PS1
36
Jakarta

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

# RESISTENSI DAN SUSEPTIBILITI ANTIVIRAL VIRUS INFLUENZA A/H5N1 DAN A/H1N1pdm 09 TERHADAP AMANTADIN DAN OSELTAMIVIR SECARA FENOTIF

Hana Apsari Pawestri, M.Sc

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta
2012

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

# RESISTENSI DAN SUSEPTIBILITI ANTIVIRAL VIRUS INFLUENZA A/H5N1 DAN A/H1N1pdm 09 TERHADAP AMANTADIN DAN OSELTAMIVIR SECARA FENOTIF

Hana Apsari Pawestri, M.Sc

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta
2012

## Daftar Anggota Tim Peneliti

| No. | N a m a | Kedudukan dalam Tim |
|---|---|---|
| 1 | Hana Apsari Pawestri, M.Sc | Ketua Pelaksana (Peneliti Pertama) |
| 2 | Dr. NLP Indi Dharmayanti, MSc | Peneliti madya |
| 3 | dr. Vivi Setiawaty, M.Biomed | Peneliti muda |
| 4 | Nyoman Fitri, MS, Apt | Peneliti pertama |
| 5 | Nur Ika Hariastuti, MS | Peneliti Pertama |
| 6 | Hartanti Dian Ikawati | Pembantu Peneliti |
| 7 | Eka Pratiwi | Pembantu Peneliti |
| 8 | Sumarno | Pembantu Peneliti |
| 9 | Triyani Sukarso | Pembantu Peneliti |
| 10 | Arie Ardiansyah, AMAK | Pembantu Peneliti |
| 11 | Nike Susanti | Pembantu Peneliti |
| 12 | Setiyaningrum | Pembantu Administrasi |

Surat Keputusan Penelitian


# KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754


**KEPUTUSAN**

**KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN**

NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

TENTANG

**PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012**

**KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN**

**MENIMBANG** :

a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;

b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

MENGINGAT :

1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;

   Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
8. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

MEMPERHATIKAN :

1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012, tanggal 9 Desember 2011;

# KEMENTERIAN KESEHATAN RI
## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
## PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754


**MEMUTUSKAN**

**MENETAPKAN** :

**KESATU** : 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;

2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

**KEDUA** : Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:

1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;

2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

**KETIGA** : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;

**KEEMPAT** : Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;

**KELIMA** : Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 6 Februari 2012

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 19621119 198803 100 1

Tembusan Yth:
1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.

# KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754


Lampiran 1
**Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan**
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

**SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 20112**

**RESISTENSI DAN SUSEPTIBILITI ANTI VIRAL VIRUS INFLUENZA A/H5N1 dan A/H1N1 pdm 09 TERHADAP AMANTADIN DAN OSELTAMIVIR SECARA FENOTIFE**

| | | |
|---|---|---|
| 1. | **Hana Apsari Pawestri, M.Sc** | : **Peneliti Pertama/Ketua Pelaksana** |
| 2. | Dr. NLP Indi Dharmayanti, M.Sc | : Peneliti Madya |
| 3. | dr. Vivi Setiawati, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 4. | Nyoman Fitri, MS., Apt | : Peneliti Pertama |
| 5. | Nur Ika Hariastuti, MS | : Peneliti Pertama |
| 6. | Hartanti Dian Ikawati, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 7. | Eka Pratiwi, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 8. | Sumarno, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 9. | Triyani Sukarso, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| 10. | Arie Ardiansyah, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 11. | Nike Susanti, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| **12.** | **Setyaningrum, SKM** | : **Sekretariat Penelitian** |
| 13. | Yakub Gunawan, Amd | : Pengolah Data |

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

# KEMENTERIAN KESEHATAN RI
## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
## PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754


Lampiran 2
**Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan**
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

**JUDUL PENELITIAN** : **RESISTENSI DAN SUSEPTIBILITI ANTI VIRAL VIRUS INFLUENZA A/H5N1 dan A/H1N1 pdm 09 TERHADAP AMANTADIN DAN OSELTAMIVIR SECARA FENOTIFE**

**JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | Peneliti Pertama | : | Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar | =Rp. | 35.000 |
| 2. | Peneliti Madya | : | Jumlah honor yang diterima per-Jam , per-minggu sebesar | =Rp. | 50.000 |
| 3. | Peneliti Non Fungsional | : | Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar | =Rp. | 30.000 |
| 4. | Pembantu Peneliti | : | Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar | =Rp. | 20.000 |
| 5. | Sekretariat Penelitian | : | Jumlah honor yang diterima setiap bulan sebesar | =Rp. | 300.000 |
| 6. | Pengolah Data | : | Jumlah honor yang diterima per paket sebesar | =Rp. | 1.540.000 |

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 1001

# Kata Pengantar

Alhamdulillahi Rabbil 'Alamin, puji syukur Penulis panjatkan kehadirat ALLAH SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Penelitian yang berjudul "**Resistensi dan Suseptibiliti Antiviral Virus A/H5N1 DAN A/H1N1pdm 09 Terhadap Amantadin dan Oseltamivir Secara Fenotif**".

Terimakasih yang sebesar-besarnya Penulis sampaikan kepada Drs. Endri Dwi Sampurno, M.Si,Apt. selaku Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian Pengembangan kementerian Kesehatan atas segala dukungan, kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada Penulis untuk melakukan penelitian ini.

Ucapan terimakasih juga Penulis sampaikan kepada dr. Vivi Setiawaty,M.Biomed selaku Penanggung Jawab Laboratorium Virologi yang telah memberi waktu, kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini dan rekan-rekan di dalam tim penelitian ini atas kerjasama, masukan dan kritikan selama penelitian, persahabatan dan dukungannya.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa Laporan ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan. Oleh karena itu sumbang saran yang bersifat membangun sangat diharapkan untuk menyempurnakan isi laporan ini. Harapan penulis kiranya laporan penelitian ini berguna dan memberikan manfaat bagi kita semua.

Jakarta, Desember 2012

Ketua Pelaksana

Hana Apsari Pawestri, M.Sc

NIP. 198106292003122002

## Ringkasan Eksekutif

# Resistensi dan Suseptibiliti Antiviral Virus A/H5N1 DAN A/H1N1pdm 09 Terhadap Amantadin dan Oseltamivir Secara Fenotif

*Hana A. Pawestri*
*Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes, Kemkes RI*
*Jl. Percetakan Negara no.23 jakarta 10560*

Kejadian luar biasa Virus Influenza A/H1N1 pada tahun 2009 dan A/H5N1 pada tahun 2005-2012 telah menjadi pandemi bukan saja di Indonesia, tetapi juga di seluruh dunia. Meskipun demikian, tidak ada data dan informasi mengenai karakterisasi dan suseptibiliti virus influenza tersebut terhadap antiviral amantadine dan oseltamivir dari Indonesia yang berhasil dipublikasi. .

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi dan menganalisis (i) gen Neuraminidase (NA) dalam menentukan resistensi terhadap Oseltamivir. (ii) gen Matrik (M) dalam menentukan resistensi terhadap Amantadin, serta suseptibiliti antiviral tersebut. Data dan informasi yang dihasilkan akan sangat bermanfaat sebagai masukan bagi kesehatan masyarakat mengenai evolusi virus, terapi, resistensi obat, dan persiapan pandemi

Metodologi penelitian yang digunakan yaitu berdesain potong lintang berbasis laboratorium dengan menggunakan sampel dari semua isolat positif virus influenza A/H1N1pdm dan A/H5N1 yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes. Sedangkan metode pemeriksaannya yaitu berupa ekstraksi, amplifikasi RNA, sekuensing DNA, analisis data residu menggunakan peranti lunak program Bioedit dan/atau DNA-Star, serta susesptibilit. Sekuensing *alignment Pairwise* akan dilakukan oleh program Bioedit dan/atau DNA Star untuk menentukan kesamaan sekuens dengan gen influenza lainnya yang telah dipublikasi secara ilmiah atau database Influenza dunia.

