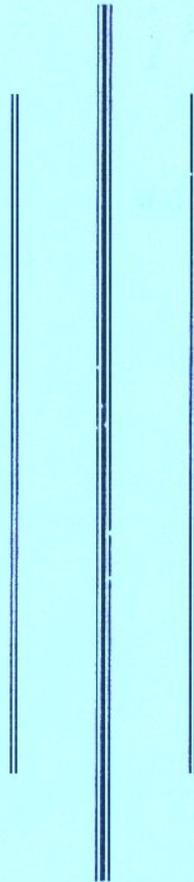




LAPORAN

KARAKTERISTIK GENETIK VIRUS MEASLES PENYEBAB KLB DI INDONESIA TAHUN 2010



KEMENTERIAN KESEHATAN RI.
PUSLITBANG BIOMEDIS DAN FARMASI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
JL. PERCETAKAN NEGARA 29
JAKARTA 10560

Subangkit

Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Badan Litbang Kesehatan
Kementerian Kesehatan

KARAKTERISTIK GENETIK VIRUS MEASLES PENYEBAB KLB DI INDONESIA TAHUN 2010

IV + 42 Halaman, 3 Tabel, 10 gambar, 1 Lampiran

Cakupan imunisasi tingkat nasional telah cukup tinggi, tetapi masih terjadi wabah atau KLB (Kejadian Luar Biasa) penyakit campak di Indonesia. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya perbedaan antara vaksin campak yang digunakan dengan virus campak liar yang ada. Hal tersebut menimbulkan pertanyaan tentang susunan genetik terutama gen N pada virus campak liar yang berhasil di isolasi dari spesimen wabah yang terjadi.

Penelitian ini dilakukan di Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dengan menggunakan koleksi virus campak antara tahun 2004-2010 sebanyak 31 isolat dari 17 Propinsi.

Hasil analisis terhadap gen N menunjukkan terdapat 2 genotipe virus campak liar di Indonesia yang masih beredar yaitu genotipe D9 dan G3 antara tahun 2004-2010. Provinsi Kalimantan Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, Lampung, dan Maluku Utara, serta Sulawesi Selatan masih beredar 2 Genotype. Sedangkan propinsi Banten, DKI, Jawa Barat, NAD, Riau, Sumsel, Sumbar dan Sumut dideteksi terdapat Genotype D9. Propinsi Babel, Kalimantan Tengah dan Kalimantan Timur hanya dideteksi hanya terdapat genotype G3. Analisis gen H menunjukkan bahwa terdapat mutasi 10 Asam amino dari 156 (Posisi 406-562). Melalui filogeni yang terbentuk berdasarkan gen N, terlihat bahwa terdapat perbedaan sekuen antara virus campak liar dengan vaksin campak yang diduga dapat menyebabkan masih seringnya tingkat kesakitan campak di Indonesia

DAFTAR ISI

| | |
|---------------------------------------|-----|
| IV. BASE DAN PEMBAHASAN | Hal |
| V. SAMPULAN DAN SARAN | 37 |
| DAFTAR ISI | i |
| DAFTAR TABEL | ii |
| DAFTAR GAMBAR | iii |
| BAB | |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 1. Sejarah virus campak | 5 |
| 2. Struktur virus campak | 6 |
| 3. Protein-protein virus campak | 8 |
| 4. Replikasi virus campak | 9 |
| 5. Sifat virus campak | 9 |
| 6. Aspek klinis | 10 |
| 7. Diagnosis laboratorium | 13 |
| 8. Epidemiologi | 15 |
| 9. Epidemiologi molekuler | 18 |
| 10. Vaksin campak | 20 |
| 11. Filogenetik | 21 |
| III. METODOLOGI PENELITIAN | |
| 1. Kerangka Pikir | 23 |
| 2. Tempat dan Waktu Penelitian | 24 |
| 3. Disain Penelitian | 24 |
| 4. Jenis Penelitian | 24 |
| 5. Populasi dan Sampel | 24 |
| 6. Cara Pemilihan dan Estimasi Sampel | 25 |
| 7. Kriteria Inklusi dan Eksklusi | 25 |
| 8. Variabel | 25 |
| 9. Cara Pengumpulan Data | 25 |

| | |
|--|----|
| 10. Bahan dan Cara Kerja | 25 |
| 11. Rencana Pengolahan dan Analisis Data | 27 |
| 12. Definisi Operasional..... | 27 |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 29 |
| V. SIMPULAN DAN SARAN | 37 |
| A. Kesimpulan | 37 |
| B. Saran | 37 |
| DAFTAR PUSTAKA | 39 |
| LAMPIRAN | 42 |

DAFTAR TABEL

TABEL

Halaman

Naskah

| | |
|--|----|
| 1. Perbandingan jumlah nukleotida virus campak | 7 |
| 2. Estimasi jumlah kematian kasus campak di dunia tahun 2006 | 17 |
| 3. Jumlah Isolat Campak antara tahun 2004-2010 | 29 |
| 4. Gambaran Klinis Penyakit Campak | 31 |
| 5. Insidensi dan Prevalensi Penyakit Campak | 35 |
| 6. Dimensi Genotipe Genotipe Var. Campak | 38 |
| 7. Gambaran hasil PCR terhadap gen | 39 |
| 8. Gambaran hasil PCR terhadap gen | 39 |
| 9. Peta penyebaran virus campak-ur antara tahun 2004-2010 | 39 |
| 10. Perbandingan Asuln Aminid antara Virus Campak Yakutia dan Virus campak Ur | 42 |

DAFTAR GAMBAR

| GAMBAR | | Halaman |
|--------|--|---------|
| | Naskah | |
| 1. | Struktur Virus Campak | 6 |
| 2. | Struktur RNA Virus Campak | 7 |
| 3. | Gambaran Klinik Penyakit Campak | 10 |
| 4. | Gambaran Klinik Penyakit Campak | 11 |
| 5. | Hubungan Perjalanan Penyakit Campak | 15 |
| 6. | Distribusi Geografik Genotipe Virus Campak | 18 |
| 7. | Gambar Hasil PCR terhadap gen N | 31 |
| 8. | Gambar Hasil PCR terhadap gen H | 31 |
| 9. | Pohon Phylogenetik virus campak liar antara tahun 2004-2010 | 33 |
| 10. | Perbedaan Asam Amino antara Virus Campak Vaksin dan Virus campak Liar | 36 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang Penelitian

Penyakit Measles disebabkan oleh virus measles atau biasa disebut virus measles. Virus measles termasuk genus Morbillivirus, familia Paramyxoviridae. Penyakit ini sangat menular dan akut. Bila terjadi pada balita terutama anak-anak dengan gizi buruk maka dapat terjadi komplikasi. Komplikasi yang sering terjadi adalah bronchopneumonia, gastroenteritis, dan otitis media sedangkan ensefalitis jarang terjadi tetapi dapat berakibat fatal, yaitu kematian^{1,2,5,9,10}.

Di negara sedang berkembang hampir semua ibu telah terserang penyakit measles pada masa kecilnya sehingga bayi yang dilahirkan mempunyai maternal antibodi terhadap penyakit measles, tetapi kadar antibodi tersebut berangsur-angsur menurun sehingga perlindungan yang didapat hanya 6-9 bulan pertama kelahiran. Oleh karena itu, perlu pencegahan penyakit measles dilakukan dengan memberi satu dosis vaksin measles yang telah dilemahkan. Di Indonesia vaksin diberikan setelah anak berumur 9 bulan^{2,4,5,10}.

