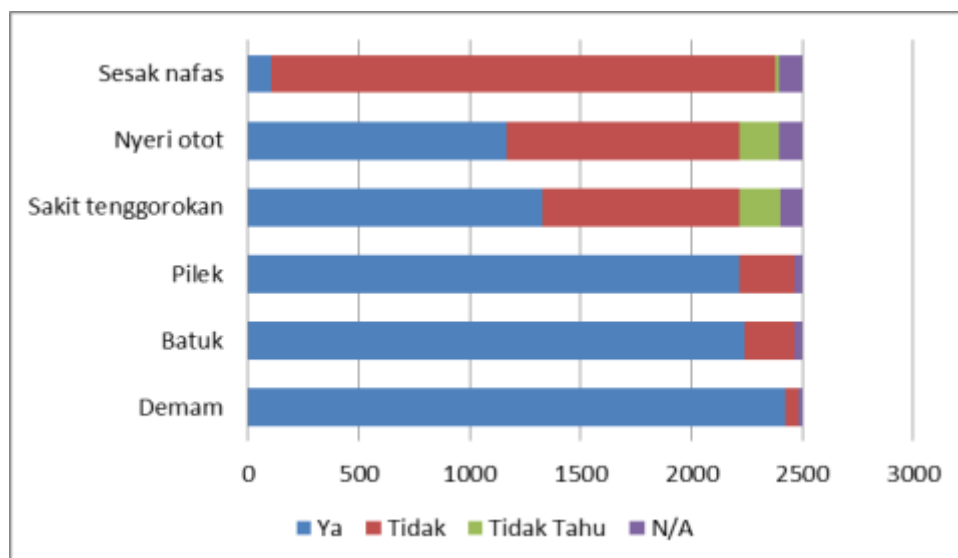
Gambar 23. Grafik distribusi kasus ISPA rawat jalan (ILI) berdasarkan kelompok umur per minggu.

Berdasarkan jenis kelamin pada gambar 24, keseluruhan penderita kasus ILI dari 27 sentinel, tidak terdapat perbedaan yang berarti antara laki-laki dan perempuan, walaupun laki-laki sedikit lebih banyak (52%) dibandingkan wanita.



Gambar 24. Grafik distribusi kasus ILI berdasarkan jenis kelamin.

Berdasarkan data gejala klinis yang didapatkan dari kasus ILI, tampak bahwa demam, batuk, dan pilek adalah gejala klinis yang dominan, dengan proporsi masing-masing adalah 97%, 90%, dan 87% (Gambar 25).



Gambar 25. Grafik distribusi gejala klinis kasus ILI.

Keterangan: X Axis menunjukkan Jumlah Kasus *ILI*, sedangkan Y Axis merupakan Gejala Klinis pada kasus *ILI*.

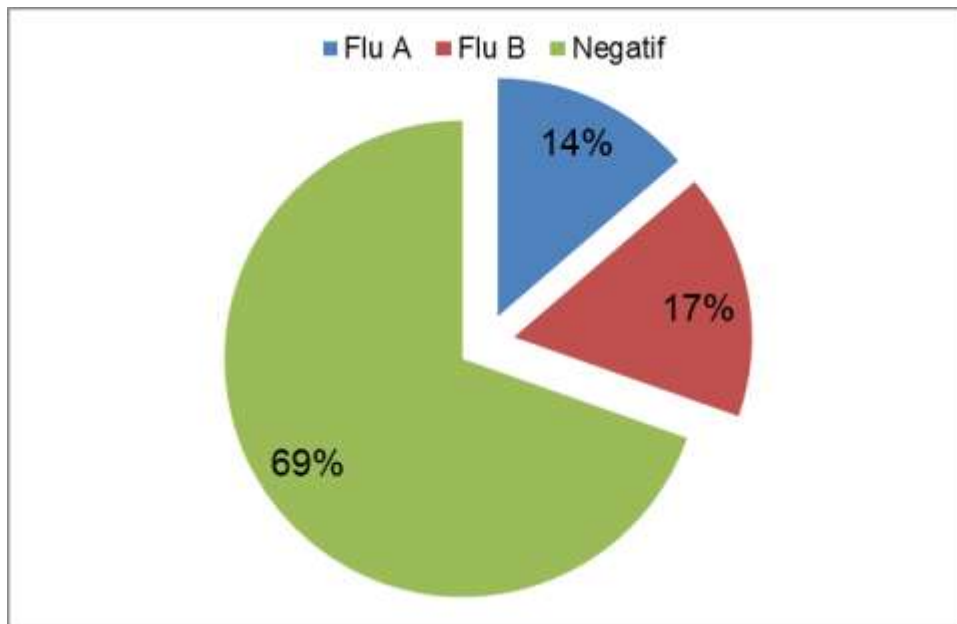
Tabel 2 menunjukkan distribusi riwayat kontak pasien ILI. Terdapat 2,24% kasus yang menyatakan adanya kontak dengan ayam mati. Terdapat keluarga dengan sakit yang sama yaitu adanya kontak dengan keluarga yang menderita sakit yang sama (demam, batuk, pilek) dalam jangka waktu dua minggu terakhir.

Tabel 2. Distribusi Riwayat Kontak Pasien yang mempunyai gejala ILI

Kontak Unggas Mati	Jumlah kasus	%
Kontak dengan Ayam mati	85	2,24
Tidak di jawab	51	1,34
Tidak Kontak	3.625	96,42
Total	3.761	100

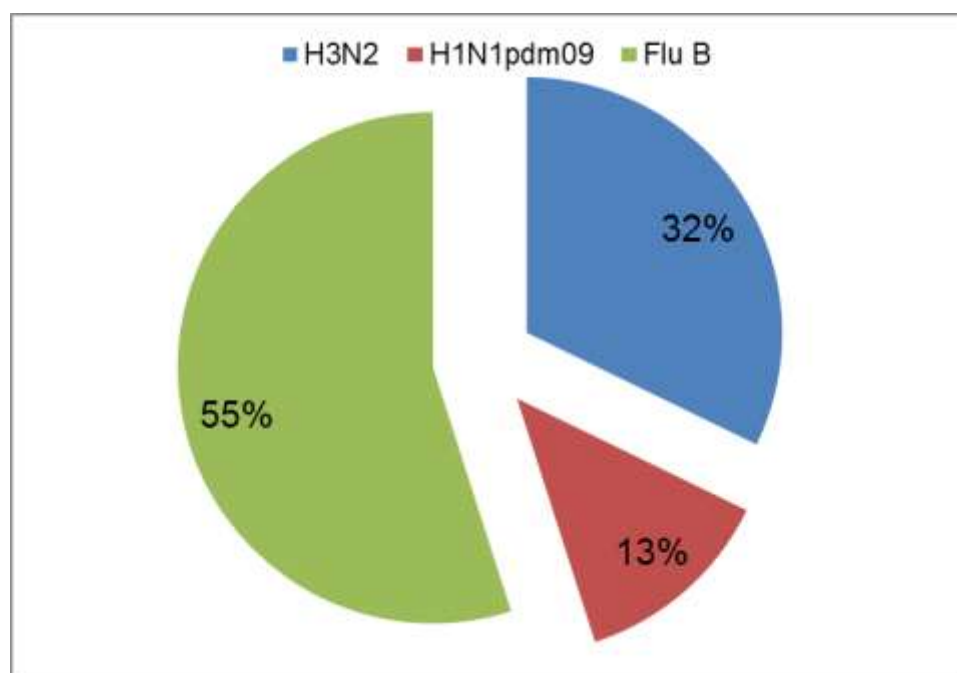
Kemudian, untuk mencari kemungkinan adanya paparan virus Influenza dari unggas, maka responden juga diberikan pertanyaan mengenai adanya kontak dengan unggas mati atau sakit dalam dua minggu terakhir dan adanya peternakan di dekat tempat tinggal kasus. Terdapat 2,24% responden yang menyatakan kontak dengan unggas mati atau sakit dan sebanyak 96,42% responden yang menyatakan tidak ada kontak dengan unggas mati.

Pemeriksaan *RT-PCR* terhadap Virus Influenza menunjukkan bahwa 31% spesimen menunjukkan hasil positif Influenza, baik influenza tipe A maupun tipe B, sebagaimana ditunjukkan pada gambar 26.



Gambar 26. Hasil Pemeriksaan PCR Influenza dari Kasus ILI

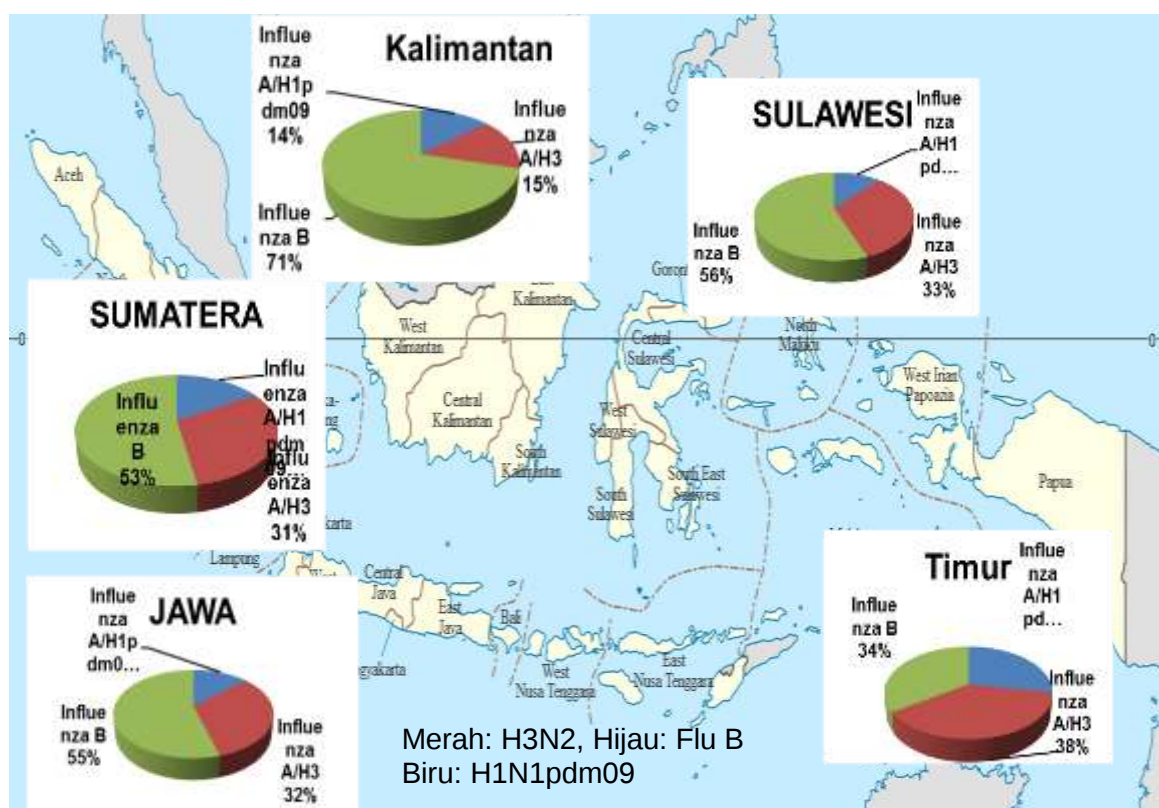
Pemeriksaan sub tipe terhadap spesimen positif Influenza A secara lebih lanjut menunjukkan sebaran sebagaimana ditunjukkan pada gambar 27. Secara keseluruhan untuk tahun 2016, Influenza tipe B lebih banyak bersirkulasi di Indonesia (55%), dibandingkan dengan Influenza tipe A (45%). Pada gambar 28, dapat dilihat sebaran sub tipe virus Influenza A/H3N2 lebih dominan dibandingkan H1N1pdm09.



Gambar 27. Distribusi *Subtype* virus Influenza dari Kasus ISPA rawat jalan (ILI)

6.2. Kasus Influenza

Bila dilihat secara spesifik pada kasus Influenza dari kasus ILI pada tahun 2016 ini, maka tampak bahwa sebaran jumlah kasus berbeda berdasarkan lokasi dan waktu (Gambar 28). Demikian pula dengan sebaran tipe dan subtype virus influenza per pulau besar di Indonesia yaitu pulau Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi dan Indonesia Timur. Hampir di semua pulau, Flu B dominan bersirkulasi kecuali di Indonesia bagian Timur dimana Influenza A H3N2 lebih dominan.

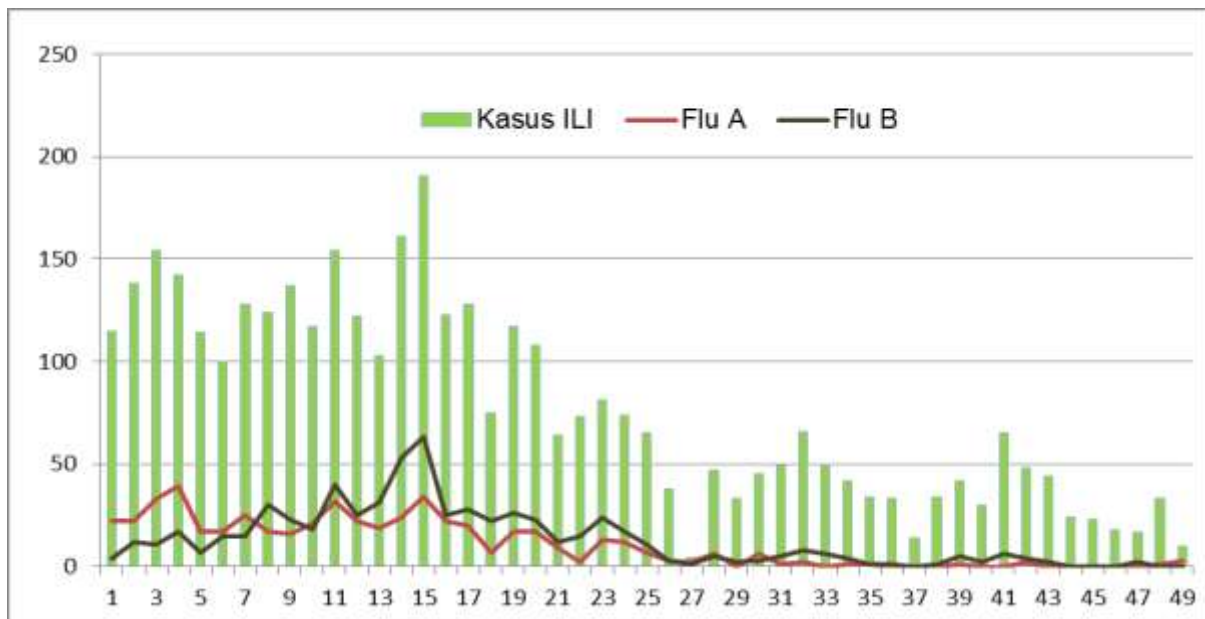


Gambar 28. Distribusi *Subtype* virus Influenza per pulau

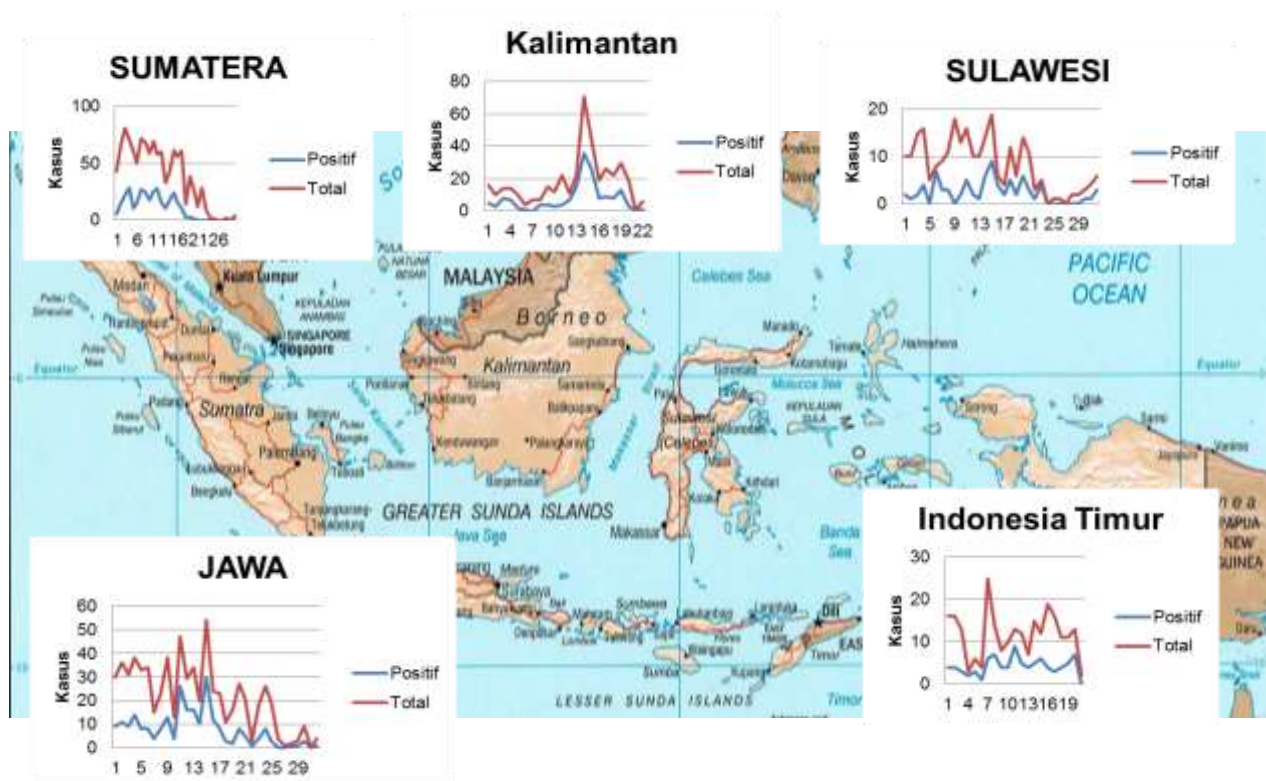
Perbedaan tipe dan subtype Virus Influenza yang beredar dan mendominasi berdasarkan minggu epidemiologi memperlihatkan pola pada minggu 1 – 19 kasus ILI meningkat (Gambar 29).

Pola sirkulasi virus influenza yang lebih dominan diawal tahun juga dialami pada beberapa pulau besar, yaitu di Jawa, Sumatera, Sulawesi dan Indonesia bagian

Timur. Sedangkan kasus di ILI di pulau Kalimantan mulai meningkat pada minggu ke 13 (Gambar 30).



Gambar 29. Grafik distribusi tipe dan subtype virus Influenza berdasarkan minggu. Keterangan: X Axis menunjukkan Jumlah Kasus, sedangkan Y Axis adalah minggu.



Gambar 30. Grafik distribusi mingguan tipe dan subtype virus Influenza berdasarkan pulau.

Perbandingan proporsi gejala klinis pada kasus ILI dan kasus positif Influenza sebagaimana terlihat pada Tabel 3, terlihat bahwa baik pada kasus ILI maupun Influenza, gejala demam, batuk, serta pilek merupakan gejala yang sering dikeluhkan oleh pasien, dengan proporsi masing-masing 99%, 92%, 87%.

Tabel 3. Perbandingan proporsi gejala klinis dari kasus ILI dan kasus positif influenza

Gejala Klinis	ILI Ya	(n=3761) %	Influenza Pos	(n=1143) %
Demam	3723	99	1132	99
Batuk	3460	92	1074	94
Pilek	3272	87	1063	93
Sakit Tenggorok	1993	53	732	64
Sesak Napas	113	3	23	2
Nyeri Otot	1805	48	560	49

Untuk riwayat kontak dengan keluarga yang menderita sakit (batuk, demam, dan lain-lain) dalam jangka dua minggu, 44% kasus Influenza menyatakan bahwa terdapat kontak dengan anggota keluarga dengan sakit yang sama, hampir sama dengan kasus ILI sebanyak 42% mempunyai riwayat kontak.

Tabel 4. Perbandingan Proporsi Riwayat Kontak Pada Kasus ILI dan Kasus Positif Influenza

	ILI Ya	(n=3761) %	Influenza Pos	(n=1143) %
Keluarga yang sakit	1580	42	503	44
Kontak ayam mati	150	4	23	2
Rumah dekat peternakan	1279	34	400	35

6.3. Kasus ISPA di Rumah Sakit

Dari 69,348 pasien rawat inap di 6 rumah sakit sentinel ISPA Berat di RS di tahun 2016, ada 865 (1%) kasus ISPA Berat yang teridentifikasi oleh tim RS dengan 804 (98%) kasus yang dapat diperiksa spesimen swab hidung dan tenggorok. Proporsi positif influenzanya sebesar 13% (N = 103 kasus). Dengan sub tipe A(H3N2) sebesar 26% dan A(H1N1)pdm09 sebesar 25% serta tipe B 49%. (Tabel 5).

Tabel 5. Kumulatif Data Virologi ISPA Berat 2016

Kasus ISPA Berat		Kumulatif (1 Januari - 30 Desember 2016) (%)
Total rawat inap		76,057
Total kasus SARI		865 (1.1)
Total spesimen SARI diperiksa		804
Total spesimen SARI positif influenza		103 (13)
Subtipe Influenza		
	A(H3N2)	27 (26)
	A(H1N1)pdm09	26 (25)
	B	50 (49)
	A(H1N1)	0
	A(H5N1)	0
	Not Subtyped	0

Proporsi kasus positif influenza tertinggi pada tahun 2016 ditemukan pada minggu ke 50 dengan 58% kasus ISPA Berat terdeteksi positif Influenza. Influenza B, A(H3N2), dan A(H1N1)pdm09 merupakan subtipe virus influenza yang terdeteksi bersirkulasi di Indonesia melalui sistem SIBI ini di tahun 2016.

Pada tabel 6, dari 865 kasus ISPA Berat, 55% adalah laki-laki dan 45% adalah perempuan. Sebanyak 804 dari 865 kasus ISPA Berat dapat diambil spesimennya dan dari 804 kasus tersebut terdapat 103 kasus yang positif influenza. Seratus tiga kasus yang ditemukan positif influenza, proporsi laki-laki sebesar 60% dan perempuan 40%. Sebagian besar proporsi kasus ISPA Berat (36,2%) dan kasus positif influenza (41.2%) ditemukan pada kelompok umur 1 – 4 tahun.

Berdasarkan gejala saat masuk, sesuai dengan kriteria definisi kasus ISPA Berat, mayoritas penderita ISPA Berat memiliki riwayat panas (99%) dan batuk (99%). Semua kasus positif influenza memiliki riwayat panas (100%) dan batuk (100%). Pneumonia ditemukan pada 25% kasus ISPA Berat dan 22% pada kasus positif influenza. Pada anak-anak di bawah 5 tahun yang positif influenza,

9% teridentifikasi dengan gejala kejang. Terdapat satu kasus positif Influenza yang meninggal dunia.

Cukup banyak kasus ISPA Berat yang memiliki kondisi/penyakit penyerta seperti perokok (4%), asma (2%), Penyakit Paru Obstruktif Kronis (2%), dan tuberkulosis (1.5%). Sedangkan untuk pasien positif influenza, perokok (8%), asma (5%), Penyakit Kardiovaskuler (4%) dan Penyakit Paru Obstruktif Kronis (4%) merupakan kondisi penyerta yang paling banyak terdeteksi. Dengan pemeriksaan X-Ray, 22% dari kasus ISPA berat menunjukkan hasil pneumonia.

Tabel 6. Proporsi kasus ISPA Berat berdasarkan data demografi, gejala, riwayat medis, dan kondisi saat keluar

	ISPA Berat (N=865) n (%)	Positif Influenza (N=103) n (%)
Jenis Kelamin		
Laki-laki	477 (55)	61 (60)
Perempuan	388 (45)	41 (40)
Kelompok Umur		
< 1 tahun	234 (27.1)	15 (14.7)
1 – 4 tahun	313 (36.2)	42 (41.2)
5 – 14 tahun	162 (18.7)	22 (21.6)
15 – 49 tahun	75 (8.7)	8 (7.8)
50 – 64 tahun	49 (5.7)	3 (2.9)
>65 tahun	32 (3.7)	12 (11.8)
Gejala saat masuk*		
Riwayat panas	858 (99)	102 (100)
Panas $\geq 38^{\circ}\text{C}$	596 (69)	76 (74.5)
Batuk	858 (99)	102 (100)
Sakit tenggorokan	124 (14)	21 (21)
Sesak napas	412 (48)	35 (34)
Muntah	290 (33.5)	32 (31)
Nyeri dada pleuritik	69 (8)	11 (11)
Ronki	371 (43)	27 (26.5)
Diare	147 (17)	13 (13)
Riwayat medis*		
Perokok	31 (4)	8 (8)
Asma	21 (2)	5 (5)
Kelainan neurologis	2 (0.2)	0 (0)
Hamil	1 (0.1)	0 (0)
Diabetes	26 (3)	5 (5)
Ginjal Kronis	3 (0.3)	1 (1)

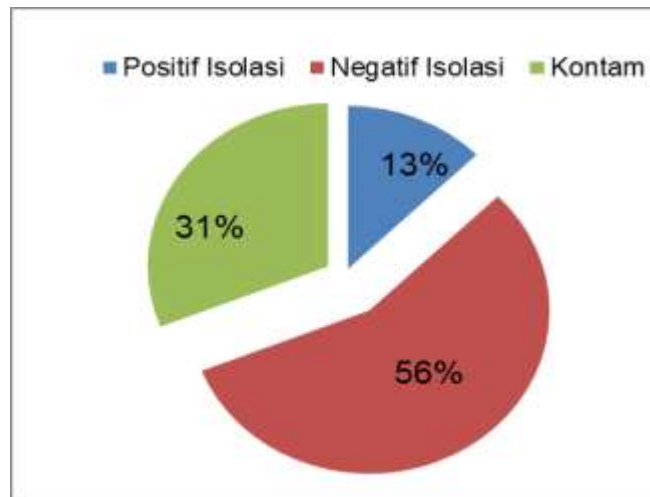
Tuberkulosis	13 (1.5)	1 (1)
Penyakit Kardiovaskular	15 (2)	4 (4)
Penyakit Paru Obstruktif Kronis	14 (2)	4 (4)
Imunosupresif	1 (0.1)	0 (0)
Penyakit Hati Kronis	4 (0.5)	0 (0)
Kelainan Hematologis	1 (0.1)	0 (0)
Vaksinasi flu	7 (0.8)	1 (1)
Kanker	1 (0.1)	0 (0)
Obesitas	6 (0.7)	2 (2)
Kondisi saat keluar		
Meninggal	5 (0.6)	1 (1)
Pemeriksaan X-Ray		
Dilakukan rontgen X-Ray	301 (35)	34 (33)
Pneumonia pada hasil rontgen X-Ray	213 (25)	22 (22)
Gejala Berat untuk anak di bawah 5 tahun*	ISPA Berat (N=547) n (%)	Positif Influenza (N=57) n (%)
Tarikan dinding dada	120 (22)	4 (7)
Tidak bisa minum	6 (1)	0 (0)
Kejang	37 (7)	5 (9)
Stridor	26 (5)	0 (0)
Kesadaran menurun	7 (1)	0 (0)

*Satu pasien bisa memiliki > 1 gejala/riwayat medis

6.4. Karakteristik Virus Influenza

6.4.1. Isolasi Virus Influenza

Untuk spesimen kasus ILI yang terkonfirmasi positif Influenza, pemeriksaan dilanjutkan dengan isolasi Virus Influenza. Tujuan isolasi Virus Influenza adalah untuk mendapatkan isolat virus yang dapat digunakan untuk analisa karakterisasi Virus Influenza lebih lanjut. Sebanyak 963 spesimen klinis dilanjutkan dengan isolasi dengan rincian 860 spesimen ILI dan 103 spesimen SARI. Pada tabel 6, dari 963 spesimen positif yang dilakukan isolasi, didapat 121 (13%) isolat dengan rincian 106 positif Influenza B, 15 positif Influenza A/H1N1pdm09, dan tidak ada virus H3N2 yang tumbuh. Dari 963 spesimen yang diisolasi, sebanyak 539 tidak tumbuh dan 297 kontam oleh jamur atau bakteri (Gambar 31).