Hasil Penelitian yang didapat adalah sebagai berikut :

1. **Karakterisasi molekuler gen NA**
   Hasil analisis residu gen NA virus influenza pandemi A/H1N1 menunjukkan bahwa virus tersebut masih sensitif terhadap antiviral oseltamivir yang ditunjukkan melalui posisi asam amino H275.
2. **Karakterisasi molekuler gen M**
   Hasil analisis urutan asam amino terhadap gen M menunjukkan bahwa virus tersebut telah resisten terhadap antiviral amantadin yang ditunjukkan melalui posisi asam amino no 31 (S31N).

Kesimpulan dari penelitian ini, merebaknya pandemi virus influenza A/H1N1 pada tahun 2009 dan A/H5N1 sejak tahun 2005 telah membuat perhatian publik yang cukup besar. Oleh karena itu, diadakan studi untuk melihat bagaimana karakterisai resistensi dari virus tersebut terhadap antiviral oseltamivir dan amantadin khususnya pada virus yang diisolasi dari Indonesia. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa antiviral amantadin. Untuk mencegah, mengendalikan, dan memonitor lebih lanjut penggunaan antiviral oseltamivir dan amatandin perlu dilakukan penelitian secara rutin setiap tahun mengenai suseptibiliti obat tersebut supaya optimal digunakan sebagai pencegahan dan pengobatan infeksi berat influenza A/H1N1pdm09 maupun A/H5N1.

## Resistensi dan Suseptibiliti Antiviral Virus A/H5N1 DAN A/H1N1pdm 09 Terhadap Amantadin dan Oseltamivir Secara Fenotif


### Abstrak

**Latar belakang**

Selama tahun 2009, seperti halnya negara lain di dunia, Indonesia juga melaporkan kasus H1N1 pandemi virus. Meskipun angka kematian kasusnya tidak setinggi kasus H5N1, tidak ada informasi atau publikasi yang didapatkan dari Indonesia. Di dalam penelitian ini, kami telah melakukan sekuensing dan karakterisasi resistensi amantadin dan oseltamivir secara fenitifik dari 50 isolat virus pandemi H1N1pdm 09 dan H5N1 Indonesia. Data ini akan memberikan informasi yang berguna mengenai studi resistensi antiviral, dan kesiapsiagaan pandemi.

**Metode**

RT-PCR dan sekuensing metode Sanger, dan suseptibiliti terhadap isolat H1N1 dan H5N1 telah dilakukan pada 50 isolat dari 50 pasien H1N1 dan H5N1. Dilakukan analisis residu mengenai antiviral resistenesi resistensi terhadap oseltamivi, zanamivir, dan amantadin, serta suseptibiliti virus tersebut dengan metoda fluorescens dan hemaglutinasi inhibisi.

**Hasil**

Isolat virus pandemi A/H1N1 dan A/H5N1 sebanyak 50 diperoleh dari berbagai propinsi di Indonesia selama pandemi pada tahun 2005-2012. Terdapat mutasi pada gen M yang berhubungan dengan resistensi terhadap amantadin (S31N). Mutasi tidak terjadi pada gen PA (T515A), yang menunjukkan tingkat virulensi yang tinggi pada tikus. Hasil analisis terhadap gen NA dari semua isolat Indonesia tidak ditemukan adanya mutasi delesi yang berhubungan dengan berhubungan dengan adaptasi terhadap inangnya. Tidak ditemukan mutasi terhadap antiviral oseltamivir dan zanamivir dalam protein NA.

**Kesimpulan**

Telah dilakukan karakterisasi genetik dan susceptibility secara komprehensif dari virus H1N1 yang diisolasi selama pandemi tahun 2009 dan H5N1 tahun 2005-2012. Temuan ini telah meningkatkan kepedulian mengenai pentingnya karakterisasi genom untuk risiko kesehatan manusia dan kebutuhan untuk meningkatkan upaya di dalam memantau evolusi dan pengobatan virus influenza di seluruh propinsi Indonesia.



**Kata kunci : karakterisasi molekuler, virus pandemi H1N1**

## Daftar Isi

Hal.

Daftar Nama Tim Peneliti ..... i
Surat Keputusan Penelitian ..... ii
Kata Pengantar ..... vi
Ringkasan Eksekutif ..... vii
Abstrak ..... viii
Daftar Isi ..... ix
Daftar Gambar ..... x
Daftar Lampiran ..... xi

I. PENDAHULUAN ..... 1

II. TUJUAN DAN MANFAAT ..... 4

III. TINJAUAN PUSTAKA ..... 5

IV. METODOLOGI
IV.1. Kerangka Pikir ..... 9
IV.2. Tempat dan Waktu Penelitian ..... 9
IV.3. Desain & Jenis Penelitian ..... 9
IV.4. Populasi dan Sampel ..... 9
IV.5. Cara Pemilihan dan Estimasi Sampel ..... 10
III.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel ..... 10
III.7. Bahan dan Cara Kerja serta Analisis Data ..... 10

V. HASIL DAN PEMBAHASAN
V.1. Antiviral resistensi terhadap oseltamivir ..... 12
V.2. Antiviral resistensi terhadap amantadine ..... 13

VI. KESIMPULAN DAN SARAN ..... 15

VII. UCAPAN TERIMA KASIH ..... 15

VIII. DAFTAR PUSTAKA ..... 16

IX. LAMPIRAN
Lampiran 1. Surat pembebasan etik penelitian ..... 18

## DAFTAR GAMBAR

Hal.

Gambar 1. Analisis residu gen NA A/H1N1pdm09. Resistensi antiviral Oseltamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 275 (H2875Y)..... 12

Gambar 2. Analisis residu gen NA A/H5N1. Resistensi antiviral Oseltamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 275 (H2875Y)..... 13

Gambar 3. Analisis residu gen M A/H1N1pdm09. Resistensi antiviral Amantadin ditunjukkan pada posisi asam amino 27, 30, 31, dan 34 (V27A, A30TP, S31N, G34E)..... 14

Gambar 4. Analisis residu gen M A/H5N1. Resistensi antiviral Amantadin ditunjukkan pada posisi asam amino 27, 30, 31, dan 34 (V27A, A30TP, S31N, G34E)..... 14

## DAFTAR LAMPIRAN

Hal.

