

**PS1
3**

Jakarta

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Molekuler Karakteristik Virus Influenza A/H1N1 Pandemi di Indonesia



Hana Apsari Pawestri, M.Sc

**Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta
2011**

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Molekuler Karakteristik Virus Influenza A/H1N1 Pandemi di Indonesia



Hana Apsari Pawestri, M.Sc

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal :	30 - 8 - 2012
No. Induk :	PS 1-3 / 2012
No. Klass :	PS 1
	3

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta
2011

PS1
3

Kata Pengantar

Alhamdulillah Rabbil 'Alamin, puji syukur Penulis panjatkan kehadiran ALLAH SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Penelitian yang berjudul **"Molekuler Karakteristik Virus Influenza A/H1N1 Pandemi di Indonesia"**.

Terimakasih yang sebesar-besarnya Penulis sampaikan kepada Drs. Ondri 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 2011
Ketua Pelaksana

Hana Apsari Pawestri, M.Sc
NIP. 198106292003122002

Ringkasan Eksekutif

Molekuler Karakteristik Virus Influenza A/H1N1 Pandemi di Indonesia

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 telah menjadi pandemi bukan saja di Indonesia, tetapi juga di seluruh dunia. Meskipun demikian, tidak ada data dan informasi mengenai virus influenza H1N1 pandemi dari Indonesia yang berhasil dipublikasi. .

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi dan menganalisis (i) gen Hemagglutinin (HA) dalam menentukan *clade*, *receptor binding site*, dan *glycosilation site*, (ii) gen Neuraminidase (NA) dalam menentukan resistensi terhadap Oseltamivir dan adaptasi replikasi di dalam sel inang yang berbeda, (iii) gen Matrik (M) dalam menentukan resistensi terhadap Amantadin, (iv) gen *Polymerase Basic 1* (PB1), *Polymerase Basic 2* gene (PB2), *Polymerase Acid* (PA), and *Non Structural* (NS) untuk menentukan tingkat keganasan (virulensi) dan patogenitas, (v) gen *Nucleoprotein* (NP) untuk menentukan aktifitas dan adaptasi polimerase. Data dan informasi yang dihasilkan akan sangat bermanfaat sebagai masukan bagi kesehatan masyarakat mengenai evolusi virus, pengembangan vaksin, resistensi obat, dan persiapan pandemi

Metodologi penelitian yang digunakan yaitu berdesain deskriptif berbasis laboratorium dengan menggunakan sampel dari semua isolat positif virus influenza A/H1N1pdm yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, tahun 2011. Sedangkan metode pemeriksaannya yaitu berupa ekstraksi, amplifikasi RNA, sekuensing DNA dan analisis data residu menggunakan peranti lunak program Bioedit dan/atau DNA-Star. 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. Perbandingan filogenetika dari setiap gen akan dianalisa dengan menggunakan analisis *maximum parsimony* dan *neighbour joining* dengan program MEGA.

Hasil Penelitian yang didapat adalah sebagai berikut :

1. Karakterisasi molekuler gen HA

Hasil analisis residu terhadap gen HA menunjukkan bahwa situs pengikatan reseptor virus flu babi berisi urutan asam amino QAG yang dapat mengikat reseptor asam sialik (Sialic acid/SA) sistem pernapasan babi. Situs-ikatan reseptor dari flu musiman manusia virus H1N1 juga mengandung amino asam QEG yang mengikat khusus untuk SA- α -2,6Gal dari sistem pernafasan manusia bagian atas. Akibatnya, musiman flu manusia H1N1 pandemi dapat menginfeksi dan menyebabkan gejala pada manusia.

2. 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.

3. 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).

4. Karakterisasi molekuler gen NP

Aktivitas polimerasi untuk adaptasi terhadap inang ditunjukkan pada posisi asam amino N319K, yang menunjukkan bahwa pada posisi tersebut belum mengalami mutasi yang berakibat pada peningkatan adaptasi pada inang lain yang berbeda.

5. Karakterisasi molekuler gen NS

Analisis residu PDZ domain untuk patogenitas dan spesifik inang pada gen NS, menunjukkan bahwa virus pandemi A/H1N1 merupakan virus dengan patogenitas yang rendah yang ditandai oleh *stop codon* pada posisi 220 dan C terminus 227-230 (GTEI).

6. Karakterisasi molekuler gen PA

Patogenitas virus ditunjukkan pada asam amino gen PA pada posisi 515. Hasil analisis urutan sekuens menunjukkan bahwa virus A/H1N1 pandemi tidak mempunyai patogenitas yang tinggi.

7. Karakterisasi molekuler gen PB1

Virulensi dan patogenitas virus influenza pandemi A/H1N1 juga ditandai pada posisi asam amino gen PA K207R (Lys207Arg) dan Y436H (Tyr436His) yang menunjukkan bahwa virus tersebut mempunyai patogenitas yang rendah.

8. Karakterisasi molekuler gen PB2

Analisis asam amino menunjukkan bahwa gen PB2 dari virus pandemi H1N1 dapat menghasilkan protein PB1-F2 yang hanya terdiri dari 11 asam amino karena adanya kodon stop awal pada posisi 12. Oleh karena itu, protein PB1-F2 virus tersebut diperpendek sehingga tidak mampu menginduksi apoptosis. Hasil ini menunjukkan bahwa virus pandemi flu H1N1 adalah virus dengan patogenitas yang rendah

Kesimpulan dan hasil analisis yang didapatkan menunjukkan bahwa pandemi manusia influenza A (H1N1) adalah virus yang berasal dari berbagai virus yang sudah ada, yang menggabungkan materi genetik dari flu burung (H1N1) virus, flu babi klasik (H1N1), flu manusia (H3N2), dan Eurasia flu babi Eurasia (H1N1). Analisis urutan untuk *receptor binding site* dan *cleavage site* hemagglutinin (HA), *stalk* neuraminidase (NA), non-struktural protein 1 (NS1), polimerase protein dasar 2 (PB2), dan protein polimerase dasar 1 (PB1), menunjukkan bahwa (i) virus pandemi influenza manusia A (H1N1) adalah virus patogen virulen yang rendah, (ii) replikasi terbatas pada sel-sel saluran pernapasan bagian atas, sehingga tidak menyebabkan infeksi sistemik, (iii) menyebar di kalangan hanya manusia, (iv) replikasi dapat dihambat oleh oseltamivir, zanamivir, interferon (IFN), dan tumor necrosis faktor α (TNF- α).

Molekuler Karakteristik Virus Influenza A/H1N1 Pandemi di Indonesia

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 dari 63 isolat virus pandemi H1N1 Indonesia. Data ini akan memberikan informasi yang berguna mengenai : pola evolusi, analisis virus, database virulensi, pengembangan vaksin, studi resistensi antiviral, dan kesiapsiagaan pandemi.

Metode

RT-PCR dan sekuensing metode Sanger terhadap RNA isolat H1N1 telah dilakukan pada 63 isolat dari 63 pasien H1N1. Dilakukan analisis residu mengenai evolusi virus, situs pelekatan reseptor, situs pemotongan, resistensi terhadap oseltamivi, zanamivir, dan amantadin, virulensi dan patogenisitas, aktivitas polimerase, serta adaptasi terhadap pertumbuhan dalam inang yang berbeda.

Hasil

Isolat virus pandemi A/H1N1 sebanyak 63 diperoleh dari berbagai propinsi di Indonesia selama pandemi pada tahun 2009. Semua isolat tersebut memiliki beberapa motif asam amino pada protein HA yang berkaitan dengan virus berpatogen rendah (*low pathogenic influenza virus*). Motif tersebut ditemukan dan serupa dengan motif pada virus babi dan virus musiman H1N1 dari Indonesia. 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 adaptasi terhadap inangnya. Tidak ditemukan mutasi terhadap antiviral oseltamivir dan zanamivir dalam protein NA. Semua gen NS dari virus tersebut tidak memiliki motif ESEV pada PDZ domain, dan tidak ada mutasi pada posisi asam amino no 92 (D92N). Selain itu, semua gen PB2 memiliki Glu (E) 627 dan Asp (D) 701 yang tidak berkaitan dengan tingkat virulensi maupun patogenitas yang tinggi.

Kesimpulan

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

Kata kunci : karakterisasi molekuler, virus pandemi H1N1

Molecular Characterization of Influenza Virus A/H1N1 in Indonesia

Abstract

Background

Within 2009, as the other country in the worlds, Indonesia reported the pandemic A/H1N1 viruses cases. Even though, the case fatality rate was not high as H5N1 cases, no sufficient molecular information from Indonesia has yet been published. We have generated full length sequences from 63 Indonesian H1N1 isolates. These data provide information into public health, virus evolution pattern analysis, virulence database, vaccine development, drug resistant studies, and pandemic preparedness.

Methods

RT-PCR and Sanger Sequencing method of H5N1 RNA was conducted on 63 isolates from 63 H1N1 patients. Residue analysis that confer to clades, lineages, receptor binding site, glycosilation site, resistance to oseltamivir and adamantanes, virulence and pathogenicity, polymerase activity, and adaptation to growth in different host are generated.

Results

These sixty three H1N1 influenza isolates were obtained from different provinces of Indonesia during the pandemic in 2009. All the Indonesian isolates has the multiple basic amino acids to satisfy the motif of a low pathogenic influenza virus. Those motif were similar to those of the swine virus and other seasonal H1N1 viruses from Indonesia. The presence of amantadine resistance in the M2 gene of Indonesia viruses isolated during this outbreak was suggested by a fixed mutation in M2 (S31N). No mutation occurs in the PA gene (T515A), encoding a protein involved in higher pathohenicity in mice. NA gene of all isolates doesn't have 20 amino acids deletion associated with adaptation to growth in chicken or avian. There was no mutation associated with resistance to oseltamivir and zanamivir in the NA protein. All the NS gene of the viruses doesn't have ESEV motif of PDZ binding domain and has Asp at position 92. In addition, all the PB2 gene has Glu (E) 627 and Asp (D) 701.