Gambar 31. Persentase spesimen klinis yang dapat diisolasi

Tabel 7. Distribusi spesimen klinis yang diisolasi

No.	Daerah	Isolasi	Negatif	Kontam	Positif	%
1	Aceh	17	3	14	0	0
2	Ambon	15	14	1	0	0
3	Babel	54	25	6	23	43
4	Bandung	17	9	5	3	18
5	Balikpapan	91	55	31	5	5
6	Batam	19	13	5	1	5
7	Banjarmasin	49	24	19	6	12
8	Bengkulu	70	19	48	3	4
9	Denpasar	26	19	5	2	8
10	Jayapura	19	17	1	1	5
11	Jambi	30	21	6	3	10
12	Yogyakarta	18	8	4	6	33
13	Kupang	22	3	19	0	0
14	Lampung	50	39	4	7	14
15	Makassar	47	19	22	6	13
16	Malang	29	19	4	6	21
17	Mamuju	3	0	3	0	0
18	Mataram	26	5	21	0	0
19	Medan	34	15	11	2	6
20	Merauke	38	17	18	3	8
21	Padang	34	18	15	1	3
22	Palangkaraya	22	9	3	10	45
23	Palembang	32	21	7	4	13
24	Palu	28	18	8	2	7

25	Semarang	45	25	5	15	33
26	Pekanbaru	22	14	8	0	0
27	Tangerang	3	3	0	0	0
28	SARI	103	87	4	12	12
		963	539	297	121	13

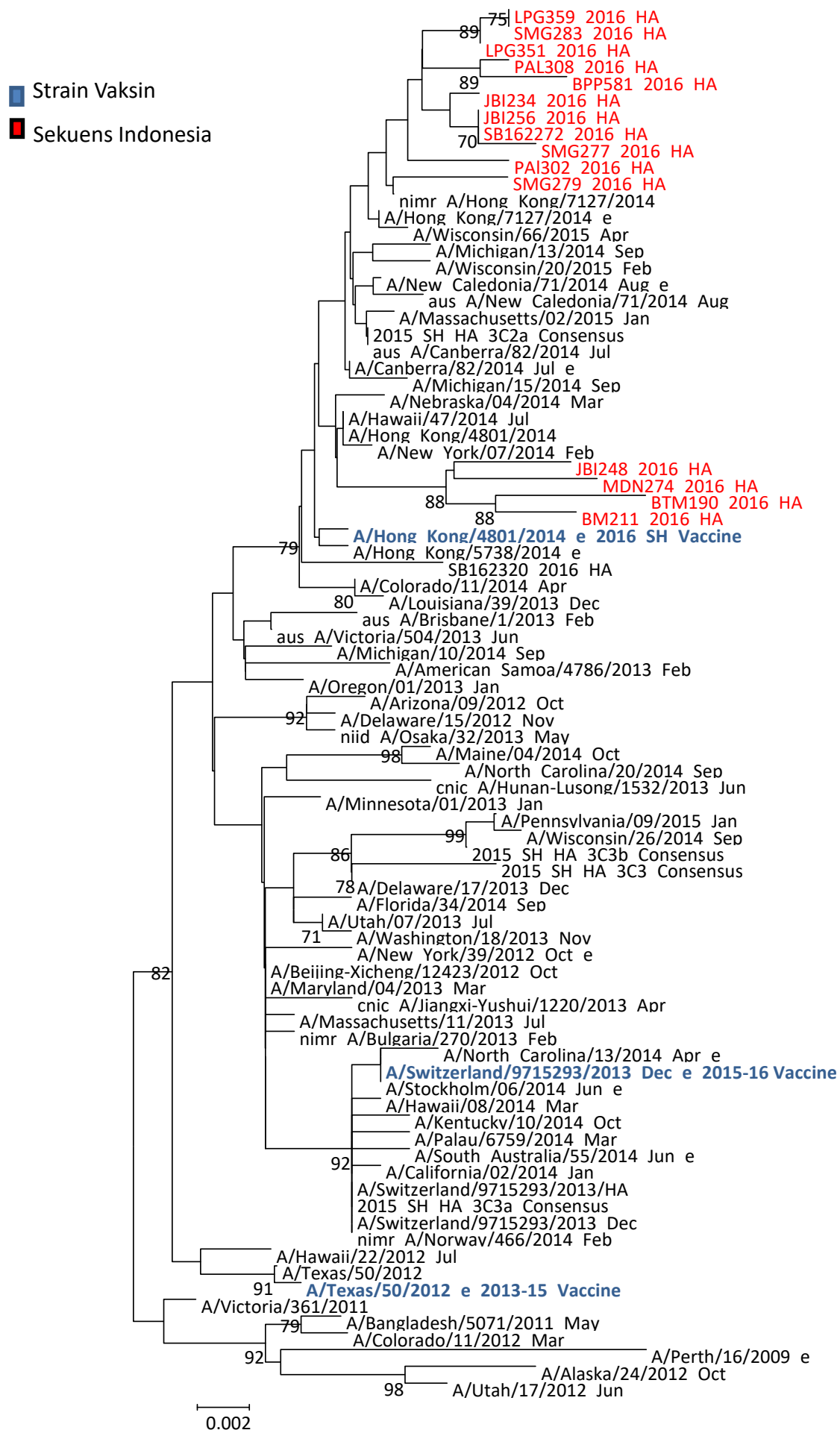
6.4.2. Karakteristik Molekuler Virus Influenza

6.4.2.1. Karakteristik gen HA (A/H3N2)

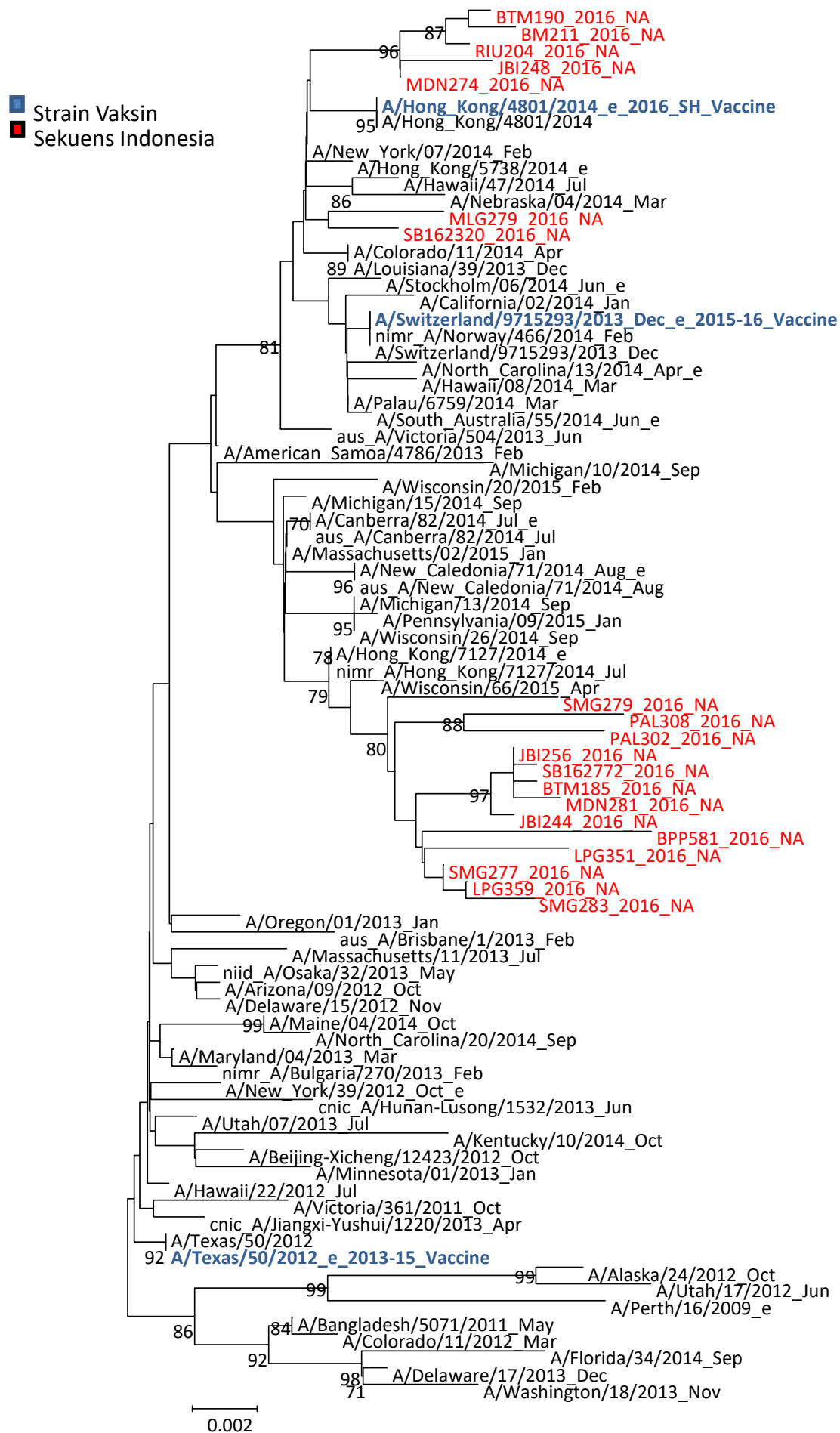
Sebanyak lima belas spesimen klinis ILI dari kasus ILI dan SIBI dilanjutkan dengan sekuensing. Empat belas spesimen kasus ILI (BTM190, BTM211, JBI244, JBI248, JBI256, MDN274, BPP581, LPG351, LPG359, SMG277, SMG279, SMG283, PAL302, PAL308) dan satu spesimen klinis SIBI (SB162772) telah dapat dilakukan sekuensing sehingga diperoleh urutan basa sepanjang 1701bp atau *open reading frame* (ORF) gen HA. Berdasarkan analisis pohon filogenetik dapat diketahui bahwa kelima virus yang bersirkulasi tersebut berkelompok dengan strain vaksin WHO untuk tahun 2016, A/HongKong/4801/2014 (Gambar 32). Analisis dilakukan oleh perangkat lunak MEGA 6 dengan metoda neighbour joining (NJ), Kimura-2 parameter, dengan 1000 kali pengulangan (bootstrap).

6.4.2.2. Karakteristik gen NA (A/H3N2)

Sebanyak dua puluh spesimen klinis dari kasus ILI dan SIBI telah dapat dilakukan sekuensing terhadap urutan basa gen NA sepanjang 1401 bp atau ORF gen NA. Dua puluh spesimen yang berhasil di sekuensing gen NA terdiri dari 2 kasus SIBI (SB162320 dan SB162772) dan 18 kasus ILI (BTM185, BTM190, BTM211, JBI244, JBI248, JBI256, RIU204, MDN274, MDN281, BPP581, MLG279, LPG351, LPG359, SMG277, SMG279, SMG283, PAL302, PAL308). Berdasarkan pohon filogenetik pada gambar 33, virus-virus tahun 2016 satu kelompok dengan strain vaksin WHO. Analisis dilakukan oleh perangkat lunak MEGA 6 dengan metoda neighbour joining (NJ), Kimura-2 parameter, dengan 1000 kali pengulangan (bootstrap). Berdasarkan *alignment* gen NA dengan strain vaksin WHO, A/HongKong/4801/2014, virus H3N2 masih sensitif terhadap oseltamivir dengan tidak adanya mutasi 119V dan R292K (Gambar 34).



Gambar 32. Pohon Filogenetik gen HA A/H3N2



Gambar 33. Pohon Filogenetik gen NA Influenza A/H3N2



Gambar 34. *Alignment* urutan basa gen NA virus H3N2 Indonesia tahun 2016 dengan strain vaksin WHO, A/HongKong/4801/2014. Petanda oseltamivir resisten adalah adanya mutasi E119V dan R292K. Virus Indonesia sensitif terhadap oseltamivir dengan tidak ditemukannya mutasi E119V dan R292K (kotak merah).

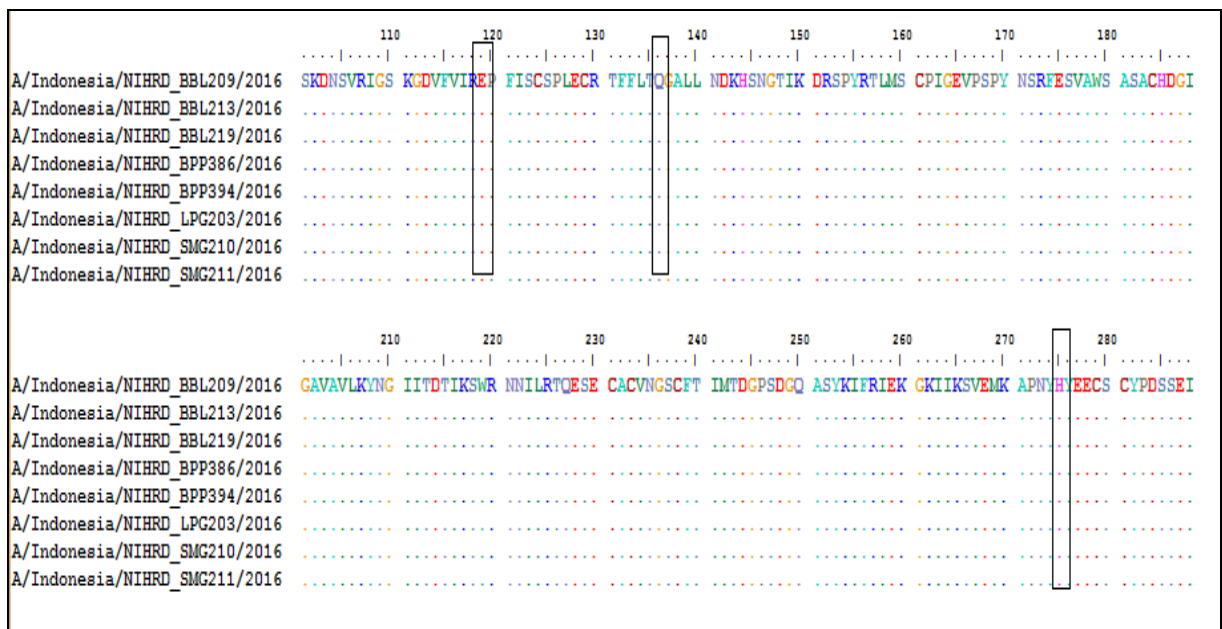
6.4.2.3. Karakteristik gen NA (A/H1N1pdm09)

Delapan isolat positif Influenza A/H1N1pdm09 dari empat daerah yaitu Semarang, (SMG210 dan SMG211), Balikpapan (BPP386 dan BPP394), Bangka Belitung (BBL213, BBL209 dan BBL219), Lampung (LPG203) telah berhasil dikarakterisasi gen NA. Berdasarkan *alignment* gen NA dengan strain

vaksin WHO A/California/7/2009 (H1N1pdm09), tidak ada mutasi pada 275H (Gambar 35).

6.4.2.4. Karakteristik gen HA (A/H1N1pdm09)

Delapan isolat virus Influenza A (H1N1)pdm09 telah berhasil dikarakterisasi, yaitu SMG210, SMG211, BPP386, BPP394, BBL209, BBL213, BBL219, LPG203. Berdasarkan sekuensing gen HA, virus Influenza A (H1N1)pdm09 yang bersirkulasi tahun 2016 berada pada kelompok yang sama dengan strain vaksin tahun 2016 A/California/7/2009 (H1N1pdm09) (gambar 36). Analisis HA H1N1pdm09 dilakukan oleh perangkat lunak MEGA 6 dengan metoda neighbour joining (NJ), Kimura-2 parameter, dengan 1000 kali pengulangan (bootstrap).



Gambar 35. Analisis residu gen NA A(H1N1)pdm09

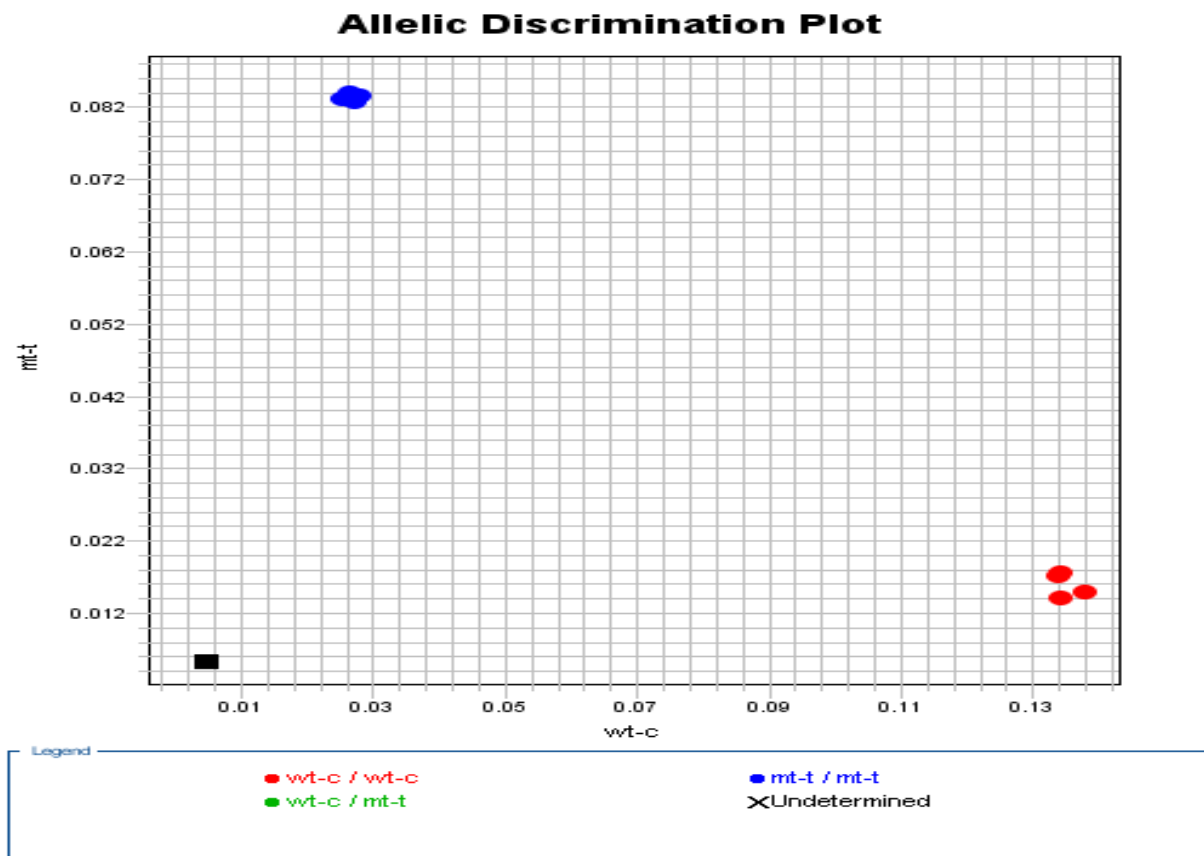
Resistensi antiviral Oseltamivir ditunjukkan dengan mutasi asam amino pada posisi 275 (H275Y) dan 119 (E119V). Sedangkan resistensi antiviral Zanamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 136 (Q136K).



Gambar 36. Pohon Filogenetik gen HA. (Keterangan Blok biru = strain vaksin)

6.5. Pemeriksaan Resistensi Mutasi Oseltamivir

Resistensi terhadap antiviral oseltamivir dilakukan dengan menggunakan metoda diskriminasi alel. Metoda untuk membedakan alel tersebut dapat dilakukan dengan metoda real-time reverse transcriptase (rRT-PCR) yang dirancang untuk mendeteksi mutasi H275Y. Pemeriksaan ini berhasil digunakan untuk membedakan alel yang berbeda dengan basis substitusi tunggal atau polimorfisme nukleotida tunggal (single nucleotide polymorphism/SNP). RNA dari sampel klinis diperiksa dengan menggunakan rRT-PCR untuk mengidentifikasi adanya mutasi asam amino di posisi 275 yang berhubungan dengan resistensi antiviral Oseltamivir.



Gambar 37. Plot Diskriminasi alel resistensi oseltamivir dengan rRT-PCR.

Kontrol dan sampel RNA alel H275- *wild type* akan sejajar dengan axis-X (warna merah), sedangkan kontrol 275Y-*mutant* akan sejajar dan berkumpul sepanjang garis axis Y (warna biru). Negatif control ditunjukkan dengan tanda X di bagian pojok kiri axis X dan Y.

Hasil dari pemeriksaan terhadap sampel Influenza positif H1N1pdm09 menunjukkan adanya mutasi asam amino Histidine (H) menjadi Tyrosin (Y) yang berkaitan dengan resistensi oseltamivir pada posisi 275 pada dua isolat ILI. Hal ini menunjukkan bahwa virus tersebut sensitif terhadap antiviral Oseltamivir (Gambar 37).

6.6. Virus-virus lain Penyebab Infeksi Saluran Pernafasan

6.6.1. Puskesmas

Sebanyak 1590 spesimen negatif influenza dari ILI dilakukan pemeriksaan multiplex PCR untuk mengetahui virus penyebab lain dari kasus ISPA di Puskesmas dan RS. Spesimen dipilih secara random dan mewakili dari 27 puskesmas sentinel. Tabel 7 menunjukkan virus-virus penyebab infeksi saluran pernafasan dari kasus ILI. Selain influenza A dan B, penyebab terbanyak adalah human rhinovirus. Sebanyak 327 (23,4%) kasus ditemukan lebih dari satu virus pada spesimen yang sama.

Tabel 8. Virus-virus saluran pernafasan penyebab ISPA di Puskesmas

Jenis Virus	Positif (N=1590)	%
Human Enterovirus	157	9,9
Adenovirus	160	10
Metapneumovirus	146	9,2
Human Rhinovirus	342	21,5
Parainfluenza Virus	85	5,3
Respiratory Syncytial Virus	152	9,6
Human Bocavirus	26	1,6
Flu B	62	3,9
Flu A	155	9,7
Coronavirus NL63	52	3,3
Coronavirus OC43	51	3,2
Coronavirus 229E	16	1,0
Negatif	176	11,1

6.6.2. Rumah Sakit

Sebanyak 789 spesimen SIBI dilakukan pemeriksaan multipleks PCR untuk mengetahui virus penyebab lain dari kasus SIBI. Tabel 9 menunjukkan virus-virus penyebab infeksi saluran pernafasan dari kasus SIBI. Selain influenza A dan B, penyebab terbanyak adalah human rhinovirus sebanyak 180 (31,7%). Kasus ditemukan lebih dari satu virus pada spesimen yang sama 144 (25,4%).