Lampiran 1. Surat pembebasan etik penelitian..... 21

# I. PENDAHULUAN

Infeksi virus influenza merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas yang signifikan pada manusia di seluruh dunia, terutama pada kelompok manusia dengan risiko tinggi seperti kelompok usia lanjut, balita dan kelainan immunitas.[1] Kelompok resiko tinggi tersebut mendapatkan terapi antiviral terhadap Virus Influenza untuk mencegah terjadinya komplikasi.[1,2] Influenza A dan B bertanggung jawab sebagai penyebab epidemi saat musim dingin di wilayah negara sub tropis dan sepanjang tahun di negara tropis khususnya pada musim penghujan[2]. Tetapi, hanya virus influenza A yang bertanggung jawab untuk terjadinya influenza musiman dan pandemi global[3]. Ketidakpastian akan terjadinya epidemi dan pandemi influenza serta kemungkinan munculnya strain patogen virus yang baru yang menyebabkan penyakit berat pada manusia-misalnya, H5N1 di Hong Kong pada tahun 1997 dan pandemi H1N1pdm 2009 menjadikan penyakit influenza merupakan target yang tepat untuk obat antivirus dan vaksinasi.[3]

Program vaksinasi memainkan peran utama dalam pencegahan influenza dan komplikasi yang terkait. Namun, karena terbatasnya penggunaan vaksin influenza, adanya mutasi *antigenic drift, antigenic shift*, serta terjadinya epidemi dan pandemi yang terkait, maka sangat diperlukan adanya peran penting terapi antivirus dalam pengelolaan penyakit influenza.[4]

Saat ini terdapat dua kelas obat anti influenza yang tersedia: inhibitor dari ionchannel M2 virus (adamantanes: amantadine, rimantadine) dan inhibitor neuraminidase virus (oseltamivir, zanamivir, peramivir). Kedua kelas obat antiviral tersebut menunjukkan adanya manfaat virologi dan klinis pada penyakit influenza musiman. Obat antiviral oseltamivir juga telah menunjukkan adanya manfaat dalam mencegah komplikasi saluran pernapasan bawah dari infeksi influenza.[5] Namun, untuk kedua kelas obat tersebut,, pengembangan resistensi antivirus telah terbukti terjadi selama – dan bahkan tanpa adanya terapi dengan antivirus.

Pengobatan antiviral dengan inhibitor neuraminidase seperti oseltamivir merupakan terapi yang utama di dalam manajemen klinis infeksi H5N1 pada manusia. Namun, dampak

kematian dengan pengobatan antivirus oseltamivir masih tetap terjadi.[3] Selanjutnya, hasil awal surveilans kerentanan obat antivirus dari virus influenza yang beredar di Eropa telah mengungkapkan bahwa proporsi yang signifikan (13%) dari virus H1N1 pada manusia, pada saat ini resisten terhadap oseltamivir.[4] Hal tersebut dikarenakan bahwa kemanjuran klinis sangat terbatas terhadap obat oseltamivir termasuk keterlambatan inisiasi pengobatan dimana virus saat itu sudah menginfeksi saluran pernapasan, dan proses immunopatologi telah berkembang menjadi sangat pesat. Penyebab yang kedua merupakan penyebab yang sangat potensial terhadap kegagalan terapi adalah adanya resisten virus tersebut terhadap obat antiviral.[3]

Saluran ion M2 adalah target dari adamantanes antivirus. Senyawa ini menyumbat saluran dan mencegah dari pompa proton ke dalam virion. Dengan adanya adamantanes, RNA virus tetap terikat pada M1 dan tidak bisa masuk inti sel inang. Oleh karena itu replikasi virus dihambat.[6] Resistensi adamantane disebabkan oleh mutasi titik tunggal pada gen M2 yang melapisi saluran M2. Karena mutasi titik tersebut tidak memiliki efek merugikan pada seleksi virus, mutasi ini dapat terjadi di alam dan dapat menyebar tanpa adanya tekanan (terapi) obat antiviral. Bahkan, meskipun adamantanes yang jarang digunakan, telah ada peningkatan resistensi pada populasi virus influenza manusia A (H3N2) di seluruh dunia. [7, 8, 9]. Meskipun dalam tingkat yang jauh lebih rendah, resistensi adamantane juga telah diamati pada virus influenza H1N1.

Resistensi Oseltamivir disebabkan oleh mutasi pada atau dekat situs aktif dari neuraminidase virus. Metabolit aktif oseltamivir, oseltamivir karboksilat-, mengikat neuraminidase virus dan menghambat fungsinya. Namun, karena sifat dari molekul oseltamivir karboksilat-, penataan ulang molekul dari saku mengikat dalam neuraminidase diperlukan untuk memfasilitasi pengikatan oseltamivir karboksilat-. Tiga dari mutasi resistansi neuraminidase inhibitor yaitu R292K, N294S, H274Y dan E119V menghambat penataan ulang molekul, sehingga mencegah pengikatan oseltamivir, mengakibatkan resistensi terhadap oseltamivir. Mutasi resisten inhibitor neuraminidase terjadi bervariasi baik pada gen N1 maupun N2. Ada empat mutasi besar dari gen N2 (E119V, R292K, N294S, dan H274Y) dan satu mutasi besar terisolasi dari N1 gen (H275Y). Mutasi tersebut memungkinkan adanya pengikatan substrat asam alami sialic, virus bermutasi sehingga dapat bertahan dan menyebar [10].

Dalam percobaan in vitro pada hewan menunjukkan berkurangnya efisiensi replikasi dan virulensi virus tersebut. [10-14]. Resistensi oseltamivir telah terdeteksi selama perawatan pada dua pasien (29%) dari 7 pasien di Vietnam yang terinfeksi H5N1.[15] Perkembangan resistensi oseltamivir juga telah dilaporkan pada strain influenza musiman. Sebuah studi tahun 2004 di Jepang menemukan bahwa 9 dari 50 anak dengan infeksi virus influenza A (H3N2) yang telah diobati dengan oseltamivir (18 persen) memiliki virus dengan resistansi mutasi obat pada gen neuraminidase (R292K, N294S, atau E119V). [16] Pada tahun 2000-2001, peneliti Jepang juga menemukan resistensi virus influenza A (H1N1) dengan mutasi H274Y pada 7 dari 43 anak yang diobati oseltamivir (16%) [17]. Penelitian surveilans di Amerika selama musim 2007-2008 menemukan bahwa 57 dari 896 (6,3%) memiliki mutasi virus H1N1 H274Y di gen NA pada masing-masing isolat virus.[18] Baru-baru ini, resistensi oseltamivir pada virus pandemi H1N1 telah diisolasi dari 3 orang di Denmark, Jepang dan Hong Kong, dua di antaranya menerima profilaksis oseltamivir pada saat terapi pengobatan, sementara yang ketiga tidak pernah diobati dengan obat tersebut.[19]

Walaupun munculnya virus yang resisten telah diamati selama pengobatan dengan oseltamivir, telah lama diasumsikan bahwa resistensi virus tidak ditransmisikan secara efisien dan tidak terjadi secara alami. Faktanya, penelitian surveilans telah menunjukkan tingkat resistensi yang sangat rendah (<0,5%) pada isolat komunitas sampai saat ini.[20] Namun, sejak akhir 2007 peningkatan resistensi oseltamivir H274Y yang dramatis terjadi secara tiba-tiba pada neuraminidase virus telah dilaporkan dalam sirkulasi influenza A (H1N1) virus di seluruh dunia tanpa adanya peningkatan penggunaan oseltamivir.[21] Analisis baru-baru ini dilaporkan bahwa pada virus H1N1 musiman menunjukkan tingkat resistensi yang meningkat, mendekati 100% di wilayah geografis tertentu termasuk Amerika Serikat dan Eropa. Alasan untuk kemunculan resistensi oseltamivir yang tiba-tiba terjadi secara alami di virus H1N1 masih tidak jelas. Pendapat ahli menyatakan bahwa perubahan H274Y dapat mengkompensasi perubahan lain dalam neuraminidase virus H1N1 baru-baru yang meningkatkan aktivitas neuraminidase, sehingga memulihkan keseimbangan hemagglutinin dan neuraminidase fungsi yang diperlukan untuk berkembang biak secara efisien.[22]

Singkatnya, terjadinya resistensi adamantane yang tinggi secara alami pada virus H3N2, H5N1 dan virus H1N1, H5N1 dan resistensi oseltamivir pada virus H1N1 maupun H5N1

memberikan tantangan untuk terapi pengobatan antiviral, terutama di kelompok pasien berisiko tinggi. Di samping itu, resistensi terhadap kedua agen tersebut mungkin muncul dengan cepat selama pengobatan infeksi dengan virus. Sehingga, ada beberapa permasalahan yang menjadi perhatian utama, yaitu : 1. Prelevansi resistensi antivirus , 2. Susceptibiliti antiviral tersebut, dan 3. Potensi manfaat pengobatan antivirus gabungan untuk mencegah (atau sebaliknya) resistensi antivirus. Studi penelitian ini akan mencoba untuk memberikan pemahaman yang lebih baik mengenai isu-isu tersebut diatas.