Conclusion

The comprehensive genetic characterization of Indonesian H1N1 isolated during the pandemic of 2009. These findings upraise concern for the important of genome characterization for the human health risk and the need for increased efforts to monitor the evolution of influenza viruses across the Indonesia provinces.

Key Words: Molecular characterization, H1N1pandemic viruses

Daftar Anggota Tim Peneliti

No.	N a m a	Kedudukan dalam Tim
1	Hana Apsari Pawestri, M.Sc	Ketua Pelaksana (Peneliti Pertama)
2	Drs. Syahril Harun, M.Sc	Peneliti
3	dr. Vivi Setiawaty, M.Biomed	Peneliti
4	dr. Ni Ketut Susilarini, MS	Peneliti
5	Kindi Adam, S.Si	Peneliti
6	Hartanti Dian Ikawati, S.Si	Peneliti
7	Kartika Dewi Puspa, S.Si, Apt	Peneliti
8	Sumarno	Pembantu Peneliti
9	Triyani Sukarso	Pembantu Peneliti
10	Arie Ardiansyah Nugraha	Pembantu Peneliti
11	Fahim	Pembantu Peneliti
12	Risma Sinurat	Pembantu Administrasi

DAFTAR ISI

	Hal.
Kata Pengantar	i
Ringkasan Eksekutif	ii
Abstrak	iv
Daftar Nama Tim Peneliti.....	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	viii
Daftar Lampiran	ix
 I. PENDAHULUAN.....	 1
 II. TUJUAN.....	 2
 III. MANFAAT	 3
 IV. METODOLOGI	
IV.1. Kerangka Pikir.....	3
IV.2. Tempat dan Waktu Penelitian	3
IV.3. Desain & Jenis Penelitian.....	3
IV.4. Populasi dan Sampel	3
IV.5. Cara Pemilihan dan Estimasi Sampel	4
III.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel	4
III.7. Bahan dan Cara Kerja serta Analisis Data	4
 V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
V.1. Karakterisasi molekuler gen HA.....	5
V.2. Karakterisasi molekuler gen NA.....	9
V.3. Karakterisasi molekuler gen NS.....	11
V.4. Karakterisasi molekuler gen M.....	13
V.5. Karakterisasi molekuler gen PB2.....	14
V.6. Karakterisasi molekuler gen NP.....	14
V.7. Karakterisasi molekuler gen PB1.....	15
V.8. Karakterisasi molekuler gen PA.....	17
 V. KESIMPULAN DAN SARAN	 18
 VI. UCAPAN TERIMA KASIH.....	 18
 VIII. DAFTAR PUSTAKA.....	 19
 IX. LAMPIRAN	
Lampiran 1. Surat pembebasan etik penelitian.....	21
Lampiran 2. Surat keputusan penelitian.....	22
Lampiran 2. Lembar pengesahan penelitian.....	25

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 1. Analisis residu gen HA. Situs pelekatan reseptor (<i>Receptor Binding Site</i>) ditunjukkan pada posisi asam amino 227-229 (QEG).....	6
Gambar 2. Analisis residu gen HA. Situs pemotongan (<i>Cleavage site</i>) ditunjukkan pada posisi asam amino 327-339.....	7
Gambar 3. Pohon filogeni gen HA. Analisis dilakukan oleh perangkat lunak MEGA 4 dengan metoda <i>neighbour joining</i> (NJ), Kimura-2 parameter.....	8
Gambar 4. Analisis residu gen NA. <i>Stalk region</i> ditunjukkan pada posisi asam amino 49-68.....	9
Gambar 5. Analisis residu gen NA. Resistensi antiviral Oseltamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 275 (H2875Y).....	10
Gambar 6. Analisis residu gen NA. Resistensi antiviral Zanamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 136 (Q136K).....	11
Gambar 7. Analisis residu gen NS. Situs PDZ (C terminal) ditunjukkan pada posisi asam amino 227-230 (GTEI).....	12
Gambar 8. Analisis residu gen NS. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 92 (D92E).....	12
Gambar 9. Analisis residu gen M. Resistensi antiviral Amantadin ditunjukkan pada posisi asam amino 27, 30, 31, dan 34 (V27A, A30TP, S31N, G34E).....	13
Gambar 10. Analisis residu gen PB2. Virulensi ditunjukkan pada posisi asam amino 627 (E627K) dan 701 (D701N).....	14
Gambar 11. Analisis residu gen NP. Aktivitas polimerase ditunjukkan pada posisi asam amino 319 (N319K).	15
Gambar 12. Analisis residu gen PB1. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 207 (K207R).....	16
Gambar 13. Analisis residu gen PB1. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 436 (Y436H).....	16
Gambar 14. Analisis residu gen PA. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 515 (T515A).....	17

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Surat pembebasan etik penelitian.....	21
Lampiran 2. Surat keputusan penelitian.....	22
Lampiran 3. Lembar pengesahan penelitian.....	25

I. PENDAHULUAN

Infeksi virus influenza merupakan penyakit yang saat ini masih menjadi penyebab masalah kesehatan yang utama dengan angka kematian yang cukup tinggi di dunia¹. 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 penghujan². Tetapi, hanya virus influenza A yang bertanggung jawab untuk terjadinya influenza musiman dan pandemi global³. Setiap tahunnya, diperkirakan epidemi influenza menyebabkan 3-5 juta kasus influenza berat dan 250,000-500,000 kematian di seluruh dunia¹. Infeksi virus influenza pada kenyataannya juga berimbas pada sektor ekonomi. Diperkirakan kerugian terjadi lebih dari \$10-60 juta pertahun (tergantung dari besarnya kejadian epidemi) di negara berkembang¹.

Kejadian luar biasa dan epidemi terjadi karena adanya perubahan antigen dan keragaman pada salah satu atau kedua glikoprotein dari virus influenza, yaitu Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA)⁴. Perubahan tersebut bisa terjadi dikarenakan adanya mutasi atau seleksi, seperti oleh tekanan imunitas (*antigenic drift*)^{2,3,4}. *Antigenic drift* terjadi sebagai hasil dari keragaman mutasi, termasuk substitusi, delesi, dan insersi diantara gen HA dan NA^{2,4}. Mutasi tersebut terjadi karena adanya kesalahan aktifitas *proofreading* selama proses transkripsi dari genom influenza⁴. Mutasi yang mengubah situs antigenik pada glikoprotein permukaan menghasilkan strain virus yang tidak dapat dikenali oleh sistem imunitas sel inang^{5,6}. Oleh karena itu, komposisi dari vaksin influenza musiman perlu diperbaharui secara berkala dengan koordinasi WHO Global Influenza programme dalam rangka menghadapi perubahan virus influenza⁶.

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 global⁵. *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 pandemic^{5,6}. Pandemi virus influenza A/H2N2 (1957) dan Hong Kong Influenza A/H3N2 (1968) pandemics disebabkan oleh *reassortant* yang mengandung komponen segmen HA, PB1, dan NA atau HA dan PB1 virus dari burung di dalam virus manusia. Kemudian, penularan langsung dari virus flu burung influenza A/H5N1 virus dari peternakan ke manusia dilaporkan pertama kali dengan adanya kejadian

luar biasa oleh virus flu burung H5N1 virus di Hong Kong pada tahun 1997⁷.

Virus influenza yang mengalami *triple re-assortment*, mengandung gen *HA*, nukleoprotein (*NP*), *NA*, *matrik (M)*, dan protein nonstruktural (*NS*), yang berasal mula dari virus influenza A babi. Gen polimerase PB2 (*PB2*) dan polimerase (*PA*) virus flu burung yang berasal dari Amerika Utara dan gen polimerase PB1 (*PB1*) dari virus influenza A manusia, telah berhasil diidentifikasi sebagai virus baru influenza A/H1N1⁸. Virus baru ini dilaporkan menular dengan sangat baik antar manusia dan dibuktikan bahwa manusia tidak mempunyai kekebalan terhadap virus tersebut. Kondisi ini telah memenuhi kriteria bahwa virus baru tersebut berpotensi menjadi virus penyebab pandemi⁹. Kesimpulannya, sejak tahun 2009, virus tersebut telah menyebar ke seluruh dunia termasuk Indonesia, menyebabkan dikeluarkannya keputusan WHO akan terjadinya pandemi.

Meskipun demikian, tidak ada data dan informasi mengenai virus influenza H1N1 pandemi dari Indonesia yang berhasil dipublikasi. Dalam penelitian ini, kami mengusulkan untuk mengkarakterisasi dan menganalisis secara molekuler semua gen dari isolat virus Influenza A/H1N1 yang berasal dari Indonesia. Data dan informasi yang dihasilkan akan sangat bermanfaat sebagai masukan bagi kesehatan masyarakat mengenai evolusi virus, pengembangan vaksin, resistensi obat, dan persiapan pandemi.