Tabel 9. Virus-virus saluran pernafasan lainnya penyebab ISPA Berat di Rumah Sakit

	MPV	HRV	HEV	AdV	Flu A	HboV	CoV-OC43	PIV	RSVA/B	CoV-NL63	Flu B	infeksi ganda
RS Deli Serdang	3	22	8	13	7	20	4	5	6	0	0	22
RS Dr. M. Haulussy	2	12	1	2	0	1	2	1	4	1	0	5
RS Kanudjoso Djati	14	50	6	10	11	24	3	7	25	1	0	29
RS Wonosari	13	26	1	5	8	41	0	4	27	1	0	40
RS Bitung	7	6	0	0	1	0	1	0	7	1	1	3
RS Mataram	18	64	2	16	9	2	3	4	33	0	1	45
	57	180	18	46	36	88	13	21	102	4	2	144

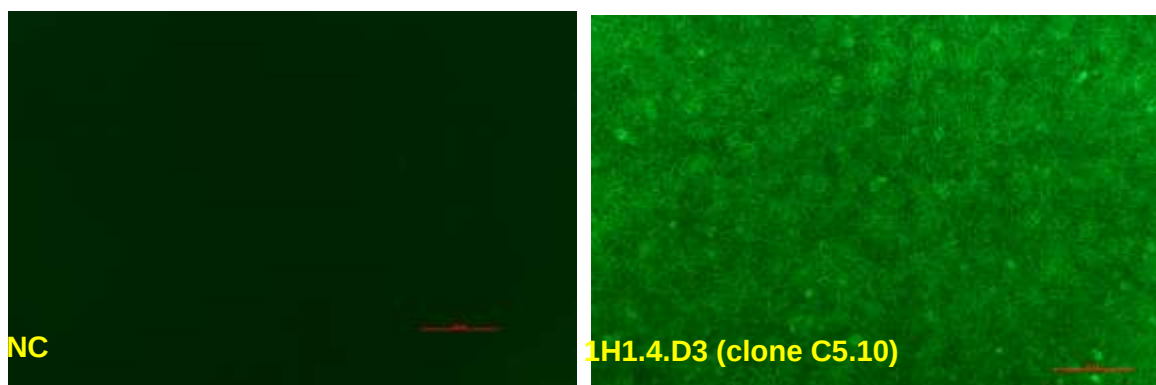
6.7. Monoclonal Antibodi

Sel hibridoma yang didapat dari hasil fusi sel *splenosit* dengan sel PAI memiliki karakter yang berbeda dari kedua sel induk tersebut (Tabel 10). Untuk memisahkan sel hibridoma dari kedua sel induk, dilakukan seleksi dengan menggunakan Hypoxanthine Aminopterin Thymidine medium (HAT medium). Sel PAI merupakan sel yang bersifat *immortal* dengan genotip HGPRT-, dalam media HAT, sel PAI akan kehilangan kemampuan untuk mensintesis DNA, dan aminopterin akan menghambat *de novo pathway* yang menyebabkan sel PAI mati dalam media HAT. Sel splenosit memiliki genotip HGPRT + dan bersifat mortal. Sel splenosit akan mati karena siklus replikasi sel terbatas dan sel tidak mampu berkembang. Sementara sel hibridoma memiliki genotip HGPRT +/- yang bersifat *immortal* dan memiliki kemampuan mensintesis DNA sehingga dapat bertahan dan mampu bereplikasi dalam medium HAT.

Tabel 10. Jumlah koloni hibridoma yang terbentuk dan tingkat keberhasilan fusi

Grup	H1N1pdm	H3N2	H5N1	Influenza A Grup 2	Influenza A campuran	Influenza B
Hibridoma	55	32	161	88	84	1
Persentase keberhasilan fusi	28.65	11.11	83.85	45.83	29.17	1.04

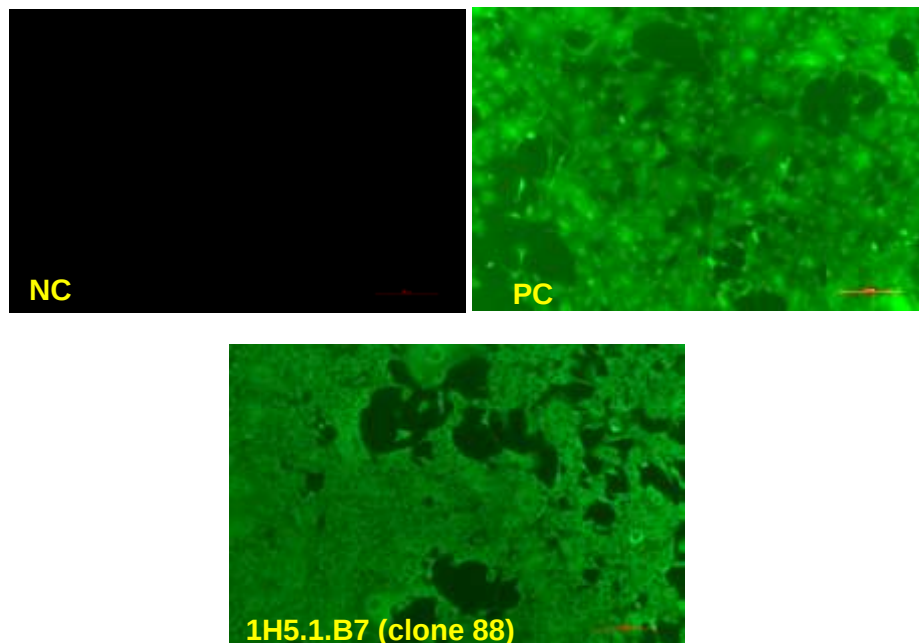
Sel hibridoma yang hidup dan bereplikasi akan mengekspresikan antibodi yang diekspresikan ke supernatan, kemudian supernatan dikoleksi dan diidentifikasi dengan metode IFA untuk mengetahui apakah antibodi yang terbentuk dapat mengenali virus influenza. Pada penelitian ini diketahui bahwa sebagian besar hibridoma yang terbentuk memberikan reaksi pada IFA. Namun selanjutnya diketahui bahwa sinyal yang diberikan oleh antibodi tersebut bukan merupakan antibodi yang mengenali virus influenza melainkan antibodi yang mengenali sel MDCK (Gambar 38). Hal ini dapat terjadi karena pada proses infeksi mencit, virus yang digunakan adalah isolat virus Influenza yang ditumbuhkan dalam sel MDCK. Meskipun supernatan isolat virus Influenza tersebut telah disentrifugasi untuk memisahkan sel dan supernatan, namun residu dari sel MDCK kemungkinan masih terbawa saat digunakan dalam injeksi virus ke mencit. Akibatnya, tubuh mencit mengenali sel MDCK sebagai benda asing dan memproduksi antibodi terhadap sel MDCK.



Gambar 38. Antibodi yang diekspresikan sel Hibridoma 1h1.4.D3 (clone C5.10) berikatan dengan sel MDCK dan memberikan sinyal warna fluoresen dideteksi dengan metode IFA

Tingkat keberhasilan fusi bergantung pada teknik fusi, kondisi sel PAI dan kondisi mencit. Pada penelitian ini, keberhasilan fusi tiap kelompok mencit berbeda-beda yang terlihat pada tabel 11. Tingkat keberhasilan fusi tertinggi adalah pada kelompok mencit yang diinfeksi virus H5N1, sedangkan yang paling rendah adalah pada kelompok mencit yang diinfeksi Influenza B. Lama waktu pengerjaan dan kondisi limpa setelah mencit *disacrifice* juga menjadi faktor penentu keberhasilan fusi.

Pada penelitian ini, didapatkan 7 *clone* sel hibridoma yang menunjukkan reaksi positif dalam mengenali virus Influenza A/H5N1 (Tabel 9). Pada gambar 39 sel hibridoma 1H5.1.B7 (*clone* 88) dapat bereaksi dengan virus Influenza A/H5N1 yang menginfeksi sel MDCK, ditunjukkan dengan fluoresensi berwarna hijau.



Gambar 39. Antibodi yang diekspresikan sel hibridoma 1H5.1.B7 (*clone* 88) mampu berikatan dengan virus Influenza A/H5N1 yang menginfeksi sel MDCK dideteksi dengan metode IFA

Setelah sel hibridoma teridentifikasi mampu mengenali virus Influenza, dilakukan *self-limited cloning* untuk memurnikan sel hibridoma. Dalam *self-limited cloning* didapatkan *single colony* sel hibridoma yang berasal dari 1 sel (Gambar 40). Pada tahap *self-limited cloning* medium HAT diganti dengan medium HT untuk membantu pertumbuhan sel hibridoma. *Single colony* yang

tumbuh kemudian diperbanyak dan *supernatan* dikoleksi dan disimpan untuk analisis selanjutnya.



Gambar 40. *Single colony* dari sel hibridoma yang ditumbuhkan dalam medium HT

Tabel 11. Daftar sel hibridoma yang mengenali virus Influenza A

No	Nama Sel Hybridoma
1	1H5.2.B10 (clone 30)
2	1H5.1.C7 (clone 88)
3	1H5.3.E2 (clone 94)
4	1H5.4.F4 (clone 99)
5	1H5.1.H4 (clone 103)
6	1H5.1.F8 (clone 105)
7	1H5.5.C2 (clone 115)

6.8. Pengembangan metode deteksi virus infeksi saluran pernafasan lainnya

Pada penelitian ini dikembangkan 3 set primer *multiplex* untuk mendeteksi virus penyebab ISPA non influenza. Primer set tersebut terdiri atas :

1. Set primer Human Parainfluenza Virus
2. Set primer RSV A-RSVB- SARS
3. Set primer Human Coronavirus (HKU1-NL63-OC43-229E)

Sekuen untuk setiap primer diperoleh dari penelitian sebelumnya dengan beberapa modifikasi untuk mendapatkan hasil yang optimal. Proses optimasi untuk setiap set primer meliputi :

- a. Optimasi set primer secara *singleplex*

- b. Optimasi set primer secara *multiplex*
- c. Uji sensitifitas *multiplex*
- d. Uji spesifitas *multiplex*

Pengujian setiap set primer menggunakan kontrol positif berupa *g-block gene fragment* yang didesain sesuai dengan daerah yang menjadi target tiap-tiap primer yang digunakan. Reagen yang digunakan untuk pemeriksaan adalah Superscript III Platinum Taq One-step qRT PCR Invitrogen (cat.117320). Primer dan *g-block gene fragment* disintesis oleh Integrated DNA Technologies (IDT).

1. Set primer Human Parainfluenza Virus (HPIV)

Gen target untuk primer HPIV-1, 2 dan 3 adalah gen *hemagglutinin-neuraminidase* (HN). Sedangkan gen target untuk HPIV-4 adalah *nucleoprotein*. Sekuen primer dan probe yang digunakan dalam set primer HPIV mengacu pada penelitian sebelumnya.²⁰

Tabel 12. Sekuen primer HPIV yang digunakan dalam penelitian

Virus	Primer Forward (F)	Primer Reverse (R)	Taqman probe (P)
HPIV-1	TGA TTT AAA CCC GGT AAT TTC TCA T	CCT TGT TCC TGC AGC TAT TAC AGA	FAM-ACG ACA ACA GGA AAT C-BHQ1
HPIV-2	AGG ACT ATG AAA ACC ATT TAC CTA AGT GA	AAG CAA GTC TCA GTT CAG CTA GAT CA	TEXAS-RED-ATC AAT CGC AAA AGC TGT TCA GTC ACT GCT ATA C-BHQ2
HPIV-3	TGA TGA AAG ATC AGA TTA TGC ATA TC	CCG GGA CAC CCA GTT GTG	HEX-TGG ACC AGG GAT ATA CTA CAA AGG CAA AAT AAT ATT TCT C-BHQ1
HPIV-4	CAA AYG ATC CAC AGC AAA GAT TC	ATG TGG CCT GTA AGG AAA GCA	CY-5-GTA TCA TCA TCT GCC AAA TCG GCA ATT AAA CA-Iowa Black RQ

- a. Optimasi set primer secara *singleplex*

Pada studi sebelumnya primer/probe tersebut digunakan untuk mendeteksi HPIV pada sampel klinis secara *singleplex*. Dalam penelitian ini dilakukan modifikasi terhadap *dye* sekuen probe yang digunakan karena pemeriksaan akan dilakukan secara *multiplex* sehingga *dye* tidak boleh sama untuk target yang berbeda. Untuk HPIV-1 digunakan FAM, HPIV-2 digunakan Texas Red, HPIV-3 digunakan HEX dan Cy5 untuk HPIV-4.

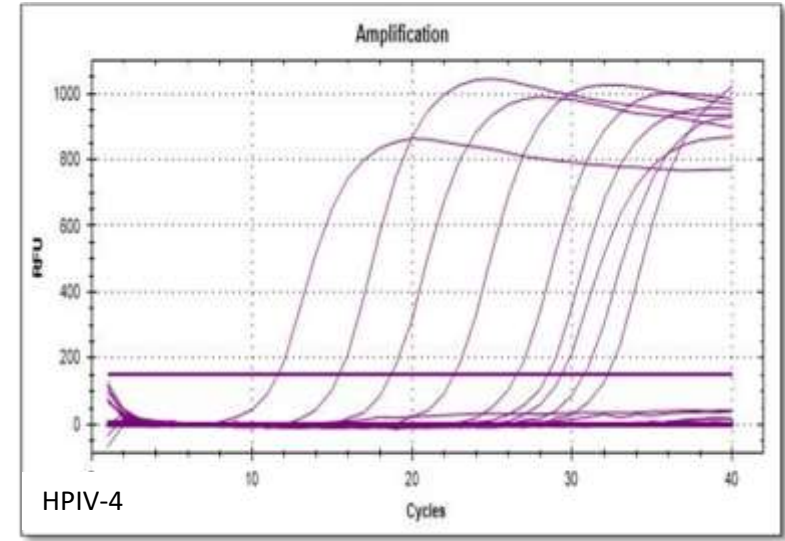
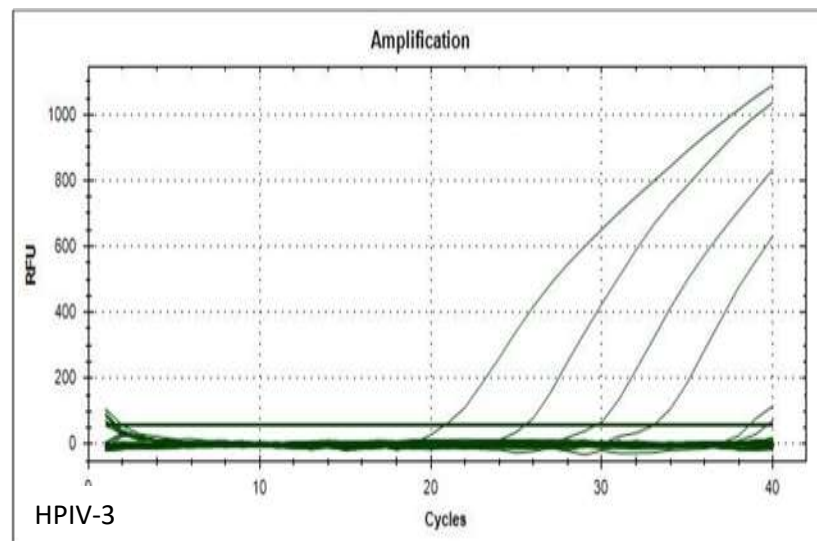
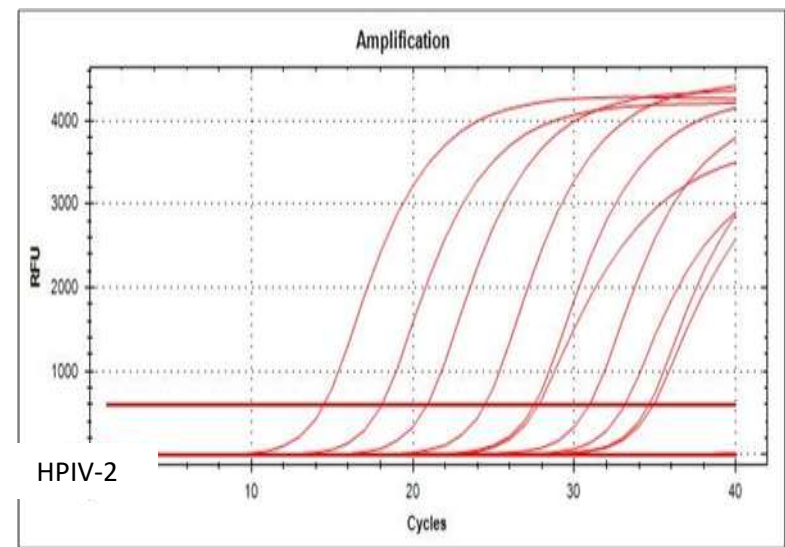
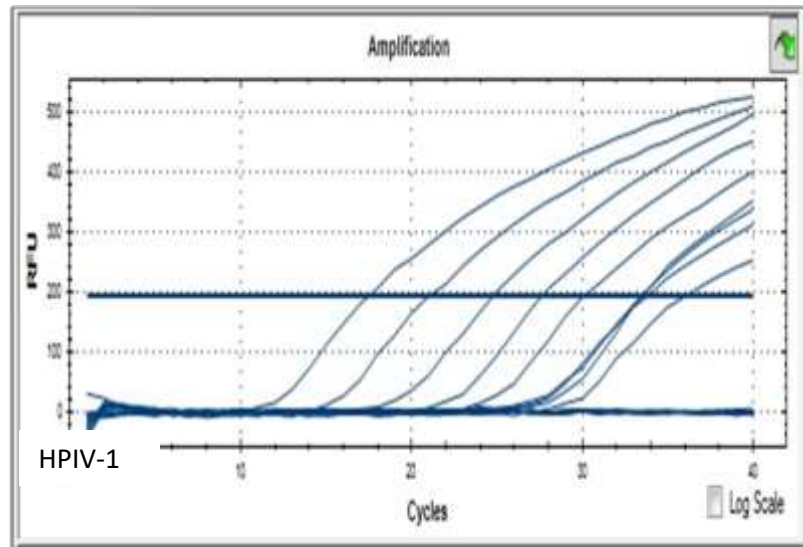
Sebagai langkah awal dilakukan resuspensi dan pengenceran bertingkat terhadap sampel yang digunakan. Konsentrasi stok sampel yang digunakan

untuk HPIV-1,2 dan 3 adalah 50ng/μl sedangkan untuk HPIV-4 adalah 100ng/μl. Perbedaan konsentrasi ini disebabkan panjang *g-block gene fragment* yang digunakan. *G-block gene fragment* untuk HPIV-1,2 dan 3 tidak meliputi seluruh gen HN melainkan hanya parsial saja. Sedangkan untuk HPIV-4 meliputi seluruh gen HN. Kualitas set primer diuji secara terpisah dalam 4 (empat) eksperimen yang berbeda untuk HPIV-1,2,3 dan 4. Komposisi reagen yang digunakan untuk setiap reaksi *singleplex* sebagai berikut : 12.5 μl 2x *reaction mix*, 5.5μl nuclease free water, 0.5μl primer F, 0.5μl primer R, 0.5μl probe dan 0.5μl enzim. *Template* yang digunakan terpisah antara HPIV-1,2,3 dan 4 masing-masing sebanyak 5μl. Optimasi dilakukan pada pengenceran 10^{-2} sampai dengan 10^{-10} tanpa ulangan. Kondisi suhu PCR *singleplex* menurut Pol (2007) adalah

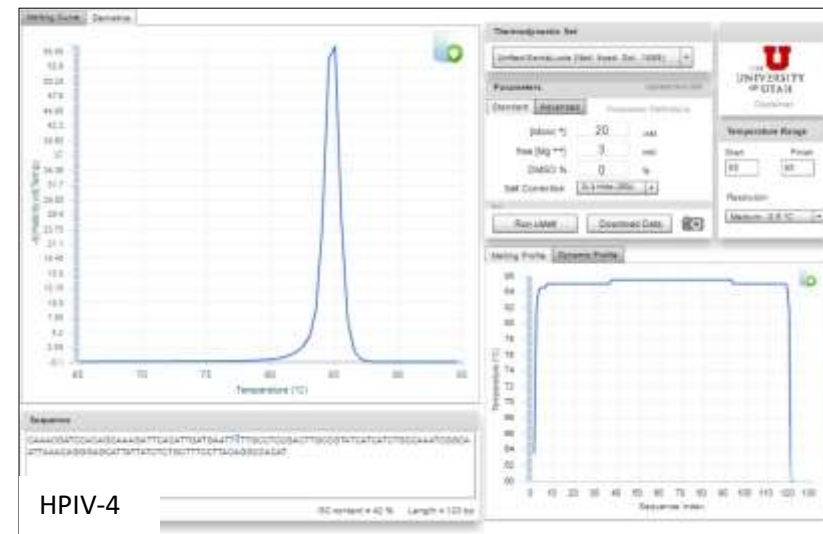
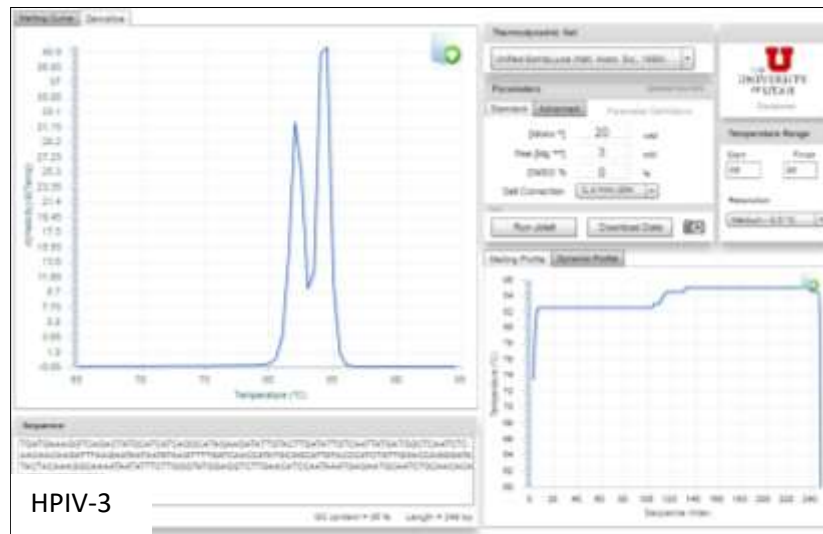
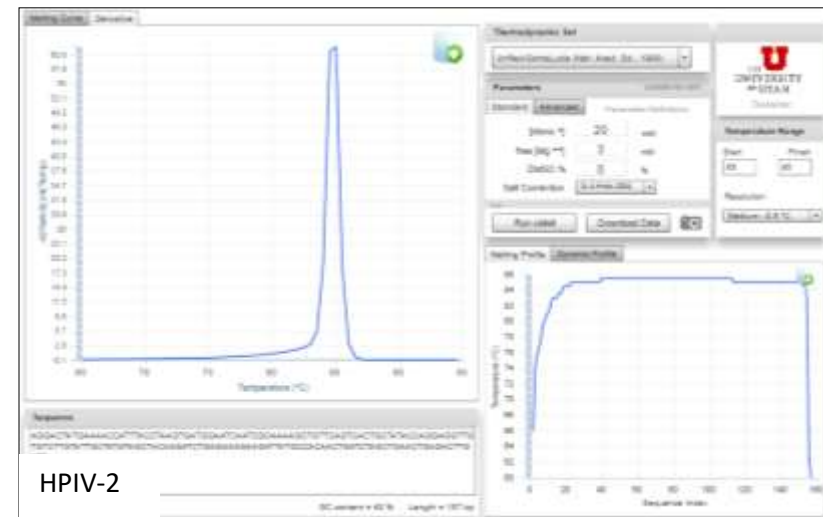
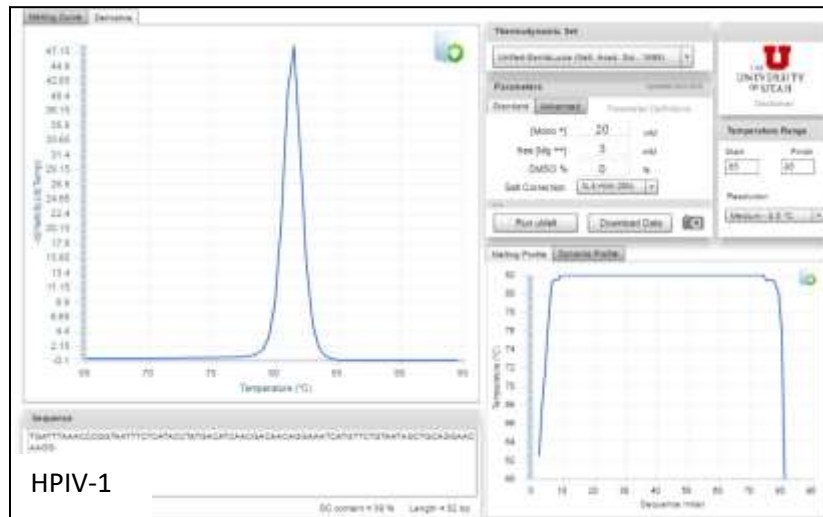
- *Reverse Transcriptase* :
50°C 30 menit
- *Hot Start*
95°C 2 menit
- *2-Step Cycling, 40 Cycle*
95°C 15 detik
60°C 1 menit (koleksi data)

Kurva amplifikasi hasil optimasi set primer dapat dilihat pada Gambar 41. Kurva amplifikasi untuk tiap set primer berbeda satu sama lain. Kurva amplifikasi yang paling optimal terlihat pada kurva amplifikasi primer HPIV-2. Kurva amplifikasi untuk primer yang lain terlihat kurang sigmoid. Pada optimasi set primer secara *multiplex* suhu *annealing* akan diturunkan menjadi 55°C untuk mengoptimalkan reaksi PCRnya.

Pada kurva amplifikasi primer HPIV-3 dengan konsentrasi sampel tertinggi), terlihat produk PCR baru terdeteksi pada *cycle* ke-25. Sementara untuk ketiga primer yang lain, produk PCR sudah terdeteksi lebih awal. Dari hasil pengecekan *melt curve* produk PCR masing-masing primer dengan *software* U-Melt (Utah University, USA) terlihat 2 puncak pada *melt curve* produk PCR HPIV-3 (Gambar 41). Diduga primer tidak spesifik karena dapat mengamplifikasi target lain sehingga terjadi kompetisi penggunaan enzim, dNTP atau komponen PCR yang lain. Hal ini berakibat kurang optimalnya reaksi PCR *multiplex* untuk HPIV-3.