Dalam rangka tahapan menurunkan jumlah kasus penyakit measles, Pemerintah Indonesia (Departemen Kesehatan) telah melakukan program-program vaksinasi. Keberhasilan pencegahan penyakit measles dengan cara imunisasi sudah banyak terbukti dengan

menurunnya angka kesakitan dan angka kematian yang disebabkan oleh penyakit ini. Cakupan imunisasi measles pada tingkat nasional sudah cukup tinggi, mencapai 90% tetapi masih ditemukan KLB (Kejadian Luar Biasa) measles di Indonesia. Dilaporkan selama tahun 2007 terdapat 114 KLB measles yang terjadi di Indonesia dengan kecenderungan meningkat selama 3 tahun terakhir^{3,4}.

Salah satu penyebab terjadinya KLB tersebut kemungkinan adanya perbedaan antigenesitas antara strain vaksin yang digunakan dengan strain virus measles liar yang beredar di Indonesia, sehingga antibodi yang terbentuk pada anak yang mendapat imunisasi kurang spesifik terhadap antigen yang dipunyai oleh virus measles liar yang beredar di Indonesia.^{11, 12, 13}

Virus measles merupakan virus yang *monotypic* dengan variabilitas genetik yang cukup besar. Karakterisasi genetik dari virus tersebut didasarkan pada analisis sekuens gen N untuk menentukan genotype dan sekuens gen H terkait dengan antigenesitas dan netralisasi. Berdasarkan standar pengklasifikasian dan protokol analisis genetik dari WHO, genotype virus measles liar ditentukan oleh sekurang-kurangnya 456 nukleotida pada ujung 3'-COOH gen N. Analisis genetik dari virus tersebut akan memberikan gambaran yang komprehensif mengenai karakteristik genetik dan distribusi genotype virus measles liar di seluruh dunia khususnya di Indonesia^{1,5,10,11}. Untuk itu, setiap terjadi KLB

penentuan genotipe virus measles sangat diperlukan untuk mengetahui jenis karakteristik virus measles penyebab.

Hasil sekuensing tersebut diharapkan dapat dianalisis lebih lanjut secara keilmuan genetika dan bioinformatika dengan menggunakan software MEGA Versi 4 atau Bioedit, sehingga mendapat gambaran tentang karakteristik genetik virus measles liar yang ada di Indonesia.^{6,7,8}

Karakteristik molekuler virus measles mempunyai peran penting untuk surveilans virus measles. Data molekuler yang ada dapat digunakan untuk mengetahui distribusi geografik virus measles dan melacak penyebaran virus. Selain digunakan juga untuk memastikan efektifitas vaksinasi guna menghentikan terjadinya transmisi kejadian endemik measles. WHO merekomendasikan bahwa pemeriksaan genetik measles dilakukan pada semua fase pengendalian virus measles (reduksi dan eliminasi), agar mendapatkan gambaran yang secara global distribusi genotipe virus measles^{10,13}.

1.2. Pertanyaan Penelitian

- 1.2.1. Bagaimana gambaran karakteristik genetik virus measles yang ada di Indonesia?
- 1.2.2. Bagaimana gambaran genotipe virus measles di Indonesia?
- 1.2.3. Apakah terdapat perbedaan secara genetik antara virus measles liar dan strain vaksin yang ada?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mendapat gambaran tentang karakteristik genetik virus measles liar yang ada di Indonesia

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1.1. Mengisolasi virus measles liar penyebab KLB di Indonesia

1.3.2.1.2. Mendapatkan susunan nukleotida virus measles liar terutama gen Nukleoprotein dan gen Haemagglutinin

1.3.2.1.3. Mengidentifikasi dan memetakan genotype virus measles liar di Indonesia

1.4. Manfaat

1.5.1. Diperoleh peta mengenai genotype virus measles liar di Indonesia

1.5.2. Dapat digunakan sebagai data dasar untuk pengembangan vaksin di masa depan

1.5.3. Membantu desain diagnostik secara molekular untuk deteksi virus measles di Indonesia

1.5.4. Membantu studi epidemiologi molekuler lebih dalam, untuk mendorong Indonesia memasuki tahapan Eradikasi Measles

BAB. II

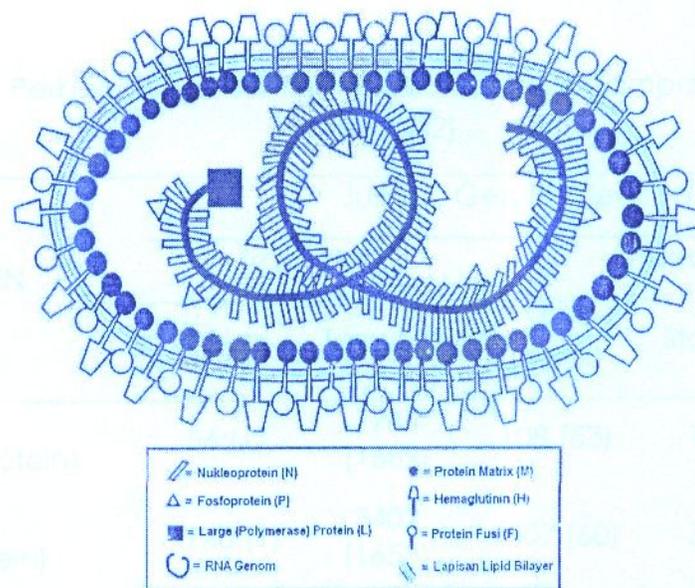
TINJAUAN PUSTAKA

1. Sejarah Virus Campak

Virus campak atau biasa disebut measles (dari bahasa latin, *Misellus* = *miserable* yang berarti menyedihkan) atau Rubeola (dari bahasa latin *Rubeolus* = *Reddish* yang berarti kemerahan) atau biasa juga dikenal sebagai *Morbili* (dari bahasa latin *Morbus* yang berarti penyakit). Virus ini telah dikenal beberapa ratus tahun yang lalu. Catatan medis pertama tentang virus ini dibuat oleh dokter Persia yang bernama Ibnu Razi (Rhazes) yang menulis buku yang berjudul "*Smallpox and Measles*" tahun 865-932. Sedangkan catatan epidemiologi penyakit campak pertama kali ditulis oleh Panum pada tahun 1864, setelah melakukan penyelidikan wabah campak di pulau Faroe. Dia berkesimpulan bahwa campak adalah penyakit menular yang ditularkan dari manusia ke manusia melalui saluran pernapasan. Panum berpendapat bahwa penyakit ini lebih berbahaya dari cacar karena lebih banyak menyebabkan kematian. (Richman *et al.*, 2002).

2. Struktur Virus Campak

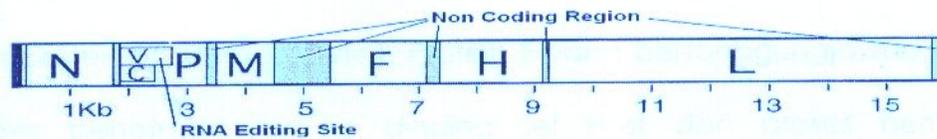
Virus campak termasuk familia paramyxovirus (Latin *myxa* = *Mucus*), genus Morbillivirus. Berbentuk sferik (bulat) dengan diselubungi *envelope* dengan ukuran diameter berkisar 100-200 nm, dengan rata-rata diameter 150 nm seperti yang terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Virus Campak (Richman *et al.*, 2002).