II. TUJUAN

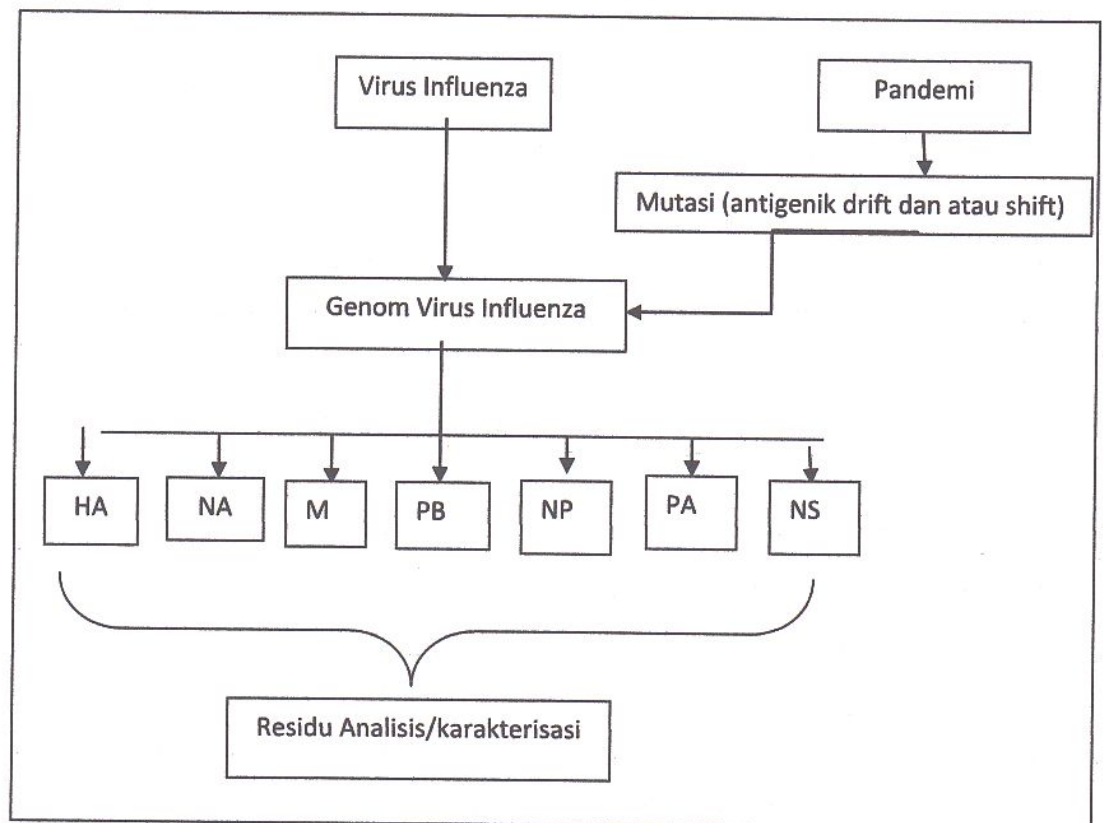
- 1) Untuk mengkarakterisasi gen Hemagglutinin (*HA*) dalam menentukan *clade*, *receptor binding site*, dan *glycosilation site*
- 2) Untuk mengkarakterisasi dan menganalisis gen Neuraminidase (*NA*) dalam menentukan resistensi terhadap Oseltamivir dan adaptasi replikasi di dalam sel inang yang berbeda.
- 3) Untuk mengkarakteristik dan menganalisis gen Matrik (*M*) dalam menentukan resistensi terhadap Amantadin
- 4) Untuk mengkarakterisasi dan menganalisis gen Polymerase Basic 1 (*PB1*), Polymerase Basic 2 gene (*PB2*), Polymerase Acid (*PA*), and Non Structural (*NS*) untuk menentukan tingkat keganasan (virulensi) dan patogenitas.
- 5) Untuk mengkarakterisasi dan menganalisis gen Nucloprotein gene (*NP*) untuk menentukan aktifitas dan adaptasi polimerase

III. MANFAAT

Sebagai data dasar untuk penelitian lanjutan dan bahan masukan kepada Program dalam rangka penanggulangan pandemi influenza

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 : 2011

IV.3. Desain dan Jenis Penelitian

Studi deskriptif berbasis laboratorium.

IV.4. Populasi dan Sampel

Populasi: Semua spesimen KLB yang positif A/H1N1pdm dengan PCR yang

disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, tahun 2009-2011.

Sampel: Semua specimen KLB yang positif A/H1N1pdm dengan Kultur yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, tahun 2009-2011.

IV.5. Cara Pemilihan dan Estimasi Sampel

Sampel diambil dari penderita yang telah didiagnosa positif virus influenza A/H1N1 pada kejadian KLB tahun 2009 dengan metoda kultur virus.

IV.6. Kriteria Eksklusi dan Inklusi :

- *Kriteria Inklusi* : Semua isolat positif virus Influenza A/H1N1pdm yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan.
- *Kriteria Eksklusi* : Semua isolat negatif virus influenza A/H1N1pdm yang disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

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

- **Desain primer**
Sekuen nukleotida untuk gen HA, NA, M, NP, NS, PB1, PB2, dan PA dari virus influenza A/H1N1 pandemi 2009 (N=3000) diperoleh dari Pusat Data Virus Influenza (National Center for Biotechnology Information/NCBI, 2011). Kemudian sekuen tersebut diurutkan (*alignment*) dengan menggunakan perangkat lunak BioEdit versi 7.0.8.0 (Ibis Biosciences, USA)¹⁰. Primer untuk amplifikasi dan sekuensing dibuat dan didesain dengan menggunakan perangkat lunak Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)¹¹.
- **Ekstraksi, amplifikasi RNA, dan sekuensing**
RNA (ribonucleic acid) diekstraksi dari 140 µl isolat influenza A/H1N1 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 (*Reverse Transkriptase*) 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 3130xl (Applied Biosystem, Foster City, CA - USA).

- Sekuensing DNA, analisis data residu, dan pohon filogenetik

Hasil sekuensing akan dikompilasi dan diedit dengan menggunakan program Bioedit, CodonCode, dan DNA Star 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 4¹².

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

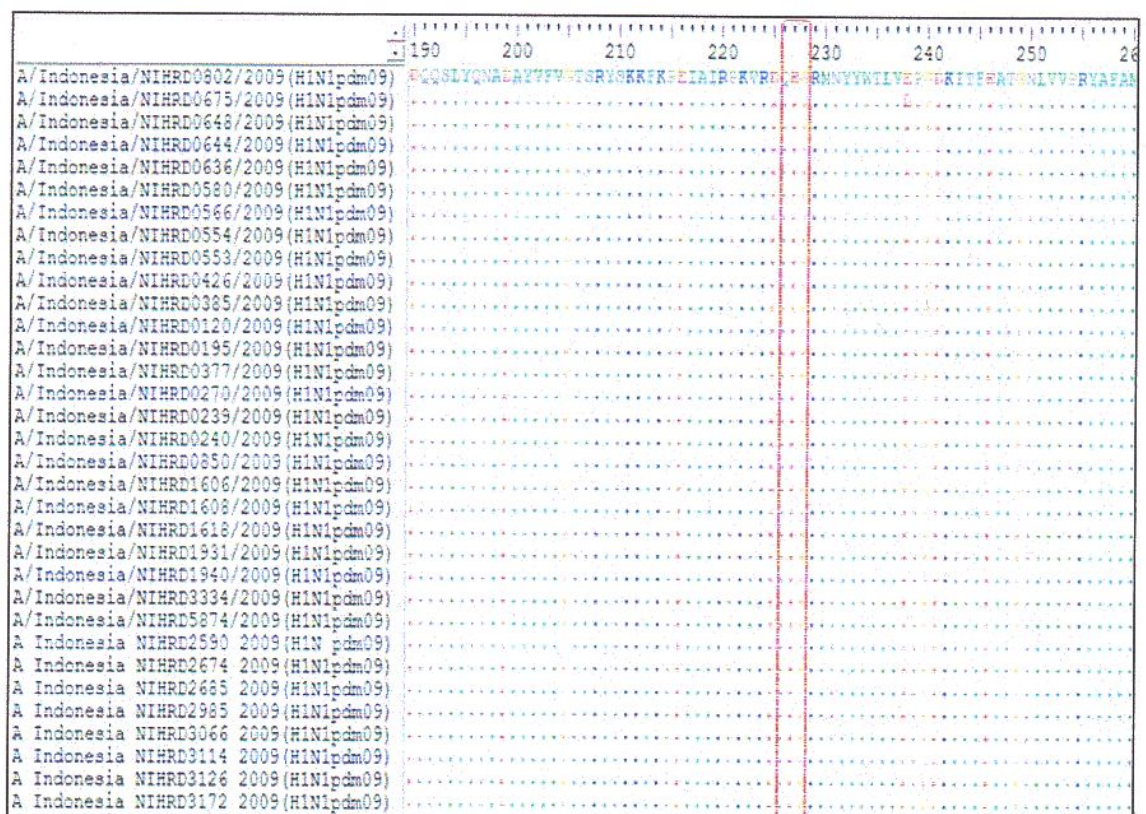
Total 63 isolat influenza A/H1N1 berhasil diperoleh untuk digunakan di dalam penelitian ini yang merepresentasikan sekuens nukleotida lengkap untuk gen HA, NA, M, NP, NS, PB1, PB2, dan PA.

V.1. Karakterisasi molekuler gen HA

Situs pelekatan reseptor (*receptor binding site*) pada molekul HA merupakan hal yang sangat penting bagi suatu virus untuk melekat secara spesifik pada reseptor Asam Sialat (*Sialic Acid*) pada permukaan selnya. Situs pelekatan tersebut secara spesifik menentukan kemampuan suatu virus dalam menginfeksi inangnya. Sebagai contoh, situs pelekatan reseptor dari molekul HA pada virus flu burung H5N1 mempunyai motif asam amino glutamin-serin-glisin (QSG) yang secara spesifik mengikat asam sialat yang berhubungan dengan galaktosa (Gal) oleh α -2.3 (asam sialat α -2.3) pada sistem pernapasan unggas. Di sisi lain, virus flu burung H5N1 tidak berhasil menginfeksi manusia dengan mudah karena sel reseptor manusia pada sistem pernapasan atas mengandung asam sialat α -2.6, bukan asam sialat α -2.3. Tetapi sistem pernapasan manusia bagian bawah mengandung asam sialat α -2.3, dengan demikian pada suatu kasus tertentu dimana jumlah titer virus sangat tinggi dan kasus mempunyai kontak yang sangat dekat dengan kasus positif H5N1, virus flu burung H5N1 dapat menginfeksi saluran pernafasan bagian bawah tersebut dan menyebabkan sakit bahkan kematian.^{13,14}

Situs pelekatan reseptor dari virus babi mempunyai motif asam amino glutamin-alanin-glisin (QAG) yang dapat berikatan dengan reseptor asam sialat dari sistem pernapasan babi. Sedangkan, situs pelekatan reseptor dari virus flu musiman H1N1 mempunyai motif asam amino glutamin-asam glutamat-glisin (QEG) yang secara spesifik dapat mengikat pada asam α -2.6 Gal dari sistem pernapasan bagian manusia bagian atas. Konsekuensinya, virus flu musiman H1N1 dapat menginfeksi dan menyebabkan kesakitan pada manusia.