## II. TUJUAN DAN MANFAAT

### II.1 TUJUAN

1. Untuk menentukan prevalensi resistensi secara fenotif terhadap amantadin dan oseltamivir pada virus A/H5N1 tahun 2005-2012 dan A/H1N1pdm09
2. Untuk menentukan suseptibiliti virus A/H5N1 dan A/H1N1pdm09 terhadap antiviral amantadin dan oseltamivir
3. Memetakan dan memonitor pola resistensi antiviral influenza terhadap amantadine dan oseltamivir pada virus A/H5N1 tahun 2005-2012 dan A/H1N1pdm 2009.

### II.2 MANFAAT

Sebagai data penunjang untuk penelitian lanjutan serta bahan masukan kepada Klinisi dan Program dalam rangka penanggulangan terapi dan pandemi influenza.

## III. TINJAUAN PUSTAKA

Virus influenza termasuk dalam keluarga Orthomyxoviridae dan diklasifikasikan dalam tiga jenis: A, B, dan C. Ketiga tipe virus tersebut mempunyai inang dan fatogenitas yang berbeda.1 Tipe B dan C virus influenza terutama diisolasi dari manusia, meskipun beberapa virus influenza B telah diisolasi dari ikan paus dan virus influenza C telah diisolasi dari babi dan anjing [1, 2, 3]. Influenza A virus menginfeksi berbagai hewan berdarah panas, termasuk burung, babi, kuda, manusia, dan mamalia lainnya. Virus flu burung pada burung air berfungsi sebagai reservoir alami untuk semua subtipe yang dikenal dari virus influenza A dan mungkin merupakan sumber utama manusia strain influenza, pandemi [3 4]

Virus Influenza berbentuk seperti adalah bola dengan diameter 80-120 nm[1, 2,3,4]. Genom virus influenza berbentuk untai tunggal yang terdiri dari 8 segmen yang dan mengkode 11 protein yang berbeda. [3 4]. Sedangkan virus influenza C hanya berisi tujuh segmen RNA.[3]

Gen nukleoprotein (NP) berasosiasi dengan virus RNA untuk membentuk struktur ribonucleoprotein (RNP) sebesar 9 nm dalam struktur heliks.[3 4] NP adalah protein yang kaya arginin dan memiliki muatan positif (pH 6,5), yang berperan penting dalam ikatan RNA-NP dan encapsidation 2. NP berisi situs antigen tipe tertentu yang memungkinkan untuk klasifikasi virus influenza. [3]

Tiga protein besar yaitu PB1, PB2, dan PA terikat pada RNP dan bertanggung jawab untuk proses transkripsi RNA dan proses penerjemahan protein. PB1 berisi wilayah karakteristik RNA-dependent- RNA- polimerase dan bertanggung jawab untuk mengikat situs terminal baik RNA virus (vRNA) dan komplementer RNA (cRNA) untuk inisiasi transkripsi dan replikasi. Protein ini dikaitkan dengan perubahan morfologi mitokondria dan induksi kematian sel. Sementara itu, PB2 memiliki fungsi utama dalam inisiasi transkripsi dan bertanggung jawab untuk struktur ikatan pra-mRNA. Protein ketiga, PA membantu untuk mengontrol langkah elongasi mRNA yang mengikat protein. [2, 3, 4]

Kedua glikoprotein, Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA), yang termasuk protein permukaan memiliki struktur berbentuk batang dan muncul sepanjang 10 nm pada permukaan virion. Kedua protein tersebut penting untuk menentukan variasi antigenik virus influenza. Influenza A virus diklasifikasikan ke dalam subtipe berdasarkan respon antibodi terhadap HA dan NA, yang merupakan dasar dari perbedaan H dan N. HA terdiri dari dua fragmen yang terpisah, HA1 dan HA2 yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Fungsi penting dari HA adalah ikatan reseptor dan aktivitas fusi, serta pembentukan budding dan partikel. HA juga merupakan penentu utama untuk penetrasi antibodi. Glikoprotein kedua adalah Neuraminidase (NA). Fungsi utama dari NA adalah menghapus residu asam sialat dari epitel lendir pernapasan dan permukaan sel untuk memfasilitasi penetrasi virus pada tahap awal dan pelepasan virion baru yang terbentuk selama tahap akhir dari siklus replikasi.

Matriks (M1) protein, yang berlokasi di sekitar nukleokapsid, adalah protein penting dalam morfogenesis partikel dan merupakan komponen utama dari virion (sekitar 40% dari protein virus) [3]. M1 memiliki peran sebagai penghubung antara glikoprotein dan kompleks RNPs, membentuk jembatan antara kompleks inti dan protein membran. Protein M yang kedua (M2) dikodekan oleh gen yang sama dengan protein M1 (terdiri dari 97 asam amino: yang ectodomain, transmembran dan domain sitoplasma yang masing-masing mengandung 24, 19 dan 54 asam amino) . M2 bertindak sebagai saluran ion. Saluran ini adalah penting selama dua tahap infeksi virus: selama uncoating virus dan selama pengolahan protein (HA) hemagglutinin dalam jaringan trans-Golgi sel yang terinfeksi. [2,3]

Dua protein, yaitu NS1 dan NS2 (NS untuk non struktural) dihasilkan dari segmen RNA yang ke-8. Peran protein NS1 yaitu menghambat transfer mRNA seluler dari inti dan mempromosikan sintesis mRNA influenza. NS1 juga mengatur splicing mRNA influenza dan perpindahannya dari nukleus ke sitosol. Virus Influenza yang tidak mempunyai protein NS1 akan kurang sensitif terhadap interferon, sedangkan virus liar tipe tahan. NS2 dihasilkan dari mRNA disambung. Berinteraksi dengan M1 melekat influenza RNP dan memfasilitasi pengangkutan

RNP ke sitoplasma. [2, 3, 4]

Proses transkripsi dan replikasi Influenza virus RNA terjadi di dalam inti sel yang terinfeksi 2. Virus melekat pada asam sialat yang mengandung reseptor selular melalui HA pada permukaan virion dan kemudian masuk ke dalam sel oleh reseptor-mediated endositosis dalam endosomes4. Selanjutnya, fusi terjadi antara amplop virus dan membran sel, memicu *uncoating* pada pH rendah yang melepaskan RNPs virus ke dalam 3 sitosol. PH yang rendah menyebabkan pergeseran konformasi dalam struktur HA untuk membawa HA2 (fussion peptida) kontak dengan membrane4. Proses Uncoating tergantung oleh adanya saluran ion protein M2.