Virus campak terdiri atas untai tunggal RNA tidak bersegmen dan gennya tersusun secara linear, yang dipisahkan oleh *intergenic trinucleotide*, GAA. Tiap gen mengandung satu *open reading frame* (kecuali Gen P), *transcriptional start* dan *stop signal*, dan *Polyadenilation signal*. Seperti yang terlihat pada Gambar 2 dan Tabel 1, Genom virus

campak mengandung 15.894 nukleotida, yang terdiri atas 6 gen yaitu 3'-leader N, P/C/V, M, F, L-5" (Dwonling, 1986).



Gambar 2. Struktur RNA Virus Campak (Richman et al., 2002).

Tabel 1. Perbandingan Jumlah Nukleotida Virus Campak (Richman et al., 2002)

| GEN | Jumlah Gen (nukleotida) | | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------|--------------|-----------------|
| | Transkripsi | | Translasi | |
| | Inisiasi | Terminasi | Start (awal) | Stop (berhenti) |
| Gen N (Nukleoprotein) | 56 (1) | 1744 (1689) | 108 (53) | 1685 (1630) |
| Gen P (fosfoprotein) | 1748 (1) | 3402 (1655) | 1807 (60) | 3330 (1583) |
| C | | | 1829 (60) | 2389 (642) |
| V | | | 1807 (60) | 2705 (958) |
| Gen M (Matriks) | 3406 (1) | 4871 (1466) | 3438 (33) | 4445 (1040) |
| Gen F (Fusi) | 4875 (1) | 7247 (2373) | 5449 (575) | 7110 (2236) |
| Gen H (Hemaglutinin) | 7251 (1) | 9208 (19858) | 7271 (21) | 9124 (1874) |
| Gen L (large) | 9212 (1) | 15854 (6643) | 9234 (23) | 15785 (6574) |

3. Protein-protein Virus Campak

Membran *envelope* yang menyelubungi virus campak sangat penting terhadap patogenesis karena mengandung protein F (Fusion) dan protein H (Hemagglutinin). Protein F yang bertanggungjawab untuk proses penetrasi virus ke dinding sel Host dan proses hemolisis, sedangkan protein H bekerja untuk proses penempelan atau adsorpsi virus terhadap sel (Dwonling, 1986).

Gen N (nukleoprotein) berfungsi untuk mengkode struktur utama protein virus. Protein N sangat penting untuk pembentukan cetakan untuk proses transkripsi, replikasi dan pembentukan virion baru. Gen N merupakan bagian yang penting untuk proses identifikasi genotipe virus campak (WHO, 2006 dan 2007).

Gen P yang berfungsi sebagai cetakan untuk produksi Fosfoprotein yang mempunyai tugas sebagai pengatur proses transkripsi virus. Gen P juga menyandikan pembentukan protein C dan V. Protein C berfungsi sebagai pengatur sintesis RNA, sedangkan protein V berfungsi sebagai pengatur replikasi Genom virus (Richman, *et al.*, 2002).

Protein L (*Large*=Besar) memiliki jumlah asam amino yang paling banyak dibandingkan dengan protein yang lain. Protein L berfungsi sebagai pengkatalisis komponen RNA polimerase pada saat proses sintesis virus. Gen M mengkode matriks protein yang berfungsi pada pembentukan dinding *envelope* virus. Protein M juga berfungsi sebagai maturasi dari virion (Richman, *et al.*, 2002).

4. Replikasi Virus Campak

Sel-sel yang diinfeksi oleh virus campak akan mengadakan fusi dengan sel-sel di sekitarnya baik yang terinfeksi dengan virus tersebut maupun yang tidak terinfeksi (Soedarto, 1988). Setelah proses adsorpsi permukaan sel melalui bantuan Hemaglutinin, virus menembus masuk dan melepaskan selubung envelopenya, kemudian virion RNA polymerase mentranskripsikan *negatif-strand* RNA menjadi mRNA (Levinson dan Jawetz, 1992).

Berbagai mRNA yang dihasilkan kemudian ditranslasikan menjadi protein virus spesifik. Nukleoprotein terbentuk, Matriks protein kemudian menggabungkannya dengan *envelope*, dan untuk selanjutnya virus baru keluar melalui membran sel (Levinson dan Jawetz, 1992).

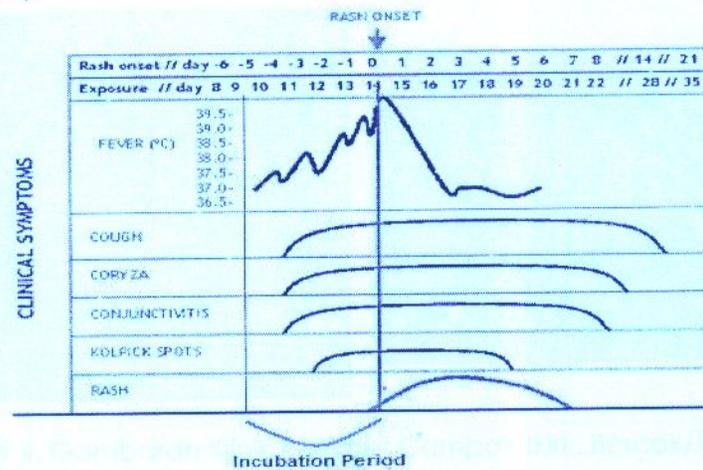
5. Sifat Virus Campak

Virus campak dapat bertahan hidup di permukaan benda selama 2 jam pada suhu normal. Virus ini sangat peka terhadap panas, dan inaktif pada suhu 56°C setelah 30 menit. Virus ini juga inaktif dalam larutan eter maupun kloroform, dalam suasana asam (pH kurang dari 5) dan suasana alkalis (pH lebih dari 10), sinar ultra violet dan cahaya. Virus ini mudah dimatikan dengan banyak desinfektan seperti natrium hipoklorit 1%, alkohol 70% dan formalin (Soedarto, 1988).

6. Aspek Klinis

Penyakit campak adalah penyakit yang sangat menular. Anak-anak yang belum mengalami vaksinasi sangat rentan untuk terserang penyakit campak. Penyakit ini ditularkan melalui droplet, kontak langsung dengan sekret nasal dan sekret tenggorok penderita. Setelah menginfeksi, virus campak masuk ke dalam epitel saluran pernapasan dan menyebar ke pembuluh getah bening.

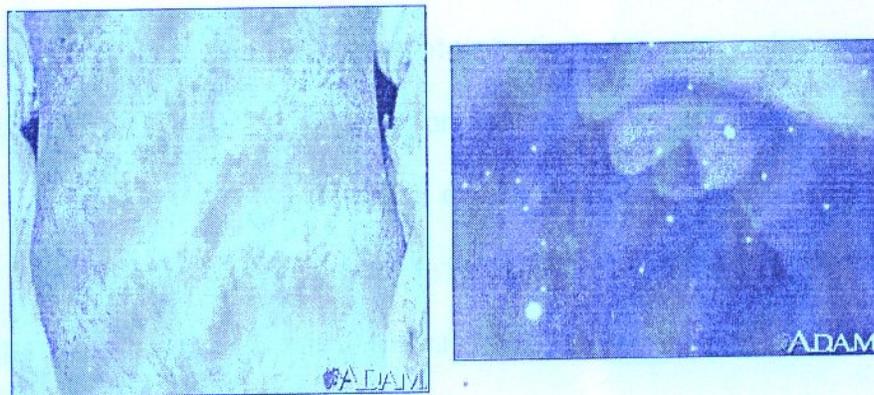
Setelah 2-3 hari terjadi replikasi, viremia primer terjadi saat virus menyebar ke sistem retikuloendotelial, untuk kemudian terjadi viremia sekunder setelah 5-7 hari yang memungkinkan terjadinya replikasi virus pada kulit, konjungtiva, saluran pernapasan dan organ lain termasuk limpa, timus, paru-paru, hati dan ginjal. Puncak tertinggi viremia terjadi 11-14 hari setelah infeksi dan cepat menurun setelah beberapa hari (WHO, 2007).