Gambar 41. Kurva amplifikasi set primer HPIV secara *singleplex*



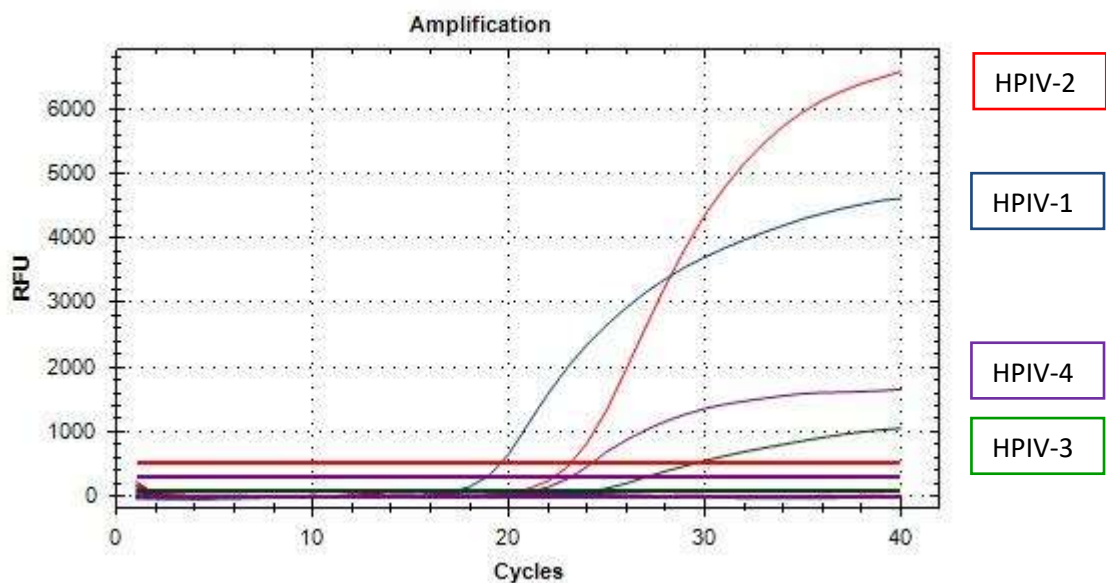
Gambar 42. Gambaran *melt curve* produk PCR primer HPIV-1,2,3 dan 4 yang diprediksi menggunakan *software* U-Melt v.2.0.2.²¹

b. Optimasi set primer secara *multiplex*

Kualitas set primer diuji dalam 1 (satu) eksperimen yang sama untuk HPIV-1,2,3 dan 4. Komposisi reagen yang digunakan berbeda dengan optimasi secara *singleplex*. Untuk setiap reaksi komposisinya sebagai berikut : 13.5µl 2x *reaction mix*, 0.5µl primer F, 0.5µl primer R, 0.5µl *probe* dan 0.5µl enzim. Sampel (*template*) yang digunakan terpisah antara HPIV-1,2,3 dan 4 masing-masing sebanyak 5µl. Konsentrasi awal sampel yang digunakan untuk HPIV-1,2 dan 4 adalah 10ng/µl. Sedangkan untuk HPIV-3 adalah 50ng/µl. Optimasi set primer secara *multiplex* dilakukan pada pengenceran 10^{-2} sampai dengan 10^{-10} dengan 3 kali ulangan untuk tiap pengenceran. Kondisi suhu PCR *multiplex* yang digunakan adalah sebagai berikut :

- *Reverse Transcriptase* :
50°C 30 menit
- *Hot Start*
95°C 2 menit
- *2-Step Cycling, 40 Cycle*
95°C 15 detik
55°C 1 menit (koleksi data)

Perubahan suhu annealing dimaksudkan untuk mengoptimalkan reaksi PCR yang terjadi. Kurva amplifikasi set primer secara *multiplex* terlihat pada Gambar 42.



Gambar 43. Kurva amplifikasi set primer secara *multiplex*

Penurunan suhu *annealing* dari 60°C menjadi 55°C membuat kurva keempat primer HPIV lebih *sigmoid* dibanding sebelumnya.

c. Uji sensitifitas *multiplex assay*

Dari tabel 13 terlihat bahwa konsentrasi terkecil yang masih bisa dideteksi untuk masing-masing primer berbeda. Untuk HPIV1 dan 2 konsentrasi terkecilnya adalah $10 \times 10^{-9} \text{ ng/}\mu\text{l}$. Sedangkan untuk HPIV-4 konsentrasi terkecilnya adalah $10 \times 10^{-10} \text{ ng/}\mu\text{l}$. HPIV-3 sudah tidak terdeteksi lebih awal dibanding ketiga virus lainnya yaitu pada konsentrasi $50 \times 10^{-4} \text{ ng/}\mu\text{l}$. Hal ini terkait dengan adanya *secondary structure* yang terlihat pada *melt curve* produk PCR HPIV-3 yang mengurangi sensitifitas primer HPIV-3 (Gambar 43).

Tabel 13. Uji sensitifitas *multiplex assay* pada berbagai pengenceran sampel

Target	Rerata nilai Ct									
	10^{-1*}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Human Parainfluenza 1	14.53	18.75	22.32	27.95	31.36	35.41	38.52	36.16	37.83	NA
Human Parainfluenza 2	9.4	14.34	21.12	23.56	27.93	31.82	33.19	35.32	38.1*	NA
Human Parainfluenza 3	21.50	26.8	34.99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Human Parainfluenza 4	9.01	12.69	16.34	22.42	26.15	29	31.14	33.76	36.43	38.45*

* konsentrasi awal untuk HPIV-1,2 dan 4 adalah $10 \text{ ng/}\mu\text{l}$ sedangkan HPIV-4 adalah $50 \text{ ng/}\mu\text{l}$

**amplifikasi hanya terlihat pada 2 ulangan, NA: *no amplification*

d. Uji spesifitas *multiplex assay*

Untuk mengetahui spesifitasnya, *multiplex assay* diuji menggunakan panel virus HPIV-1,2,3,4 dan virus saluran pernapasan lain. Hasilnya dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 14. Hasil uji spesifitas *multiplex assay* HPIV dengan berbagai panel virus saluran pernapasan

No	Nama Virus	Sumber	Hasil
1	Influenza A/H3	Spesimen klinis	Negatif
2	Influenza A/H1pdm	Isolat	Negatif
3	Influenza A/H5	Isolat	Negatif
4	Influenza B	Isolat	Negatif
5	Human Parainfluenza Virus 1	<i>Synthesized gene fragment</i>	Positif
6	Human Parainfluenza Virus 2	Isolat	Positif
7	Human Parainfluenza Virus 2	<i>Synthesized gene fragment</i>	Positif
8	Human Parainfluenza Virus 3	Isolat	Positif
9	Human Parainfluenza Virus 3	<i>Synthesized gene fragment</i>	Positif
10	Human Parainfluenza Virus 4	Spesimen klinis	Positif
11	Human Parainfluenza Virus 4	<i>Synthesized gene fragment</i>	Positif
12	Respiratory Syncitial Virus A	Spesimen klinis	Negatif
13	Respiratory Syncitial Virus A	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif
14	Respiratory Syncitial Virus B	Spesimen klinis	Negatif
15	Respiratory Syncitial Virus B	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif
16	Rhinovirus	Spesimen klinis	Negatif
17	SARS	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif
18	Human Coronavirus HKU-1	Spesimen klinis	Negatif
19	Human Coronavirus HKU-1	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif

20	Human Coronavirus OC-43	Spesimen klinis	Negatif
21	Human Coronavirus OC-43	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif
22	Human Coronavirus NL-63	Spesimen klinis	Negatif
23	Human Coronavirus NL-63	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif
24	Human Coronavirus 229E	Spesimen klinis	Negatif
25	Human Coronavirus 229E	<i>Synthesized gene fragment</i>	Negatif

Pada tabel 14 di atas spesifitas *multiplex assay* HPIV terlihat cukup memuaskan. *Multiplex assay* HPIV menunjukkan hasil positif ketika diuji dengan spesimen HPIV 1,2,3 maupun 4. Sebaliknya untuk spesimen selain HPIV menunjukkan hasil negatif.

2. Set primer RSV A-RSV B-SARS

Gen target untuk RSV A, RSV B adalah gen *nucleoprotein*. Sedangkan untuk SARS adalah nucleocapsid. Sekuen primer yang digunakan dalam set primer ini terdapat pada Tabel 15.

Tabel. 15. Susunan nukleotida primer dan probe RSV A-RSV B- SARS^{22,23}

No	Virus	Primer F (5' → 3')	Primer R (5' → 3')	Probe (5' → 3')
1	RSV A	AGA TCA ACT TCT GTC ATC CAG CAA	GCACATCATAATT AGGAGTATCAAT	Cy5-CAC CAT CCA ACG GAG CAC AGG AGA T-Iowa Black RQ
2	RSV B	AAG ATG CAA ATC ATA AAT TCA CAG G	TGATATCCAGCAT CTTTAAGTATCTTT ATAGTG	HEX-AGG TAT GTT ATA TGC TAT GTC CAG GTT AGG AAG GGA A-BHQ1
3	SARS	GGA GCC TTG AAT ACA CCC AAA G	GCA CGG TGG CAG CAT TG	FAM-CCA CAT TGG CAC CCG CAA TCC- BHQ1

a. Optimasi set primer secara *singleplex*

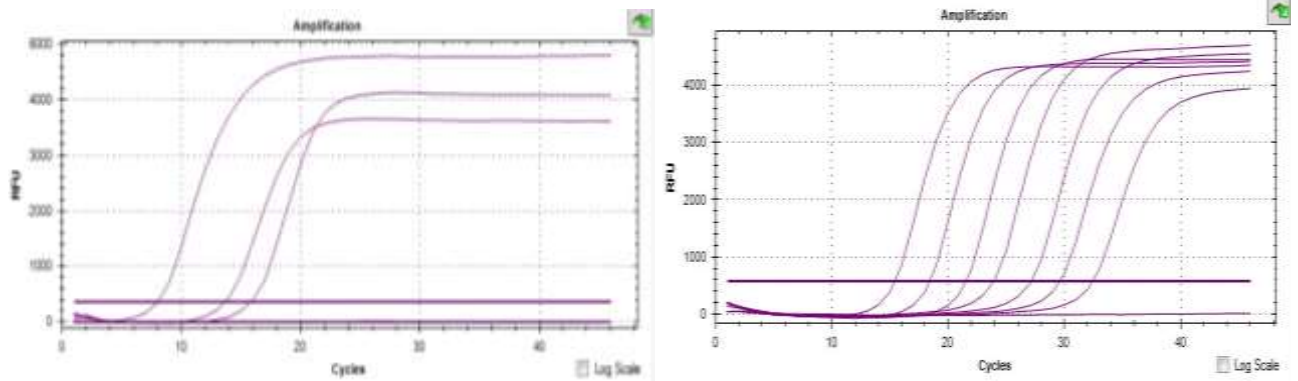
Optimasi *singleplex* dilakukan dengan pemeriksaan menggunakan kontrol positif spesifik terhadap target. Kontrol positif berupa DNA spesifik *G-block gene fragment* untuk RSV A, RSV B, dan SARS. Konsentrasi awal kontrol positif adalah 100ng/ μ l setelah resuspensi dan kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-10} . Uji *singleplex* dilakukan menggunakan kontrol positif dengan konsentrasi 1 ng/ μ l hingga 10^{-8} ng/ μ l (pengenceran 10^{-2} hingga 10^{-10}).

Optimasi dilakukan menggunakan reagensia SuperScript III One Step qRT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). Komposisi reagen yang digunakan untuk setiap reaksi *singleplex* sebagai berikut : 12.5 μ l 2x *reaction mix*, 5.5 μ l nuclease free water, 0.5 μ l primer F, 0.5 μ l primer R, 0.5 μ l probe dan 0.5 μ l enzim mix. *Template* yang digunakan terpisah antara RSV A, RSV B, dan SARS masing-masing sebanyak 5 μ l. Kondisi suhu PCR *singleplex* terdapat pada tabel 16.

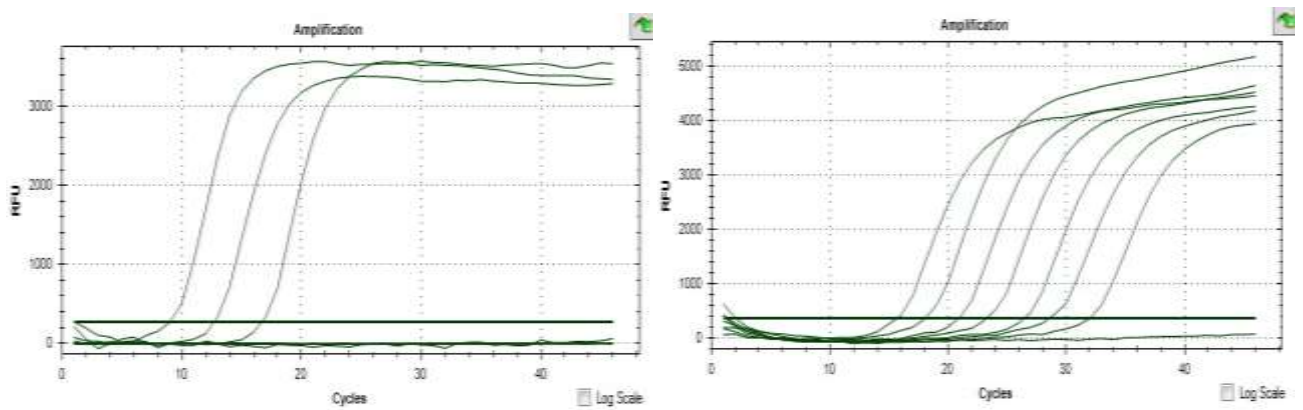
Tabel 16. Kondisi suhu RT-PCR ²³

No	Tahapan	Suhu
1	<i>Reverse Transcriptase</i>	50 ⁰ C selama 30 menit
2	<i>Hot Start</i>	95 ⁰ C selama 2 menit
3	<i>2-Step Cycling: 45 Cycle PCR:</i> <i>-denaturation</i> <i>-annealing</i> dan koleksi data	95 ⁰ C selama 15 detik 60 ⁰ C selama 1 menit

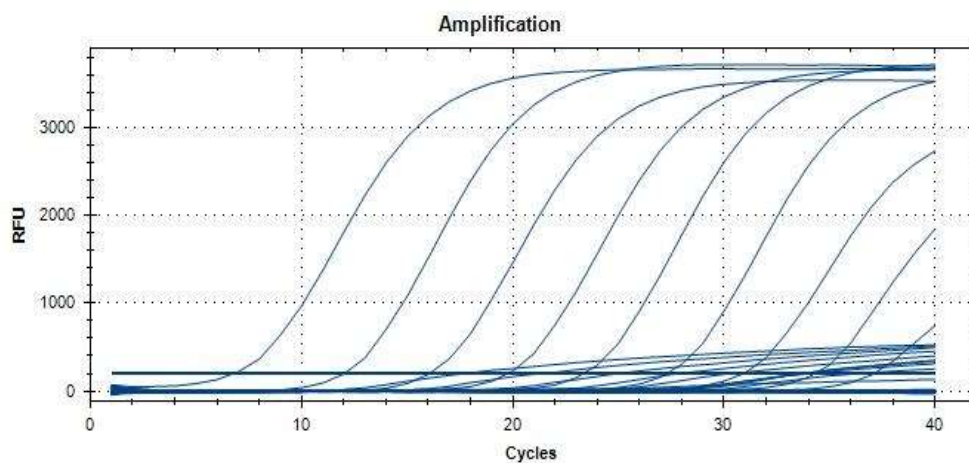
Optimasi set primer secara *singleplex* telah berhasil mengamplifikasi target yang diinginkan yaitu RSV A, RSV B, dan SARS seperti terlihat pada Gambar 44 hingga 46. Hasil uji terlihat bagus dengan teramplifikasinya target yang ditandai dengan terbentuknya kurva amplifikasi yang sigmoid.



Gambar 44. Hasil *singleplex* RSV A dengan konsentrasi kontrol positif 1 ng/μl hingga 10⁻⁸ ng/μl



Gambar 45. Hasil *singleplex* RSV B dengan konsentrasi kontrol positif 1 ng/μl hingga 10⁻⁸ ng/μl

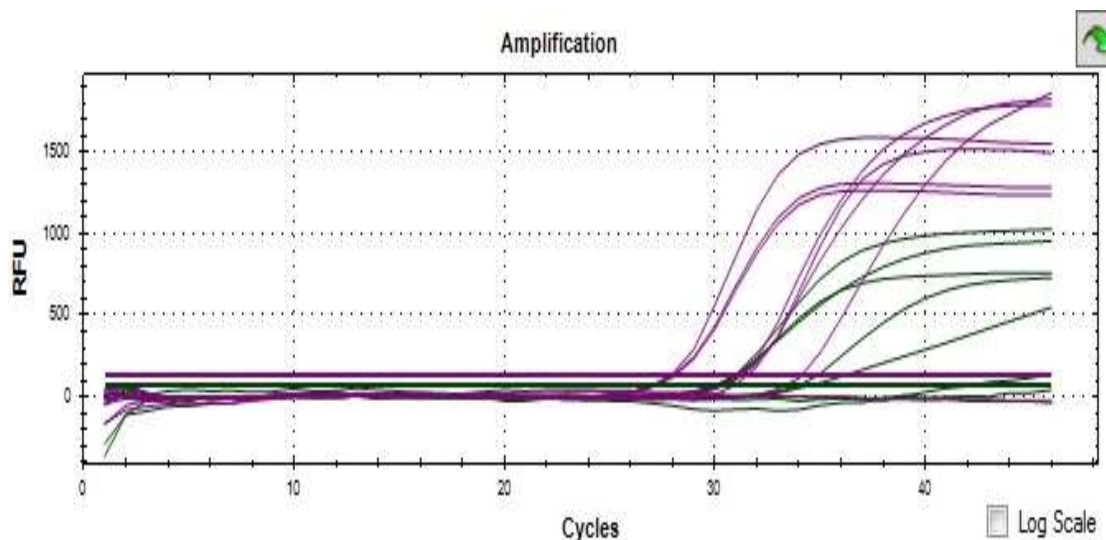


Gambar 46. Hasil *singleplex* SARS dengan konsentrasi kontrol positif 1 ng/μl hingga 10⁻⁸ ng/μl

Kualitas assay dilakukan secara bertahap yaitu dimulai dengan penggabungan primer probe secara *duplex*, *trioplex*, dan untuk kemudian dilakukan secara *multiplex* yang terdiri dari 4 primer probe. Uji duplex dilakukan untuk RSV A dan RSV B dengan komposisi reagensia sebagai berikut: 12.5 µl 2x reaction mix, 0.5 µl primer F RSV A, 0.5 µl primer R RSV A, 0.5 µl probe RSV A, 0.5 µl primer F RSV B, 0.5 µl primer R RSV B, probe RSV B 0.5 µl, 0.5 µl enzim mix, dan 4.0 µl nuclease free water. Template RSV A dan RSV B dengan menggunakan kontrol positif dengan konsentrasi kontrol positif 10^{-5} ng/µl dan 10^{-6} ng/µl dengan masing-masing ulangan sebanyak 3 kali (Tabel 17). Kondisi RT-PCR *duplex* menggunakan kondisi suhu yang sama seperti pada *singleplex*.

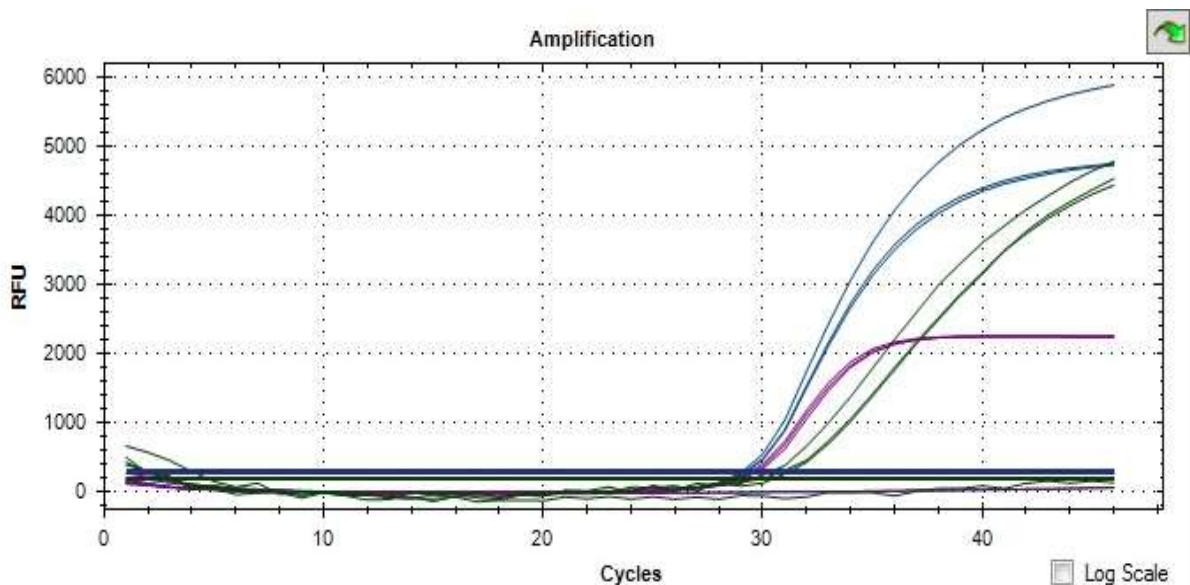
Tabel 17. Nilai *Cycle Threshold* (Ct) uji *duplex* RSV A dan RSV B

Target	Rerata nilai Ct	
	konsentrasi 10^{-5} (ng/µl)	konsentrasi 10^{-6} (ng/µl)
RSV A	28.02	31.33
RSV B	29.96	34.34



Gambar 47. Hasil *duplex* RSV A dan RSV B pada kontrol positif konsentrasi 10^{-5} ng/ul dan 10^{-6} ng/ul.

Uji *trioplex* yang terdiri dari set primer probe RSV A, RSV B, dan SARS, dilakukan setelah uji *duplex* berhasil dilakukan. Komposisi reagensia adalah sebagai berikut: 12.5 µl 2x reaction mix, 0.5 µl primer F RSV A, 0.5 µl primer R RSV A, 0.5 µl probe RSV A, 0.5 µl primer F RSV B, 0.5 µl primer R RSV B, probe RSV B 0.5 µl, , 0.5 µl primer F SARS, 0.5 µl primer R SARS, 0.5 µl probe SARS 0.5 µl enzim mix, dan 2.5 µl nuclease free water. Template RSV A dan RSV B serta SARS dilakukan dengan menggunakan kontrol positif dengan pengenceran 10^{-7} dengan masing-masing ulangan sebanyak 3 kali. Kondisi RT-PCR *trioplex* menggunakan kondisi suhu yang sama seperti pada *singleplex*.



Gambar 48. Hasil *Trioplex* RSV A dan RSV B dengan kontrol positif konsentrasi 10^{-7}

Tabel 18. Nilai Cycle Treshold (Ct) uji *trioplex* RSV A, RSV B, dan SARS

Target	Rerata nilai Ct pada control postifi konsentrasi 10^{-5} ng/µl
RSV A	29.13
RSV B	29.03
SARS	27.69

c. Uji sensitivitas *multiplex*

Uji sensitivitas terhadap uji *multiplex* dilakukan dengan melakukan pengenceran control positif dari 10^{-7} hingga 10^{-12} dengan pengulangan sebanyak dua kali. Komposisi komponen reagensia sesuai dengan reaksi pada *trioplex*, sedangkan kondisi RT-PCR dilakukan sesuai Tabel 19. Hasil uji sensitivitas dijabarkan pada tabel 18 dimana konsentrasi minimal ketiga template RSV A, RSV B dan SARS untuk dapat dideteksi oleh uji *multiplex* adalah pada konsentrasi 10^{-7} ng/μl (pengenceran 10^{-9}).

Tabel 19. Hasil uji sensitivitas *multiplex*

Pengenceran kontrol positif	Konsentrasi kontrol positif (ng/μl)	Rerata nilai Ct		
		RSV A	RSV B	SARS
10^{-7}	10^{-5}	29.13	29.03	27.69
10^{-8}	10^{-6}	31.24	32.01	31.21
10^{-9}	10^{-7}	34.13	34.63	34.46
10^{-10}	10^{-8}	NA	36.97	37.36
10^{-11}	10^{-9}	NA	41.07	NA
10^{-12}	10^{-10}	NA	NA	NA

NA: Not available

d. Uji spesifisitas *multiplex*

Uji spesifisitas dilakukan untuk mengetahui apakah primer probe set ini dapat mengamplifikasi virus di saluran pernafasan lainnya. Uji spesifisitas dilakukan dengan menguji primer probe set dengan virus-virus sebagai berikut: influenza B lineage Yamagata, influenza B lineage Victoria, Influenza A/H1pdm, Influenza A/H3, Influenza A/H5, MERS-CoV, HPIV 1 hingga HPIV 4, HCOV NL 63, HCOV OC43, HCOV 229E, HCOV HKU1A. Komposisi komponen reagensia sesuai dengan reaksi pada *trioplex*, sedangkan kondisi RT-PCR dilakukan sesuai Tabel 20. Hasil uji spesifisitas dijabarkan pada tabel 20 dimana

berdasarkan hasil tersebut primer probe set *multiplex* hanya spesifik terhadap target RSV A, RSV B, dan SARS saja, tidak terhadap target lain yang diujikan.

Tabel 20. Hasil Uji Spesifisitas *Multiplex*

Virus	Sumber	Hasil RT-PCR
RSV A	<i>gene fragmen</i> (gen N)	RSV A
RSV B	<i>gene fragmen</i> (gen N)	RSV B
SARS	<i>gene fragmen</i> (gen Nucleocapsid)	SARS
Influenza A/H1pdm	Vaksin hidup dilemahkan	tidak terdeteksi
Influenza A/H3	Vaksin hidup dilemahkan	tidak terdeteksi
Influenza A/H5	Isolat virus	tidak terdeteksi
Influenza B (Victoria)	Spesimen Klinis	tidak terdeteksi
Influenza B (Yamagata)	Spesimen Klinis	tidak terdeteksi
MERS-CoV	Isolat virus	tidak terdeteksi
HPIV 1	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HPIV 2	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HPIV 3	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HPIV 4	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HCOV NL63	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HCOV OC43	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HCOV 229E	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi
HCOV HKU1	<i>gene fragment</i>	tidak terdeteksi

3. Set Primer Coronavirus

Pada set multipleks yang ketiga ini bertujuan untuk mendeteksi Human Coronavirus (HKU1-NL63-OC43-229E). Gen target untuk keempat virus ini

adalah gen nucleocapsid protein. Adapun sekuen primer untuk set primer Coronavirus dapat dilihat pada Tabel 21.