Untuk mempelajari spesifisitas situs pelekatan reseptor dari virus influenza pandemi A/H1N1 pandemi, dilakukan analisis residu terhadap gen HA dari virus pandemi A/H1N1 yang diisolasi dari pasien di Indonesia (Gambar 1). Dari gambar tersebut, dapat diketahui bahwa semua isolat virus A/H1N1 Indonesia mempunyai situs pelekatan reseptor dengan motif asam amino QEG. Situs pelekatan tersebut dapat mengikat reseptor asam sialat α -2.6 Gal pada bagian sistem pernapasan manusia bagian atas.

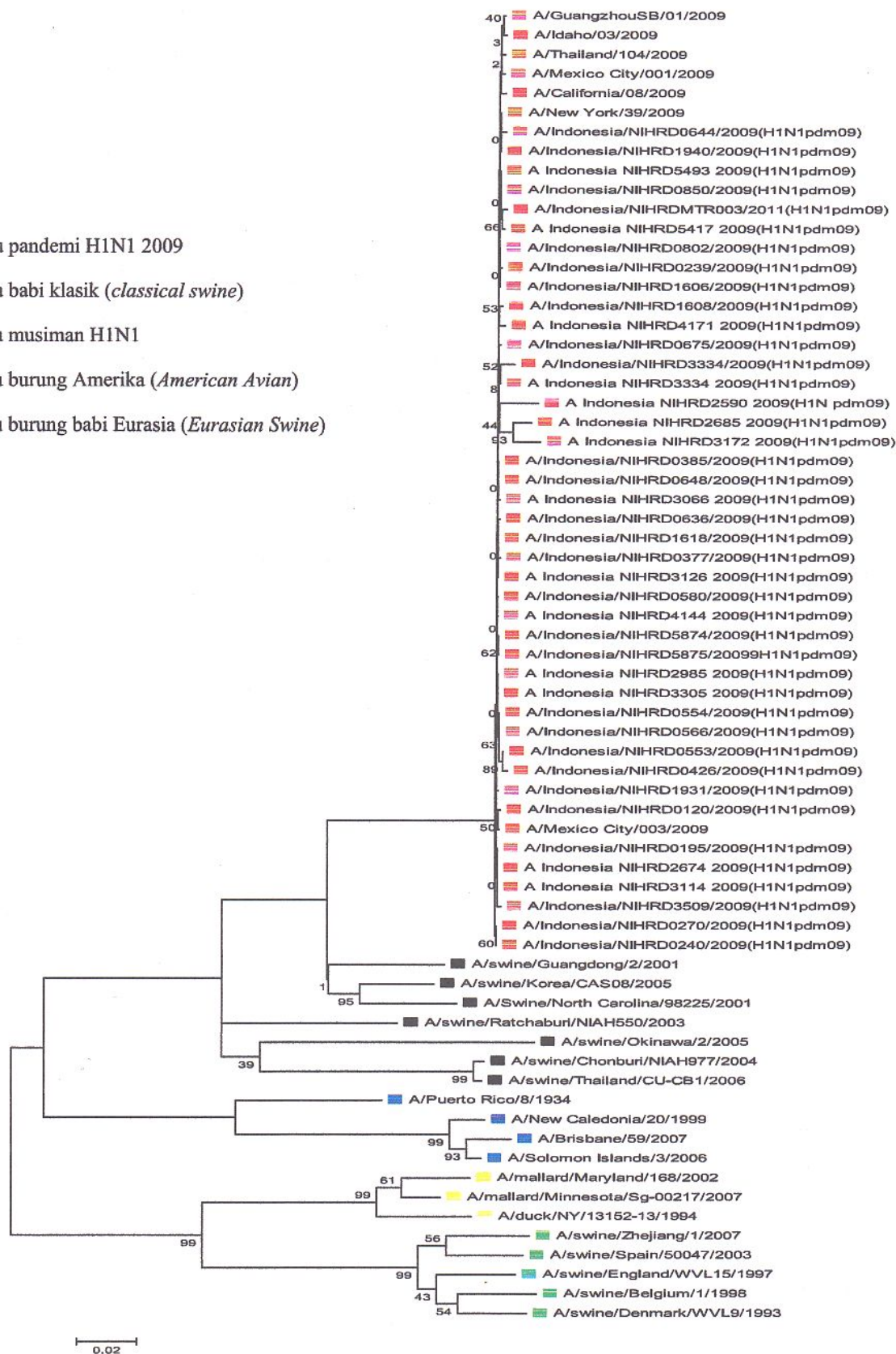


Gambar 1. Analisis residu gen HA. Situs pelekatan reseptor (*Receptor Binding Site*) ditunjukkan pada posisi asam amino 227-229 (QEG).

Virus flu burung dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe berdasarkan patogenitas dan situs pemotongan (*cleavage site*) pada gen HA. Tipe pertama dari virus tersebut

Keterangan :

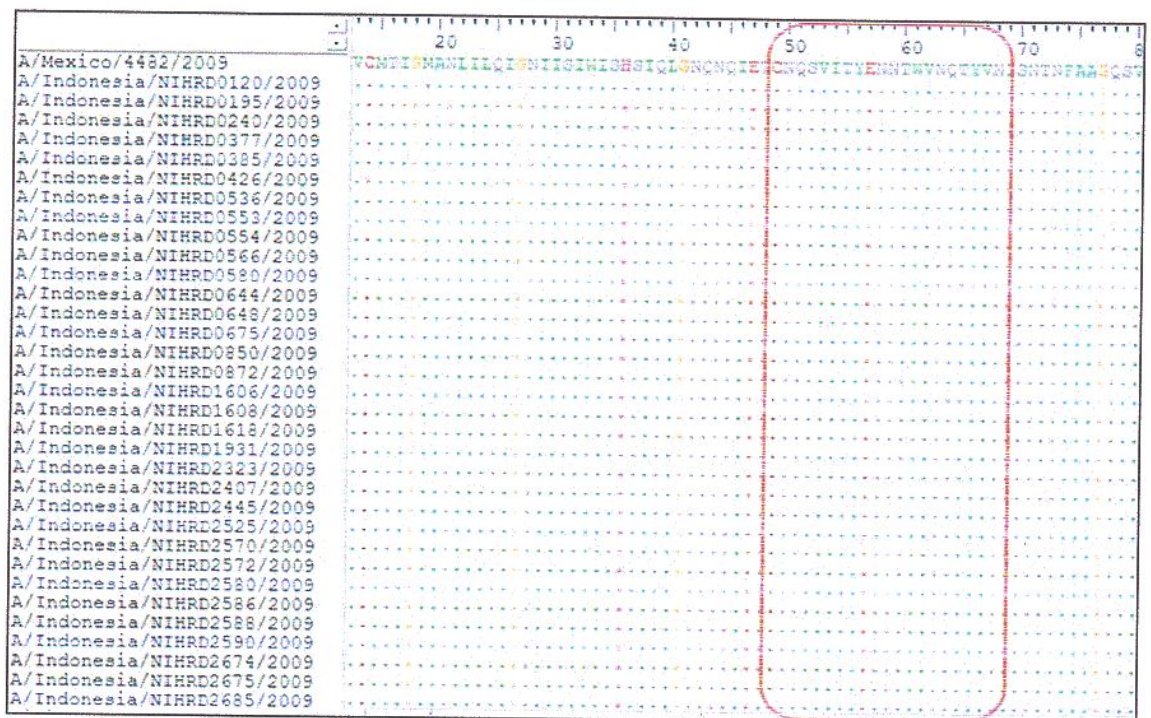
- = virus flu pandemi H1N1 2009
- = virus flu babi klasik (*classical swine*)
- = virus flu musiman H1N1
- = virus flu burung Amerika (*American Avian*)
- = virus flu burung babi Eurasia (*Eurasian Swine*)



Gambar 3. Pohon filogeni gen HA. Analisis dilakukan oleh perangkat lunak MEGA 4 dengan metoda *neighbour joining* (NJ), Kimura-2 parameter.