Gambar 3. Gambaran Klinik Penyakit Campak (WHO,

Seperti yang terlihat pada gambar 3, masa inkubasi (saat sampai terbentuknya *rash*) penyakit campak adalah 9-14 hari dengan rata-rata 10 hari. Perjalanan penyakit dibagi menjadi 3 stadium, yaitu : stadium prodormal, stadium erupsi dan stadium konvalesen.

Stadium Prodormal berlangsung selama 3-5 hari. Disertai batuk, demam, *coryze* yaitu hidung mengeluarkan air terus menerus dan konjungtivitis dengan fotofobia. Sekitar 2-3 hari sebelum stadium ini berakhir, akan timbul bercak koplik (makula kecil berwarna merah atau ulkus dengan pusat yang berwarna putih kebiruan) di selaput lendir pipi yang berhadapan dengan premolar, yang merupakan tanda khas untuk penyakit campak. Bercak ini merupakan bercak bintik-bintik putih keabu-abuan dengan eritema di daerah sekitarnya (Richman, *et al.*, 2002).



Gambar 4. Gambaran Klinik Penyakit Campak (kiri : Bercak/Ruam Merah pada punggung; Kanan : Koplik Spot). Sumber : www.adam.com

Stadium erupsi ditandai dengan timbulnya demam tinggi (40-41°C) disertai ruam atau *rash* (bercak merah) di kulit mulai lateral atas daerah tengkuk, menjalar ke telinga dan pipi bagian posterior. Kemudian meluas ke bagian muka, leher, dan lengan atas. Biasanya setelah 2-3 hari ruam sudah mencapai anggota gerak bawah, kemudian akan menghilang sesuai dengan urutan timbulnya. Pada orang dewasa, ruam kulit dapat lebih hebat dan komplikasi lebih sering terjadi, sedangkan bayi yang masih mempunyai antibodi maternal, ruam mungkin saja tidak timbul (Richman, *et al.*, 2002).

Pada stadium konvalesen, sesudah ruam kulit mencapai maksimum, demam dan malaise akan menghilang dan ruam akan meninggalkan bekas berupa bintik-bintik hitam dengan permukaan bersisik halus. Keadaan ini khas untuk campak. Bintik-bintik ini akan menghilang antara 7-10 hari. Jika tidak ada komplikasi, maka gejala-gejala lain akan menghilang setelah timbul ruam, selanjutnya akan sembuh tanpa gejala sisa (Richman, *et al.*, 2002).

Meskipun pada umumnya campak adalah penyakit yang jinak dan sembuh dengan sendirinya, tetapi kadang-kadang dapat terjadi komplikasi. Komplikasi berat akibat infeksi sekunder oleh bakteri seperti bronkhitis, pneumonia. Hal ini dikarenakan akibat dari infeksi campak sehingga saluran pernafasan menjadi rentan terhadap kuman (Riddell dan Michael, 2005).

Komplikasi kasus pneumonia dilaporkan terjadi 5-10% dari kasus campak, sedangkan infeksi telinga bagian tengah sebesar 5-15%. Ensefalitis, diare akut, dan infeksi telinga bagian tengah (otitis media) juga merupakan salah satu komplikasi berat yang dapat ditimbulkan oleh penyakit campak. Ensefalitis terjadi sekitar 1/1000 kasus campak, tetapi tidak ada korelasi antara beratnya infeksi akibat campak dengan timbulnya komplikasi neurologik. Komplikasi-komplikasi yang terjadi seringkali menyebabkan kematian bila dibandingkan oleh penyakit campak itu sendiri (Levinson dan Jawetz, 1992; Richman *et al.*, 2002; Riddell dan Michaelal, 2005).

Virus campak dapat juga menimbulkan kematian pada 10% penderita. Pada wanita hamil yang menderita campak, sekitar 20% akan mengalami abortus tetapi tidak ada efek teratogenik seperti yang ditimbulkan oleh virus Rubella. Miokarditis juga merupakan komplikasi pada sekitar 20% penderita yang umumnya adalah reversibel (Soedarto, 1988).

7. Diagnosis Laboratorium

Ada banyak cara untuk diagnosis secara laboratorium penyakit campak, dari mulai teknik konvensional sampai yang berbasis studi molekuler. Berdasarkan bahan dasar yang akan diperiksa, diagnosis laboratorium yang digunakan untuk konfirmasi kasus campak dibagi menjadi 3, yaitu :

1. Pemeriksaan Antibodi (immunoglobulin)

Dilakukan untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap virus campak di dalam serum penderita. Termasuk di dalamnya adalah pemeriksaan IgM Spesifik terhadap virus campak dan pemeriksaan sero konversi serum IgG (Terjadi kenaikan 4 kali atau lebih antara serum akut dan konvalesen) (Kalter, 1963)

Teknik yang dilakukan untuk diagnosis ini bermacam-macam dari yang bersifat konvensional seperti HI (Haemagglutinasia Inhibisi), CF (Complement Fixation Test) dan Microneutralization. Tetapi metode yang paling sering dilakukan adalah secara ELISA (*Enzym Linked Immuno Sorbent Assay*) (WHO, 2007).

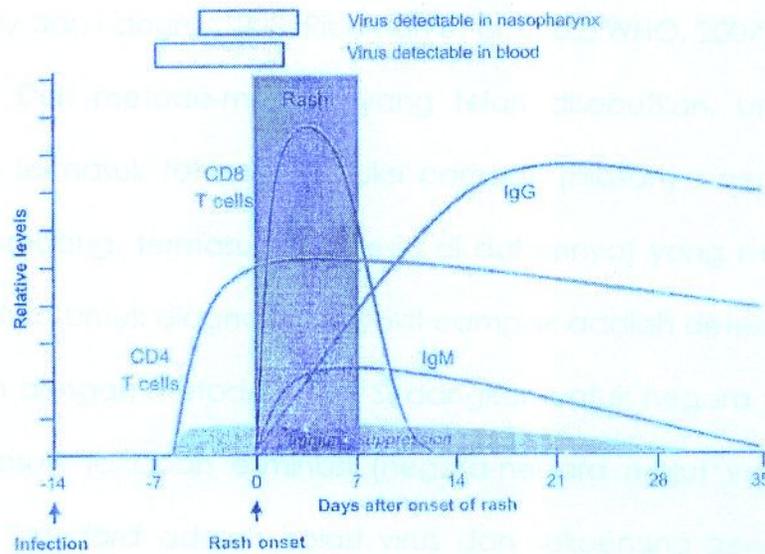
Metode ELISA paling sering dilakukan karena biaya yang murah dan teknik yang dilakukan juga mudah (Kalter, 1963; Mahy dan Kangro, 1992; Richman *et al.* 2002; WHO, 2007).