Tabel 21. Sekuen set primer Human Coronavirus

No	Virus	Primer F	Primer R	Probe
1	HCoV-OC43	GCT CAG GAA GGT CTG CTC C	TCC TGC ACT AGA GGC TCT GC	FAM-TTC CAG ATC TAC TTC GCG CAC ATC C-BHQ1
2	HCoV-229E	CGC AAG AAT TCA GAA CCA GAG	GGC AGT CAG GTT CTT CAA CAA	TET-CCA CAC TTC AAT CAA AAG CTC CCA AAT G-BHQ1
3	HCoV-NL63	AGG ACC TTA AAT TCA GAC AAC GTT CT	GAT TAC GTT TGC GAT TAC CAA GAC T	CY3-TGG GTT GCT AAG GAA GGT GCTA A-BHQ2
4	HCoV-HKU1	AGT TCC CAT TGC TTT CGG AGT A	CCG GCT GTG TCT ATA CCA ATA TCC	ROX-CCC CTT CTG AAG CAA-BHQ2

e. Optimasi set primer secara *singleplex*

Master mix untuk rRT-PCR *singleplex* ini menggunakan kit Superscript III Platinum taq One Step qRT-PCR dengan konsentrasi primer *Forward* dan *Reverse* masing-masing 40µM dan konsentrasi probe 10µM. Optimasi dilakukan secara rRT-PCR pada set primer secara terpisah menggunakan *g-Blocks gene fragment* masing –masing virus sebagai *template* PCR. Selain itu, dilakukan juga optimasi kondisi suhu PCR pada rRT-PCR *singleplex* ini. Adapun kondisi suhu yang digunakan pada optimasi ini adalah :

- Kondisi suhu PCR 1

Reverse Transcriptase :

50°C 30 menit

Hot Start

95°C 2 menit

2-Step Cycling, 40 Cycle

95°C 15 detik

68°C 1 menit (koleksi data)

- Kondisi suhu PCR 2

<i>Reverse Transcriptase :</i>	
50°C	30 menit
<i>Hot Start</i>	
95°C	2 menit
2-Step Cycling,	40 Cycle
95°C	15 detik
60°C	1 menit (koleksi data)

Pada optimasi kondisi suhu PCR 1, template PCR yang digunakan berupa serial dilusi dengan konsentrasi 1 ng/μL sampai 10⁻⁸ ng/μL (pengenceran 10⁻² sampai 10⁻¹⁰) tanpa pengulangan. Sedangkan untuk optimasi kondisi suhu PCR 2, template PCR yang digunakan adalah pengenceran 10⁻⁶ untuk OC43 dan 10⁻³ untuk 229E dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Kurva amplifikasi hasil optimasi kondisi suhu PCR 1 dan 2 dapat dilihat pada Gambar 49 dan 50.

Berdasarkan hasil optimasi kondisi suhu PCR, dapat dilihat bahwa kondisi suhu PCR 2 lebih optimal dibanding kondisi suhu PCR 1 (kurva lebih sigmoid).

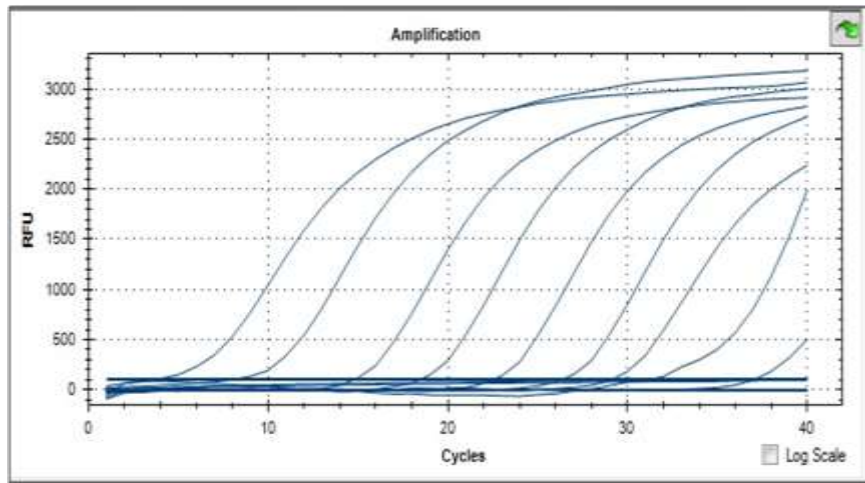
f. Optimasi set primer secara duplex

Berdasarkan hasil optimasi kondisi suhu PCR, primer yang selanjutnya digunakan adalah OC 43 dan 229E. Sama seperti halnya master mix untuk rRT-PCR singleplex, master mix untuk duplex menggunakan kit Superscript III Platinum taq One Step qRT-PCR dengan konsentrasi tiap set primer F dan R masing-masing 40 μM dan konsentrasi probe 10 μM. Bedanya, pada pembuatan master mix duplex, primer probe HCoV-OC 43 dan primer probe HCoV-229E dicampur dalam satu tabung.

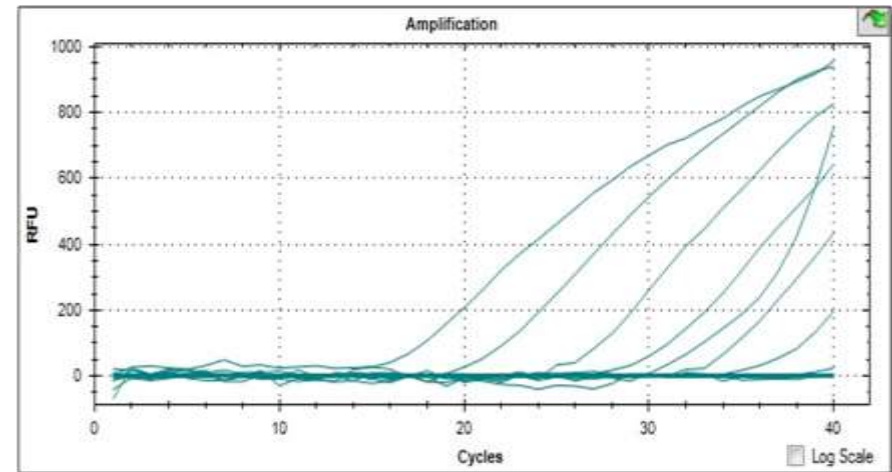
Optimasi set primer secara *duplex* dilakukan pada pengenceran 10⁻⁵ untuk HCoV-229E dan pengenceran 10⁻⁶ untuk HCoV-OC 43 dengan 3 kali ulangan untuk tiap konsentrasi. Optimasi set primer secara *duplex* menggunakan kondisi suhu PCR 2 pada rRT-PCR *singleplex*.

g. Uji sensitivitas duplex

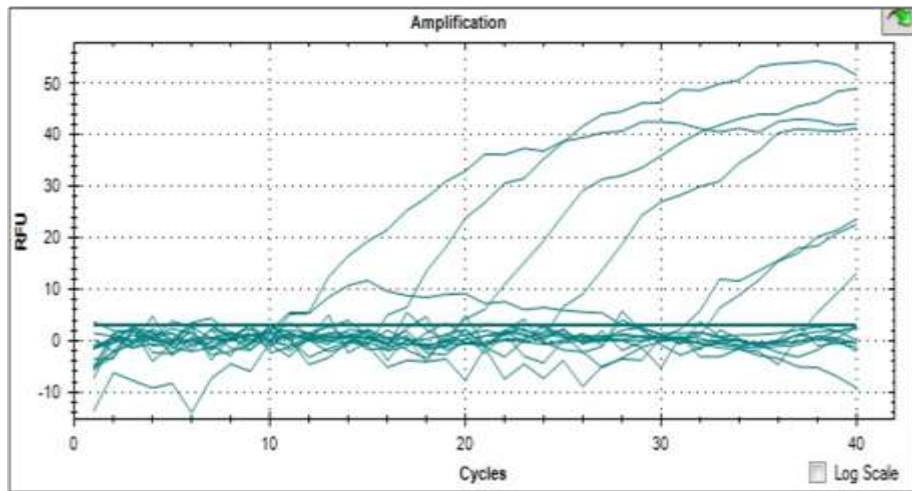
Uji sensitivitas set primer secara *duplex* dilakukan pada pengenceran 10^{-2} sampai dengan 10^{-10} dengan 3 kali ulangan untuk tiap pengenceran (table 21). Kondisi suhu PCR *duplex* menggunakan kondisi suhu PCR 2 pada rRT-PCR *singleplex*.



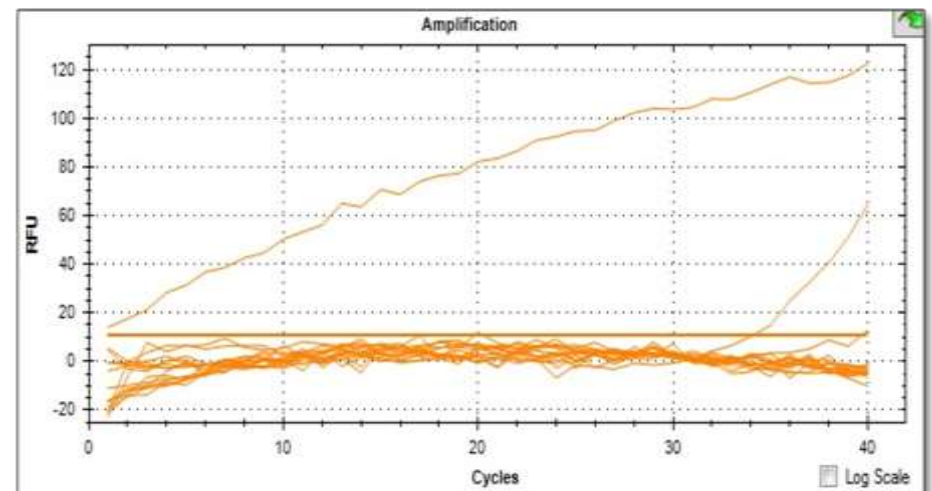
a.



b.

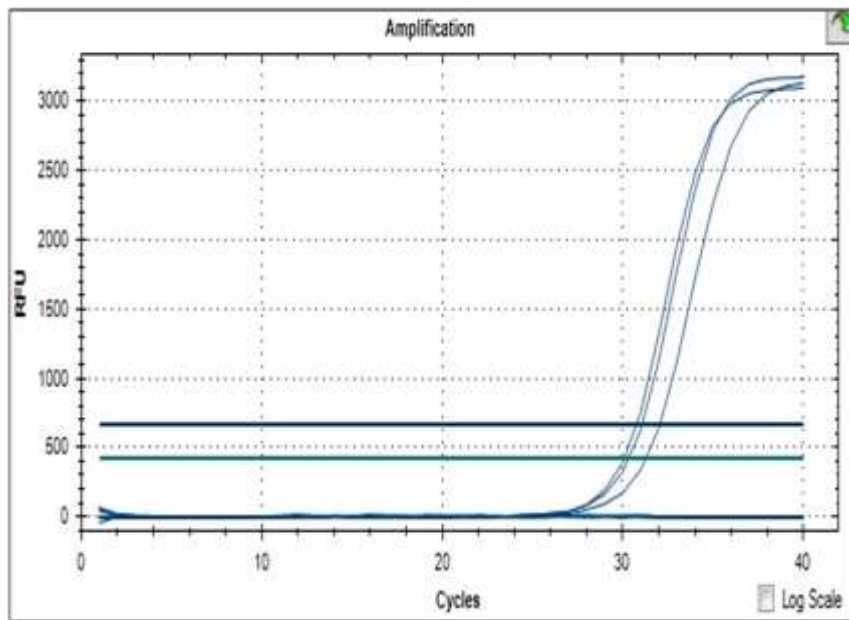


c.

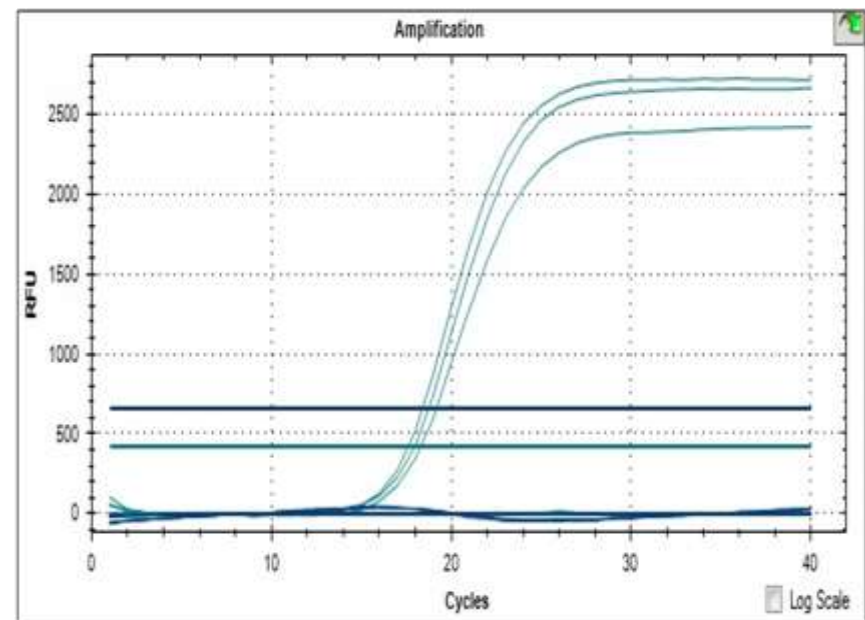


d.

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

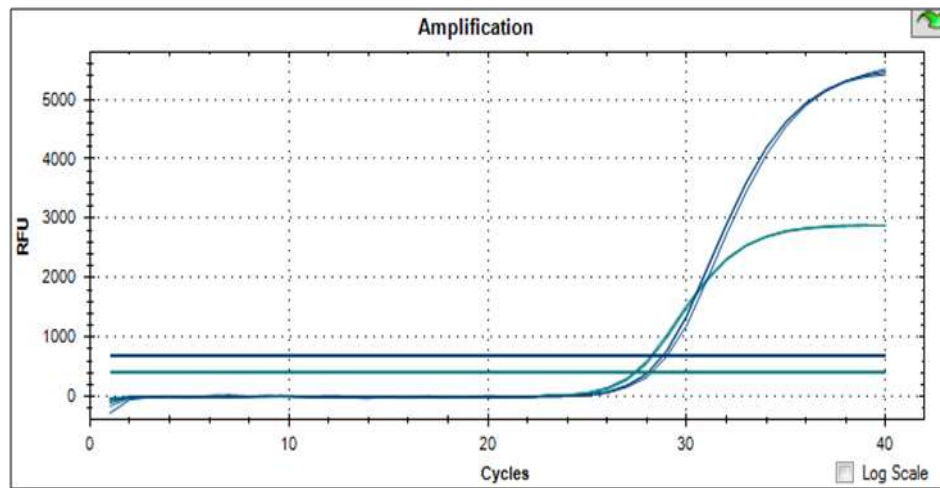


a.



b.

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



Gambar 51. Kurva amplifikasi optimasi set primer secara duplex

Tabel 22. Uji sensitivitas set primer HCoV-OC43 dan HCoV-229E

Target	Rerata nilai Ct								
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
HCoV-OC 43	9,26	14,14	19,50	24,1 3	27,8 6	31,4 4	32,26	36,8 3	NA
HCoV-229E	11,1 7	14,76	23,63	26,6 6	29,0 3	31,7 2	34,81	NA	NA

h. Uji spesifisitas duplex

Template PCR pada pengujian ini menggunakan virus pada table 22 sebagai berikut:

Tabel 23. Spesifisitas pengujian PIV, RSV dan Coronavirus

No	Nama Virus	Jenis Template	Uji spesivisitas terhadap:	
			HCoV-OC 43	HCoV-229E
1	PIV 1	<i>gene fragment</i>	–	–
2	PIV 1	spesimen klinis	–	–
3	PIV 2	<i>gene fragment</i>	–	–
4	PIV 2	spesimen klinis	–	–
5	PIV 3	<i>gene fragment</i>	–	–
6	PIV 4	<i>gene fragment</i>	–	–
7	PIV 4	spesimen klinis	–	–
8	RSV A	<i>gene fragment</i>	–	–

9	RSV A	spesimen klinis	-	-
10	RSV B	<i>gene fragment</i>	-	-
11	RSV B	spesimen klinis	-	-
12	Influenza A/H3	spesimen klinis	-	-
13	Influenza A/H5	isolat	-	-
14	Influenza A/H1pdm09	isolat	-	-
15	Influenza B	isolat	-	-
16	Influenza A/H7		-	-
17	Rhinovirus	spesimen klinis	-	-
18	HCoV-HKU 1A	spesimen klinis	-	-
19	HCoV-NL 63	spesimen klinis	-	-
20	HCoV-OC 43	Spesimen klinis	+	-
21	HCoV-229E	Spesimen klinis	-	+
22	SARS	<i>gene fragment</i>	-	-

6.9. Deteksi *Streptococcus pneumoniae* pada kasus pneumonia

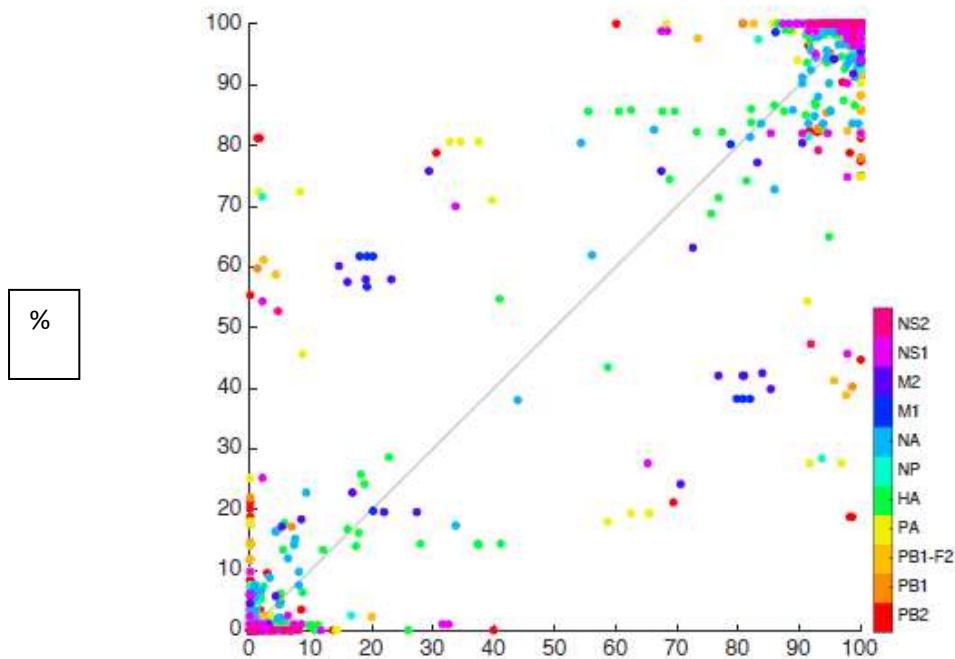
Beberapa kasus pneumonia yang dideteksi dari kasus ISPA berat yang dirawat di RS sentinel dilakukan uji dengan rapid diagnostik test untuk mengetahui adanya *Streptococcus pneumoniae* dari urine. Sebagian besar kasus pneumonia yang diuji dengan RDT ini adalah anak-anak. Sebanyak empat rumah sakit yang melaporkan hasil uji RDT *S. pneumniae* yaitu RSUD Wonosari, RSUD Deli Serdang, RSU Kanudjoso Djatiwibowo dan RS NTB.

Tabel 24. Hasil pengujian *S. pneumoniae* dengan RDT

Rumah Sakit	Kasus pneumonia Anak (< 14 tahun)	Kasus pneumonia dewasa	Hasil	
			Positif	Negatif
RSU NTB	14	0	14	0
RSUD Wonosari	39	1	40	0
RSUD Deli Serdang	14	0	12	2
RSU Kanudjoso Djatiibowo	9	8	17	0

6.10. Quasispecies Influenza A (H5N1)

Penelitian dilakukan dengan amplifikasi menggunakan pendekatan 32 pasang primer dan selanjutnya diperiksa dengan NGS Roche 454 serta bioinformatika untuk menganalisis sejumlah data. Data yang terkumpul merupakan data spesimen influenza A/H5N1 antara tahun 2008 - 2011 sebanyak 71 spesimen dari 43 kasus.



Gambar 52. Persentase jumlah hasil sekuensing per genom.

Rata-rata jumlah sekuensing yang dihasilkan sebanyak 30,960 perspesimen (kisaran: 1,522 - 138,222). Hampir seluruh panjang genom berhasil disekuens dengan beberapa variasi sehingga didapat distribusi yang tidak merata dari varian seluruh genom (gambar 52).

VII. PEMBAHASAN

Surveilans *Influenza Like Illness (ILI)* telah dilaksanakan sejak tahun 1999 di Indonesia, sehingga dengan pelaksanaan yang telah hampir 15 tahun dapat dilihat “*Seasonality*” atau pola musiman dari kasus Influenza.^{3,5,11} Berdasarkan surveilans ini, dapat diketahui bahwa *positivity rate* untuk Influenza adalah hanya berkisar 10-30% dari seluruh kasus *ILI*. Hal ini sesuai dengan beberapa studi dan surveilans yang dilaksanakan di dunia (ref). Sehingga selain Virus Influenza, agen penyebab *ILI* lain perlu dideteksi secara khusus karena pemeriksaan agen lainnya bukan merupakan deteksi rutin dari Surveilans *ILI*. Beberapa studi, termasuk di Indonesia menunjukkan bahwa virus lainnya, seperti *Adenovirus*, *Rhinovirus*, *Metapneumovirus*, dan lain-lain menjadi penyebab lain kasus *ILI*.

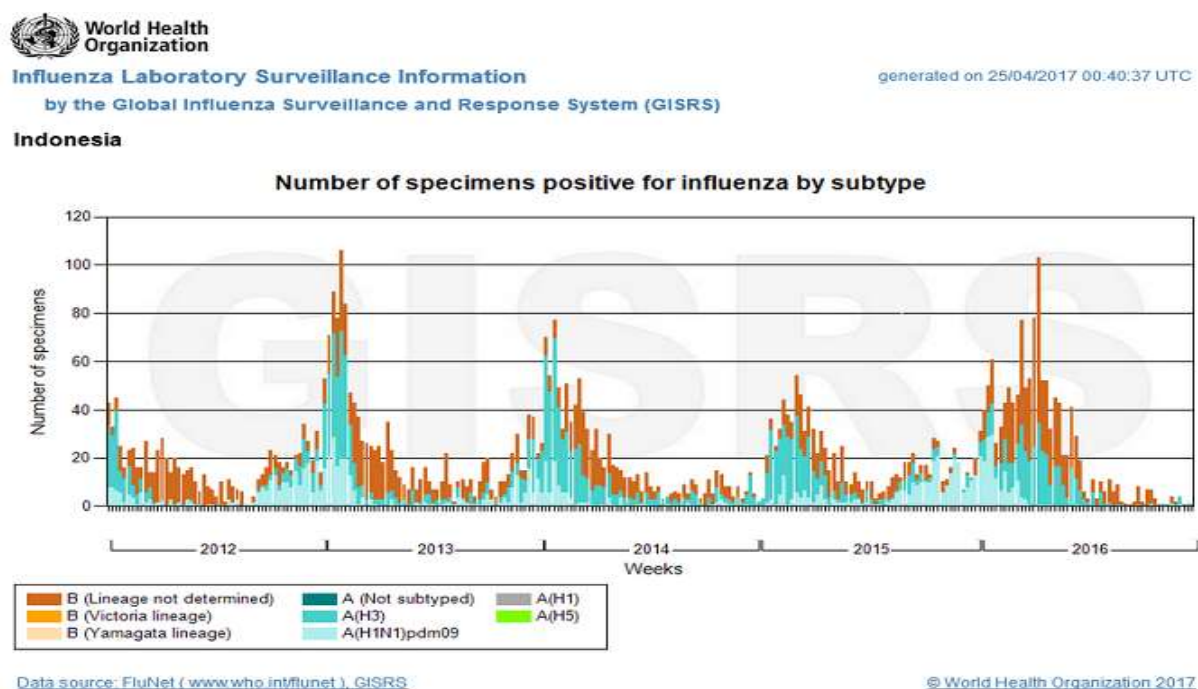
Pada tahun 2016, kasus *ILI* terbanyak ditemukan pada bulan Januari kemudian menurun dan tampak meningkat lagi pada bulan November. Pola ini diikuti dengan kasus positif Influenza, dimana kasus terbanyak ditemukan pada bulan Januari, dan mengalami penurunan di bulan-bulan selanjutnya, dan mencapai titik terendah pada bulan Agustus. Kasus Influenza cenderung meningkat kembali di bulan November. Pola musiman Influenza di Indonesia, pada tahun 2016 tidak jauh berbeda dengan pola tahun-tahun sebelumnya (Gambar 53).

Penyebab perbedaan pola musiman ini belum diketahui secara pasti. Beberapa sumber menyatakan bahwa pola musiman kemungkinan merupakan hasil dari interaksi beberapa faktor, seperti kondisi iklim, epidemiologi (usia di populasi, kepadatan penduduk, pola migrasi), kerentanan dan karakteristik virus.^{13,14} Salah satu pendapat menyatakan bahwa pola musiman Influenza berkaitan dengan musim hujan dan temperatur serta kelembaban memegang peranan yang terpenting dalam menentukan pola transmisi.¹³

Bila dilihat secara mendetail berdasarkan grafik FluNet selama 5 tahun sejak 2012-2016 (Gambar 54), kasus Influenza hampir sama dengan tahun sebelumnya yaitu 20%. Hal ini dapat dikaitkan dengan tingginya aktivitas Virus Influenza walaupun angka tersebut juga dapat disebabkan karena semakin banyaknya

sentinel surveilans berkaitan dengan Influenza (ILI, SIBI, dan surveilans Dinkes DKI) serta adanya peningkatan dalam penentuan pengambilan spesimen dari pasien dengan menggunakan definisi operasional *ILI* yang lebih ketat.

Terdapat pola musiman yang konsisten selama lima tahun, dimana Virus Influenza terdeteksi paling banyak dan mencapai puncaknya selama musim hujan yaitu dari bulan November hingga Februari. Selama musim kemarau, Virus Influenza masih dapat terdeteksi, walaupun dalam jumlah yang relatif sangat rendah bila dibandingkan pada saat musim hujan. Secara keseluruhan, pola ini mirip dengan pola Influenza di daerah Asia Tenggara, seperti Thailand dan Singapura, dimana Virus Influenza bersirkulasi sepanjang tahun. Pola sirkulasi Virus Influenza di Indonesia yang terletak di daerah tropis, lebih mirip dengan pola sirkulasi Virus Influenza di *Northern Hemisphere*, namun terdapat perbedaan dalam tipe Virus Influenza yang bersirkulasi (Gambar 55).