Delapan segmen genom virus influenza saling berhubungan dengan empat protein virus untuk membentuk kompleks ribonucleprotein virus (vRNPs). Protein utama adalah NP, yang melapisi RNA. Protein yang tersisa PA, PB I, PB2 berperan untuk mengikat RNA virus, menciptakan struktur menjulur. Struktur menjulur dibentuk dan dipertahankan antara delapan segmen dan berisi 12 nukleotida di ujung RNA virus influenza 3' dan 13 nukleotida pada ujung 5 '. [2,3,4,5] Kompleks RNP virus tersebut kemudian dipindahkan ke inti, di mana transkripsi dan translasi terjadi. The RdRp nukleokapsid-terkait, yang terdiri dari sebuah kompleks dari tiga P (PA, PB1, PB2 dan) protein bertanggung jawab atas proses transkripsi dan replikasi yang dikatalisis tiga reaksi yang berbeda. Pertama, vRNAs ditranskripsi menjadi RNA (mRNA). RdRp mengikat ke alkohol-cap struktur dan kemudian urutan nukleotida dibelah oleh aktivitas endonuklease (PB1 dan PB2), membentuk molekul starter untuk sintesis mRNA virus. Selanjutnya, protein PA berperan dalam elongasi untuk mengikat NP dalam menghasilkan mRNA lengkap. Kedua, RdRp yang disintesis oleh cRNA setiap segmen akan digunakan sebagai template untuk menghasilkan vRNA lebih. Ketiga, RdRp yang disintesis oleh vRNA akan menggunakan hasil terjemahan cRNS sebagai template. [2, 3, 4, 5]

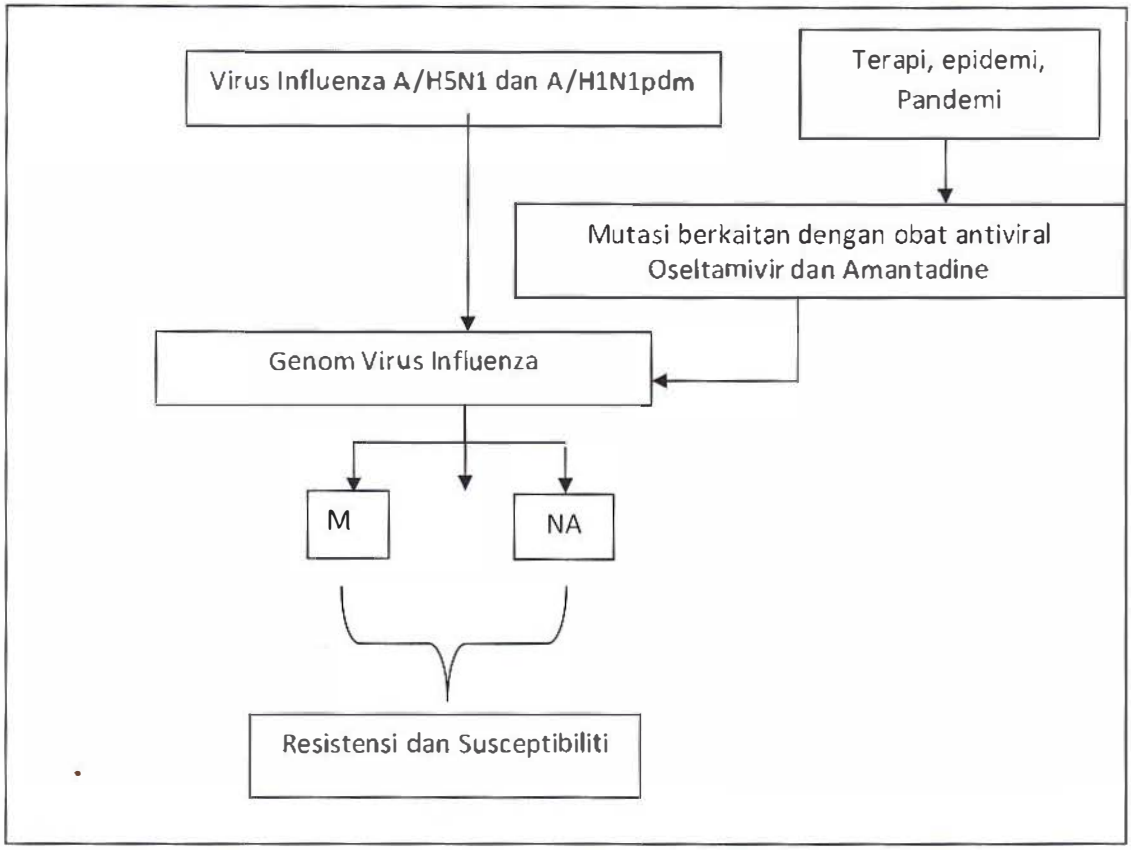
Kompleks ribonucleocapsid virus (RNP) menempel dengan NP pada inti akan berpindah ke permukaan sel yang berhubungan dengan MI dan NS2 protein. Pada

membran sel mereka tertutup oleh HA, NA, dan protein M2. The HA glikoprotein dan NA dirakit di retikulum endoplasma dan dihubungkan dengan RNP oleh protein M1. Influenza partikel virus yang dirilis setelah amplop virus telah dipisahkan dari membran sel selama proses awal. Aktivitas enzimatik dari protein NA diperlukan untuk menghilangkan asam sialat dari glikoprotein seluler dan virus, sehingga partikel virus individu bisa dilepaskan. [2, 3, 4]

Virus influenza berdistribusi di seluruh dunia dan menyebabkan wabah yang sangat intensif per tahun 4. Influenza A dan B bertanggung jawab atas wabah pada musim dingin di iklim yang hangat dan sepanjang tahun di sekitar (musim hujan terutama) di iklim tropis. Virus influenza menyebar dari manusia ke manusia melalui tetesan udara saat batuk, bersin atau saat berbicara[7]. Periode inkubasi penyakit influenza adalah sekitar 2 hari dan berkisar dari 1-5 hari, tergantung pada variasi [3 8]. Gejala-gejala pada orang dewasa termasuk demam dan menggigil, sakit kepala, fotofobia, batuk, malaise, sakit otot, sakit tenggorokan dan [3, 8]. Influenza A Virus sebagian besar bertanggung jawab atas wabah musiman dan pandemi global. Diperkirakan bahwa epidemi tahunan menyebabkan 3-5 juta kasus penyakit parah dan 250.000-500.000 kematian di seluruh dunia [4]. Berdasarkan pada tahun 2003 penduduk AS, epidemi influenza tahunan menghasilkan rata-rata 610.660 jiwa tahun hilang, 3,1 juta hari dirawat di rumah sakit, dan 31,4 juta kunjungan rawat jalan [9].

## IV. METODA

### *IV.1 Kerangka Pikir*




### *IV.2 Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian*

Tempat penelitian : Laboratorium Virologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes

Waktu penelitian : 2012

### *IV.3 Desain Penelitian*

Studi potong lintang

### *IV. 4. Populasi dan Sampel*

Populasi:

- Semua spesimen KLB yang positif Influenza A/H5N1 dengan PCR yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, tahun 2005-2012.
- Semua spesimen KLB yang positif Influenza A/H1N1pdm09 dengan PCR

yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, tahun 2009

Sampel:

- Semua specimen KLB yang positif Influenza A/H5N1 dengan Kultur yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, tahun 2005-2012.
- Semua specimen KLB yang positif Influenza A/H1N1pdm09 dengan Kultur yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, tahun 2009

*IV. 5 Cara Pemilihan dan Estimasi Sampel*

Sampel diambil dari penderita yang telah didiagnosa positif virus influenza dari kejadian KLB A/H5N1 tahun 2005-2012 dan A/H1N1pdm09 tahun 2009 dengan metoda kultur virus.