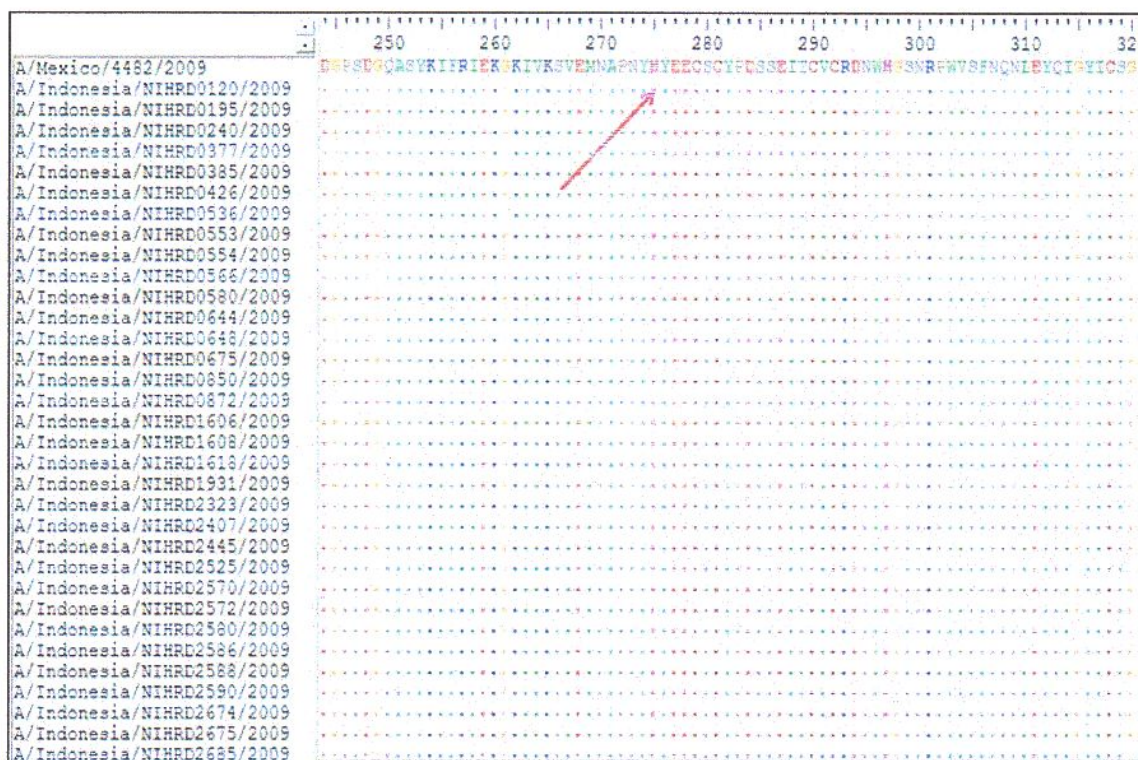
V.2. Karakterisasi molekuler gen NA

Enzim neuraminidase akan memotong residu asam sialat agar virus yang baru dapat melepaskan diri dari sel membran inangnya. Pemotongan residu asam sialat menyebabkan virus yang baru melepaskan diri dari inangnya dan menginfeksi sel lainnya. Analisis dari sekuen gen NA dari virus flu burung H5N1 menunjukkan bahwa sekuens tersebut kehilangan 20 asam amino (delesi) pada posisi 49-68 yang berada di posisi antara membran virus dan kepala globularnya (*stalk region*). Delesi tersebut menyebabkan posisi tersebut lebih pendek sehingga membuat virus lebih patogen dan virulen.¹⁶ Virus influenza babi H1N1, virus influenza musiman H1N1, serta virus influenza pandemi H1N1 tidak mempunyai delesi sebanyak 20 asam amino pada posisi *stalk*, sehingga virus tersebut tidak patogen dan virulen (gambar 4).



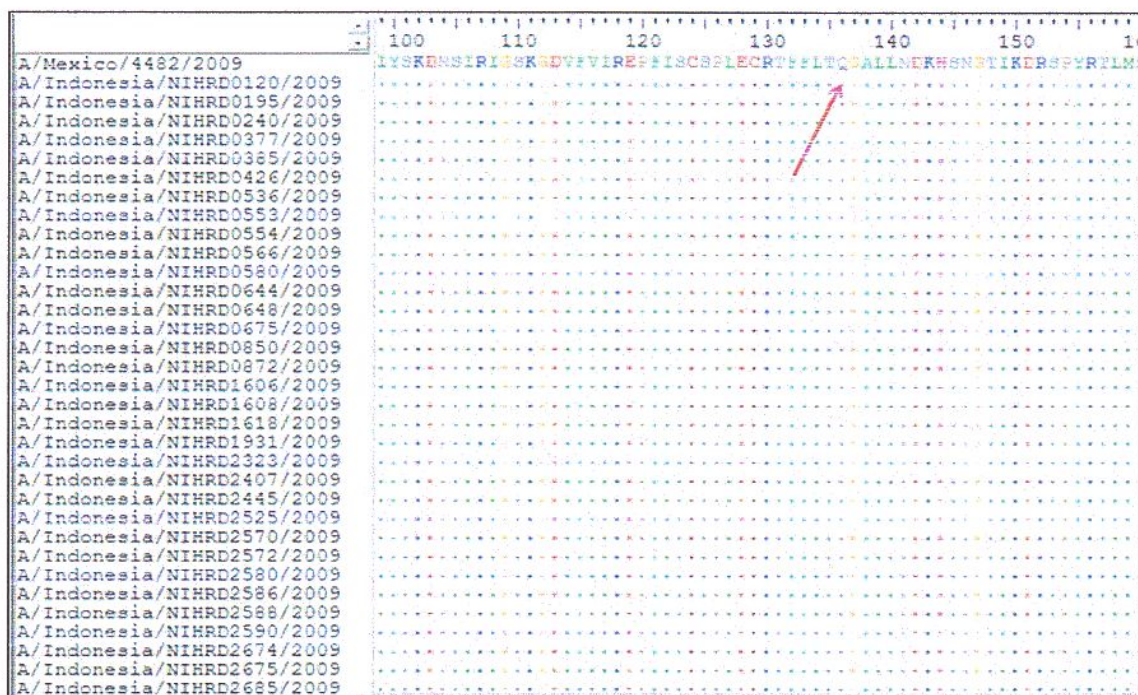
Gambar 4. Analisis residu gen NA. *Stalk region* ditunjukkan pada posisi asam amino 49-68

Oseltamivir dan zanamivir 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.



Gambar 5. Analisis residu gen NA. Resistensi antiviral Oseltamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 275 (H2875Y)

Resistensi Oseltamivir dan Zanamivir disebabkan oleh mutasi pada atau dekat situs aktif dari neuraminidase virus. Metabolit aktif oseltamivir dan zanamivir akan mengikat neuraminidase virus dan menghambat fungsinya. Mutasi utama dari gen NA subtype N1 yaitu H275Y (oseltamivir) dan Q136K (zanamivir) 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 lainnya¹⁷. 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 Denmark¹⁹, analisis residu untuk resistensi antiviral pada gen NA menunjukkan bahwa semua virus pandemi H1N1 dari Indonesia masih sensitif terhadap antiviral zanamivir dan oseltamivir (gambar 5 dan 6). Oleh karena itu, terapi antiviral dengan zanamivir dan oseltamivir untuk pencegahan penyebaran virus pandemi H1N1 dapat terus digunakan.



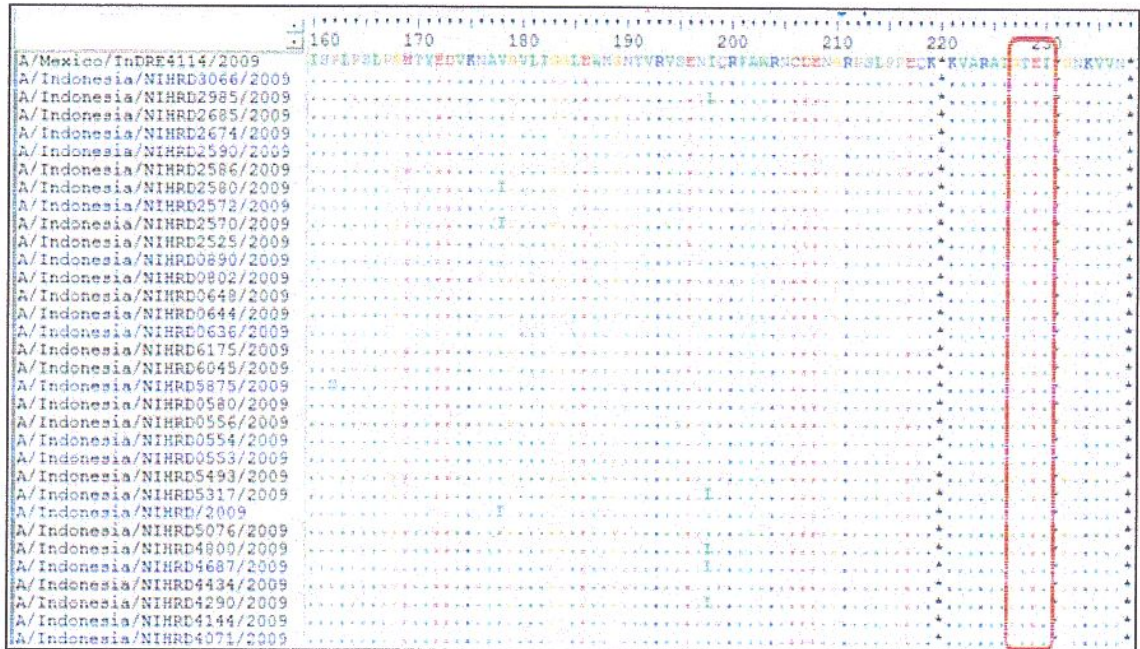
Gambar 6. Analisis residu gen NA. Resistensi antiviral Zanamivir ditunjukkan pada posisi asam amino 136 (Q136K)