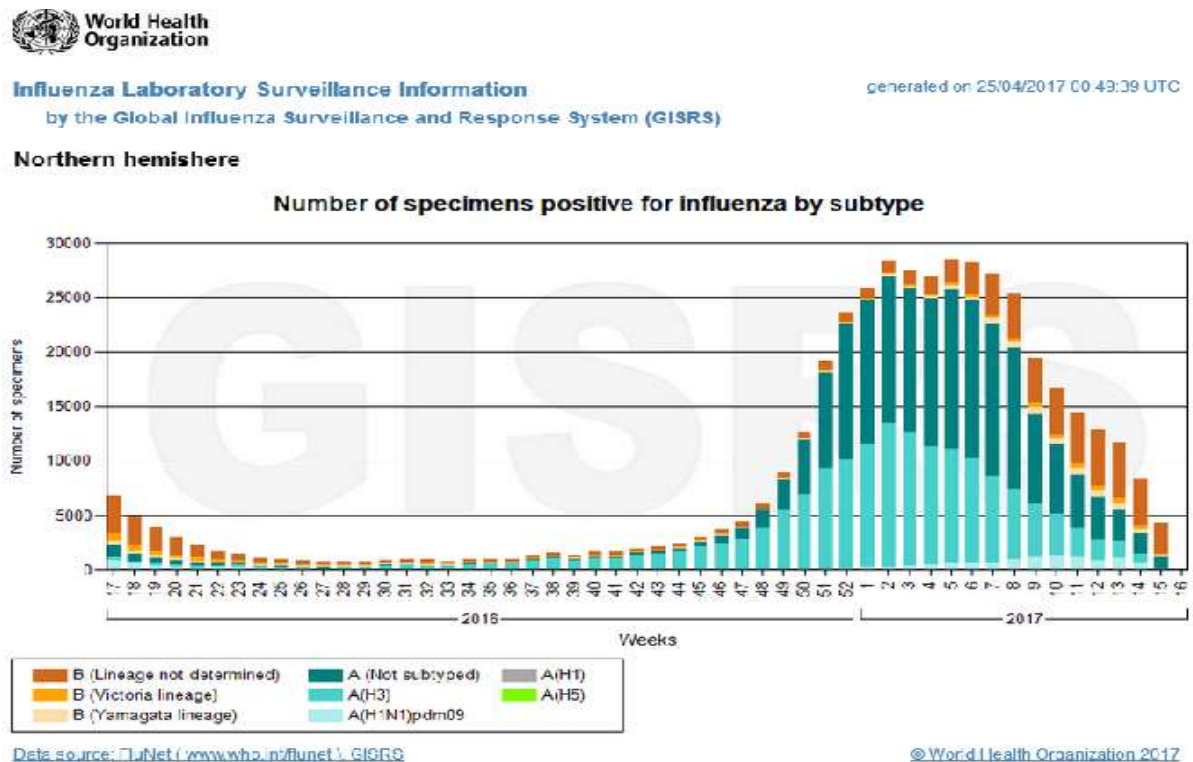


Gambar 53. Pola sirkulasi virus influenza di Indonesia 2012-2016

Tipe Virus Influenza yang dominan beredar di Indonesia pada tahun 2016 sedikit berbeda dengan tahun sebelumnya. Pada tahun 2015, Influenza tipe B (63%) adalah virus yang paling banyak ditemukan, sedangkan pada tahun 2016 Influenza tipe A adalah yang lebih mendominasi (61%) dimana sub tipe H3N2 dan H1N1pdm09 mempunyai proporsi yang hampir sama. Virus Influenza A/H3N2

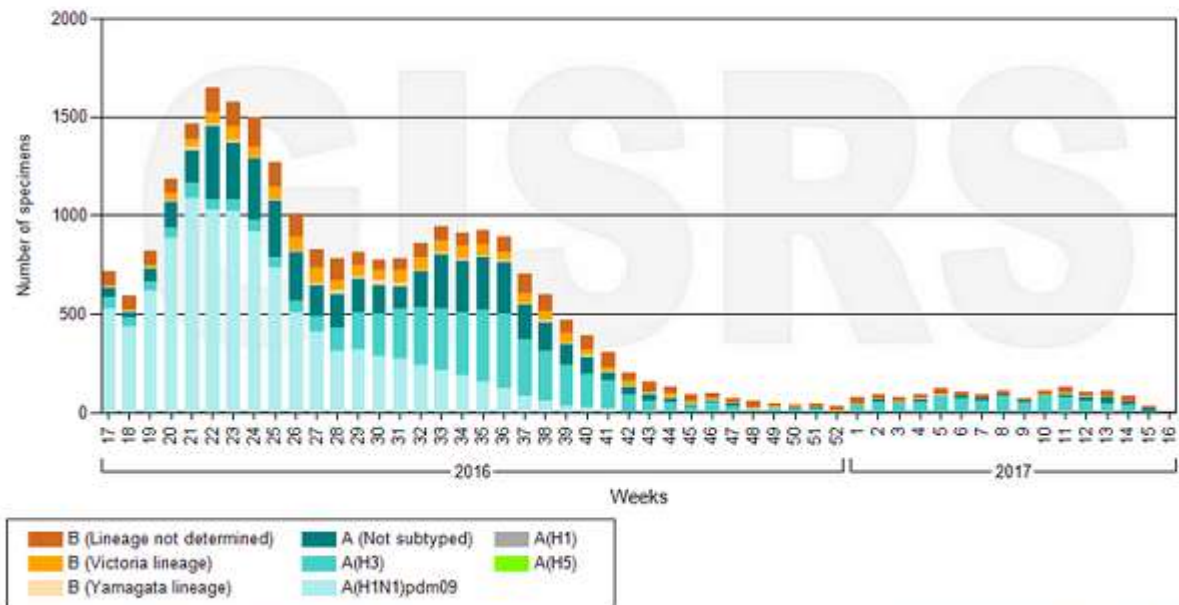
dominan pada awal tahun sedangkan Influenza A/H1N1pdm09 lebih dominan pada akhir tahun.

Perbedaan jumlah kasus Influenza positif dan sub tipe yang dominan dari masing-masing sentinel dapat dilihat pada gambar 28 dan 30, dimana perbedaan tersebut dikarenakan masing-masing sentinel mengalami puncak kasus Influenza di waktu yang berbeda. Sebagai contoh, sentinel di wilayah pulau Kalimantan memiliki jumlah kasus terbanyak di minggu 13 - 16, sedangkan sentinel di Pulau Jawa dan Sumatera kasus terbanyak di minggu 1 - 17. Hampir seluruh sentinel Influenza tipe B yang mendominasi.



Gambar 54. Pola musiman Influenza di belahan bumi utara (*Northern Hemisphere*) (sumber: www.flunet.org)

Number of specimens positive for influenza by subtype



Data source: FluNet (www.who.int/flu-net), GISRS

© World Health Organization 2017

Gambar 55. Pola musiman Influenza di belahan bumi selatan (*Southern Hemisphere*) (sumber: www.flunet.org)

Berdasarkan karakter responden, perbedaan jumlah laki-laki dan perempuan yang menderita Influenza tidak terlalu besar. Berdasarkan umur responden, yang paling banyak menderita *ILI* dan positif Influenza adalah pada rentang umur dibawah 15 tahun, dibandingkan dengan jumlah kasus *ILI* dan kasus positif Influenza pada kelompok usia lanjut > 60 tahun. Hal ini bukanlah hasil yang mengejutkan, dikarenakan anak-anak merupakan *reservoir* utama virus pernapasan dan pada beberapa studi menunjukkan bahwa populasi ini memiliki “*attack rate*” yang sebagaimana dinyatakan Navaro dalam studinya kelompok umur lanjut usia adalah kelompok yang paling sedikit menderita Influenza.¹⁵ Hal ini menurut Zambon dapat diakibatkan oleh karena pada umumnya pasien usia lanjut, datang terlambat ke tempat pengobatan, dan pada kelompok usia ini virus tidak dengan mudah berkembang, sehingga hasil Laboratorium yang akurat sulit dicapai.⁸

Data epidemiologi Virus Influenza di negara-negara maju, terutama yang memiliki empat musim biasanya diperoleh dari beberapa sumber seperti surveilans berbasis Laboratorium, sentinel surveilans, serta catatan rawat inap dan rawat jalan.

Di negara-negara berkembang, di mana sumber daya yang ada terbatas dan Influenza bukan menjadi prioritas, metode surveilans menggunakan sentinel mungkin lebih mudah dilaksanakan dibandingkan surveilans yang berbasis populasi. Namun, terdapat beberapa keterbatasan dalam data yang diperoleh dari surveilans sentinel. Data sentinel tidak dapat secara tepat diekstrapolasikan kepada keseluruhan populasi, karena dikatakan bahwa pasien di klinik rawat jalan yang menjadi sentinel tidak sesungguhnya mewakili. Masih ada beberapa kelemahan lain, antara lain ketepatan pemilihan pasien yang masih tergantung kepada petugas medis dan paramedis dalam melaksanakan kegiatan Surveilans Influenza ini.

Di samping itu, Puskesmas telah memiliki pencatatan kasus rawat jalan yang secara khusus didalamnya tidak tercantum diagnosa *ILI*, melainkan diagnosa lain (ISPA) juga merupakan kesulitan dalam pelaksanaan pencatatan dan pelaporan kasus *ILI*. Sehingga dengan data yang ada sangat sulit untuk menentukan *disease burden* secara keseluruhan. Namun, sistem sentinel *ILI* ini berguna untuk mengidentifikasi strain Influenza yang dominan yang bersirkulasi di komunitas. Tipe dan subtype Virus Influenza yang beredar dari hasil penelitian Surveilans Virologi ini disampaikan ke *WHO* melalui FluNet (www.who.int/flunet) dan dimasukkan ke dalam Web Badan Litbangkes (www.litbang.depkes.go.id) sehingga dapat memberikan informasi untuk perumusan kebijakan penanggulangan Influenza termasuk pemberian vaksinasi. Hasil karakterisasi dengan menggunakan analisis bioinformatik pada isolat Virus Influenza A/H3 menunjukkan bahwa Virus A/H3 yang bersirkulasi di Indonesia pada tahun 2016 masih sama dengan vaksin strain yang direkomendasikan oleh *WHO* untuk tahun 2015-2016.

Surveilans ISPA Berat merupakan salah satu pemantauan berkala virus influenza yang dilaksanakan untuk pasien rawat inap. Kasus influenza yang dideteksi

berdasarkan definisi WHO lebih menggambarkan trend sirkulasi influenza dari waktu ke waktu dan bukan untuk mendeteksi semua kejadian influenza di Indonesia. Infeksi influenza menyebabkan sindroma klinis yang tidak mudah dibedakan dari infeksi saluran pernapasan lainnya. Data yang didapatkan dari SIBI dan juga dari surveilan *Influenza Like Illness* (ILI) kemudian dimasukkan dalam website Flunet sebagai gambaran sirkulasi tahunan dari virus influenza di Indonesia yang dapat digunakan sebagai kewaspadaan menghadapi pandemi influenza. Untuk melihat update data sirkulasi influenza di negara lain yang tentu saja sangat bervariasi, dapat kita lihat di Flunet. Hal ini dipengaruhi oleh adanya beberapa indikator dalam menggambarkan trend yang terjadi antara lain : letak geografi, representatif data, akurasi pengambilan spesimen di lapangan, kualitas pemeriksaan serta faktor lingkungan .

Di tahun 2016, tidak ditemukan adanya puncak kejadian influenza di Indonesia, dimana influenza positif selalu ditemukan di setiap bulannya. Dibandingkan dengan influenza positif di global, dimana peningkatan kasus terjadi di awal tahun hingga minggu ke 10 kemudian mulai mengalami penurunan. Berdasarkan data dari WHO, untuk tahun 2016, influenza B, A(H3N2), dan A(H1N1)pdm09 merupakan virus influenza yang beredar di negara-negara Asia.⁹

Dengan sifat virus influenza yang mudah bermutasi, pemantauan terhadap karakterisasi virus yang beredar menjadi sangat penting dan memudahkan dalam menentukan komposisi vaksin influenza yang efektif untuk manusia. WHO mempunyai peranan penting dalam memberikan formal rekomendasi untuk komposisi vaksin influenza yang beredar. Tentu saja hal ini didapat melalui informasi dan isolat virus dari jejaring GISRS. Direkomendasikan agar vaksin trivalen yang digunakan di musim 2015-2016 untuk influenza musiman (belahan bumi utara) berisi sebagai berikut¹⁰:

- A / California / 7/2009 (H1N1) pdm09 like virus;
- A / Texas / 50/2012 (H3N2) -like virus;
- B / Massachusetts / 2/2012-like virus

Hasil karakterisasi virus influenza yang beredar di 6 wilayah tersebut di tahun 2016 adalah A/California/7/2009 (H1N1) dan A/Texas/50/2012. Hal ini masih

relevan terkait dengan rekomendasi WHO untuk musim 2015-2016. Sehingga vaksin influenza yang beredar saat ini masih dapat dimanfaatkan dan efektif untuk pencegahan terinfeksi influenza.

Proporsi kasus positif influenza dari kasus ISPA berat yang dirawat di 6 sentinel rumah sakit sebesar 11% di tahun 2016 lebih rendah dibandingkan dengan proporsi kasus positif influenza dari kasus ISPA berat yang dirawat di New Zealand sebesar 22,7%. Namun lebih tinggi jika dibandingkan dengan proporsi kasus positif influenza dari kasus ISPA berat yang dirawat di Kenya sebesar 9,6%. Perbedaan besaran proporsi ini dimungkinkan terjadi karena banyak faktor, seperti: deteksi kasus ISPA berat, teknik pengambilan spesimen oleh petugas laboratorium, pemeriksaan laboratorium, dan agen penyebab lain yang memiliki gejala yang sama dengan influenza.^{24,25}

Dari hasil juga disampaikan indikator yang penting untuk kinerja deteksi kasus adalah proporsi (%) kasus ISPA Berat dari jumlah rawat inap. Secara umum, hal ini seharusnya $\geq 1\%$ dan dapat meningkat menjadi 5% saat puncak musim influenza atau penyakit pernapasan lainnya. Proporsi positif influenza dari kasus ISPA berat dengan spesimen memberikan informasi tentang kegiatan influenza di daerah tersebut di Indonesia. Hal ini juga dapat menjadi indikator kualitas dari spesimen dimana jika proporsi positif influenza tetap rendah dalam periode waktu yang lama, hal tersebut dapat menandakan bahwa kualitas spesimen dipengaruhi oleh teknik pengambilan spesimen, sistem *cold chain* mulai dari pengepakan, penyimpanan spesimen dan pengiriman spesimen.

Adanya kondisi/penyakit penyerta yang ditemukan pada kasus ISPA Berat yang memiliki kondisi/penyakit penyerta seperti asma (6,5%), perokok (6%), penyakit paru obstruktif kronis (2,5%), dimana berdasarkan panduan dari WHO, kondisi penyerta seperti penyakit kronis dapat memperparah penyakit influenza yang diderita.²⁴

Deteksi cepat virus influenza pada kasus berat dapat membantu penegakan diagnosis dan penatalaksanaan pasien pada kasus ISPA berat. Pengembangan monoklonal antibodi terhadap influenza merupakan salah satu pendekatan dalam pengembangan metode deteksi virus influenza.⁴

Pada penelitian ini, dilakukan pengembangan mouse-monoklonal antibodi terhadap virus influenza dimana antibodi monospesifik yang terbentuk diharapkan hanya dapat berikatan dengan epitope virus influenza. Monoklonal antibodi sangat bermanfaat dalam identifikasi, karakterisasi antigenik dan dapat digunakan dalam diagnostik, terapi dan studi mengenai *drug delivery*.²⁶ Secara garis besar, pengembangan monoklonal terdiri dari tiga tahap; imunisasi, fusi dan kloning, serta tahapan identifikasi hibridoma.

Meskipun menghasilkan sel hibridoma dengan persentase keberhasilan fusi 83.85%, hanya 7 dari 161 sel hibridoma yang dapat mengenali virus Influenza A/H5N1. Hal ini dapat terjadi karena konsentrasi virus yang digunakan saat injeksi relatif rendah. Isolat Influenza A/H5N1 yang digunakan untuk menginfeksi mencit memiliki titer HA berkisar 512. Untuk produksi monoklonal antibodi, tidak hanya injeksi menggunakan virus, namun dapat pula menggunakan protein, salah satunya protein yang umum digunakan adalah protein HA yang dapat merangsang pembentukan antibodi. Injeksi dengan salah satu HA dari satu sub tipe Influenza tidak hanya dapat memproduksi antibodi spesifik terhadap sub tipe virus tersebut, namun dapat pula membentuk monoklonal yang dapat mengenali sub tipe yang lain (*cross reactive antibody*).²⁷

Hal lain yang menyebabkan rendahnya sel hibridoma yang mengenali virus Influenza antara lain adalah karena mencit yang digunakan dalam penelitian ini bukan mencit SPF (special pathogen free), sehingga sangat dimungkinkan mencit pernah terinfeksi penyakit lain dan memproduksi antibodi selain anti virus Influenza.

Berdasarkan data hasil studi mengenai keragaman virus di dalam populasi inang yang sama, kami mengamati distribusi varian genom yang tidak merata: keragaman virus paling tinggi pada gen yang terkait dengan kompleks ribonukleoprotein (subunit polimerase PA, PB1, PB2 dan NP nukleoprotein). Ketika membandingkan data H5N1 dengan data sekuensing generasi berikutnya dari pasien yang terinfeksi virus pandemi H1N1 tahun 2009, variasi urutan keseluruhan kurang jelas untuk H1N1 (pdm2009) daripada untuk H5N1. Pengamatan ini mungkin mengindikasikan bahwa evolusi di dalam populasi inang yang sama selama infeksi manusia dengan virus unggas lebih dinamis daripada

virus yang sudah beradaptasi dengan baik pada manusia, seperti virus H1N1pdm. Salah satu varian mutasi yang berpengaruh terhadap adaptasi virus pada inang mamalia yaitu mutasi gen PB2 asam amino E627K.²⁸ Tetapi data yang dihasilkan dari hasil analisis deep sequencing menunjukkan adanya banyak variasi mutasi pada gen PB2 selain E627K yang berpengaruh terhadap adaptasi inang. Mutasi tersebut diantaranya N657H dan I394Y. Untuk membuktikan dan mengkonfirmasi bahwa mutasi tersebut berperan secara fenotifik, diperlukan uji lanjut secara in vitro (aktifitas polymerase) atau in vivo pada hewan coba.

VIII. KESIMPULAN DAN SARAN

8.1 KESIMPULAN

- Indonesia yang merupakan negara yang terletak di daerah tropis memiliki pola sirkulasi Virus Influenza serupa dengan negara di *Northern Hemisphere*, walaupun terdapat perbedaan dalam tipe Virus Influenza yang paling banyak bersirkulasi. Dari hasil pemantauan virus yang bersirkulasi diketahui bahwa virus yang bersirkulasi sesuai dengan virus yang bersirkulasi di dunia.
- Pada tahun 2016 ini, 20% dari kasus ISPA di Puskesmas merupakan kasus positif Influenza sedangkan Proporsi Influenza sebagai penyebab kasus ISPA berat di RS sebesar 11% dengan tipe Virus Influenza A yang mendominasi. Pola musiman Influenza untuk tahun ini tidak berbeda dengan tahun sebelumnya dimana Virus Influenza beredar sepanjang tahun dengan puncak kasus pada musim penghujan.
- Kasus Influenza ditemukan lebih banyak pada anak usia kurang dari lima belas tahun, dengan sebaran kasus Influenza bervariasi di setiap sentinel.
- Virus Influenza yang beredar di Indonesia masih sensitif terhadap antiviral Oseltamivir.
- Ditemukan ada beberapa virus infeksi pernafasan selain influenza yang menjadi penyebab ISPA.
- Gejala klinis yang dominan dari kasus ISPA adalah demam dan batuk, hal ini berkorelasi jelas dengan hasil laboratorium.
- Monoklonal antibodi dapat diproduksi, namun untuk meningkatkan produksi antibodi anti Influenza dibutuhkan virus dengan konsentrasi dan purifikasi tinggi. Selain itu, untuk memperkecil produksi antibodi yang tidak diinginkan, dibutuhkan mencent SPF.
- Variasi mutasi pada gen PB2 selain E627K yang berpengaruh terhadap adaptasi inang.

8.2 SARAN

- Pemantauan berkala virus influenza tetap harus dilakukan dengan peningkatan kualitas data epidemiologi dan klinis yang didapatkan dari sentinel
- Kualitas spesimen harus ditingkatkan agar didapatkan isolat yang bisa dianalisa lebih lanjut dengan metode molekular
- Perlunya riset dan analisa lebih lanjut untuk mengetahui etiologi lain dari kasus ISPA yang negatif influenza.
- Untuk membuktikan dan mengkonfirmasi bahwa mutasi tersebut berperan secara fenotifik, diperlukan uji lanjut secara in vitro (aktifitas polymerase) atau in vivo pada hewan coba.

IX. DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Kamps, B.S., Teran, G.R. 2006. Influenza 2006. In: Influenza Report 2006 (1st edition). Kamps, B.S., Hoffman, C., Preiser, W., (eds). Flying Publisher. Cologne. pp: 17-38
2. WHO. 2012. WHO Interim Global epidemiological Surveillance Standards for Influenza diunduh dari <http://www.who.int/influenza/resources/documents/infsurvmanual.pdf>. Diunduh pada tanggal 28 Desember 2012
3. Sedyaningsih E.R, Setiawaty, V. 2009. Awal Pandemi Influenza A(H1N1) 2009: Suatu Tinjauan. Jurnal Penyakit Menular Indonesia. 1(1):29-41.
4. Beckett, C.G., Kosasih, H., Ma'roef, C., Listyaningsih, E., Elyazar, I.R.F., Wuryadi, S., Yuwono, D., McArdle, J.L., Corwin A.L., Porter, K. 2004. Influenza Surveillance in Indonesia, 1999-2003. Clinical Infectious Disease. 39:443-449.
5. Yuwono, D., Putranto, R.P., Sehatman, Subangkit, Nur A.P, K., Susilowati, Klino, Wasiyo, Santono, Heriyanto, B., Gendrowahyuhono, Sedyaningsih, E.R. 2008. Epidemiological Study of Influenza in Jakarta and Surrounding Areas. Bulletin Penelitian Kesehatan. 36:2:71-82
6. Kosasih, H., Roselinda, Nurhayati, Klimov, A., Xiyan, X., Lindstrom, S., Mahoney, F., Beckett, C., Burgess, T. H., Blair, P. J., Uyeki, T. M. and Sedyaningsih, E. R. 2012, Surveillance of Influenza in Indonesia, 2003–2007. Influenza and Other Respiratory Viruses. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00403.
7. ____, 2007. Pedoman Surveillans Pneumonia Puskesmas dan Rumah Sakit Sentinel. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Jakarta
8. Zambon, M. C., Stockton, J. D., Clewley, J. P., & Fleming, D. M. 2001. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. The Lancet, 358(9291), 1410-1416.
9. Taubenberger JK, Layne SP. 2001. Diagnosis of influenza virus: coming to grips with the molecular era. Molecular diagnosis, 6(4), 291-305.

10. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. 2000. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Archives of Internal Medicine*, 160(21), 3243.
11. Kasper MR, Wierzba TF, Sovann L, Blair PJ, Putnam S. 2010. Evaluation of an influenza-like illness case definition in the diagnosis of influenza among patients with acute febrile illness in Cambodia, *BMC Infectious Disease* 10:320. doi:10.1186/1471-2334-10-320
12. Dilantika C, Sedyaningsih ER, Kasper MR, Agtini M, Listiyaningsih E, Uyeki TM, Putnam SD. 2010. Influenza virus infection among pediatric patients reporting diarrhea and influenza-like illness. *BMC infectious diseases*, 10(1), 3.
13. Comach G, Teneza-Mora N, Kochel TJ, Espino C, Sierra G, Camacho DE, Halsey ES. 2012. Sentinel surveillance of influenza-like illness in two hospitals in maracay, Venezuela: 2006–2010. *PloS one*, 7(9), e44511.
14. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season. Diunduh dari http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_17_north/en/
15. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016 southern hemisphere influenza season. Diunduh dari http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_south/en/
16. Nguyen T, Rivaller P, Davis CT, Thi Hoa D, Balish A, et al. 2012. Evolution of highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus populations in Vietnam between 2007 and 2010. *Virology* 432: 405–416.
17. Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M, Cantudo-Muñoz P, Petit-Gancedo C, Jiménez-Valera M, Rosa-Fraile M. 2005. Influenza-like illness criteria were poorly related to laboratory-confirmed influenza in a sentinel surveillance study. *Journal of clinical epidemiology*, 58(3), 275-279.
18. European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Global estimates of the direct burden of influenza on the health of younger children (under age 5 years) including separate estimates for the European Region. Diunduh dari

<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvise/Lists/ECDC%20Reviews/ECDC>, November 2011. Diunduh pada tanggal 25 Desember 2011.

19. Noda M, Masrinoul P, Punkum C, Pipattanaboon C, Ramasoota P, Setthapramote C, Sasaki T, Sasayama M, Yamashita A, Kurosu, Ikuta K, Okabayashi T. Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against Dengue virus capsid protein among four serotypes. *Biologics: Targets and Therapy*.2012;6:409-416.
20. Van de Pol AC, et.al. Increased Detection of Respiratory Syncytial Virus, Influenza Viruses, Parainfluenza Viruses and Adenoviruses with real time PCR in Samples from Patient with Respiratory Symptoms. *Journal of Clinical Microbiology*.2007;2260-2262.
21. Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. uMELT: Prediction of high-resolution melting curve and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*.2011;27(7):1019-1020. Doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr065>.
22. Emery SL, Erdman DD, et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis* .2004;10(2):311-6.
23. van Elden LJ, van Loon AM, et al. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol*.2003;41(9):4378-81.
24. Q.Sue Hang et al, Implementing hospital-based surveillance for severe acute respiratory infections caused by influenza and other respiratory pathogens in New Zealand, *Western Pac Surveill Response J*. 2014 Apr-Jun; 5(2): 23–30.
25. Katz MA, Muthoka P, Emukule GO, Kalani R, Njuguna H, et al. (2014) Results From the First Six Years of National Sentinel Surveillance for Influenza in Kenya, July 2007–June 2013. *PLoS ONE* 9(6): e98615. doi:10.1371/journal.pone.0098615.
26. Siddiqui,M. 2010. Monoklonal Antibodies as Diagnostics; an Appraisal. *Indian J Pharm Sci* 72(1):12-17
27. Malik A, Mallajosyula V, Mishra N N, Arukha A P, Varadarajan R, Gupta S K. Generation and characterisation of monoklonal antibodies specific to avian influenza H7N9 haemagglutinin protein. *Indian J Med Microbiol* 2016;34:489-94.