*V. 6. Kriteria Ekslusi dan Inklusi :*

- *Kriteria Inklusi :*
  - Semua isolat positif virus Influenza A/H5N1 dan A/H1N1pdm09 yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan.
  - Isolat positif A/H5N1 dan A/H1N1pdm09 yang memenuhi standar untuk pemeriksaan resistensi dan susesptibiliti, yaitu volume isolat yang cukup (≥2m ml/spesimen) dan titer virus yang cukup tinggi (kelipatan >518 dengan tes Hemaglutinasi/HA)
- *Kriteria Ekslusi :*
  - Semua isolat negatif virus influenza A/H5N1 dan A/H1N1pdm09 yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
  - Isolat positif A/H5N1 dan A/H1N1pdm09 yang memenuhi standar untuk pemeriksaan resistensi dan susesptibiliti, yaitu volume isolat yang cukup (< 2m ml/spesimen) dan titer virus yang cukup tinggi (kelipatan <518 dengan tes Hemaglutinasi/HA)

*IV.7. Bahan, cara kerja, dan analisis data*

- Ekstraksi, amplifikasi RNA, dan sekuensing

  RNA (ribonucleic acid) diektraksi dari 140 μl isolat influenza A/H1N1 dengan menggunakan kit ektraksi 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 (*Reverse Transkiptase)* dengan reagen *Superscript III Reverse Transcriptase PCR with Platinum Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA - USA). Sekuensing kemudian 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 3130*xl* (Applied Biosystem, Foster City, CA - USA).

- Sekuensing DNA, analisis data residu, dan pohon filogenetik untuk menentukan Hasil sekuensing akan dikompilasi dan diedit dengan menggunakan program Sequencher untuk menentukan kesamaan sekuens dengan gen influenza lainnya yang telah dipublikasi secara ilmiah atau database Influenza A/H1N1 lainnya di dunia. Perbandingan filogenetika dari gen HA akan dianalisa dengan menggunakan analisis *neighbour joining* (NJ) dengan program MEGA 4 [12].
- Susceptibiliti

Susceptibiliti virus influenza untuk amantadine dan inhibitor neuraminidase akan ditentukan oleh uji fluorometri dengan menggunakan kit NA-Fluor™ Influenza Neuraminidase Assay Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA – USA). Uji fenotipik ini umumnya dianggap standar uji laboratorium resistensi obat antivirus dan ditentukan oleh mutasi spesifik dalam genom virus (genotipe), yang mengarah ke perubahan dalam protein target virus. Konsentrasi penghambatan 50% (IC50) nilai, yang merupakan konsentrasi obat yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas enzim sebesar 50%, ditentukan oleh pengujian aktivitas NA virus di hadapan serial setengah-log pengenceran dari masing-masing inhibitor[7].

- Analisis Data

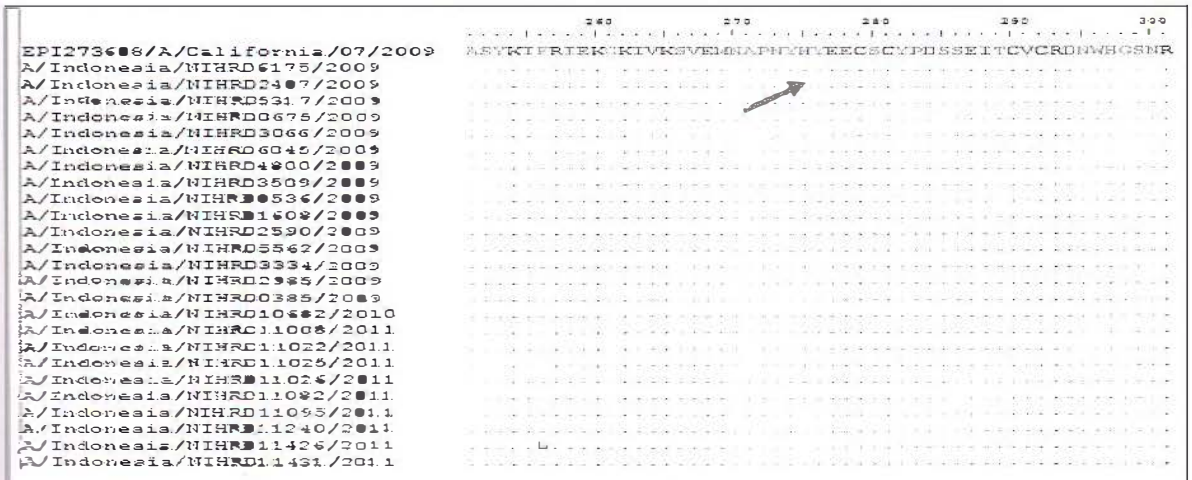
Analisis data resistensi dan susceptibiliti akan dilakukan dengan menggunakan software Robosage dan atau Graphpad.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

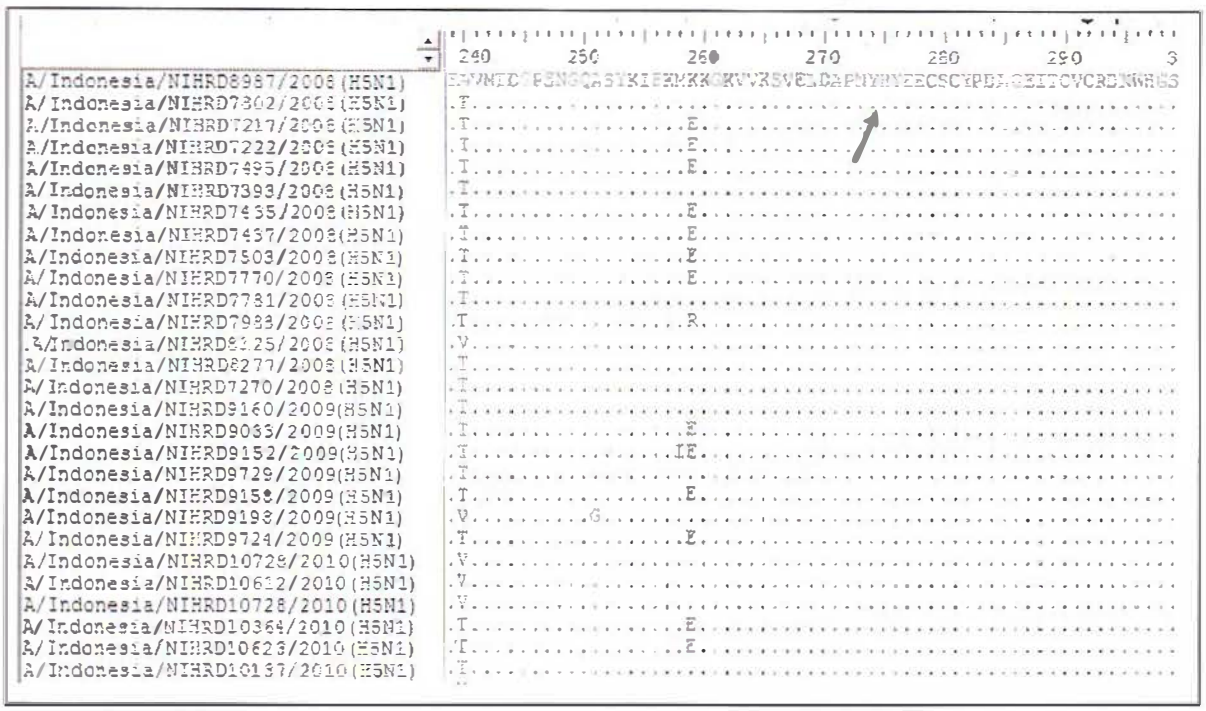
Total masing-masing 25 isolat influenza A/H1N1pdm tahun 2009-2011 dan 25 isolat A/H5N1 tahun 2005-2012 yang berhasil dianalisis untuk merepresentasikan resistensi antiviral amatandine dan oseltamivir pada gen NA dan M.