2. Pemeriksaan Isolasi/Kultur Virus

Dilakukan untuk mendeteksi adanya virus campak dalam spesimen yang diperiksa. Metode yang digunakan adalah secara isolasi biakan jaringan, yang pada prinsipnya bahwa virus tidak dapat hidup bebas, sehingga diperlukan sel inang untuk pertumbuhannya. Sel inang yang biasa digunakan untuk biakan jaringan isolasi virus campak adalah Sel Vero yang berasal dari Sel

Ginjal Monyet Hijau Afrika (*Cercophitecus aethiops*) atau Sel B95a yang berasal dari sel Lymphoblastoid sel B Marmoset (Genus *Callithrix*).

Metode isolasi sangat jarang dilakukan dikarenakan teknik yang dilakukan cukup sulit, memerlukan tempat dan alat yang khusus serta biaya cukup mahal (Kalter, 1963; Mahy dan Kangro, 1992; Richman *et al.* 2002; WHO, 2007).



Gambar 5. Gambar Hubungan Perjalanan Penyakit Campak dengan Bahan Deteksinya

3. Pemeriksaan Bahan Genetik

Dilakukan untuk mendeteksi adanya bahan genetik virus dalam spesimen. Sedikit berbeda dengan teknik isolasi, pemeriksaan bahan genetik tidak memerlukan virus hidup, cukup hanya bahan genetik dari virus yang dimaksud saja.

Teknik yang dilakukan untuk diagnosis ini adalah RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymeration Chain Reaction*) dan sekuensing genom virus campak.

Bila ditinjau dari sisi akurasi diagnosis, teknik ini lebih akurat bila dibandingkan dengan metode-metode yang lain, tetapi karena membutuhkan biaya yang mahal, maka jarang sekali dilakukan (Mahy dan Kangro, 1992; Richman *et al.* 2002; WHO, 2007).

Dari metode-metode yang telah disebutkan, untuk negara yang termasuk tahapan reduksi campak (biasanya negara-negara berkembang, termasuk Indonesia di dalamnya) yang menjadi *Gold Standard* untuk diagnosis penyakit campak adalah deteksi IgM pada serum dengan metode ELISA. Sedangkan untuk negara yang sudah memasuki tahapan eliminasi (negara-negara maju) yang menjadi *Gold Standard* adalah isolasi virus dan sekuensing genom (Apsari, 2006; WHO, 2007)

8. Epidemiologi

Sebelum adanya program vaksinasi, penyakit campak selalu menjadi penyakit yang biasa menginfeksi anak-anak. Berbeda pada negara maju, tingkat kesakitan penyakit campak sangat tinggi pada negara-negara berkembang. Hampir 20 juta orang terserang penyakit ini. Dilaporkan oleh WHO bahwa pada tahun 2006 estimasi tingkat kematian akibat penyakit campak sebanyak 242.000 orang; artinya

terdapat sekitar 663 kematian setiap harinya; 27 kematian setiap jamnya akibat penyakit campak. Pada negara yang sudah bebas penyakit campak, biasanya kasus yang terjadi adalah kasus "impor" (WHO, 2006).

Pada pemukiman padat penduduk, penyakit campak menginfeksi anak-anak usia 3-4 tahun. Sedangkan untuk pemukiman yang lebih jarang penduduknya, insiden penyakit terjadi paling tinggi umur 5-10 tahun. Biasanya penyakit ini disebarkan saat anak-anak masuk ke sekolah.

Tabel 2. Estimasi jumlah kematian kasus campak di dunia tahun 2006
(WHO, 2007)

| NO. | Regional | Estimasi kematian akibat campak | Range |
|-----|---------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1 | Afrika | 36.000 | (26.000-49.000) |
| 2 | Amerika | < 1.000 | - |
| 3 | Mediterania | 23.000 | (16.000-34.000) |
| 4 | Eropa | < 1.000 | - |
| 5 | Asia Tenggara | 178.000 | (128.000-234.000) |
| 6 | Pasifik Barat | 5.000 | (3000-7000) |
| | Total | 242.000 | (173.000-325.000) |

Dari Tabel 2, dapat dilihat bahwa estimasi jumlah kematian akibat penyakit campak adalah tertinggi untuk negara-negara berkembang. Asia tenggara menduduki peringkat pertama dengan total estimasi kematian sebanyak 178.000 jiwa. Sedangkan untuk negara-negara maju

(benua Amerika, Pasifik barat dan Eropa) estimasi tingkat kematian penyakit campak adalah sangat kecil yaitu tidak lebih dari 5.000 jiwa

9. Epidemiologi Molekuler

Karakteristik molekuler virus campak mempunyai peran penting untuk surveilans virus campak. Data molekuler yang ada dapat digunakan untuk mengetahui distribusi geografik virus campak dan melacak penyebaran virus. Selain digunakan juga untuk memastikan efektifitas vaksinasi guna menghentikan terjadinya transmisi kejadian endemik campak. WHO merekomendasikan bahwa pemeriksaan genetik campak dilakukan pada semua fase pengendalian virus campak (reduksi dan eliminasi), agar mendapatkan gambaran yang secara global distribusi genotipe virus campak (WHO, 2007).

WHO telah menunjuk 2 Bank strain virus campak; yaitu CDC (Center Disease Control) yang berada di Amerika Serikat dan HPA (Health Protection Agency) yang bertempat di Inggris. Adapun tugas dari organisasi di atas adalah untuk menganalisis, menyimpan, menentukan dan memverifikasi strains virus campak. Data yang dihasilkan disimpan/dimasukan pada Gen Bank dan juga ke WHO (WHO, 2007).

WHO telah mengeluarkan panduan untuk penamaan virus campak pada tahun 1988, termasuk juga di dalamnya tentang metode laboratorium untuk menentukan karakteristik genetik virus campak.

Disebutkan bahwa sekuen 450 nukleotida yang mengkode bagian gen Nukleoprotein (N) virus campak adalah data minimal yang diperlukan untuk menentukan genotipe virus campak, sedangkan sekuen lengkap gen Hemaglutinin (H) virus campak harus dilaporkan bila terjadi kejadian wabah yang sangat besar (WHO, 2007).

Walaupun virus campak hanya terdapat 1 serotipe, banyak terdapat keragaman genetiknya. WHO melaporkan bahwa terdapat 8 clade (A-H), yang terdiri dari sekitar 22 genotipe. Clade B, C, D, G dan H masing-masing terdiri dari lebih dari 1 genotipe. (B1-3; C1-2; D1-10; G1-3; H1-2). Clade A, E dan F hanya mempunyai 1 genotipe saja. Sekuen strain vaksin mengindikasikan bahwa semua virus campak liar berasal dari genotipe A (Riddell dan Michael, 2005; WHO, 2006; WHO, 2007).

Merujuk Gambar 4 tentang distribusi geografik genotipe di dunia, bahwa dilaporkan terdapat 3 genotipe yaitu G2, G3 dan D9 untuk wilayah Indonesia. Adanya perbedaan antara genom vaksin dan virus campak liar inilah yang mungkin menyebabkan belum efektifnya program vaksinasi sehingga masih sering timbul kejadian wabah penyakit campak (Sehatman, 2005).

