

Filoanalisis Gen HA Virus Influenza H1N1 2009 di Surabaya**HA Gene Phyloanalysis of Influenza H1N1 2009 Virus in Surabaya**

¹Ema Qurnianingsih, ²Kadek Rachmawati, ¹Reviany V. Nidom, ³Suhartati Soewono,
²CA Nidom

¹AIRC Universitas Airlangga

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

³Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Jalan Mulyorejo, Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : kadekrachmawati@yahoo.co.id

Abstract

Influenza H1N1 2009 virus is a type A influenza virus that caused influenza pandemic in 2009. As of August 1, 2010, data from WHO stated that this virus has spread in 214 countries including Indonesia with more than 18.000 deaths. Although the case fatality rate (CFR) of this virus is low (0,98 %) but it is highly contagious. The first isolate of influenza H1N1 2009 virus is A/California/04/2009, which its genetic analysis revealed that this virus is a triple reassortant virus (from swine influenza virus, avian influenza virus and human influenza virus). It makes this new H1N1 subtype virus is not known by human immune system. Indonesia, as one of the infected countries, has no molecular data about this virus yet. Phyloanalysis conducted in this research showed that virus obtained from Surabaya (A/Indonesia/Unair/2010) had similarity with influenza H1N1 2009 virus in Perth, Australia, (A/Perth/260/2009).

Keywords: influenza H1N1 2009 virus, Surabaya, phyloanalysis.

Pendahuluan

Virus influenza H1N1 2009 atau yang lebih dikenal dengan virus flu babi pertama kali terjadi di Meksiko, merupakan penyakit infeksi yang menyerang manusia dan disebabkan oleh virus influenza tipe A subtype H1N1 strain Meksiko (Neumann *et al.*, 2009). Virus ini juga dikenal dengan virus pandemik influenza H1N1 2009 yang merupakan nama resmi yang dikeluarkan oleh WHO tahun 2009 (WHO, 2010).

Data dari WHO menyebutkan bahwa sampai dengan 1 Agustus 2010, virus H1N1 2009 telah menyebar di 214 Negara, dengan 18449 kematian yang tersebar di semua benua. (WHO, 2010). Di Indonesia data jumlah kumulatif penderita flu H1N1 2009 adalah data sampai dengan 23 Agustus 2009 sebanyak 1.005 orang dengan 5 orang di antaranya meninggal dunia dan sampai dengan saat ini belum ada data terbaru. Meskipun angka kefatalan kasus (*Case Fatality Rate/CFR*) hanya sekitar 0,98% namun flu H1N1 2009 ini mudah menular (Neumann *et al.*, 2009; Depkes RI, 2010).

Virus influenza H1N1 2009 yang pertama diisolasi adalah A/California/04/09, dimana virus ini memiliki komposisi gen yang unik yang belum pernah dijumpai sebelumnya (*Novel S-OIV Investigation Team*, 2009; Itoh, 2009). Komposisi gen virus ini merupakan hasil *triple reassortment* antara virus influenza swine (babi), *avian*

(burung) dan manusia (*Novel S-OIV Investigation Team*, 2009). Hal ini sangat dimungkinkan karena virus influenza memiliki kemampuan untuk berubah atau bermutasi melalui *antigenic drift* dan *antigenic shift* pada genomnya yang bertujuan untuk menghindari dari respon imun inang (Puzelli *et al*, 2001; Treanor *et al*, 2004; CDC, 2005; Knipe, 2007). *Antigenic drift* terjadi secara gradual sedangkan *antigenic shift* terjadi sekali waktu namun virus influenza dapat mengalami perubahan yang drastis dan menghasilkan subtipe baru yang dapat terjadi pada virus influenza A dimana Subtipe baru yang dihasilkan oleh proses *antigenic shift* (terutama *reassortment*) dapat memiliki virulensi yang cukup tinggi. (CDC, 2005; Knipe, 2007).