V.3. Karakterisasi molekuler gen NS

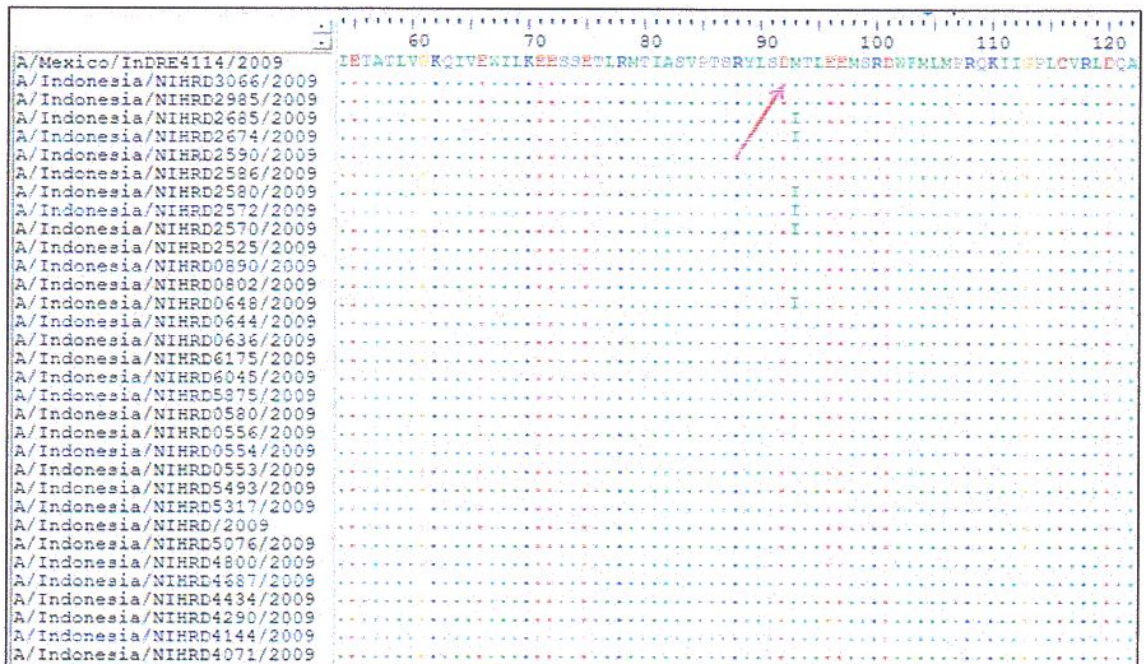
Sebuah studi yang dilakukan pada protein NS1 telah dilaporkan bahwa asam amino pada 4 posisi terakhir pada bagian C-Terminus (posisi no 227-330) dibentuk oleh motif ESEV (asam glutamik-serin-asam glutamik-valin). Fungsi dari motif ESEV adalah sebagai PDZ (*postsynaptic density protein*) untuk mengenali situs protein dan berperan serta didalam signaling sel. Virus yang mempunyai motif ESEV mempunyai kecenderungan berpatogen tinggi seperti flu Spanyol H1N1 dan flu burung H5N1.²⁰ Analisis terhadap gen NS1 flu pandemi H1N1 di Indonesia menunjukkan bahwa virus tersebut tidak mempunyai motif ESEV tetapi mempunyai *stop codon* pada posisi 220 (gambar 7). Hal ini menunjukkan bahwa virus pandemic H1N1 yang diisolasi dari Indonesia bukan merupakan virus dengan patogen yang tinggi.

Protein NS1 diekspresikan di dalam sel yang terinfeksi oleh virus Influenzaa dan terlibat di dalam proses penekanan oleh imunitas dari inangnya. Di dalam sel inang, IFN (*interferon*) dan TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) adalah molekul selular antiviral. Namun demikian, virus influenza dapat menolak efek dari IFN dan TNF- α dengan mutasi pada posisi asam amino 92 (D92E).²¹ Analisis terhadap gen NS1 pada virus pandemic H1N1 tidak mengandung mutasi dari protein asam aspartic (D) menjadi asam glutamik (E) pada

posisi asam amino 92 (gambar 8). Hal ini mengindikasikan bahwa IFN dan TNF- α secara alternatif dapat digunakan untuk menekan replikasi virus pandemi. H1N1.



Gambar 7. Analisis residu gen NS. Situs PDZ (C terminal) ditunjukkan pada posisi asam amino 227-230 (GTEI).



Gambar 8. Analisis residu gen NS. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 92 (D92E).

V.4. Karakterisasi molekuler gen M

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 9). Konsekuensinya, antiviral amantadin tersebut tidak bisa lagi digunakan sebagai obat terapi untuk virus influenza pandemic A/H1N1.



Gambar 9. Analisis residu gen M. Resistensi antiviral Amantadin ditunjukkan pada posisi asam amino 27, 30, 31, dan 34 (V27A, A30TP, S31N, G34E).

V.5. Karakterisasi molekuler gen PB2

Keberhasilan suatu virus untuk bisa bereplikasi diatur dan ditentukan oleh protein PB2. Berdasarkan studi yang telah dilakukan sebelumnya, mutasi yang terjadi pada protein PB2 yaitu E627K secara signifikan dapat meningkatkan keberhasilan suatu virus dalam bereplikasi dan secara otomatis meningkatkan virulensinya²³. Mutasi yang terdapat pada protein PB2 tersebut, yaitu E627K dan D701N telah dilaporkan meningkatkan kemampuan bereplikasi dan menyebar dengan baik pada hewan mamalia²⁴. Hasil analisis asam amino dari protein PB2 menunjukkan bahwa virus virus influenza pandemi A/H1N1 Indonesia mempunyai motif E627 dan D701. Hal ini mengindikasikan bahwa virus tersebut mempunyai tingkat replikasi dan penyebaran yang normal (tidak virulen) diantara inang mamalia.

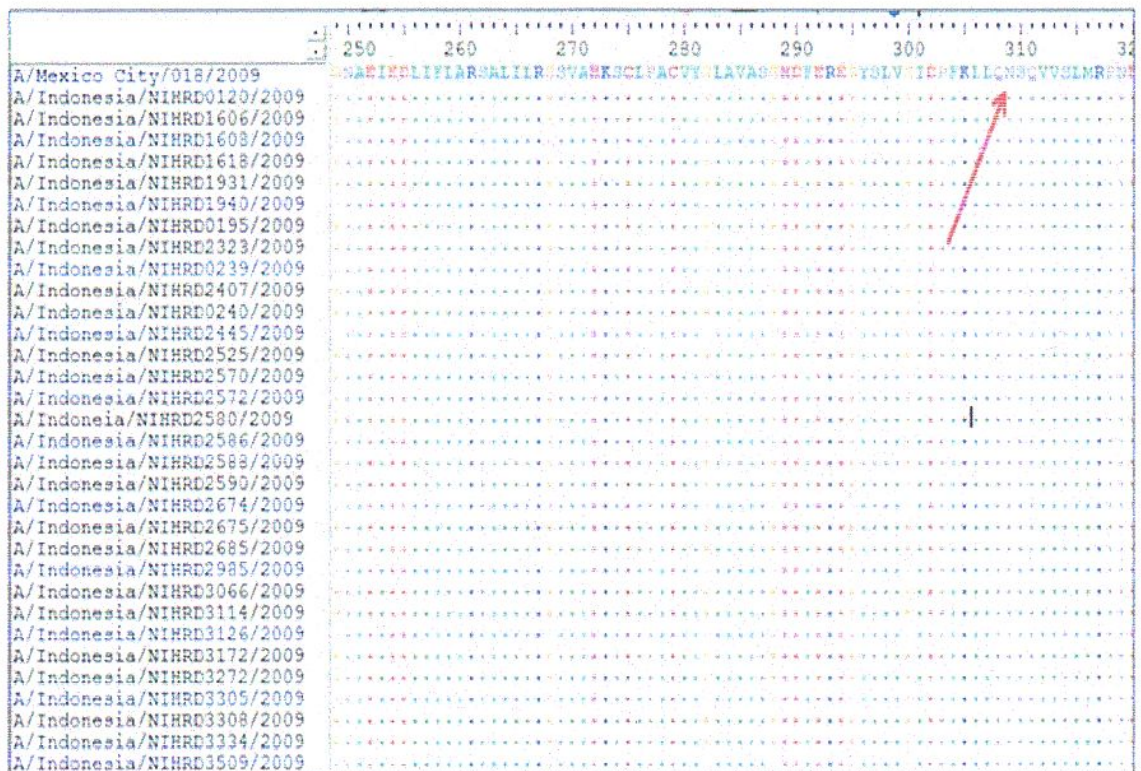


Gambar 10. Analisis residue gen PB2. Virulensi ditunjukkan pada posisi asam amino 627 (E627K) dan 701 (D701N)

V.6. Karakterisasi molekuler gen NP

Keseluruhan genom virus influenza dienkapsulasi oleh gen NP, yang berfungsi untuk mrngkondensasikan genom RNA yang bersegmen ke dalam nucleokapsidanya dan bersama-sama dengan tiga enzim polimerase lainnya (PA, PB1, an PB2) membentuk ribonukleoprotein (RNP) untuk proses transkripsi, replikasi, dan pembentukan virus baru.²⁵ Gen NP juga mempunyai peranan penting di dalam meningkatkan aktifitas polimerase untuk beradaptasi dengan sel inangnya²⁶. Mutasi pada gen NP pada posisi asam amino

N319K (Asp319Lis), akan berakibat pada meningkatnya adaptasi virus influenza pada inangnya. Hasil analisis bioinformatika pada gen NP terhadap semua virus pandemi A/H1N1 Indonesia memperlihatkan bahwa virus tersebut tidak mengalami mutasi pada posisi asam amino 319 (gambar 11).