Pada tahun 1965 dikembangkan lagi virus campak oleh Schwarz yang sampai sekarang menjadi acuan vaksin campak di seluruh dunia. Tahun 1968, pemerintah Amerika Serikat menggantikan vaksin Schwarz strain dengan vaksin Moraten strain (More Attenuated Strain) (Richman, *et al.*, 2002).

Jenis vaksin yang lain adalah CAM-70 yang merupakan jenis vaksin yang berasal dari isolat virus campak yang dikembangkan di telur (CAM = Chorio Allantoic Membran). Vaksin ini dikembangkan oleh Jepang. Vaksin ini biasa juga disebut Vaksin Takashi strain. Vaksin ini telah terbukti berhasil mencegah penyakit campak di beberapa negara termasuk di Indonesia. Vaksin jenis inilah yang diproduksi oleh PT Biofarma, Bandung.

Di Indonesia vaksin diberikan setelah anak berumur 9 bulan. Pemberian vaksinasi campak pada anak dapat menurunkan jumlah penderita sampai 46% dibandingkan anak yang tidak mendapat vaksinasi (WHO, 1990).

11. Filogenetik

Persamaan dan perbedaan dari spesies dapat digunakan untuk melihat hubungan evolusi atau biasa disebut filogeni. Banyak tipe perbedaan karakter yang dapat digunakan sebagai dasar dari analisis filogenetik, tetapi susunan nukleotida dan sekuen protein adalah yang paling populer dikarenakan setiap makhluk hidup mempunyai susunan

sekuen yang berbeda dan dapat dibandingkan secara objektif (Westhead *et al.*, 2002)

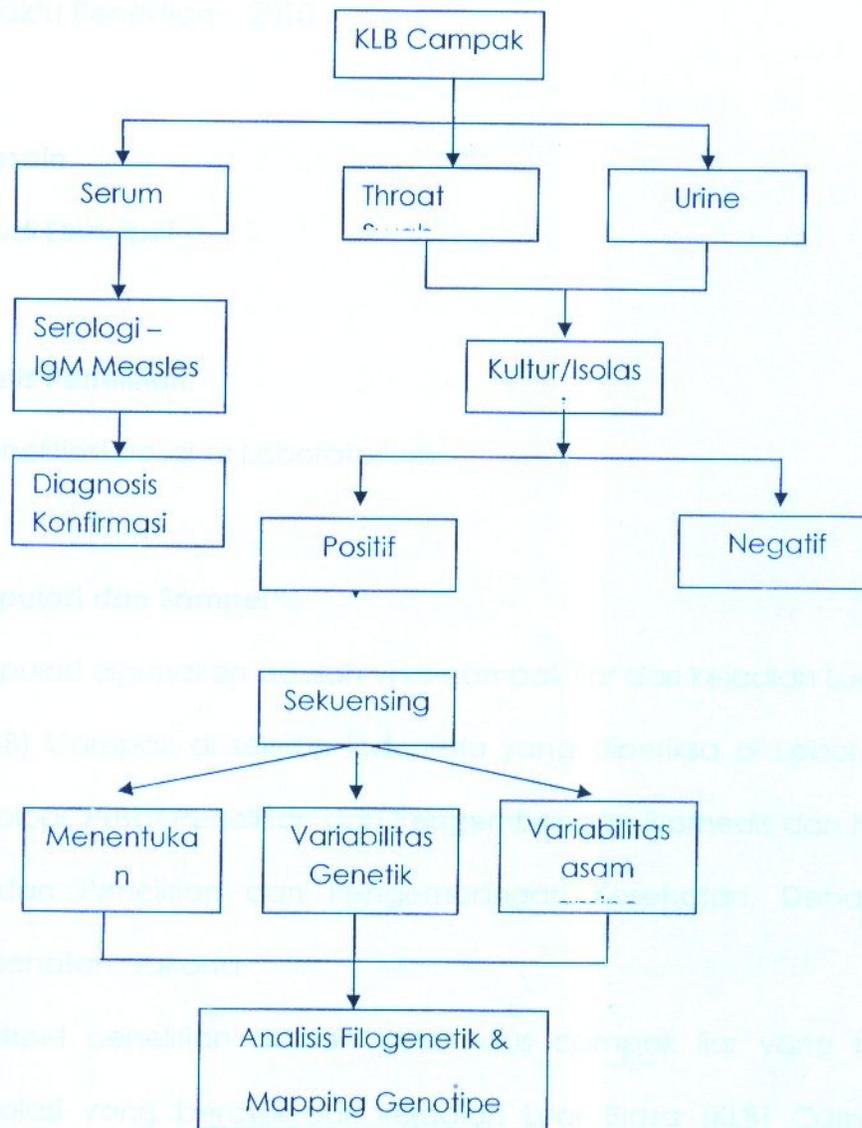
Pohon filogenetik adalah suatu cara yang sederhana untuk melihat adanya hubungan evolusi melalui cabang-cabang berupa garis yang berhubungan secara kekerabatan.

Saat ini telah berkembang bermacam-macam perangkat lunak untuk menganalisis filogenetik, diantaranya PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), Mr. Bayes dan MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Semua perangkat lunak memberikan hasil analisis yang sama (Hall, 2007).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

1. Kerangka Pikir



2. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian:

National Measles Laboratory - Jakarta, Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Balitbangkes, Jakarta

Waktu Penelitian : 2010

3. Desain

Studi Deskriptif

4. Jenis Penelitian

Penelitian dasar di Laboratorium

5. Populasi dan Sampel

Populasi digunakan adalah virus campak liar dari kejadian Luar Biasa (KLB) Campak di seluruh Indonesia yang diperiksa di Laboratorium Virologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, Jakarta.

Sampel penelitian adalah isolat virus campak liar yang berhasil diisolasi yang berasal dari kejadian Luar Biasa (KLB) Campak di seluruh Indonesia sampai tahun 2010.

10.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi:

6. Cara Pemilihan dan Estimasi Sampel

Sampel diambil dari seluruh populasi isolat virus campak liar positif untuk kemudian dilakukan sekuensing

7. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel

Kriteria inklusi : Virus campak liar positif yang berhasil dikultur dan disekuensing

Kriteria eksklusi : Virus campak liar yang tidak berhasil dikultur (hasil kultur Negatif) dan tidak mempunyai data demografi lengkap

8. Variabel

Data dikumpulkan dari hasil isolasi virus campak kasus KLB yang dilakukan oleh laboratorium virologi Puslitbang Biomedis dan Farmasi.

9. Cara Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dengan menggunakan Data Dasar KLB Campak yang ada sejak tahun 2003 sampai 2010.

Data didapat dari proses pemeriksaan sekuensing dari bahan biologis tersimpan (BBT)

10. Bahan dan Cara Kerja

10.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi :

1. BSC (Biosafety Cabinet) Class II.A
2. Lemari Es
3. Inkubator dengan gas CO₂
4. Deep Freezer (-70°C)
5. Liquid Nitrogen Tank
6. Autoclave
7. Botol Medium
8. Pippet Aid
9. Pippet Steril ukuran 1ml, 5ml dan 10ml
10. Flask ukuran 25 ml
11. DNA Sekuencer
12. Mesin PCR
13. Ekstraktor DNA
14. Cryo Vial

10.2. Reagen dan Media

Reagen yang digunakan meliputi :

1. Reagen Isolasi Virus (perbanyak Virus)
2. Reagen RT-PCR
3. Reagen Sequencing

10.4 Isolasi Virus

1. Disiapkan sel Vero SLAM yang telah konfluent pada flask T-25

2. Diinokulasikan dengan urine atau swab hasil pengambilan spesimen sebanyak 500 ul
3. Ditambahkan medium pertumbuhan sebanyak 10 ml
4. Diinkubasi pada suhu 37°C dengan gas CO₂ terkontrol
5. Diamati selama 5-7 hari
6. Jika positif akan terbentuk CPE (Cyto Pathogenic Effect) pada sel.