Gen virus Influenza tipe A tersusun dalam 8 segmen yang dibungkus oleh protein nukleokapsid. Kedelapan gen tersebut adalah gen *Polymerase Basic 1* (PB1), *Polymerase Basic 2* (PB2), *Polymerase Acidic* (PA), Hemagglutinin (HA atau H), Nukleoprotein (NP), Neuraminidase (NA atau N), Matriks (M) dan Non Struktural (NS) dimana masing-masing mengekspresi satu protein kecuali M1, M2, NS1 dan NS2 (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Neumann, 2009). Protein HA menentukan patogenisitas dan imungenisitas dari virus influenza. Glikoprotein HA memiliki peran yang penting dalam menentukan patogenisitas di banyak spesies binatang. Glikoprotein HA memerantari ikatan virus dengan sel inang yang mengawali proses replikasi virus. Hal ini sangat kritis dalam siklus hidup virus (Suzuki *et al*, 2002; Neumann *et al*, 2009). Letak glikoprotein HA yang berada di permukaan virus menyebabkannya menjadi target utama dari respon imun. Akibat seleksi positif dari antibodi penetralisir maka dapat terjadi mutasi titik (*antigenic drift*) pada gen HA dengan frekuensi kurang dari 1 % pertahun dan dapat menimbulkan strain baru yang bertahan 2-5 tahun (CDC, 2005; Kamps *et al*, 2006, Knipe *et al*, 2007).

Indonesia adalah salah satu negara yang juga terinfeksi oleh virus influenza H1N1 2009, dengan angka kejadian yang cukup tinggi, namun belum banyak penelitian di Indonesia khususnya Surabaya, yang menganalisis secara molekuler strain virus influenza H1N1 2009 yang diisolasi di Surabaya. Oleh karena sifat glikoprotein HA yang penting dalam menentukan patogenisitas virus, maka penelitian ini akan melakukan analisis molekuler (karakterisasi molekuler dan filoanalisis) dari gen HA virus influenza H1N1 2009 di Surabaya.

Materi dan Metode Penelitian

Inokulasi virus di kultur sel MDCK

Kultur sel MDCK disiapkan pada *Plate* untuk kultur dengan 6 sumuran (70-95 % konfluen). Medium dibuang, lalu kultur sel dicuci dengan 1 ml PBS sebanyak 2x. 200 µl spesimen diambil dari *eppendorf* yang berisi hasil preparasi swab nasofaring dan dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran pada kultur sel MDCK lalu diinkubasi dalam inkubator (37°C, 5 % CO₂) selama 1 jam selanjutnya diberi *maintenance medium* sebanyak 2 ml/sumuran. Kultur sel diamati dibawah mikroskop setiap hari untuk melihat ada / tidaknya CPE.

Isolasi RNA virus

Isolasi RNA virus menggunakan *RNA extraction kit* (Qiagen) sesuai dengan petunjuk produsen. Larutan RNA selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Proses RT-PCR pada penelitian ini menggunakan *Two step RT PCR kit* (Invitrogen) sesuai dengan petunjuk produsen. Adapun pelaksanaannya adalah sebagai

berikut : 4 μ l 5x *phussion buffer*, 1 μ l *dNTP mix*, *primer forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 2 μ l serta enzim 0,2 μ l. *DDW* ditambahkan sampai mendapat volume *master mix* 20 μ l. *cDNA* yang telah jadi diambil sebanyak 2 μ l. Campuran lalu dimasukkan dalam mesin *PCR*, suhu di set yaitu : denaturasi 98°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 30 detik dan *final extension* 72°C selama 10 menit dengan jumlah siklus adalah 35 kali.

Sekuensing

Mesin sekuensing yang digunakan pada penelitian ini adalah AB prism 3130 (Applied Biosystem, USA).

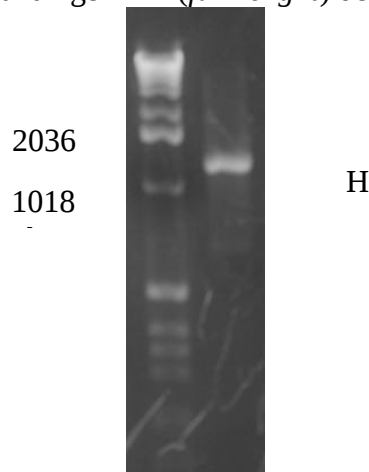
Filoanalisis

Hasil *sequencing* dianalisis dengan menggunakan *software Genetic* versi 09.

Hasil dan Pembahasan

PCR Gen HA Virus Influenza H1N1 2009 di Indonesia

Metode *two step* PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah untuk mendapatkan keseluruhan gen HA (*full lenght*) dengan panjang sekitar 1700 nt.