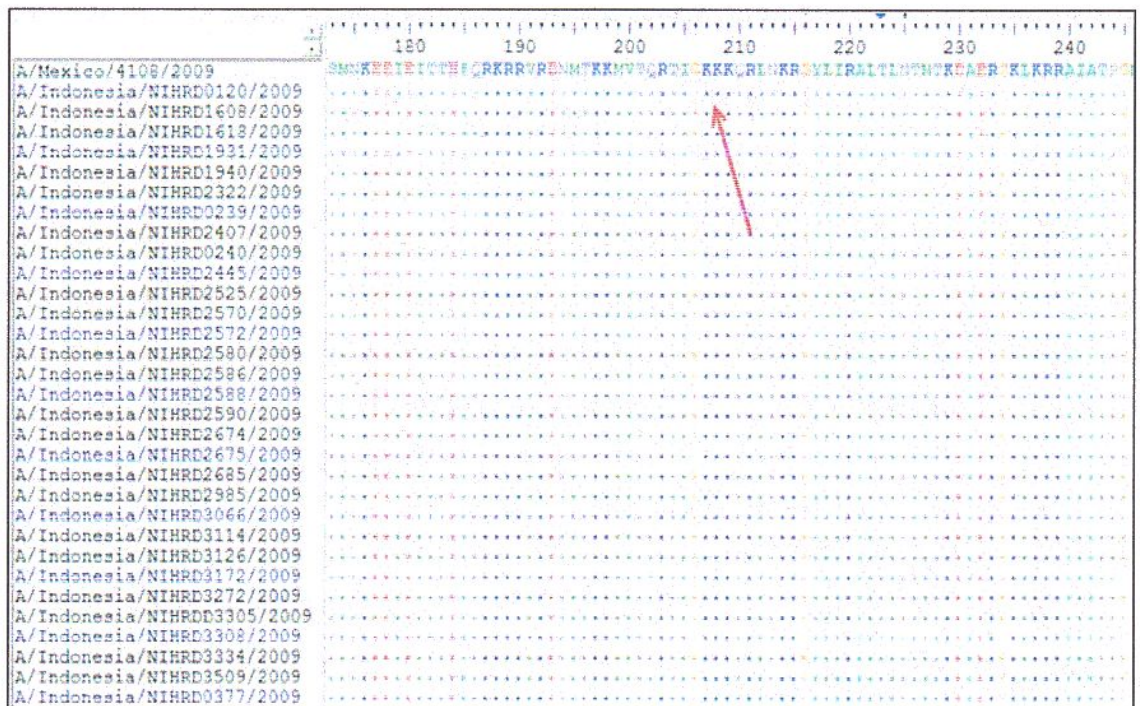


Gambar 11. Analisis residu gen NP. Aktivitas polimerase ditunjukkan pada posisi asam amino 319 (N319K).

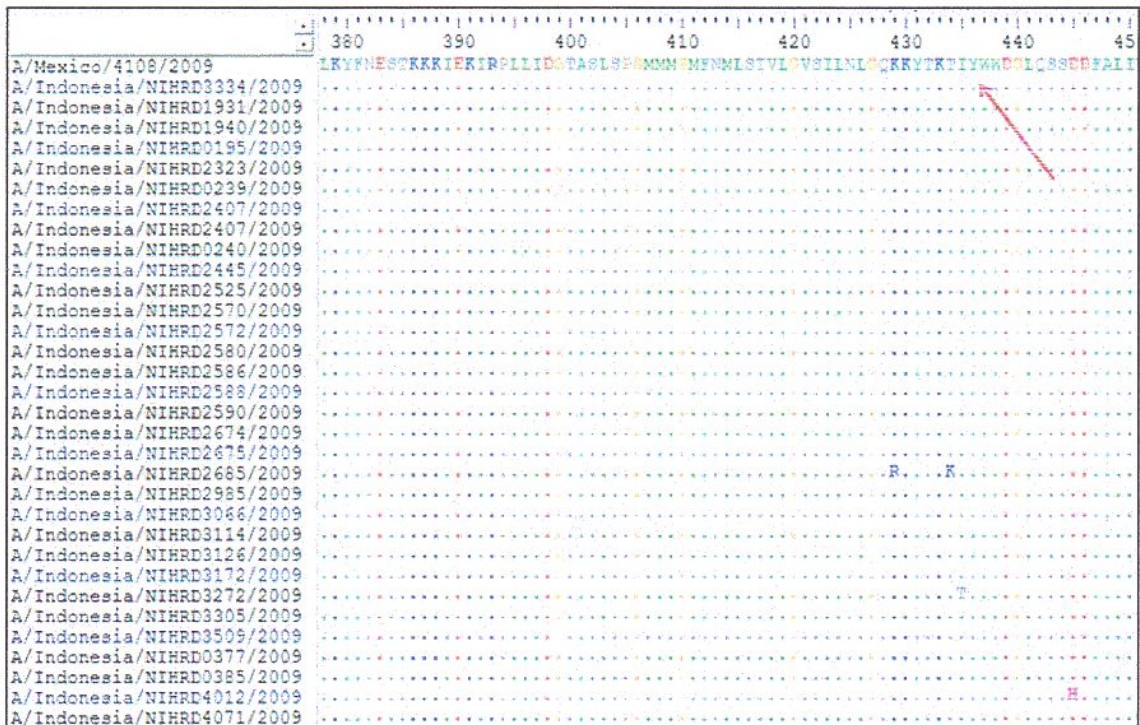
V.7. Karakterisasi molekuler gen PB1

Genom virus influenza yang terbesar setelah PB2 adalah gen PB1. Gen ini memproduksi tiga jenis protein yaitu PB1-F1, PB1-F2, dan N40. Gen PB1 ini bekerjasama dengan dua gen lainnya yaitu gen PB2 dan PA berperan di dalam membentuk viral polymerase. Viral polymerase ini bertanggung jawab terhadap proses transkripsi dan replikasi.

Mutasi yang terjadi pada gen PB1 pada posisi asam amino K207R (Lis207Arg) dan Y436H (Tir436His) menyebabkan virus tidak bisa bertransmisi dengan mudah dan menyebabkan patogen pada inang yang berbeda²⁷. Hasil analisis pada virus pandemi A/H1N1 Indonesia memperlihatkan bahwa semua virus tersebut belum mengalami mutasi yang berhubungan dengan adaptasi dan patogenitas (gambar 12 dan 13).



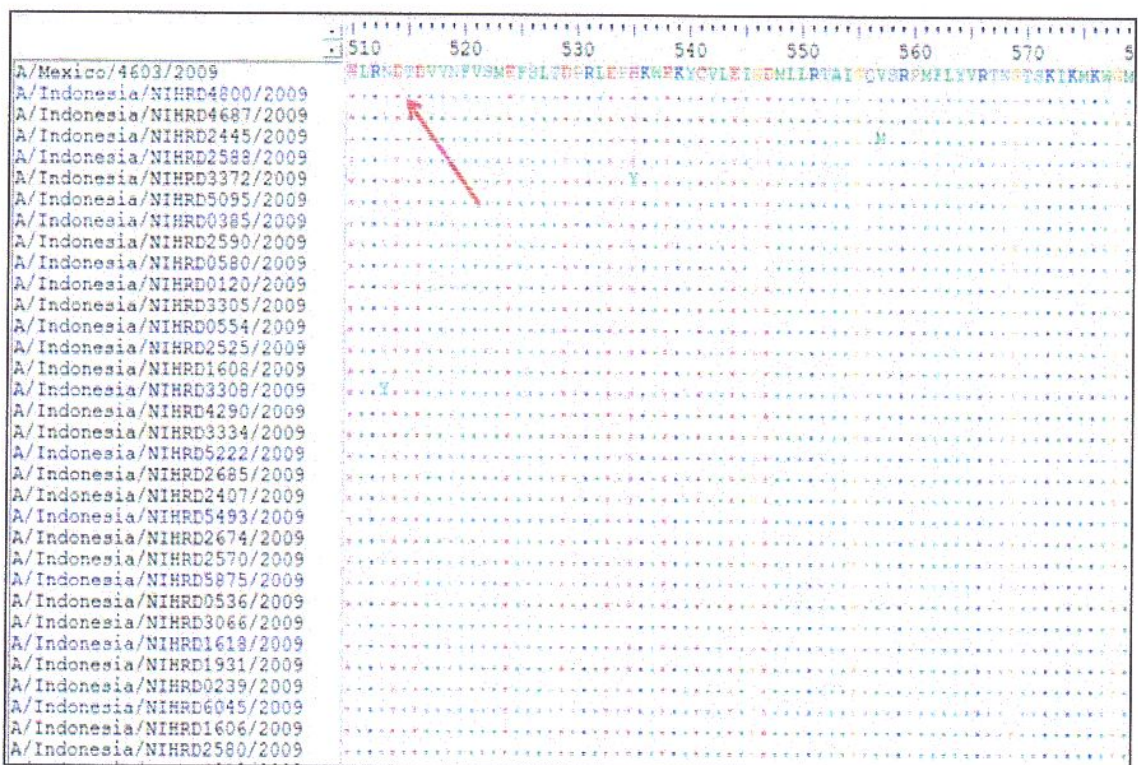
Gambar 12. Analisis residu gen PB1. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 207 (K207R).



Gambar 13. Analisis residu gen PB1. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 436 (Y436H).

V.8. Karakterisasi molekuler gen PA

Gen PA merupakan gen ketiga selain gen PB1 dan PB2 yang berfungsi untuk membentuk viral polimerase. Ketika protein PA diekspresikan sendiri, gen tersebut membawa induksi umum proteolisis yang akan mengurangi tingkat ekspresi protein PA itu sendiri. Hal ini akan mengakibatkan kegagalan suatu sel mamalia untuk mengekspresikan protein PA. Protein PA juga berkorelasi terhadap kondensasi kromatin dan morfologi nucleus^{27, 28}. Mutasi yang terjadi pada protein PA pada posisi asam amino T515A (Tre515Ala) akan mengurangi patogenitas dari virus tersebut. Semua virus pandemi A/H1N1 Indonesia berdasarkan hasil analisis residu bioinformatika memperlihatkan tidak adanya mutasi yang berkaitan dengan patogenitas pada gen PA posisi 515 (gambar 14). Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa virus pandemi A/H1N1 merupakan virus yang mempunyai patogenitas rendah.



Gambar 14. Analisis residu gen PA. Patogenitas ditunjukkan pada posisi asam amino 515 (T515A).