10.5 Sekuensing Virus

Hasil Isolasi positif kemudian di ekstraksi dan dilakukan PCR untuk dilakukan proses sequencing dengan primer yang telah ditentukan

11. Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Data penelitian dianalisis menggunakan perangkat Lunak Bioedit untuk aligment Nukleotida dan MEGA Versi 4 dengan metode Neighbor-Joining.

Data Juga akan dilakukan pemetaan dengan menggunakan perangkat lunak Quantum GIS.

12. Definisi Operasional

1. **Isolasi virus**, teknik perbanyakkan virus dengan metode biakan jaringan

2. **Sekuensing**, teknik penentuan urutan asam amino atau urutan nukleotida dari DNA atau RNA.
3. **MEGA Versi 4** perangkat lunak (*Software*) untuk analisis genetika

BAB III

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil isolasi dari sampel KLB (Kejadian Luar Biasa) atau wabah campak antara tahun 2004 sampai dengan tahun 2010 berhasil diisolasi virus campak liar sebanyak 31 isolat.

Tabel 3. Jumlah Isolat Campak antara tahun 2004-2010

| Nama Propinsi | Jumlah Isolat |
|-------------------|---------------|
| Bangka Belitung | 1 |
| Banten | 1 |
| DKI | 3 |
| Jawa Barat | 1 |
| Jawa Tengah | 4 |
| Jawa Timur | 2 |
| Kalimantan Barat | 3 |
| Kalimantan Tengah | 1 |
| Kalimantan Timur | 1 |
| Lampung | 2 |
| Maluku Utara | 2 |
| NAD | 2 |
| Riau | 2 |
| Sulawesi Selatan | 2 |
| Sumatera Selatan | 2 |
| Sumatera Barat | 1 |
| Sumatera Utara | 1 |
| Total | 31 |

Adapun tahun 2004 berhasil diisolasi sebanyak 16 isolat. Tahun 2006 sebanyak 6 isolat. Sedangkan tahun 2005, 2008 dan 2010 hanya 1 isolat saja. Tahun 2009 tidak ada satu isolatpun yang berhasil diisolasi.

Semua Isolat merupakan koleksi virus dari Laboratorium Nasional Measles Badan Litbangkes.

Pemeriksaan PCR

Perbanyakan Virus dalam bentuk Isolat diperlukan untuk pemeriksaan lebih lanjut dengan menggunakan PCR dan Sekuensing. Dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan PCR dan Sekuensing dengan menggunakan primer Gen N (Nukleoprotein) dan Gen H (Haemagglutinin).

Adapun Metode dan Primer untuk pemeriksaan PCR yang digunakan merupakan rujukan dari WHO-SEARO untuk menentukan genotype dari virus campak liar.