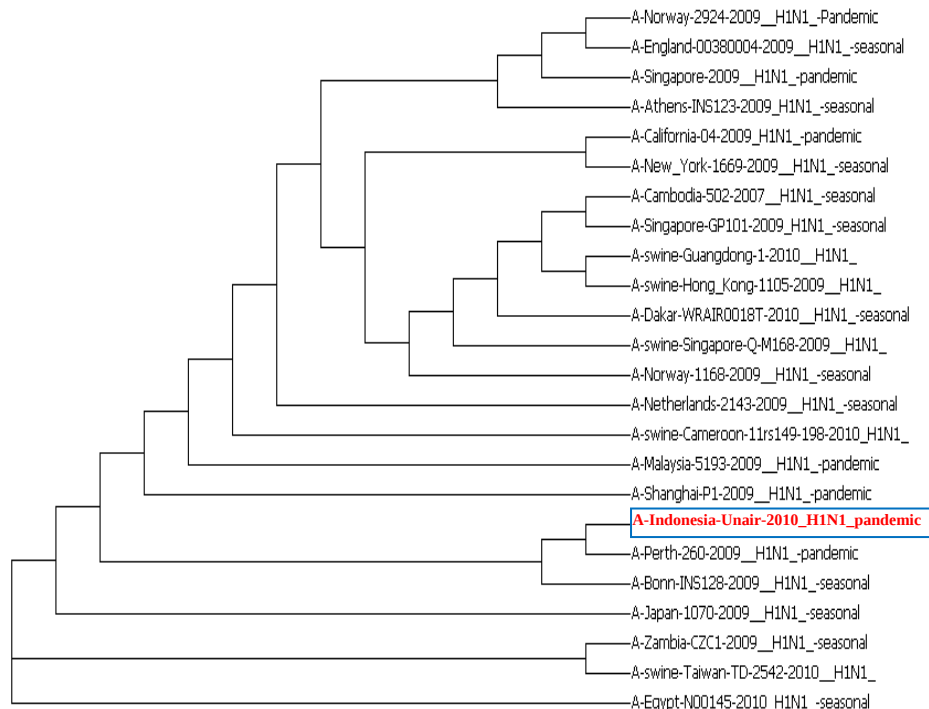
Gambar 1. Hasil Elektroforesis A/Indonesia/Unair/2010 (H1N1). Gen HA teramplifikasi pada posisi sekitar 1700 bp

Virus influenza H1N1 2009 merupakan virus Influenza A yang mengalami reassortan tripel yang berisi gen virus dari manusia, babi dan burung. Analisis filogenetik dari semua gen virus influenza H1N1 2009 yang pertama kali diisolasi yaitu virus influenza A/California/04/09, tampak bahwa dari delapan segmen genomnya, enam segmen gen (PB2, PB1, PA, HA, NP dan NS) memiliki kemiripan dengan yang pernah ditemukan pada virus influenza babi yang mengalami reassortan tripel dan bersirkulasi pada babi di Amerika Utara. Gen yang mengkode protein NA dan protein M, sangat mirip dengan virus influenza A yang bersirkulasi di populasi babi di Eurasia. Kombinasi genetik yang tidak biasa ini belum pernah dijumpai di Amerika Serikat atau dimanapun. Virus influenza babi di Amerika Utara yang mengalami reassortan tripel diketahui memiliki gen HA, NP, NA, M dan NS yang berasal dari virus influenza A babi yang klasik; gen PB2 dan PA berasal dari virus influenza burung dari garis keluarga Amerika Utara (*North American lineage*); dan gen PB1 berasal dari virus influenza A manusia (*seasonal influenza A virus* / virus influenza A musiman) (*Novel S-OIV Investigation Team*, 2009).

Metode PCR dengan menggunakan primer yang spesifik untuk H1N1 2009 merupakan salah satu metode untuk penegakan diagnosis infeksi dengan virus influenza H1N1 2009 (*Novel S-OIV Investigation Team*, 2009). Dari PCR yang dilakukan pada penelitian ini didapatkan hasil positif yakni terdapatnya pita pada elektroforesis di daerah dengan panjang sekitar 1700 bp untuk gen HA dan sekitar 1400 bp untuk gen NA. Dengan demikian virus yang diisolasi pada penelitian ini merupakan virus influenza H1N1 2009.