28. Leung Ng AK, Chan WH, Choi ST, Lam MKH, Lau KF, Chan PKS, Au SWN, Fodor E, Shaw PC. Influenza Polymerase Activity Correlates with the Strength of Interaction between Nucleoprotein and PB2 through the Host-Specific Residue K/E627. PLoS ONE 7(5): e36415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036415.ssz766>.

X. UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikum warahmatullah wabarakatuh,

Dengan mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT, dan mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada seluruh tim Surveilans Virologi Puslitbang BTDK dan daerah. Dengan selesainya kegiatan penelitian **Pengembangan Metode Deteksi dan Identifikasi Molekuler Menunjang Pemantauan Berkala Penyakit Infeksi Saluran Pernafasan dan Pneumonia** tahun 2016 ini, kami sampaikan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang dengan segala keterbatasan waktunya masih dapat membimbing kami melakukan kegiatan dengan baik dan terarah. Kepada Drs. Bambang Heriyanto, MKes, selaku Pembina penelitian ini, kami haturkan terima kasih atas bimbingan yang diberikan.

Tidak lupa juga kami haturkan terima kasih kepada tim ISPA di daerah, baik Dinas Kesehatan Kota/Kabupaten dan tim Puskesmas atas kerjasama dan komitmennya untuk melaksanakan kegiatan surveilans ini. Surveilans Virologi ini tidak berhenti sampai pada akhir tahun 2016 saja namun akan terus berlanjut dan akan terus berkembang agar pemantauan Influenza di Indonesia dapat lebih baik lagi. Untuk itu dukungan dari semua pihak sangat kami butuhkan pada masa-masa yang akan datang.

Sebelum kami mengakhiri ucapan terima kasih ini, kami ingin mengajak seluruh tim Surveilans Virologi semua untuk tetap bekerjasama dengan baik dan memiliki komitmen yang tinggi untuk dapat melaksanakan kegiatan Penelitian ISPA ini di masa mendatang.

Akhirnya atas segala kekurangan dalam bertutur kata dan bersikap, kami mohon maaf yang sebesar-besarnya.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

XI. JADWAL KEGIATAN

Kegiatan	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Agt	Sep	Okt	Nov	Des
1. Persiapan												
a. Menghubungi institusi yang akan diajak kerjasama	x											
b. <i>Ethical Clearance</i>	x		x									
c. Supplies	x		x									
				x								
					x	x						
2. Implementasi												
a. Pengumpulan data		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
b. Pemeriksaan Lab		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3. Analisis data					x			x			x	x
4. Diseminasi hasil												
a. Pertemuan evaluasi												
5. Laporan												
a. <i>Feed-back</i> ke sentinel					x	x	x	x	x	x	x	x
b. Bulletin											x	
c. Laporan akhir												x

XII. BIODATA KETUA PELAKSANA

1. NAMA Dr. dr. Vivi Setiawaty, M. Biomed
2. ALAMAT Rumah : Jl. Mampang Prapatan XIV No.19R Jakarta Selatan, 12790 Kantor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes Jalan Percetakan Negara No. 23, Jakarta Pusat, 10560 Telepon : 021- 42881745 ext 302; Fax : 021- 42881754
3. RIWAYAT PENDIDIKAN ☐ 2009 – 2013 Program Doktor Ilmu Biomedik, FKUI ☐ 2006 – 2008 Magister Biomedik, FKUI ☐ 1989 - 1995 Program Dokter, Fak. Kedokteran UI ☐ 1986 - 1989 SMAN 8 Jakarta ☐ 1983 - 1986 SMPN 43 Jakarta ☐ 1978 - 1983 SDN 05 Pagi Jakarta
4. RIWAYAT PEKERJAAN - Peneliti Badan Penelitian dan Pengembangan, Kemenkes RI. (Januari 2005-sekarang). - Dokter Praktek Umum (Juli 2000 – Sekarang). - Dokter PTT Puskesmas Pembantu Katulampa, Bogor Timur, Bogor. (Juli 1997 – Juli 2000).
5. PUBLIKASI ❖ Agustiningsih Agustiningsih, Hidayat Trimarsanto, Vivi Setiawaty , I Made Artika, David Handojo Muljono. Primer Development to obtain complete codingsequence of HA and NA genes of Influenza. BMC Research Notes. 2016; 9(1). DOI: 10.1186/s13104-016-2235-8. ❖ Noer Endah Pracoyo, Made Ayu Lely Suratri, Roselinda Roselinda, Vivi Setiawaty . The Association of Hepatitis C Serological Status with Several Risk Factors in Indonesia. International Scholarly Research Notices. 2016;11:1-4. DOI: 10.1155/2016/3018135 ❖ Agustiningsih, Hartanti Dian Ikawati, Arie Ardiansyah Nugraha, Vivi Setiawaty , Reni Herman. The first case of laboratory-confirmed dengue virus infection in Mimika, Papua province, Indonesia. Health Science Journal of Indonesia. 2016;7(1):1-6.

- ❖ Nike Susanti, Vivi Setiawaty. Establishment of realtime RT-PCR assay to detect polio virus in the Acute Flaccid Paralysis laboratory surveillance. *Health Science Journal of Indonesia*. 2016;7(1):1-6.
- ❖ Sheila Kadir, **Vivi Setiawaty**, Agus Kosasih, Saptuti Chunaeni. Efektivitas Iradiasi terhadap Penurunan Limfosit T pada Komponen Sel Darah Merah Pekat (The Effectiveness of Irradiation to Decrease T Lymphocytes in the Packed Red Cell). *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 2016;26(1):9-14.
- ❖ GraceTanamal, **Vivi Setiawaty**, Ni Ken Ritchie, Ina S. Timan. Pengukuran Komponen Zat Besi pada Laki-Laki Pendonor Darah Rutin di Kabupaten Gunung Kidul Tahun 2013. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 2016;44(1):41-48.
- ❖ **Vivi Setiawaty**. Virulensi dan transmisi virus Influenza A pada manusia, hewan mamalia dan unggas. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 2012;22(3):106-111.
- ❖ Triyani Soekarso, **Vivi Setiawaty**. Comparison of rotavirus detection from rectal swab and feces in patients with diarrhea symptoms. *Health Science Journal Indonesia*. 2012;3(2):91-94.

- ❖ **Vivi Setiawaty**, Krisna NA Pangesti, Ondri D Sampurno. Establishing a laboratory Network of Influenza Diagnosis in Indonesia: an experience from Avian Influenza (H5N1) Outbreak. *Clinical Epidemiology*. 2012;4.1-4.
- ❖ **Vivi Setiawaty**, Roselinda, Ondri Dwi Sampurno. Influenza Activities in Indonesia in 2010-2011. Poster Presentation in 15th International conference of Infectious Diseases di Bangkok Juni 2012.
- ❖ Andi Yasmon, Yulianty Muhayar, **Vivi Setiawaty**, Beti Ernawati Dewi, Budiman Bela, Fera Ibrahim. Five Unique Amino Acid Residues of Hemagglutinin (HA) Proteins of Swine Influenza A (H1N1) Detected in 2009 in Jakarta, Indonesia. *Microbiology Indonesia*. 2012;6(2):69-76
- ❖ Agustiningsih, Reni Herman, Ririn Ramadhany, Eka Pratiwi, Kartika D. Puspa, **Vivi Setiawaty**. Viral and bacterial infection among hospitalized-suspected influenza A/H5N1 patients in Indonesia, 2008-2009. *Medical Journal of Indonesia*. 2012; 21(2):264-267.
- ❖ Tjandra Y. Aditama, Gina Samaan, Rita Kusriatuti, Ondri Dwi Sampurno, Wilfried Purba, Hari Santoso, Arie Bratasena, Misriyah, Anas Maruf, Elvieda Sariwati, **Vivi Setiawaty**, et.al. Avian Influenza H5N1 Transmission in Households, Indonesia. *Plos One*, 2012, 7(1):e29971:1-7.
- ❖ Tjandra Y. Aditama, Gina Samaan, Rita Kusriatuti, Wilfried Purba, Hari Santoso, Arie Bratasena, Misriyah, Anas Maruf, Elvieda Sariwati, **Vivi Setiawaty**, et.al. Risk Factors for Cluster Outbreaks of Avian Influenza A H5N1, Indonesia. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;53(12):1237-44.
- ❖ Irene L. Indalao, **Vivi Setiawaty**, Hana A. Pawestri, Subangkit. Virus Culture and real-time RT PCR in Identifying influenza viruses from Influenza Like Illness cases in Indonesia 2007-2008. *Health Science Journal Indonesia*. 2011;2(2):92-95.
- ❖ Yogi Prawira, Dewi Murniati, Adria Rusli, Sardikin Giriputro, **Vivi Setiawaty**, Hanifah Oswari, Mardjanis Said. Clinical, Laboratory, and Radiologic, Characteristics of Confirmed Avian Influenza (H5N1). *South East Asian Medical Journal*. 2012; 43(4):877-889.

- ❖ Ririn Ramadhany, **Vivi Setiawaty**, Holy Arif Wibowo, Dewi Lokida. Proportion of Influenza Cases in Severe Acute Respiratory Infection (SARI) in Indonesia 2008-2009. Medical Journal of Indonesia. 2010;19(4):264-7.
- ❖ Mirna Robert- Du Ry van Beest Holle, **V. Setiawaty** , K.N.A. Pangesti, E. Sedyaningsih. No detectable seroprevalence of avian influenza A/H5N1 among poultry farmers in rural Indonesia, 2007. Seameo Tropmed Journal.2010;41(5):1095-8.
- ❖ **Vivi Setiawaty**, Endang Rahayu Sedyaningsih, T. Mirawati Sudiro, Mirna Robert - Du Ry van Beest Holle, Krisna Nur AP, Fera Ibrahim. Antibody Anti-H5N1 Detection in Poultry Farmers and Workers in Poultry Collection Facilities in Indonesia, 2007. Medical Journal of Indonesia.2010; 19(2):124-9.
- ❖ Anita Juniatiningsih, **Vivi Setiawaty**, Endang R Sedyaningsih, Darmawan B. Setyanto. A young girl with suspected encephalitis caused by avian influenza (H5N1) infection in Indonesia, *Pediatrica Indonesiana*.2010; 50(1):62-6.
- ❖ **Vivi Setiawaty**, T. Mirawati Sudiro, Fera Ibrahim, Krisna Nur AP, Itamura S, Sedyaningsih ER. Deteksi antibody anti H5N1 dengan Uji Hambatan Hemagglutinasasi dan Uji Neutralisasi. *Jurnal Respirologi Indonesia*, 2009, 29(1):11-17.
- ❖ Krisna Nur AP, **Vivi Setiawaty**, Endang R. Sedyaningsih. Paparan virus influenza A/H5N1 pada pekerja tempat pengumpul ayam di DKI Jakarta. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 2009; XIX(3):125-131.
- ❖ Presentasi poster pada The 13th International Congress on Infectious Disease di Kuala Lumpur dengan judul "High seroresponse againsts avian influenza A/H5N1 among poultry workers in Jakarta, 2007" (19-22 Juni 2008).
- ❖ Presentasi oral pada International Conference of Emerging Infectious Disease di Atlanta, Georgia dengan judul "Case Report: Dual Infection with Influenza A/H5N1 and Influenza A/H3N2 in Jakarta, April 2007" (20-22 Maret 2008)
- ❖ Presentasi oral pada ESCAIDE Conference di Stockholm, Swedia dengan judul "Low seroprevalence of avian influenza A/H5N1 among poultry farmers in rural Indonesia suggests low risk for poultry-to-person transmission." (Oktober 2007)
- ❖ Sedyaningsih ER, Isfandari S, **Setiawaty V**, Rif'ati L, Harun S, Purba W, et.al. Epidemiology of Cases of H5N1 virus Infection in Indonesia, July 2005-June2006. *JID* 2007; 196:522-527.
- ❖ Publikasi pada Majalah Kedokteran UKI dengan judul "Avian Influenza (H5N1) virus: How this virus can infect human (Virus Flu Burung, Apa dan bagaimana virus ini menyerang manusia)" (Oktober 2006).
- ❖ Publikasi pada Buletin Penelitian Kesehatan (34(4):137-146) dengan judul "Karakteristik kasus-kasus flu burung di Indonesia, Juli 2005 – Mei 2006."
- ❖ Presentasi oral pada Simposium Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI, Jakarta dengan judul "Investigasi Kejadian Luar Biasa Diare di Kabupaten Tangerang." (Desember 2005)

XIII. PERSETUJUAN PENELITIAN

Izin penelitian diperoleh dari Kementerian Dalam Negeri dan Dinas Kesehatan Provinsi, Kabupaten/Kota serta Puskesmas yang bersangkutan.

XIV. PERSETUJUAN ETIK

Secara umum tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan pemantauan berkala pada pasien ISPA di Provinsi Jambi, Lampung, Sumatera Barat, Bangka Belitung, Sulawesi Barat, Riau, DI Aceh, Kepulauan Riau, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, DI Yogyakarta, Nusa Tenggara Barat, Kalimantan Tengah, Sulawesi Tengah, Maluku, Bengkulu, Sumatera Selatan, Bali, Nusa Tenggara Timur, Sulawesi Selatan, Sulawesi Utara, Kalimantan Timur, Kalimantan Selatan, Papua, dan Sumatera Utara, Pemeriksaan lebih lanjut virus Influenza dan agen lainnya dari seluruh sentinel pemantauan ISPA, dilakukan di Laboratorium Virologi Puslitbang BTDK. Data dari pemantauan berkala ini diharapkan dapat menyediakan informasi yang lebih lengkap mengenai penyakit yang disebabkan Influenza di Indonesia. Mitra kerja dalam kegiatan ini meliputi lembaga yang ikut berpartisipasi dan Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar kesehatan (BTDK).

Subyek penelitian yang memenuhi syarat sebelumnya akan diberikan penjelasan mengenai maksud, tujuan, manfaat, risiko apabila mengikuti penelitian serta orang yang dapat dihubungi apabila terdapat pertanyaan/masalah sehubungan penelitian ini. Apabila subyek setuju untuk ikut berpartisipasi pada penelitian ini, maka akan diminta menandatangani lembar persetujuan (*Informed Consent*) yang telah disetujui oleh Komisi Etik Badan Litbang Kemkes RI.

Data yang diperoleh melalui kuesioner berisi data umum, demografi, gejala klinis dan riwayat pengobatan, sedangkan data etiologi diperoleh dari hasil pemeriksaan yang dilakukan di Laboratorium Regional dan Laboratorium Virologi Puslitbang BTDK di Jakarta. Manfaat bagi subyek adalah diperolehnya informasi mengenai penyebab penyakitnya sehingga sangat berguna untuk pemilihan terapi, baik terapi antibiotika maupun antiviral. Tidak ada risiko yang

berarti bagi subyek yang mengikuti penelitian ini, kecuali kehilangan waktu. Penelitian ini bersifat sukarela, tidak ada sanksi bila menolak dan tidak dikenakan biaya.

Seluruh data akan disimpan di Badan Litbang Kemkes RI serta dijaga kerahasiaannya.

XVI. LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

Tempel Nomor Label

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

1. Dinas Kesehatan			
2. Pusat Kesehatan Masyarakat			
UMUM			
3. Tanggal berobat	□□/□□/□□	4. No rekam medik	□□ □□ □□
5. Tanggal mulai sakit	□□/□□/□□		
6. Nama pasien			
7. Nama kepala rumah tangga			
8. Tanggal lahir	□□/□□/□□	9. Umur	□□ tahun □□ bulan
10. Jenis kelamin	☐ Laki-laki ☐ Perempuan		
11. Alamat	Jalan _____ Gang _____ Kelurahan / Desa Nomor _____ Blok _____ RT _____ RW _____ Kecamatan _____ Kabupaten / Kota _____		
TANDA DAN GEJALA			
12. Suhu aksila saat datang	□□.□ °C	20. Frekuensi napas	□□ per menit
13. Sudah berapa hari demam ? (termasuk hari ini)	□□ hari	21. Apakah sesak napas ?	☐ Ya ☐ Tidak
14. Apakah sudah minum obat penurun panas ?	☐ Ya ☐ Tidak	22. Bila sesak napas, sudah berapa hari ?	□□ hari
15. Apakah batuk.?	☐ Ya ☐ Tidak	23. Apakah nyeri otot ?	☐ Ya ☐ Tidak
16. Apakah nyeri tenggorokan ?	☐ Ya ☐ Tidak	24. Apakah pilek ?	☐ Ya ☐ Tidak
Riwayat Penyakit dan Kontak			
17. Apakah menderita penyakit kronis ? (Asma, Diabetes, PPOK, Jantung, Ginjal, dll)	☐ Ya ☐ Tidak	25. Jika wanita, apakah sedang hamil ?	☐ Ya ☐ Tidak
18. Jika no 17, ya, Sebutkan		26. Apakah rumah pasien dekat dengan peternakan unggas ?	☐ Ya ☐ Tidak

19. Dalam 2 minggu yta, adakah anggota rmh tgg lain yg demam, batuk, & / pilek?	☐ Ya ☐ Tidak	27. Dalam 2 minggu yta, apakah pernah kontak dng ayam sakit atau ayam mati mendadak ?	☐ Ya ☐ Tidak
PENGAMBILAN SPESIMEN			
28. Swab tenggorok	☐ Ya ☐ Tidak	29. Tanggal pengambilan	/ /
30. Swab hidung	☐ Ya ☐ Tidak	31. Tanggal Pengiriman	/ /
32. Nama dokter		33. Tanda tangan	

* Isi dengan Angka atau Tanda V dalam Kotak yang tersedia

LAMPIRAN 2

NASKAH PENJELASAN *INFORMED CONSENT*

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan mengadakan kegiatan **pemeriksaan penyakit dengan gejala menyerupai Influenza yang dikenal dengan istilah *Influenza Like Illness* (ILI)** dengan tujuan untuk mendapatkan gambaran epidemiologi dan virologi penyebab penyakit tersebut di Indonesia. Hasil penelitian ini akan bermanfaat untuk perencanaan kebijakan pengobatan dan pencegahan serta penanggulangan penyakit Influenza di Indonesia.

Bapak/Ibu/Saudara akan kami sertakan dalam survei ini dengan pemeriksaan kesehatan terutama pemeriksaan Laboratorium untuk identifikasi mikroba penyebab penyakit bergejala seperti Influenza. Adapun risiko bagi Bapak/Ibu/Saudara adalah akan merasa tidak nyaman/sedikit sakit pada saat pengambilan **swab/apus hidung dan tenggorok. Pengambilan swab/apus hidung/tenggorok adalah memasukkan tangkai kapas ke lubang hidung dan tenggorokan.** Keuntungan yang diperoleh Bapak/Ibu/Saudara ikut dalam survey ini adalah biaya untuk pemeriksaan mikroba penyebab penyakit akan ditanggung dan hasilnya **akan diberikan kepada dokter yang merawat sehingga dokter yang merawat dapat melakukan pemantauan pada kesehatan Bapak/Ibu/Saudara bila mikroba yang didapat memerlukan pengobatan lebih lanjut.**

Data Bapak/Ibu/Saudara akan dijaga kerahasiaannya tanpa menyebutkan identitas, serta berhak menolak dan tidak ikut dalam penelitian ini dan sewaktu-waktu dapat mengundurkan diri. Jika Bapak/Ibu/Saudara mempunyai masalah yang berhubungan dengan survey ini dapat menghubungi Dr.dr. Vivi Setiawaty, M.Biomed (021-42881754) atau dr. Roselinda, M.Epid (081383534970) Sekretariat Pemantauan berkala ILI Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes Kemenkes RI, Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat, telepon (021) 4288 7315, e-mail: vilitbang@yahoo.com, krisnanur@yahoo.com atau dokter yang merawat di masing-masing Puskesmas.

LAMPIRAN 3

FORMULIR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN PENGEMBANGAN METODE DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER MENUNJANG PEMANTAUAN BERKALA PENYAKIT INFEKSI SALURAN PERNAFASAN DAN PNEUMONIA

Setelah mendengar penjelasan pelaksanaan pemantauan berkala, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama :Umur:.....

Alamat :

Menyatakan ikut serta dalam pemantauan berkala ini dan sudah diberikan kesempatan bertanya serta sewaktu-waktu saya dapat mengundurkan diri.

.....,/...../2016

Tanda tangan/cap jari peserta

Nama saksi

Tanda tangan saksi

LAMPIRAN 4

**BUKU REGISTER (LOG BOOK) HARIAN SARI
DI RUMAH SAKIT**

[illegible]

LAMPIRAN 5**FORMULIR LAPORAN KASUS SARI (SEVERE ACUTE RESPIRATORY INFECTION)**

Nama Rumah Sakit :

Tanggal Wawancara :

IDENTITAS

1. Nama Pasien		2. Nama Orang Tua / KK		3. ID Pasien (Label)	
4. Tanggal Lahir	□□/□□/□□	5. Jenis Kelamin	☐ Laki-laki ☐ Perempuan	6. Umur	□□ tahun □□ bulan
7. Alamat	Jalan RT/RW No. Rumah Kelurahan Kecamatan No. Telp/HP				
8. Pekerjaan	[Lihat daftar]*				

KEADAAN SAAT MASUK

9. Tanggal masuk Rumah Sakit	□□/□□/□□	10. Pernahkah sebelumnya berobat ke : (tanyakan semua pilihan di bawah ini)			
11. Suhu badan (saat masuk di RS)	□□.□ °C	a) Klinik swasta ☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT b) Puskesmas ☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT c) Rumah sakit ☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT d) Lainnya ☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT			
12. Riwayat Panas	☐ Ya ☐ Tidak	13. Tanggal mulai panas	□□/□□/□□	14. Tanggal mulai timbulnya gejala	□□/□□/□□
15. Batuk	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT		22. Frekuensi Nafas	☐ □ nafas per menit	
16. Sakit tenggorokan	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT		23. Auskultasi: terdengar ronki saat menarik napas	☐ Ya ☐ Tidak	

17. Sesak napas	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	Tanda-tanda MTBS (<5 Tahun)	24. Stridor	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
18. Nyeri dada pleuritik (pada waktu bernafas)	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT		25. Tidak bisa minum	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
19. Muntah	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT		26. Kesadaran menurun	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
20. Diare	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT		27. Tarikan dinding dada	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
21. Diagnosis saat masuk [lihat daftar]**			28. Kejang	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT

KONDISI MEDIS

29. Perokok Aktif	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	34. Penyakit Kardiovaskular	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	39. Pernah mendapatkan vaksinasi influenza dalam 12 bulan terakhir?	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
30. Sedang Hamil	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	35. Penyakit Paru Obstruktif Kronis	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	40. Kanker	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
31. Diabetes	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	36. Imunosupresif	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	41. Asma	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
32. Penyakit Ginjal Kronis	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	37. Penyakit hati kronis	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	42. Obesitas	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT
33. Tuberkulosis Aktif	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	38. Kelainan hematologis	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT	43. Kelainan neurologis	☐ Ya ☐ Tidak ☐ TT

LAMPIRAN 6

FORMULIR PENGAMBILAN DAN PENGIRIMAN SPESIMEN

Nama Rumah Sakit : _____

Pengambilan Tanggal/Minggu Ke : _____ / _____

PENGAMBILAN SPESIMEN			
1. Nama Pasien		2. ID Pasien (Label)	
JENIS SPESIMEN TANGGAL PENGAMBILAN		JAM	NAMA PENGAMBIL SPESIMEN
3. Swab Hidung	□□/□□/ □□		
4. Swab Tenggorok	□□/□□/ □□		
5. Lainnya (sebutkan jenisnya):	□□/□□/ □□		

Sentinel ke Laboratorium Pemeriksaan	PENGIRIM	KURIR	PENERIMA
6. Paraf>Nama			
7. Tanggal Kirim/Terima			
8. Jam Kirim/Tiba			
Suhu Saat Tiba			°C

CATATAN:

LAMPIRAN 7

FORMULIR LAPORAN MINGGUAN RUMAH SAKIT

Nama Rumah Sakit :

Minggu Ke : (Tanggal _____ s.d. _____)

[illegible]

LAMPIRAN 8

Laporan Bulanan Logistik

Nama Rumah Sakit :

Propinsi : _____

Alamat Rumah Sakit :

Kabupaten : _____

Periode Pelaporan : _____

(Bulan/Tahun)

[illegible]

[illegible]

LAMPIRAN 9

FORMULIR KELUAR RUMAH SAKIT

Nama Rumah Sakit :

Tanggal/Minggu Ke :

FORMULIR KELUAR RUMAH SAKIT

1. Nama Pasien	
2. ID Pasien	
3. Nama Orang Tua / Kepala Keluarga	
4. Tanggal keluar Rumah Sakit Status Akhir Pasien	/ / ☐ Sembuh ☐ Pulang Paksa ☐ Dirujuk ke RS lain _____ ☐ Meninggal Tanggal Meninggal / /
5. Diagnosis Utama saat keluar Rumah Sakit atau Meninggal [Lihat daftar]	
6. Diagnosis Sekunder saat keluar Rumah Sakit atau Meninggal [Lihat daftar]	
7. Apakah dilakukan X-Ray pada pasien selama dirawat di RS?	☐ Ya ☐ Tidak
8. Hasil X-Ray menunjukkan pneumonia (infiltrat) selama dirawat di RS?	☐ Ya ☐ Tidak
9. Hasil X-Ray menunjukkan lobar	☐ Ya ☐ Tidak

pneumonia selama dirawat di RS?	
10. Pengobatan selama dirawat di RS	a) Antibiotik ☐ Ya ☐ Tidak Jenis Antibiotik: _____
	b) Oseltamivir ☐ Ya ☐ Tidak
11. Memerlukan ventilator?	☐ ☐ Ya ☐ Tidak
12. Memerlukan perawatan di HCU atau ICU?	☐ ☐ Ya ☐ Tidak