### V.1 Antiviral resistansi terhadap oseltamivir

Oseltamivir merupakan antiviral yang dapat menghambat penyebaran infeksi virus influenza. Kedua obat tersebut berperan sebagai substrat analog yang secara spesifik mengikat pada situs aktif gen NA dan menghambat virus untuk melepaskan diri dari inangnya. Resistensi Oseltamivir disebabkan oleh mutasi pada atau dekat situs aktif dari neuraminidase virus. Metabolit aktif oseltamivir akan mengikat neuraminidase virus dan menghambat fungsinya. Mutasi utama dari gen NA subtype N1 yaitu H275Y (oseltamivir) akan menghambat penataan ulang molekul, sehingga mencegah pengikatan oseltamivir, mengakibatkan resistensi terhadap oseltamivir. Mutasi tersebut memungkinkan adanya pengikatan substrat asam sialik alami, virus bermutasi sehingga dapat bertahan dan menyebar dan menginfeksi sel lainnya[17]. Mutasi yang berkenaan dengan oseltamivir sering ditemukan pada virus influenza musiman H1N1.[18] Walaupun ditemukan resistensi terhadap oseltamivir pada virus pandemi H1N1 di Jepang, Hong Kong, dan Denmark[19], analisis residu untuk resistensi antiviral pada gen NA menunjukkan bahwa semua virus pandemi H1N1pdm09 dan A/H5N1 dari Indonesia masih sensitif terhadap antiviral oseltamivir (gambar 1 dan 2). Oleh karena itu, terapi antiviral dengan oseltamivir untuk pencegahan penyebaran virus pandemi H1N1 dan flu burung A/H5N1 dapat terus dipergunakan.




Gambar 1. Analisis residu gen NA A/H1N1pdm09. Resistensi antiviral oseltamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 275 (H275Y)




Gambar 2. Analisis residu gen NA A/H5N1. Resistensi antiviral Oseltamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 275 (H2875Y)

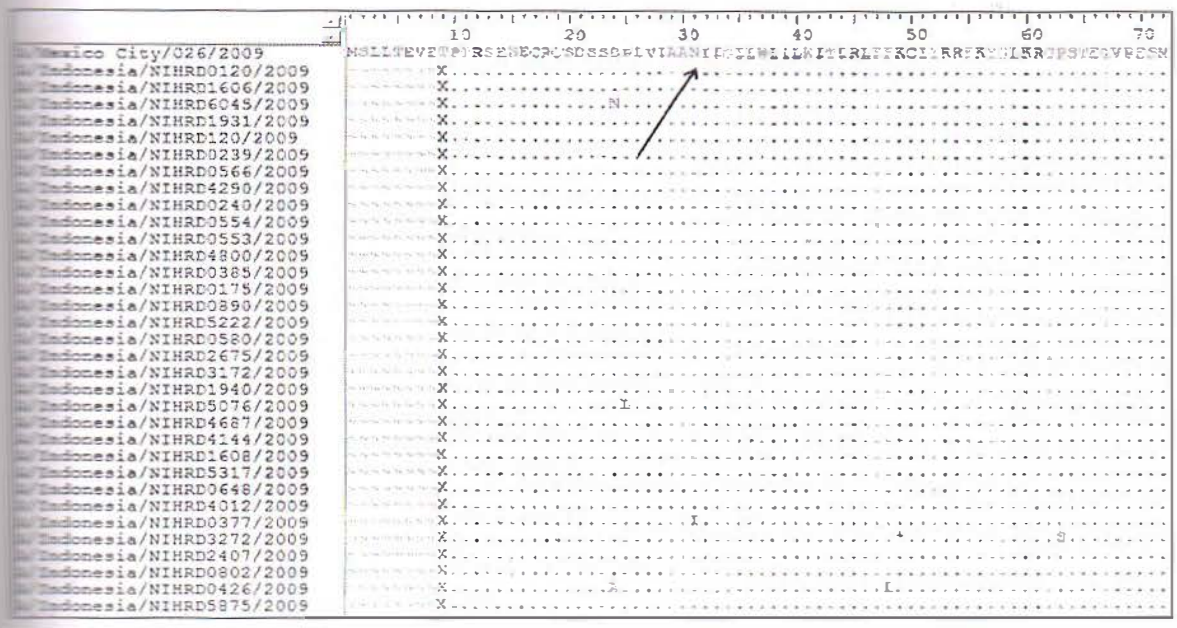
**Antiviral resistensi terhadap amantadin**

Amantadin adalah antiviral yang didesain untuk menghambat fungsi dari protein M2 yang berfungsi untuk memompa ion proton ke dalam partikel virus. Sejumlah ion proton di dalam sel akan menciptakan lingkungan asam yang akan menyebabkan pelepasan partikel virus. Proses ini sangat esensial pada tahap pertama replikasi suatu partikel virus. Jadi amantadin merupakan antiviral yang dapat menghambat replikasi virus. Tetapi, virus dapat melepaskan diri dari efek antiviral tersebut bila terjadi mutasi pada beberapa asam amino gen M, yaitu pada posisi 26, 27, 30, dan 31.[22] Mutasi yang paling signifikan yang mengindikasikan resistensi terhadap amantadin yaitu mutasi pada posisi asam amino 31 (S31N)[18].

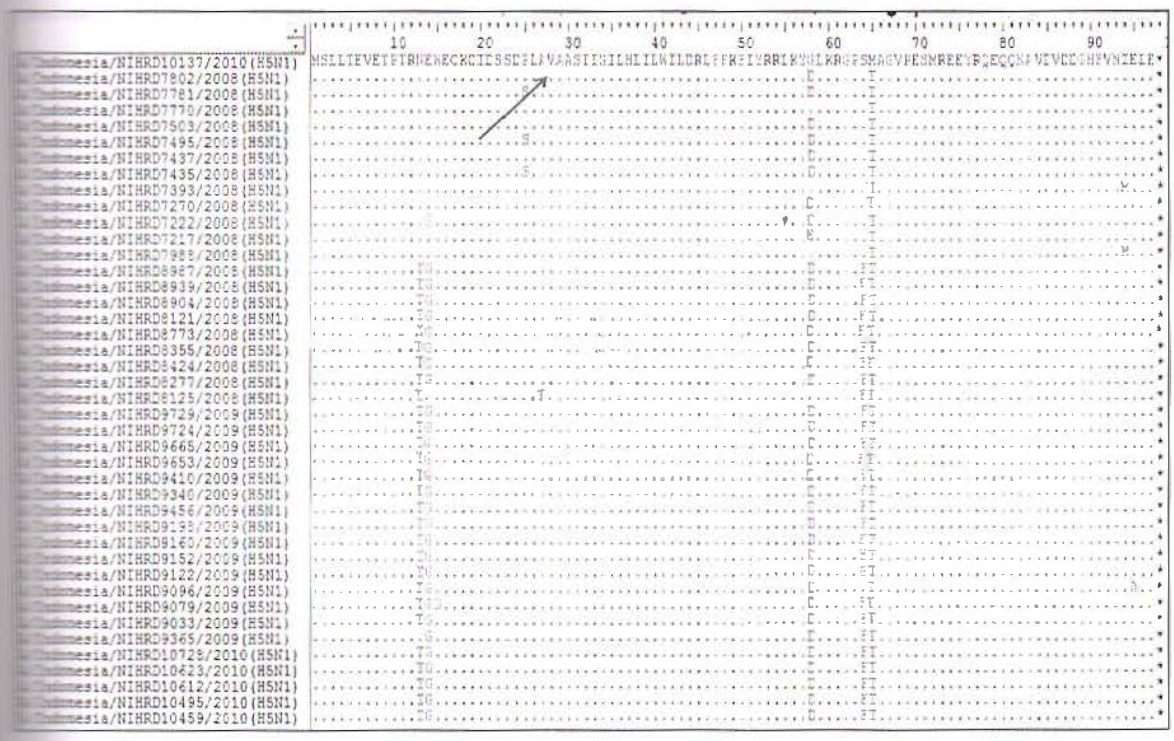
Analisis bioinformatika dari protein M virus pandemic A/H1N1 Indonesia menunjukkan bahwa virus tersebut mempunyai mutasi S31N (Serin-31-Asparagin) (gambar 3). Konsekuensinya, antiviral amantadin tersebut tidak bisa lagi digunakan sebagai obat terapi untuk virus influenza pandemic A/H1N1.