Primer Gen N

Forward : TGGAGCTATGCCATGGGAGT

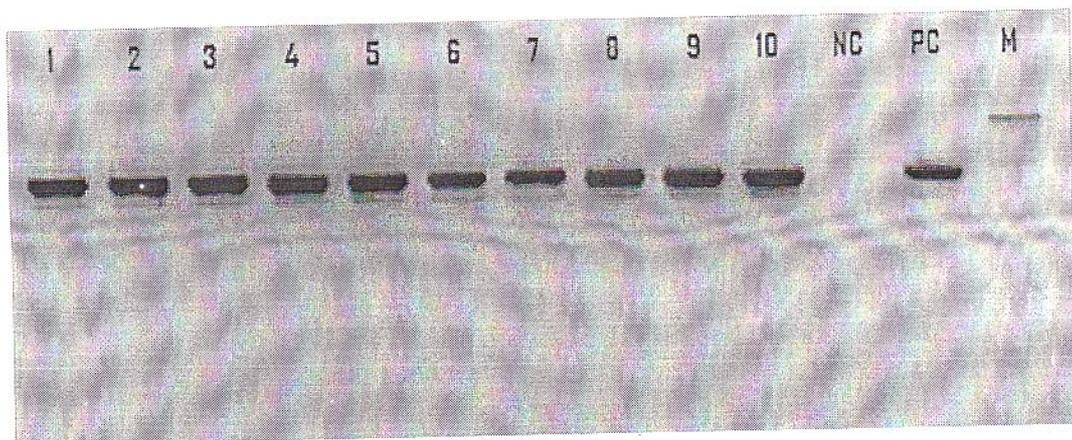
Reverse : TAACAATGATGGAGGGTAGG

Primer Gen H

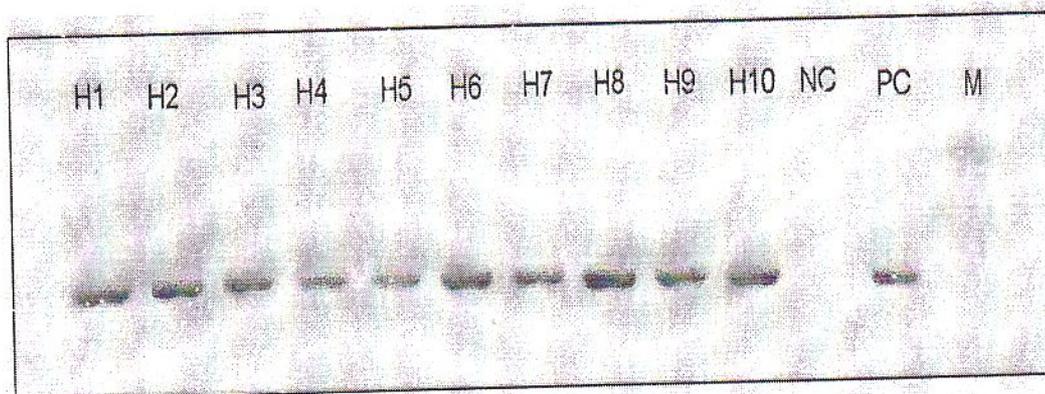
Forward : GGATTCCTTCATACGGGGTCT

Reverse : GGACCCCCTTTATAGGCAAC

Produk PCR untuk gen N dan gen H virus campak adalah sebesar 500 bp



Gambar 7. Gambar Hasil PCR terhadap gen N



Gambar 8. Gambar Hasil PCR terhadap gen H

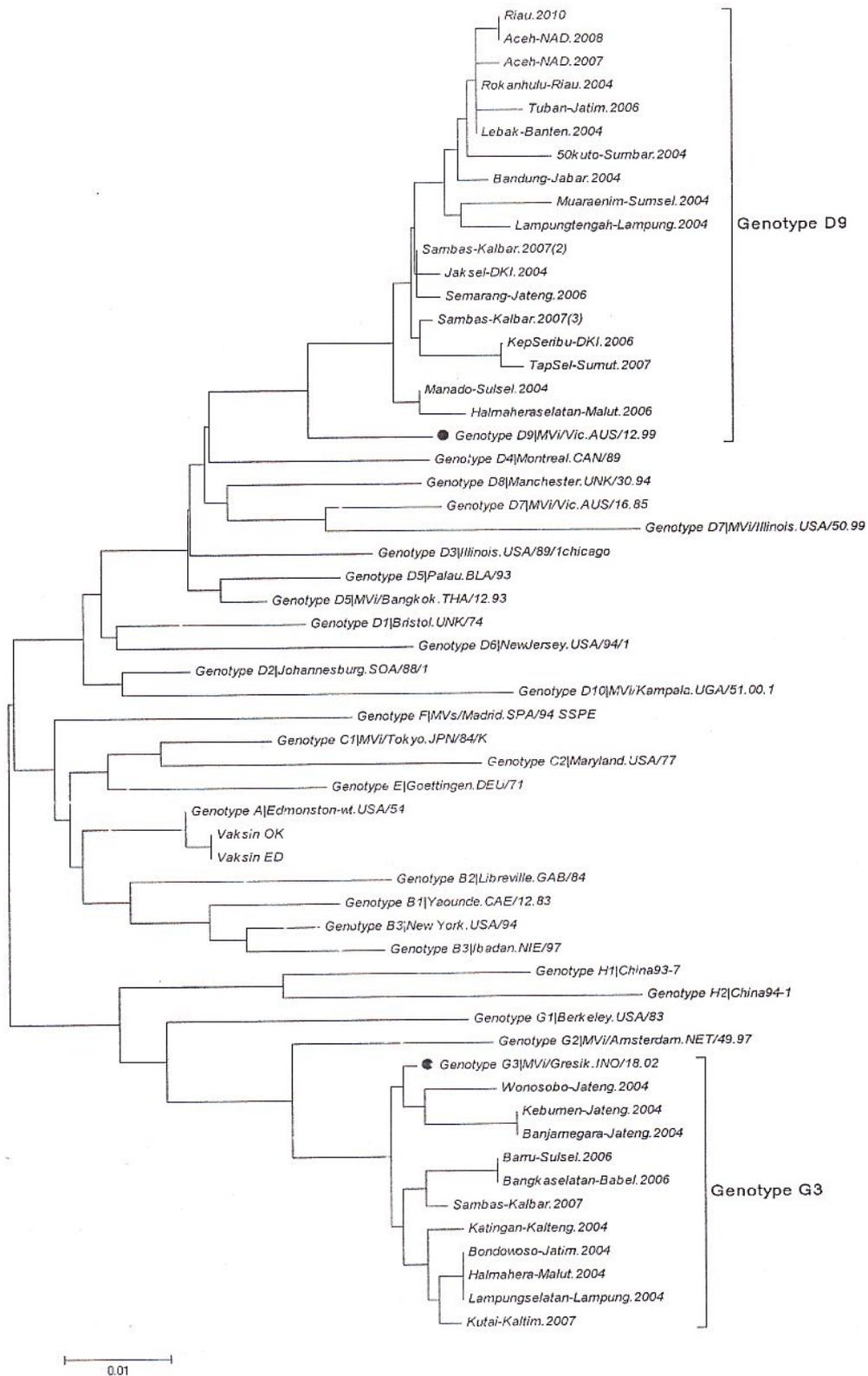
Sekuensing Gen N Campak Liar

Hasil analisis menggunakan software Bioedit Versi 7.0 antara gen N virus campak liar yang didapat adalah bahwa hampir semua virus campak liar mempunyai jumlah nukleotida yang sama yaitu 456 buah.

Berdasarkan analisis Neighbour Joining dengan menggunakan perangkat lunak MEGA versi 4.0, pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa Virus campak liar yang beredar di Wilayah Indonesia antara tahun 2004 sampai 2010 adalah Genotype D9 dan G3.

Genotype G2 yang pernah dilaporkan tahun 1999 tidak ditemukan dalam penelitian ini dan mungkin sudah tidak bersirkulasi lagi.

Yang menjadi perhatian adalah propinsi kalimantan tengah yang pada tahun 2004 dideteksi 2 genotype yang berbeda dalam 1 wabah KLB (Kejadian Luar Biasa). Provinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, Lampung, dan Maluku Utara, serta Sulawesi Selatan masih beredar 2 Genotype. Sedangkan propinsi Banten, DKI, Jawa Barat, NAD, Riau, Sumsel, Sumbar dan Sumut dideteksi terdapat Genotype D9. Propinsi Babel, Kalimantan Tengah dan Kalimantan Timur hanya dideteksi hanya terdapat genotype G3



Gambar 9. Pohon phylogenetik Virus Campak Liar antara tahun 2004-2010

Sekuensing Gen H Campak Liar

Analisis dari sekuens gen H virus campak liar yang ada, dapat diketahui bahwa Genotype tidak berhubungan dengan perubahan daripada Gen H. Genotype virus yang sama belum tentu mempunyai struktur gen H yang sama.

Gen H merupakan gen yang bertanggungjawab terhadap proses penempelan virus terhadap host. Sekuens gen H ini dapat menentukan virulensi virus campak.

Virus Campak Liar yang dianalisis dalam penelitian ini mempunyai perbedaan asam amino dengan strain vaksin. Terdapat 10 perbedaan asam amino dari 156 Asam amino yang dianalisis.

Perbedaan Asam amino terletak pada posisi 416 (Aspartat berubah menjadi Asparagin), Posisi 424 (Lysin berubah menjadi Treonin), Posisi 451 (Valin berubah menjadi Metionin), Posisi 455 (Asparagin berubah menjadi Treonin), Posisi 473 (Isoleusin berubah menjadi Treonin), Posisi 476 (Fenilalanin berubah menjadi Leusin), Posisi 481 (Tyrosin berubah menjadi Asparagin atau Seurin), Posisi 495 (Histidin berubah menjadi Asparagin).

Pada posisi 505 semua virus campak liar bermutasi dari Glysin menjadi Aspartat. Hanya Virus campak Liar yang berasal dari Bangka selatan (Propinsi Bangka Belitung) yang bermutasi asam aminonya pada posisi 466 (Valin berubah menjadi Isoleusin).

Perubahan-perubahan ini dapat menyebabkan struktur Haemagglutinin virus campak liar berubah sehingga menyebabkan perubahan tingkat virulensinya.

| VAKSIN CAM 70 A | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Aceh-MAD.2007 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Sambas-Kalbar.2007 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Sambas-kalbar.2007 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Rutakartnegara-Kaltim.2007 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Tepel-Sumut.2007 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Kep. Seribu-DKI.2006 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Bangkaselan-Babel.2006 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Barro-Sulseel.2006 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Halmaherasalatan-Malut.2006 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Tuban-Jatim.2006 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Semarang-Jateng.2006 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| LampungSelatan-Jampung.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Halmahera-Malut.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Bondowoso-Jatim.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Lebak-Banten.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Jaksel-DKI.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Lampungengah-Jempung.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Rokanulu Riau.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Jaksel-DKI.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Katingan-Kalteng.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Muarasinim-Sumsel.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Muarasinim-Sumsel.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Sokuto-Sumbang.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Manado-Sulut.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Rebunem-Jateng.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Banjarnegara-Jateng.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Monosobo-Jateng.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Bandung.2004 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Aceh.MAD2008 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |
| Riau.2010 | N | T | T | M | T | T | N | N | N | D | D | D | D | D | D |

Gambar 10. Perbedaan Asam Amino antara Virus Campak Vaksin dan Virus Campak Liar