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Merebaknya pandemi virus influenza A/H1N1 pada tahun 2009 telah membuat perhatian publik yang cukup besar. Oleh karena itu, diadakan studi untuk melihat bagaimana karakterisasi dari virus tersebut khususnya virus yang diisolasi dari Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan pemahaman kita tentang virus tersebut dengan menganalisis karakteristik serta sifat molekulernya. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa virus influenza pandemi A/H1N1 adalah virus yang berasal dari berbagai virus yang sudah ada sebelumnya, yang menggabungkan materi genetik dari virus flu burung (H1N1), virus flu babi klasik (H1N1), virus flu manusia (H3N2), dan virus flu babi Eurasia (H1N1). Analisis urutan untuk situs pelekatan receptor (*receptor binding site*) dan situs pemotongan (*cleavage site*) gen hemagglutinin (HA), *stalk* neuraminidase (NA), non-struktural protein 1 (NS1), polimerase protein dasar 2 (PB2), dan protein polimerase dasar 1 (PB1), menunjukkan bahwa (i) virus pandemi influenza A/H1N1 adalah virus patogen dengan tingkat virulensi yang rendah, (ii) replikasi terbatas pada sel-sel saluran pernapasan bagian atas, sehingga tidak menyebabkan infeksi sistemik, (iii) menyebar hanya pada kalangan manusia, (iv) replikasi dapat dihambat oleh oseltamivir, zanamivir, interferon (IFN), dan tumor necrosis faktor α (TNF- α).

Untuk mencegah, mengendalikan, dan memonitor lebih lanjut mengenai penyebaran serta sifat-sifat virus influenza pandemic A/H1N1, perlu dilakukan penelitian secara rutin setiap tahun mengenai epidemiologi secara molekuler untuk melihat karakteristik virus serta penyebaran maupun evolusinya.

VII. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana dengan dana DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan tahun 2011. Penulis selaku ketua pelaksana mengucapkan terima kasih untuk kerjasama, bantuan, dan dukungan kepada semua tim yang terlibat di dalam penelitian ini.

VIII. 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. Noelle-Angelique M. Molinari, Ismael R. Ortega-Sanchez, Mark L. Messonnier, William W. Thompson, Pascale M. Wortley, Eric Weintraub, Carolyn B. Bridges . The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs. *Vaccine, Volume 25, Issue 27*, 28 June 2007, Pages 5086-5096
4. N. J. Cox and K. Subbarao. Global Epidemiology of Influenza: Past and Present*. *Annu. Rev. Med.* 2000. 51:407-421.
5. F. Carrat, A. Flahault. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine, Volume 25, Issues 39-40*, 28 September 2007, Pages 6852-6862
6. Influenza Viruses. <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses.htm>
7. Claas, E. C. J., Osterhaus, A. D. M. E., Van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F. & Webster, R. G. (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472-477.
8. Hatta, M. & Kawaoka, Y. (2002). The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *Trends Microbiol* 10, 340-344
9. CDC/WHO Avian Influenza Response Team (2004). Outbreaks of avian influenza A (H5N1) in Asia and interim recommendations for evaluation and reporting of suspected cases – United States, 2004. *Morb Mortal Wkly Rep* 53, 97-99.
10. T. A. Hall. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol.pp. 95-98.
11. Rozen S, Skaletsky H. (2000.) *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
12. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
13. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y .(2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435-436. doi:10.1038/440435a
14. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T .(2006): H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* 312, 399. doi:10.1126/science.1125548
15. Horimoto T, Kawaoka Y .(2005): Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 591-600. doi:10.1038/nrmicro1208
16. Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, Zhu J, Li Y, Zhang A, Yu Z, Ye Z, Chen H, Jin M .(2009): The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One* 4, e6277. doi:10.1371/journal.pone.0006277
17. Moscona A. 2005. Oseltamivir Resistance-Disabling Our Influenza Defenses. *New England Journal of Medicine*. 353 : 2633-2636

18. Cheng PK, Leung TW, Ho EC, Leung PC, Ng AY, Lai MY, LimWW .(2009): Oseltamivir- and amantadine-resistant influenzaviruses A (H1N1). *Emerg. Infect. Dis.* 15, 966–968.doi:10.3201/eid1506.081357
19. Leung TWC, Tai ALS, Cheng PKC, Kong MSY, Lim W .(2009):Detection of an oseltamivir-resistant pandemic influenzaA/H1N1 virus in Hong Kong. *J. Clin. Virol.* 46, 298–299.doi:10.1016/j.jcv.2009.08.004\
20. Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA .(2008):A new influenza virus virulence determinant: the NS1protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 4381–4386. oi:10.1073/pnas.0800482105
21. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG .(2004): The NS1 gene of H5N1influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokineresponses. *Virus Res.* 103, 107–113. doi:10.1016/j.virusres.2004.02.022
22. Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H .(2009): Large-scale sequence analysis of M gene of influenza viruses with a novel neuraminidasemutation. *J. Virol.* 83, 10366–10373
23. Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y .(2004): PB2 aminoacid at position 627 affects replicative efficiency, but not celltropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice.*Virology* 320, 258–266. doi:10.1016/j.virol.2003.11.030
24. Steel J, Lowen AC, Mubareka S, Palese P .(2009): Transmissionof influenza virus in a mammalian host is increased byPB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog.* 5,e1000252. doi:10.1371/journal.ppat.1000252
25. Long JX, Peng DC, Liu YL, Wu YT, Liu XF. 2008. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes* 36:471–478. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-007-0187-8>
26. Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H. D. Klenk, and J. Stech. (2005). The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18590-18595
27. Hulse-Post DJ, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen HL, et al.(2007). Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J Virol* ;81:8515–24. doi: 10.1128/JVI.00435-0
28. Sanz-ezquerro J, Thimas Z, Susana DL, Juan O, and Amelia N. (1996). The Amino-Terminal One-Third of the Influenza Virus P AProtein Is Responsible for the Induction of Proteolysis. *J Virol*:70:3

IX. 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

PEMBEBASAN PERSETUJUAN ETIK (EXEMPTED)

Nomor : KE.01.05/EC/320/2011

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 :

"Molekuler Karakteristik Virus Influenza A/H1N1 Pandemi di Indonesia"

dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama: **Hana Apsari Prawesti, S.Si., M.Sc.**

dapat dibebaskan dari keharusan memperoleh persetujuan etik (*Exempted*) untuk pelaksanaan penelitian tersebut. Pembebasan ini berlaku sejak dimulai dilaksanakannya penelitian tersebut di atas sampai dengan selesai sesuai yang tercantum dalam protokol.

Walapun demikian kami mengingatkan bahwa dalam pelaksanaan penelitian ini, peneliti tetap diminta untuk menjaga dan menghormati martabat manusia yang menjadi responden/informan dalam penelitian ini. Dengan demikian diharapkan masyarakat luas dapat memperoleh manfaat yang baik dari penelitian ini.

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, 13 Mei 2011

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

Lampiran 2. 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/962/2011

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2011

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 2011;
- 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 2011 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;
7. Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
8. Keputusan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
9. Keputusan Kementerian Kesehatan RI No.03.05/4/220/2001 tanggal 7 Januari 2011 tentang Penetapan Pejabat Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat yang melakukan Tindakan yang Mengakibatkan Pengeluaran Anggaran Belanja/Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji SPP, Pejabat Penandatanganan SPM, Bendahara Penerima dan Pengeluaran pada Kantor Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Jakarta;

MEMPERHATIKAN

1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2011 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2011, tanggal 20 Desember 2010;
2. Perjanjian Pelaksanaan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dengan No. PR.03.01/III/876/2011 sampai dengan Nomor: No. PR.03.01/III/912/2011, tanggal 14 Februari 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 2011 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2011, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

KEDUA

- Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2011 mempunyai tugas sebagai berikut:
1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2011, 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 2011 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2011;

KELIMA

- Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2011 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 17 Februari 2011



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**

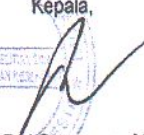
Nomor : HK.03.05/III/962/2011

Tanggal : 17 Februari 2011

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2011

MOLEKULER KARAKTERISTIK VIRUS INFLUENZA A/H1N1 PANDEMI DI INDONESIA

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1. Hana Apsari Pawestri, M.Sc | : Peneliti Pertama/Ketua Pelaksana |
| 2. dr. Ni Ketut Susilarini, MS | : Peneliti Pertama |
| 3. dr. Vivi Setiawati, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 4. Kindi Adam, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 5. Hartanti Dian Ikawati, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 6. Drs. Syahril Harun, MS | : Peneliti Non Fungsional |
| 7. Kartika Dewi Puspa, S.Si., Apt | : Peneliti Non Fungsional |
| 8. Sumarno | : Pembantu Peneliti |
| 9. Triyani Sukarso, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 10. Arie Ardiansyah, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 11. Fahim | : Pembantu Peneliti |
| 12. Risma Sinurat | : Sekretariat Penelitian |
| 13. Holy Arif Wibowo, S.Si | : Pengolah Data |
| 14. Siti Isfandari, MA | : Pengolah Data |

Kepala,


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

Lampiran 3. Lembar pengesahan penelitian

Jakarta,

2011

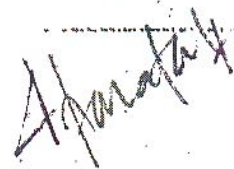
MENYETUJUI :

Kepala Bidang Biomedis



Dr, Roselinda, M.Epid
NIP. 195807011987012001

Pengusul



Hana Apsari Pawestri, M.Sc
NIP. 198106292003122002

DISETUJUI

Ketua Panitia Pembina Ilmiah



Dr. Drg. Magdarina Destri Agtini, M.Sc
NIP. 195012061984022001

Kepala Pusat Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan



Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt
NIP 19621119 198803 1 001