Filoanalisis Virus Influenza H1N1 2009 di Indonesia

Berdasarkan filoanalisis gen HA dan gen NA, virus H1N1 2009 yang diisolasi Surabaya memiliki hubungan kekerabatan paling dekat dengan virus influenza H1N1 2009 Perth yakni A/Perth/260/2009. Bila dibandingkan dengan virus influenza H1N1 2009 yang pertama kali diisolasi yakni A/California/04/2009, virus H1N1 2009 yang diisolasi Surabaya diduga memiliki perbedaan karena dari gambaran pohon filogenetiknya, kedua virus ini tidak berada dalam satu *cluster*.



Gambar 2. Filoanalisis virus H1N1 2009 yang diisolasi di Surabaya (A/Indonesia/Unair/2010 (H1N1)) dengan virus influenza H1N1 2009 lainnya

Hasil analisis filogenetik virus A/Indonesia/Unair/2010 (H1N1) menunjukkan adanya kedekatan hubungan virus ini dengan virus influenza H1N1 2009 yang ada di Perth. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa virus influenza H1N1 2009 yang ada di Indonesia berasal dari Australia. Hal ini dimungkinkan karena adanya lalu lintas yang cukup tinggi antara warga kedua negara seperti data pada Badan Pusat Statistik Indonesia maupun data dari Pemerintahan Australia. Dari data yang ada jumlah turis Australia yang berkunjung ke Indonesia tahun 2009, menempati urutan ketiga tertinggi setelah Singapura dan Malaysia yakni sebesar 584.437 orang (BPS, 2011). Sedangkan jumlah warga negara Indonesia yang berkunjung ke Australia menempati urutan ke-13,

yakni sekitar 97.029 orang pada tahun 2009 (Department of Resources, Energy and Tourism Australian Government, 2011).

Virus A/Indonesia/Unair/2010 (h1N1) dilihat dari pohon filogenetiknya sudah memiliki perbedaan dengan isolat pertama virus influenza H1N1 2009 yaitu A/California/04/2009.

Penularan influenza dapat melalui beberapa mekanisme contohnya aerosol, droplet ukuran besar maupun kontak langsung dengan berbagai hasil sekresi yang mengandung virus memudahkan virus ini dapat menyebar dalam jarak jauh (Nicass *et al*, 2005; Tellier, 2006). Hal ini dikarenakan ketika virus influenza berada diluar tubuh, virus tersebut dapat ditransmisikan atau ditularkan melalui berbagai media yang sering dipergunakan dalam kehidupan sehari-hari seperti *bank notes*, gagang pintu, tombol lampu dan lainnya serta berbagai benda peralatan rumah tangga yang terbuat dari stainless steel maupun plastik dan *tissue* (Bean *et al.*, 1982; Thomas *et al.*, 2008).

Penularan melalui *bank notes* merupakan salah satu hal yang penting, karena media ini dapat menyebar ke berbagai negara di dunia. Pada penelitian yang dilakukan oleh Thomas dkk (2008) menunjukkan bahwa virus influenza dapat bertahan hidup pada catatan bank lebih dari 3 hari bila diinokulasikan dalam konsentrasi tinggi. Bila virus inokulum ini berada pada keadaan di dalam mukus yang dihasilkan saluran nafas, maka virus influenza ini mampu bertahan hingga lebih dari 17 hari (Thomas *et al.*, 2008). Pada penelitian yang lain, virus influenza juga mampu bertahan hidup 24-48 jam pada permukaan peralatan rumah tangga yang keras dan tidak berpori seperti peralatan yang terbuat dari stainless steel maupun plastik (Bean *et al.*, 1982). Dengan demikian ada kemungkinan besar virus ini terbawa antar negara, terutama dalam kasus ini adalah Indonesia maupun Australia, melalui berbagai peralatan yang dibawa oleh wisatawan antar negara.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil filoanalisis gen HA dan gen NA pada penelitian ini, virus influenza H1N1 2009 yang diisolasi di Surabaya (A/Indonesia/Unair/2010) sudah memiliki perbedaan dengan virus A/California/04/2009 (H1N1) dan memiliki hubungan kekerabatan dengan virus influenza H1N1 2009 di Perth, Australia.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen kesehatan atas kontribusi dana penelitian melalui program RISBIN IPTEKDOK tahun anggaran 2011.

Daftar Pustaka

- Badan Pusat Statistik republik Indonesia. 2011. Jumlah Kedatangan Wisatawan Mancanegara ke Indonesia Menurut Negara Tempat Tinggal 2002-2009. Diunduh pada 12 Juli 2011 pukul 10.06 BBWI. http://www.bps.go.id/tabsub/view.php?tabel=1&daftar=1&id_subyek=16¬ab=16
- Bean B, B.M. Moore, B .Stern, L.R. Peterson, D.N. Gerding and H.H.J. Balfour, 1982. Survival of Influenza Viruses on Environmental Surfaces. *J. Infect Dis.* 146(1): 47-51.
- CDC. 2005. Questions and Answers About Avian Influenza (Bird Flu) and Avian Influenza A (H5N1) Virus. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2010. Seputar Penanggulangan Pandemi Flu Baru H1N1 oleh Departemen Kesehatan RI. (Disitasi 22 Maret 2010, pukul 15.00 WIB). <http://www.depkes.go.id/h1n1/>.
- Department of Resources, Energy and Tourism Australian Government. 2011. International Visitor Profile 2009: Indonesia. Diunduh pada 12 Juli 2011 pukul 10.06. <http://www.ret.gov.au/tourism/Documents/tra/International%20Visitor%20Profiles/2009/IVP Indonesia FINAL.pdf>
- Honda, A., K. Mizumoto and A. Ishihama. 2002. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. PNAS. 99: 13166-13171.
- Horimoto T. and Y.Kawaoka. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. Clin. Microbiol. Rev.
- Itoh Y., K.Shinya, M. Kiso, T. Watanabe, Y. Sakoda, M. Hatta, Y. Muramoto, D. Tamura, Y. Sakai-Tagawa, T. Noda, S. Sakabe, M. Imai, Y. Hatta, S. Watanabe, Li c, S. Yamada, K. Fujii, S. Murakami, H. Imai, A. Kakugawa, M. Ito, R. Takano, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Shimojima, T. Horimoto, H. Goto, K. Takahashi, A. Makino, H. Ishigaki, M. Nakayama, M. Okamatsu, K. Takahashi, D. Warshauer, P.A. Shult, R. Saito, H. Suzuki, Y. Furuta, M. Yamashita, K. Mitamura, K. Nakano, M. Nakamura, R. Brockman-Schneider, H. Mitamura, M. Yamazaki, N. Sugaya, M. Suresh, M. Ozawa, G. Neumann, J. Gern, H. Kida, K. Ogaswara and Y. Kawaoka. 2009. In vitro and in vivo characterization of new swine origin H1N1 influenza viruses. Nature. 460: 1021-1025.
- Kamps B.S. and R. Teran. 2006. In Influenza Report. Eds: Kamps, Hoffmann and Preiser. Flying Publisher. <http://www.influenzareport.com>.
- Knipe, D.M. and P.M. Howley. 2007. Fields Virology. 5th ed. Lipincott Williams and Wilkins. USA. 1647-1740.
- Neumann, G., T. Noda and Y. Kawaoka. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. 459: 931-939.
- Nicas M., W.W. Nazzaroff and A. Hubbard. 2005. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. J. Occup Environ Hyg. 2:143-54.
- Novel swine-origin investigation team. 2009. Emergence of novel swine-origin influenza virus (H1N1) in human. NEJM. 360:2605-2615.
- Puzelli S., M. Facchini, D. Spagnolo, M.A. De Marco, L. Calzoletti, A. Zanetti, R. Fumagali, M.L. Tanzi, A. Cassone, G. Rezza and I. Donatelli. 2010. Transmission of hemagglutinin D222G Mutant Strain of Pandemic (H1N1) 2009 Virus. Emerging Infectious Diseases . 16(5) : 863-865
- Suzuki Y. and M. Nei. 2002. Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes. Mol. Biol. Evol. 19: 501-509.
- Tellier R. 2006. Review of Aerosol Transmission of Influenza Virus. Emerging Infectious Disease. 12(11):1657-1662.
- Thomas Y., G. Voigel, W. Wunderli, P. Suter, M. Witschi, D. Koch, C. Tapperel and L. Kaiser. 2008. Survival of Influenza Virus on Banknotes. Environmental Microbiology. Vol 74 No. 10. p3002-3007.
- Treanor, J. 2004. Influenza vaccines – outmaneuvering antigenic shift and drift. NEJM. 350;3 : 218-220.
- World Health Organization, 2010. Preliminary Review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses (disitasi 22 Maret 2010, pukul 15.00 WIB). <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1-d222g/en/index.html>.