LAMPIRAN 10

Tabel Kode Penomoran ISPA di Puskesmas

No	Pulau	Provinsi	Kota/Kabupaten	PKM	Kode nomor ILI
1	Sumatera	NAD	Banda Aceh	Banda Raya	I_NAD
2	Sumatera	Sumatera Utara	Medan	Teladan	I_MDN
3	Sumatera	Kepulauan Riau	Batam	Batu Aji	I_BTM
4	Sumatera	Sumatera Selatan	Palembang	Tujuh Ulu	I_BKL
5	Sumatera	Bengkulu	Bengkulu	SukaMerindu	I_BKL
6	Sumatera	Lampung	Bandar Lampung	Sumur Batu	I_LPG
7	Sumatera	Jambi	Muaro Jambi	Sungai Duren	I_JBI
8	Sumatera	Sumatera Barat	Padang	Lubuk Buaya	I_PDG
9	Sumatera	Bangka Belitung	Bangka	Pemali	I_BBL
10	Sumatera	Riau	Pekanbaru	Rumbai	I_RIU
11	Jawa	Banten	Tangerang	Serpong	I_TGR
12	Jawa	Jawa Barat	Bandung	Padasuka	I_BDG
13	Jawa	Jawa Tengah	Semarang	Pandanaran	I_SMG
14	Jawa	DIY Jogjakarta	Yogyakarta	Kotagede I	I_DIY
15	Jawa	Jawa Timur	Malang	Dinoyo	I_MLG
16	Bali	Bali	Denpasar	Denpasar Selatan I	I_DPS
17	Lombok	NTB	Mataram	Karang Taliwang	I_MTR
18	Timor	NTT	Kupang	Sikumana	I_KPG
19	Sulawesi	Sulawesi Selatan	Makassar	Sudiang	I_MKS
20	Sulawesi	Sulawesi Tengah	Palu	Birobuli	I_PAL
21	Sulawesi	Sulawesi Barat	Mamuju	Tampapadang	I_MMJ
22	Kalimantan	Kalimantan Timur	Balikpapan	Klandasan Ilir	I_BPP
23	Kalimantan	Kalimantan Selatan	Banjarmasin	Pekauman	I_BJM
24	Kalimantan	Kalimantan Tengah	Palangkaraya	Kayon	I_PLK
25	Ambon	Maluku	Ambon	Waihaong	I_AMB
26	Papua	Papua	Jayapura	Jayapura Utara	I_JPR
27	Papua	Papua	Merauke	Mopah	I_MRK

LAMPIRAN 11

Tabel Alamat Laboratorium Regional ILI

No	Nama Laboratorium	Kontak Person dan Alamat
1	Laboratorium Mikrobiologi FKUI	Dr. Andi Yasmon, S.Pi, M.Biomed Departemen Mikrobiologi FKUI Jl. Pegangsaan Timur No. 16 Jakarta 10320 Telp. 021-3160492
2	Laboratorium BBLK Makassar	Rustam Syam, SSi, M.Kes Lab. Mikrobiologi BBLK Makassar Jl. Perintis Kemerdekaan KM. 11 Tamalanrea Makassar Sulawesi Selatan Telp. 081342456506
3	Laboratorium Mikrobiologi FK UNHAS	Prof. Dr. Muh. Nasrum Massi, PhD Bagian Mikrobiologi FK UNHAS Jl. Perintis Kemerdekaan Km.10 Makassar 90245 Sulawesi Selatan Telp. 0411-585466
4	Laboratorium BBLK Palembang	Joko Miharto, SKM BBLK Palembang Jl. Inspektur Yazid Km 2,5 Palembang 30126 Sumatera Selatan Telp. 0711-32683
6	Laboratorium BBTCL-PP Jakarta	Dyah Retnosari, SSi Laboratorium BBTCL dan PP Jl. Balai rakyat No. 2 Cakung Timur, Jakarta 13910
7	Laboratorium Virologi Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan	Dr. dr. Vivi Setiawaty, M.Biomed Laboratorium Virologi – Lab. Nas Pusat Biomedis & Teknologi Dasar Kesehatan Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Telp. 021-42881758

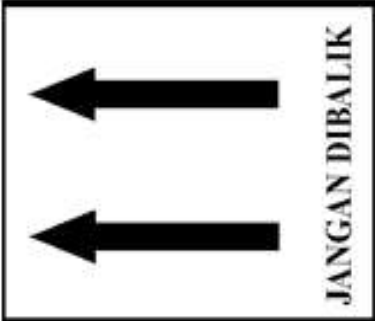
LAMPIRAN 12

Tabel Lab. Regional dan Puskesmas Sentinel

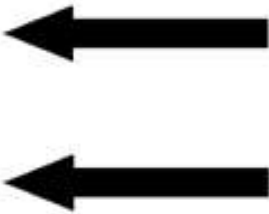
No	Nama Laboratorium	Puskesmas
1	Laboratorium Mikrobiologi FKUI	1. Puskesmas Banda Raya, NAD 2. Puskesmas Lubuk Buaya, Padang 3. Puskesmas Rumbai, Riau 4. Puskesmas Pekauman, Banjarmasin 5. Puskesmas Sukamerindu, Bengkulu
2	Laboratorium BBLK Makassar	1. Puskesmas Klandasan Ilir, Balikpapan 2. Puskesmas Waihaong, Ambon 3. Puskesmas Mopah, Merauke 4. Puskesmas Jayapura Utara, Jayapura 5. Puskesmas Tampapadang, Mamuju
3	Laboratorium Mikrobiologi FK UNHAS	1. Puskesmas Sudiang, Makassar 2. Puskesmas Denpasar Selatan I, Denpasar 3. Puskesmas Kotagede I, Yogyakarta 4. Puskesmas Birobuli, Palu 5. Puskesmas Karang Taliwang, Mataram
4	Laboratorium BBLK Palembang	1. Puskesmas Tujuh Ulu, Palembang 2. Puskesmas Pemali, Bangka Belitung 3. Puskesmas Sumur Batu, Lampung 4. Puskesmas Teladan, Medan 5. Puskesmas Padasuka, Bandung 6. Puskesmas Serpong, Tangerang Selatan
5	Laboratorium BBTCL-PP, Jakarta	1. Puskesmas Batu Aji, Batam 2. Puskesmas Pandanaran, Semarang 3. Puskesmas Sikumana, Kupang 4. Puskesmas Dinoyo, Malang 5. Puskesmas Kayon, Palangkaraya 6. Puskesmas Sungai Duren, Jambi

LAMPIRAN 13

CONTOH LABEL COOL BOX PENGIRIMAN PUSKESMAS KE LABORATORIUM REGIONAL

	<u>Kepada:</u> <u>Dr. Krisna NurAP, MS (ILI)</u> <u>Laboratorium Virologi</u> <u>Pusat Biomedis Dan Teknologi Dasar Kesehatan</u> <u>Badan Litbang Kesehatan</u> <u>Jalan Percetakan Negara 23 A</u> <u>Jakarta Pusat 10560</u> <u>Telp : 021-42887583/021-42881745</u> <u>Pengirim:</u> <u>Dr. Dadan Mulyana Kosasih</u> <u>Puskesmas Padasuka</u> <u>Jl. Padasuka No 33</u> <u>Kota Bandung 40262</u> <u>Jawa Barat</u>
	

CONTOH LABEL COOL BOX PENGIRIMAN LABORATORIUM REGIONAL KE
LABORATORIUM RUJUKAN

 JANGAN DIBALIK	PEMERIKSAAN LABORATORIUM KESEHATAN <u>Kepada:</u> <u>Dr. Krisna Nur AP, MS (ILD)</u> <u>Laboratorium Virologi</u> Pusat Biomedis Dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbang Kesehatan Jalan Percetakan Negara 23 A Jakarta Pusat 10560 <u>Telp</u> : 021-42887583/ 021-42881745 <u>Pengirim:</u> <u>DR. Andi Yasmon, S.Pi., M.Biomed</u> Laboratorium Mikrobiologi FKUI Jl. Pegangsaan Timur No.16. Jakarta Pusat - 10320 <u>Telp</u>. 021-3160491-92 Ext.16/18. Fax : 021-33010943
---	--

LAMPIRAN 14

DOKUMENTASI

1. KEGIATAN LABORATORIUM



2. KEGIATAN DI PUSKESMAS



LAMPIRAN 15

BULETIN SURVEILANS ISPA BERAT DI INDONESIA (SIBI) : Desember 2016

Data masih bersifat sementara dan dapat berubah seiring dengan penerimaan laporan

Ringkasan

Berdasarkan laporan sampai dengan tanggal 3 Desember 2016, ada 3,194 kasus ISPA Berat yang teridentifikasi oleh SIBI dengan proporsi kasus positif influenza sebesar 11% (N = 348 kasus).

I. Pendahuluan

Kegiatan ini merupakan kegiatan surveilans epidemiologi dan virologi infeksi saluran pernafasan akut (ISPA) Berat termasuk influenza musiman, kasus baru influenza seperti H5, H7, dan Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS CoV) yang dilaksanakan di enam rumah sakit di enam provinsi di Indonesia. Kegiatan SIBI bertujuan untuk mendapatkan informasi epidemiologi dan virologi ISPA Berat sebagai dasar pengambilan keputusan dalam pengendalian penyakit dalam kondisi rutin maupun pandemi.

Rumah sakit sentinel SIBI tersebut adalah:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. RSUD Wonosari, DI Yogyakarta | 4. RSUD Deli Serdang, Sumatera Utara |
| 2. RS Kanujoso, Kalimantan Timur | 5. RSUD dr. M. Haulussy, Maluku |
| 3. RSUD Bitung, Sulawesi Utara | 6. RSU Provinsi NTB, Mataram, Nusa Tenggara Barat |

Definisi kasus ISPA Berat

Demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ atau riwayat demam; dan disertai dengan semua gejala atau kondisi dibawah ini:

- Batuk;
- Gejala timbul tidak lebih dari 10 hari;
- Memerlukan perawatan rumah sakit;

Laboratorium: Uji *real time* RT-PCR dilakukan terhadap semua spesimen yang dikirimkan ke Laboratorium Nasional Balitbangkes Jakarta. Spesimen diuji untuk influenza A dan influenza B. Spesimen dengan positif influenza A, akan dilakukan uji sub tipe virus influenza A. Isolasi virus dilakukan untuk semua spesimen yang positif influenza. Hasil laboratorium juga dilaporkan ke FluNet.

Buletin ini dapat memantau tujuan khusus SIBI antara lain :

1. Diketuinya gambaran epidemiologi ISPA Berat dan influenza menurut waktu, tempat, dan orang – Tabel 1.
2. Diketuinya proporsi pneumonia dari kasus ISPA Berat – Tabel 1.
3. Diketuinya proporsi kasus influenza positif di antara kasus ISPA Berat – Tabel 2 dan Grafik 1.
4. Diketuinya karakteristik virus influenza yang beredar – Tabel 2 dan Grafik 1.
5. Diketuinya angka fatalitas kasus (CFR) ISPA Berat dan pneumonia – Tabel 1.
6. Diketuinya gambaran klinis ISPA Berat – Tabel 1.
7. Diketuinya riwayat perjalanan kasus ISPA Berat – Tabel 3.
8. Memantau kinerja surveilans setiap site sentinel – Tabel 4.

II. Hasil analisa data kegiatan SIBI (sampai dengan 3 Desember 2016)

Dari 3,194 kasus ISPA Berat, 55.5% adalah laki-laki dan 44.5% adalah perempuan. Sedangkan dari 348 kasus yang ditemukan positif influenza, proporsi laki-laki sebesar 55.5% dan perempuan 44.5%. Sebagian besar proporsi kasus ISPA Berat (36%) dan kasus positif influenza (41%) ditemukan pada kelompok umur 1 – 4 tahun (Tabel 1).

Berdasarkan gejala saat masuk, sesuai dengan kriteria definisi kasus ISPA Berat, mayoritas penderita ISPA Berat memiliki riwayat panas (99%) dan batuk (99%). Semua kasus positif influenza memiliki riwayat panas (100%) dan batuk (100%).

Pneumonia ditemukan pada 29% kasus ISPA Berat dan 20% pada kasus positif influenza. Pada anak-anak di bawah 5 tahun yang positif influenza, 17% teridentifikasi dengan gejala kejang.

Terdapat dua kasus influenza yang meninggal dunia (1%). Kasus yang meninggal berumur 54 tahun dengan diagnosa sepsis, kondisi penyerta yang dimiliki adalah ginjal kronis dan obesitas. Sedangkan kasus yang lain berumur 61 tahun dengan diagnosa Suspek TB Paru, kondisi penyerta yang dimiliki adalah diabetes, ginjal kronis, dan TB.

Cukup banyak kasus ISPA Berat yang memiliki kondisi/penyakit penyerta seperti perokok (6%), asma (4.5%), Penyakit Paru Obstruktif Kronis (2%), tuberkulosis (2%), kardiovaskular (2%), dan diabetes (2%). Sedangkan untuk pasien positif influenza, perokok (9%), asma (8%), Penyakit Paru Obstruktif Kronis (5%), kardiovaskular (3%), dan diabetes (3%) merupakan kondisi penyerta yang paling banyak terdeteksi. Berdasarkan informasi dari WHO, kondisi penyerta seperti penyakit kronis dapat memperparah penyakit influenza yang diderita (referensi: *Vaccines against influenza WHO position paper* –November 2012. Weekly Epidemiological Record, No. 47, 2012, 87, 461–476, www.who.int/wer).

Tabel 1. Karakteristik demografi, gejala, riwayat medis, dan kondisi saat keluar kasus ISPA Berat dan kasus positif influenza (sampai dengan 3 Desember 2016)

	ISPA Berat (N=3,194) n (%)	Positif Influenza (N=348) n (%)
Jenis Kelamin		
Laki-laki	1,774 (55.5)	193 (55.5)
Perempuan	1,420 (44.5)	155 (44.5)
Kelompok Umur		
< 1 tahun	932 (29.2)	43 (12.4)
1 – 4 tahun	1,153 (36.1)	143 (41.1)
5 – 14 tahun	542 (17)	79 (22.7)
15 – 49 tahun	277 (8.7)	28 (8)
50 – 64 tahun	176 (5.5)	28 (8)
>65 tahun	114 (3.6)	27 (7.8)
Gejala saat masuk*		
Riwayat panas	3,175 (99)	348 (100)
Panas $\geq 38^{\circ}\text{C}$	2,099 (66)	259 (74)
Batuk	3,178 (99)	348 (100)
Sakit tenggorokan	631 (20)	103 (30)
Sesak napas	1,625 (51)	136 (39)
Muntah	1,117 (35)	127 (36.5)
Nyeri dada pleuritik	329 (10)	48 (14)
Ronki	1,385 (43)	109 (31)
Diare	584 (18)	55 (16)
Riwayat medis*		
Perokok	185 (6)	33 (9.5)
Asma	144 (4.5)	27 (8)
Kelainan neurologis	14 (0.4)	1 (0.3)
Hamil	6 (0.2)	0 (0)
Diabetes	71 (2)	11 (3)
Ginjal Kronis	11 (0.3)	3 (1)
Tuberkulosis	63 (2)	6 (2)
Penyakit Kardiovaskular	51 (2)	10 (3)
Penyakit Paru Obstruktif Kronis	71 (2)	17 (5)
Imunosupresif	5 (0.2)	0 (0)
Penyakit Hati Kronis	6 (0.2)	0 (0)
Kelainan Hematologis	6 (0.2)	1 (0.3)
Vaksinasi flu	23 (0.7)	4 (1)
Kanker	4 (0.1)	0 (0)
Obesitas	20 (0.6)	4 (1)

Kondisi saat keluar		
Meninggal	56 (2)	2 (0.6)
Pemeriksaan X-Ray		
Dilakukan rontgen X-Ray	1,277 (40)	110 (32)
Pneumonia pada hasil rontgen X-Ray	933 (29)	70 (20)
Gejala Berat untuk anak di bawah 5 tahun*	ISPA Berat (N=2,085) n (%)	Positif Influenza (N=186) n (%)
Tarikan dinding dada	440 (21)	16 (9)
Tidak bisa minum	96 (5)	4 (2)
Kejang	231 (11)	32 (17)
Stridor	114 (5.5)	4 (2)
Kesadaran menurun	41 (2)	2 (1)

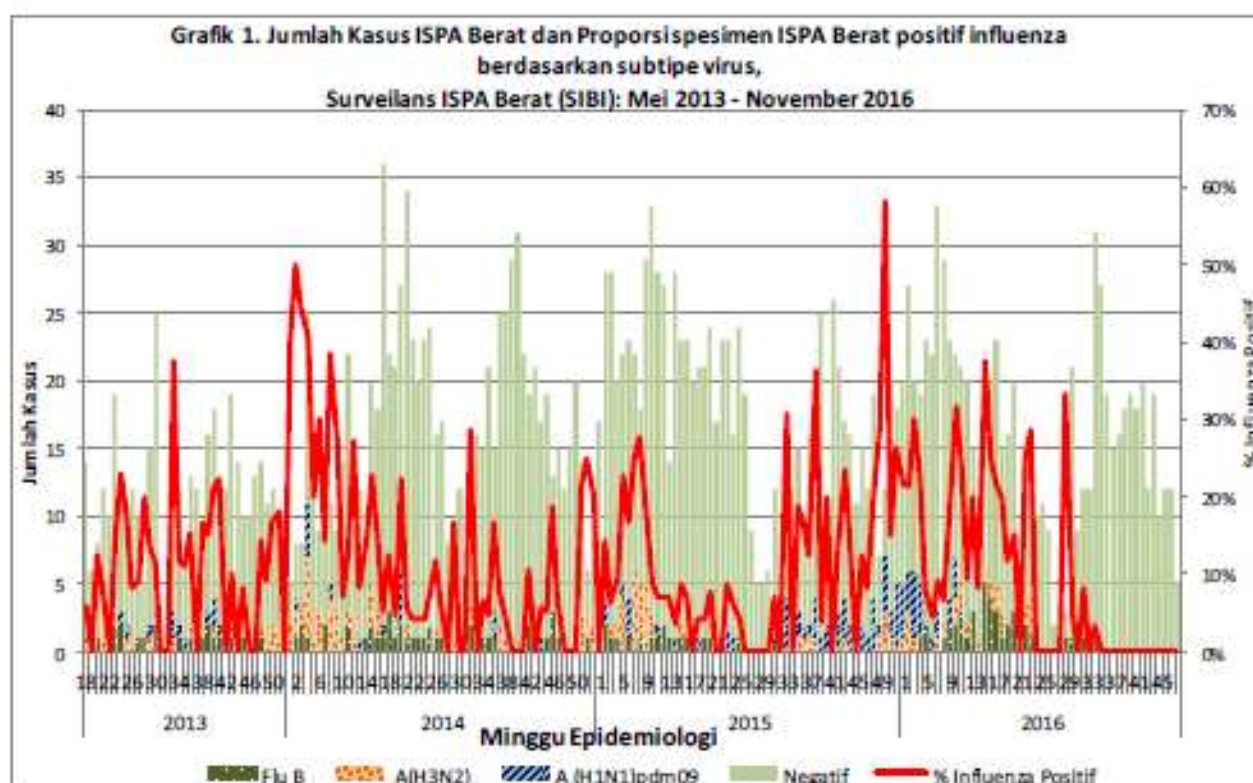
*Satu pasien bisa memiliki > 1 gejala/riwayat medis

Tabel 2. Data Surveilans ISPA Berat (sampai dengan 3 Desember 2016)

Surveilans ISPA Berat		Oktober-16	November-16	Kumulatif Sampai November 2016
Total rawat inap*		5,158	6,021	255,342
Total kasus ISPA Berat*		69 (1)	58 (1)	3,194 (1)
Total spesimen ISPA Berat diperiksa		69	58	3,038
Total spesimen ISPA Berat positif influenza		-	-	348 (11)
Subtipe Influenza				
	A(H3N2)	0	0	126 (36)
	A(H1N1)pdm09	0	0	105 (30)
	B	0	0	117 (34)
	A(H1N1)	0	0	0
	A(H5N1)	0	0	0
	Not Subtyped	0	0	0

*Laporan mingguan dari site sentinel masih ada yang belum diterima

Tabel 2 menunjukkan bahwa proporsi ISPA Berat dari total rawat inap pada bulan November 2016 (1%) sama dengan proporsi ISPA Berat pada bulan sebelumnya September 2016 (1%). Belum didapatkan hasil lab spesimen untuk bulan Oktober-November, sehingga proporsi positif influenza pada bulan Oktober-November belum bisa diketahui.



Berdasarkan Grafik 1 terlihat bahwa kasus positif influenza tertinggi ditemukan pada minggu ke 2 tahun 2014 dengan proporsi sebesar 50% dan minggu ke 50 tahun 2015 dengan proporsi 58%. Influenza B, A(H3N2), dan A(H1N1)pdm09 merupakan virus influenza yang terdeteksi melalui sistem ini.

Tabel 3. Riwayat perjalanan kasus ISPA Berat pada bulan November 2016

Rumah Sakit	Jumlah Kasus SARI	Ada Riwayat Perjalanan	Negara	Tidak Ada Riwayat Perjalanan	Riwayat Perjalanan yang Tidak Tercatat
RSUD Wonosari	11	0 (0)	-	10 (91)	1 (9)
RSUD Kanujoso	9	0 (0)	-	9 (100)	0 (0)
RSUD Bitung	2	0 (0)	-	2 (100)	0 (0)
RSUD Deli Serdang	17	0 (0)	-	17 (100)	0 (0)
RSU Prov NTB	7	0 (0)	-	7 (100)	0 (0)
RSUD dr. M. Haulussy	12	0 (0)	-	12 (100)	0 (0)

Tabel 3 menunjukkan tidak ada kasus ISPA Berat yang memiliki riwayat perjalanan pada bulan November 2016. Tidak ada kasus positif MERS CoV atau influenza A(H7N9).

Setiap site harus memastikan bahwa semua formulir kasus mendokumentasikan riwayat perjalanan. Kolom 'Riwayat Perjalanan yang Tidak Tercatat' pada tabel 3 menyediakan informasi proporsi kasus ISPA Berat yang tidak tercatat riwayat perjalanannya. Pada bulan November 2016, ada satu kasus dari RSUD Wonosari yang tidak mendokumentasikan riwayat perjalanannya.

Tabel 4. Indikator kinerja SIBI per rumah sakit sentinel (sampai dengan 3 Desember 2016)

Rumah Sakit	Rawat Inap	A	B	C	D					E
		Kasus ISPA Berat (%)	Kasus ISPA Berat dengan Spesimen (%)	Positif Influenza (%)	Positif Flu B	Positif Flu A	A (H1N1) pdm09	A (H3N2)	Negatif	Pending
RSUD Wonosari	29,138	530 (1.8)	505 (95)	68 (13)	24	44	22	22	437	36
RSUD Kanujoso	79,919	820 (1.0)	793 (97)	106 (13)	36	70	33	37	687	39
RSUD Bitung	33,310	325 (0.9)	278 (86)	30 (11)	6	24	8	16	248	16
RSUD Deli Serdang	39,294	470 (1.2)	422 (90)	60 (14)	28	32	14	18	362	34
RSU Prov NTB	41,715	794 (1.9)	792 (99)	71 (9)	19	52	23	29	721	18
RSUD dr. M. Haulussy	34,404	255 (0.7)	248 (97)	13 (5)	4	9	5	4	235	10
Total	257,780	3,194 (1.2)	3,038 (95)	348 (11)	117	231	105	126	2,690	153

- A. Sampai dengan 3 Desember 2016, proporsi kasus ISPA Berat paling besar (1.9%) ditemukan di RSU Prov. NTB. Sedangkan proporsi kasus ISPA Berat paling kecil (0.7%) ditemukan di RSUD dr. M. Haulussy. Indikator yang penting untuk kinerja deteksi kasus adalah proporsi (%) kasus ISPA Berat dari jumlah rawat inap. Secara umum, hal ini seharusnya $\geq 1\%$ dan dapat meningkat menjadi 5% saat puncak musim influenza atau penyakit pernapasan lainnya.
- B. Indikator kelengkapan data adalah proporsi kasus dengan spesimen, yang menandakan bahwa (a) kapasitas petugas dalam meyakinkan pasien supaya bersedia diambil spesimennya, dan (b) kapasitas untuk mengumpulkan, mengambil, dan menyimpan spesimen secara benar ke laboratorium. RSUD Bitung (86%) mempunyai proporsi kasus dengan spesimen yang paling rendah.
- C. Proporsi positif influenza dari kasus dengan spesimen memberikan informasi tentang kegiatan influenza di daerah tersebut. Hal ini juga dapat menjadi indikator kualitas spesimen dimana jika proporsi positif influenza tetap rendah dalam periode waktu yang lama, hal tersebut dapat menandakan bahwa kualitas spesimen kurang baik. Kualitas spesimen dipengaruhi oleh teknik pengambilan spesimen, penyimpanan spesimen (lama dan suhu), pengiriman spesimen (lama dan suhu) dan juga teknik PCR dan reagent yang digunakan.
- D. Tipe virus yang terdeteksi di setiap site memberikan informasi tentang variasi kegiatan virus per wilayah. Informasi ini bermanfaat untuk pengenalan vaksinasi di kemudian hari.
- E. Kolom hasil laboratorium tentang "pending" bermanfaat untuk memberitahukan ke site tentang jumlah kasus yang seharusnya sudah mempunyai hasil laboratorium. Setiap site harus mendokumentasikan hasil laboratorium untuk setiap kasus ISPA Berat di dalam log book. Kategori "pending" akan membantu site untuk memeriksa jumlah hasil laboratorium yang akan diterima.

Buletin SIBI ini dapat diakses secara online di: <http://ispa.pppl.depkes.go.id/>