Semua virus indonesia A/H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan mutasi M2 V27A menunjukkan perlawanan mereka terhadap amantadine (gambar 4).

Mutasi ini terkait dengan perlawanan terhadap saluran ion M2 yang memblokir antiviral golongan adamantane. Mutasi tersebut juga dilaporkan dalam protein M2 virus A/H5N1 yang diisolasi dari manusia dan unggas di Hong Kong, Vietnam, Thailand, Indonesia dan Kamboja



Gambar 3. Analisis residu gen M. Resistensi antiviral Amantadin ditunjukkan pada posisi asam amino 27, 30, 31, dan 34 (V27A, A30TP, S31N, G34E).



Gambar 4. Analisis residu gen M A/H5N1. Resistensi antiviral Amantadin ditunjukkan pada posisi asam amino 27, 30, 31, dan 34 (V27A, A30TP, S31N, G34E).

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Merebaknya pandemi virus influenza A/H1N1 pada tahun 2009 dan A/H5N1 sejak tahun 2005 telah membuat perhatian publik yang cukup besar. Oleh karena itu, diadakan studi untuk melihat bagaimana karakterisai resistensi dari virus tersebut terhadap antiviral oseltamivir dan amantadin khususnya pada virus yang diisolasi dari Indonesia. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa antiviral amantadine

Untuk mencegah, mengendalikan, dan memonitor lebih lanjut penggunaan antiviral oseltamivir dan amatandin perlu dilakukan penelitian secara rutin setiap tahun mengenai suseptibiliti obat tersebut supaya optimal digunakan sebagai pencegahan dan pengobatan infeksi berat influenza A/H1N1pdm09 maupun A/H5N1.

## VII. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana dengan dana DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan tahun 2012. Penulis selaku ketua pelaksana mengucapkan terima kasih untuk kerjasama, bantuan, dan dukungan kepada semua tim yang terlibat di dalam penelitian ini.

## VI. DAFTAR PUSTAKA


1. Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition. 2007.*The McGraw-Hill Companies. US*
2. Lynnette Brammer, Alicia Budd, Nancy Cox. Seasonal and pandemic influenza surveillance considerations for constructing multicomponent systems. *Influenza and Other Respiratory Viruses* - Volume 3, Issue 2, Date: March 2009, Pages: 51-58
3. Pillay D and Maria Zambon. Antiviral Drug Resistance. *BMJ* 1998;317;660-662
4. McKimm-Breschkin, J., T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, and M. Zambon. 2003. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2264–2272
5. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet.* 2006 Jan 28;367(9507):303-13
6. Vincent Racaniello. 2009. Release of influenza viral RNAs into cells. ttp://www.virology.ws/2009/05/06/release-of-influenza-viral-rnas-into-cells/.
7. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet.* 2005 Oct 1;366(9492):1175-81.
8. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *Jama.* 2006 Feb 22;295(8):891-4.
9. Carr J, Ives J, Kelly L, Lambkin R, Oxford J, Mendel D, et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Res.* 2002 May; 54(2):79-88.
10. Moscona A. 2005. Oseltamivir Resistance-Disabling Our Influenza Defenses. *New England Journal of Medicine.* 353 : 2633-2636
11. Herlocher ML, Carr J, Ives J, Elias S, Truscon R, Roberts N, et al. Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res.* 2002 May;54(2):99-111.
12. Ives JA, Carr JA, Mendel DB, Tai CY, Lambkin R, Kelly L, et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2002 Aug;55(2):307-17.
13. Herlocher ML, Truscon R, Elias S, Yen HL, Roberts NA, Ohmit SE, et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis.* 2004 Nov 1;190(9):1627-30.
14. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* ;**353**(25):2667-72
15. Abed Y, A.M. Bourgault, R. J Fenton, et.all. 2002. Characteristic of 2 Influenza A (H3N2) Clinical Isolates with Reduced Susceptibility to Neuraminidase Inhibitrs Due to Mutations in The Hemagglutinin Gene. *The Journal of Infectious Disease.* 186 : 1074-80

16. Vasiliy P. Mishin,1† Frederick G. Hayden,1,2 and Larisa V. Gubareva. 2005. Susceptibilities of Antiviral-Resistant Influenza Viruses to Novel Neuraminidase Inhibitors. *Antirmicrobial agents and chemotheaph.* 49 : *4515–4520*
17. Tiffany G. Sheu, Varough M. Deyde, Margaret Okomo-Adhiambo, Rebecca J. Garten, Xiyan Xu, Rick A. Bright, † Ebonee' N. Butler, Teresa R. Wallis, Alexander I. Klimov, and Larisa V. Gubareva. 2008. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 52 (9) : 3284–3292
18. A Lackenby, O Hungnes, S G Dudman, A Meijer, W J Paget, A J Hay, M C Zambon. 2008. Emergence of Resistance to Oseltamivir Among Influenza A(H1N1) Viruses In Europe. *Rapid Communication.* Eurosurveillance. 13 (1-3). www.eurosurveillance.org
19. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jμl;50(7):2395-402.
20. Tiffany G. Sheu, Varough M. Deyde, Margaret Okomo-Adhiambo, Rebecca J. Garten, Xiyan Xu, Rick A. Bright, † Ebonee' N. Butler, Teresa R. Wallis, Alexander I. Klimov, and Larisa V. Gubareva. 2008. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 52 (9) : 3284–3292
21. A Lackenby, O Hungnes, S G Dudman, A Meijer, W J Paget, A J Hay, M C Zambon. 2008. Emergence of Resistance to Oseltamivir Among Influenza A(H1N1) Viruses In Europe. *Rapid Communication.* Eurosurveillance. 13 (1-3). www.eurosurveillance.org
22. Rameix-Welti MA, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. 2008. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PloS Path* 4 (7): e1000103

**Lampiran 2. Persetujuan Atasan**

Jakarta, 2012

MENYETUJUI :

| Kepala Bidang Biomedis | Pengusul |
|---|---|
| dr. Roselinda, M.Epid | Hana Apsari Pawestri, M.Sc |
| NIP.195807011987012001 | NIP. 19810629 200312 2002 |

DISETUJUI

| Ketua Panitia Pembina Ilmiah | Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan |
|---|---|
| Dr. Drg. Magdarina Destri Agtini, M.Sc | Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si,Apt |
| NIP.195012061984022001 | NIP 19621119 198803 1 001 |

KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

## VIII. LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat pembebasan etik penelitian

KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
*E-mail:* sesban@litbang.depkes.go.id, *Website:* http://www.litbang.depkes.go.id

**PERSETUJUAN ETIK (*ETHICAL APPROVAL*)**

Nomor : KE.01.06 /EC/ 439 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

***"Resistensi dan Suseptibiliti Antiviral Virus Influenza A/H5N1 dan A/H1N1pdm 09 terhadap Amantadin dan Oseltamivir secara Fenotif"***

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

- **Hana Apsari Pawestri, M.Sc.**

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 6 Juni 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo