

**DETEKSI MUTASI H275Y DAN RESISTENSI VIRUS INFLUENZA  
A (HINI) TERHADAP OSELTAMIVIR DI INDONESIA TAHUN  
2007-2008**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Master dalam Bidang Ilmu  
Biomedik pada Universitas Indonesia di Jakarta**

**RISMALIA  
NPM: 0806419610**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM STUDI BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN BIOLOGI KEDOKTERAN  
JAKARTA  
JULI 2010**

Deteksi mutasi...., Rismalia, FK UI, 2010

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Rismalia

NPM : 0806419610

Tanda Tangan :   
  


Tanggal : 21 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

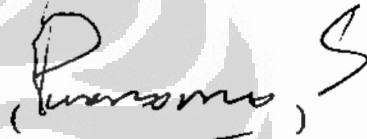
Tesis ini diajukan oleh

Nama : Rismalia  
NPM : 0806419610  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Deteksi Mutasi H275Y dan Resistensi Virus Influenza  
A (H1N1) Terhadap Oseltamivir di Indonesia Tahun  
2007-2008

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Master Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof.Drs.Poemomo Soeharso, Ph.D

()

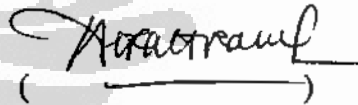
Pembimbing II: dr.Herman Kosasih

()

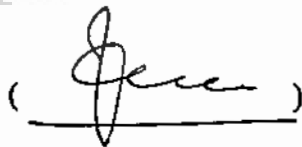
Penguji I : Drs. Dwi Ari Pujiyanto, M.Biomed. Ph.D

()

Penguji II : dr. Fera Ibrahim, Ph.D, M.Sc, SpMK

()

Penguji III : Prof.Frans D.Sujatna Ph.D

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 21 Juli 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Dr.rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi

Deteksi mutasi...., Rismalia, FK UI, 2010

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sejak masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof.Drs.Poemomo Soeharso Ph.D, dr.Herman Kosasih dan Maya Williams Ph.D, selaku pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
2. NAMRU 2 yang telah menyediakan tempat dan mendanai penelitian saya hingga selesai. Kepada Ibu Susan dan Mas Ungke terima kasih atas saran perbaikan yang sangat bermanfaat. Kepada Melinda, Ester, Anti, Anton, Agus, Mas Iqbal dan Adit terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.
3. Lembaga Eijkman sebagai tempat menyelesaikan sisa penelitian yang belum terselesaikan saat NAMRU harus tutup. Kepada dr.Helena, Iskandar dan Eva terima kasih banyak atas semua bantuan dan kerjasamanya.
4. Orang tua, saudara dan keluarga saya yang selalu mendoakan untuk kemudahan dan selesainya penelitian dan penulisan tesis ini. Suami dan anakku tercinta yang tak lelah berdoa dan selalu siap membantu sejak masa perkuliahan, penelitian hingga penulisan tesis ini.
5. Bang Sabri, terima kasih untuk dukungan, doa dan penyediaan sarana penulisan tesis ini. Kepada Kak Bambang terima kasih untuk semua jumlah dan doanya.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu biomedik di tanah air.

Jakarta 21 juli 2010

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR  
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rismalia  
NPM : 0806419610  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

DETEKSI MUTASI H275Y DAN RESISTENSI VIRUS INFLUENZA  
A (H1N1) TERHADAP OSELTAMIVIR DI INDONESIA TAHUN  
2007-2008

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta  
Pada tanggal: 21 Juli 2010  
Yang menyatakan



(Rismalia)

## ABSTRAK

Nama : Rismalia  
Program Studi : Ilmu Biomedik kekhususan Biologi  
Judul : Deteksi Mutasi H275Y dan Resistensi Virus Influenza A (H1N1)  
Terhadap Oseltamivir di Indonesia Tahun 2007-2008

### Latar Belakang:

Mutasi H275Y adalah mutasi substitusi pada gen neuraminidase virus influenza yang menghasilkan perubahan asam amino pada urutan ke 275 dari histidin (CAT) menjadi tirosin (TAT). Mutasi ini umum dijumpai pada neuraminidase tipe 1 (N1), misalnya pada virus influenza musiman pada manusia subtipe A (H1N1). Telah dibuktikan secara *in vitro* dan *in vivo* bahwa mutasi H275Y menyebabkan virus influenza A (H1N1) menjadi resisten terhadap obat anti neuraminidase oseltamivir.

### Tujuan Pemeriksaan:

Menentukan prevalensi mutasi H275Y dan resistensi oseltamivir pada virus influenza A (H1N1) di Indonesia.

### Material dan Metode:

Sebanyak 106 isolat virus influenza A (H1N1) yang diperoleh dari 16 kota di Indonesia dalam periode 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008, diuji menggunakan metoda real time RT-PCR (rRT-PCR) untuk melihat adanya mutasi H275Y dan kit neuraminidase inhibitor NA-Star untuk melihat aktivitas enzim neuraminidase. Sekuensing dilakukan untuk konfirmasi mutasi tersebut.

### Hasil dan Kesimpulan:

Ditemukan adanya virus influenza A (H1N1) yang mempunyai mutasi H275Y sebanyak 16% (17 dari 106) dan mempunyai fenotip resisten terhadap oseltamivir sebanyak 17,9% (19 dari 106). Ditemukan pula mutasi lain selain H275Y yang menyebabkan berkurangnya sensitifitas terhadap oseltamivir yaitu mutasi D151D/G dan D151N.

Kata kunci: virus influenza A (H1N1), mutasi gen Neuraminidase, Oseltamivir, Resistensi obat

## ABSTRACT

Name : Rismalia  
Program Study: Ilmu Biomedik kekhususan Biologi  
Title : Detection of H275Y mutation and Oseltamivir Resistance of Influenza A (H1N1) Virus in Indonesia year 2007-2008

### **Background:**

H275Y mutation is a substitution mutation in the neuraminidase gene of influenza virus resulting in amino acid change at position 275 where histidine (CAT) changed to tyrosine (TAT). This mutation is commonly found in type 1 neuraminidase (N1) in human seasonal influenza virus subtype A (H1N1). There have been *in vitro* and *in vivo* evidences that H275Y mutation causes influenza A (H1N1) virus to become resistant to anti-neuraminidase drug oseltamivir.

### **Purposed:**

Determine prevalence of H275Y mutation and oseltamivir resistance of influenza A (H1N1) virus in Indonesia.

### **Method:**

A total of 106 isolates of influenza A (H1N1) virus obtained from 16 cities in Indonesia during the period January 1, 2007 until May 16, 2008, was tested using real-time RT-PCR (rRT-PCR) to detect the H275Y mutations and NA-Star neuraminidase inhibitor kit to assess the neuraminidase enzyme activity. Gene sequencing was performed to confirm the mutation.

### **Result and conclusion:**

There were 16% (17 of 106) of influenza A (H1N1) viruses with H275Y mutation and 17.9% (19 of 106) with oseltamivir resistance phenotype. Other mutations (D151D / G and D151N) that cause reduced sensitivity to oseltamivir were also found in this study.

Keywords: influenza virus A (H1N1) Neuraminidase gene mutation, Oseltamivir, drug resistance

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1.PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Masalah Penelitian	5
1.3.Hipotesis Penelitian	6
1.4.Tujuan Penelitian	6
BAB 2.TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1.Virus Influenza A	8
2.1.1.Perbedaan Virus influenza A dibanding influenza B dan C	11
2.2.Siklus Hidup Virus Influenza A	12
2.3.Struktur dan Fungsi Protein NA pada Virus Influenza A	14
2.4.Anti Neuraminidase: Oseltamivir	17
2.5.Mutasi Pada Gen NA tipe 1 (N1) yang Menyebabkan Resistensi terhadap Oseltamivir	21
2.6.Uji Kemiluminesen	22
2.7.Realtime Reverse Transcription PCR	24
2.8.Sekuensing	29
3.METODE PENELITIAN	32
3.1.Pemilihan dan Pengumpulan Sampel	32
3.2.Strategi Eksperimen	33
3.3.Alat, Bahan dan Cara Kerja	35
3.3.1.Uji Neuraminidase Inhibitor (NAI)	35
3.3.1.1.IC50 Analisis	36
3.3.1.2.Analisis Data	37
3.3.2.Realtime RT-PCR (rRT-PCR)	37
3.3.2.1.Ekstraksi RNA virus	37
3.3.2.2.Realtime Reverse Transcription PCR (rRT-PCR)	38



3.3.3.Sekuensing Nukleotida	39
3.3.3.1.Elektroforesis	40
3.3.3.2.Purifikasi	41
3.3.3.3.Elektroforesis Hasil Purifikasi	41
3.3.3.4.Siklus Sekuensing	42
3.3.3.5.Presipitasi Hasil Sekuensing	42
3.3.3.6.Analisa Hasil Sekuensing	43
<b>BAB 4. HASIL PENELITIAN</b>	<b>45</b>
4.1.Hasil Uji NAI	45
4.2.Hasil Uji rRT-PCR	46
4.3.Hasil Sekuensing	52
<b>BAB 5.PEMBAHASAN</b>	<b>63</b>
<b>BAB 6.KETERBATASAN DAN HAMBATAN</b>	<b>76</b>
<b>BAB 7.KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>77</b>
7.1. KESIMPULAN	77
7.2. SARAN	77
<b>DAFTAR REFERENSI</b>	<b>79</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>88</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Kelompok Hasil dari Uji NAI dan rRT-PCR untuk sekuensing	35
2	Sekuen Primer sekuensing Gen NA tipe 1 virus influenza A (H1N1)	39
3	Hasil uji rRT-PCR dan NAI pada semua isolat secara keseluruhan	50
4	Sebaran virus influenza yang resisten di musin hujan dan musim kemarau	50
5	Sebaran virus influenza yang resisten berdasarkan strain	51
6	Hasil uji NAI untuk melihat aktifitas NA terhadap oseltamivir tiap region	51
7	Hasil uji rRT-PCR untuk melihat adanya mutasi H275Y pada 6 region	52
8	Tiga Kelompok Hasil untuk Sekuensing	52
9	Data 5 isolat yang disekuen	53
10	Jumlah substitusi nukleotida non sinonim dan sinonim pada gen NA	55
11	Lis Sampel yang digunakan pada penelitian	88
12	Hasil titrasi virus pada tes NA inhibitor	91
13	Hasil tes anti neuraminidase	92
14	Hasil penghitungan IC50 menggunakan software GraphPad v.5	93
15	Hasil Uji NAI dan rRT-PCR pada 106 isolat virus influenza A (H1N1)	94
16	Macam-macam mutasi asam amino yang ditemui pada penelitian	97
17	Asam Amino yang berperan pada situs pengikatan protein NA terhadap Oseltamivir	98

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
1	Morfologi virus influenza	9
2	Siklus hidup virus influenza	13
3	Struktur NA	14
4	Struktur situs aktif neuraminidase virus influenza A	16
5	Mekanisme katalisasi enzim neuraminidase virus influenza	17
6	Struktur kimia Asam sialiat <i>N</i> -acetylneuraminic acid (Neu5Ac) (kiri) dan zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en) (kanan)	18
7	Struktur kimia (A) dan tiga dimensi (B) Oseltamivir karboksilat, GS4071, 4- <i>N</i> -acetyl-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid.	19
8	Mekanisme kerja Neuraminidase Inhibitor.	20
9	Mekanisme Reaksi Uji Kemiluminesen	24
10	Probe terletak antara primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i>	26
11	Enzim polimerase mencapai probe	26
12	Aktivitas 5' exonuklease memotong probe sehingga reporter dan quencher terpisah	27
13	Aliran energi dari reporter ke quencher	28
14	Hasil Sekuensing Otomatis	31
15	Strategi amplifikasi gen Neuraminidase tipe 1 (N1)	39
16	Hasil purifikasi DNA	42
17	Hasil tes rRT-PCR isolat yang tidak mempunyai mutasi H275Y.	47
18	Hasil tes rRT-PCR isolat yang mempunyai mutasi H275Y.	48
19	Hasil tes rRT-PCR kontrol tanpa isolat virus.	49
20	Sekuen nukleotida posisi 452 sampel 4 yang menunjukkan adanya dua populasi virus pada isolat.	54
21	Hasil pensejajaran nukleotida kelima isolat	56
22	Hasil Pensejajaran sekuen asam amino	57
23	Protein NA yang sensitif terhadap oseltamivir.	58
24	Protein NA dengan mutasi H275Y yang resisten terhadap oseltamivir.	59
25	Macam-macam mutasi asam amino pada protein NA yang ditemui dalam penelitian.	60
26	Pohon kekerabatan virus influenza A (H1N1) asal Indonesia	62
27	Perubahan formasi asam amino pada NA untuk berikatan dengan oseltamivir	65
28	Mekanisme resistensi terhadap oseltamivir tapi tetap sensitive terhadap zanamivir.	66

29	Perbandingan struktur oseltamivir dan zanamivir	67
30	Sebaran virus influenza A (H1N1) dengan enzim NA resisten terhadap oseltamivir pada tiap region	71
31	Grafik transform data A (H1N1) kontrol sensitif pada tes NA inhibitor	92
32	Grafik transform data A (H1N1) kontrol resisten pada tes NA inhibitor.	93
33	Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 1 dari program I-Tasser.	116
34	Situs pengikatan protein NA sampel 1 dari dari program I-Tasser	116
35	Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 2 dari program I-Tasser.	117
36	Situs pengikatan protein NA sampel 2 dari dari program I-Tasser	117
37	Prediksi protein NA sampel 3 dari program I-Tasser	118
38	Situs pengikatan protein NA sampel 3 dari dari program I-Tasser	118
39	Prediksi 3 dimensi protein NA sampel 4A dari program I-Tasser	119
40	Situs pengikatan protein NA sampel 4A dari dari program I-Tasser	119
41	Prediksi 3 dimensi protein NA sampel 4G dari program I-Tasser	120
42	Situs pengikatan protein NA sampel 4G dari dari program I-Tasser	120
43	Prediksi 3 dimensi protein NA sampel 5 dari program I-Tasser	121
44	Situs pengikatan protein NA sampel 5 dari dari program I-Tasser	121
45	Prediksi 3 dimensi protein NA kontrol sensitif dari program I-Tasser	122
46	Situs pengikatan protein NA control sensitif dari dari program I-Tasser	122
47	Prediksi 3 dimensi protein NA kontrol resisten dari program I-Tasser	123
48	Situs pengikatan protein NA control resisten dari dari program I-Tasser	123

## DAFTAR SINGKATAN

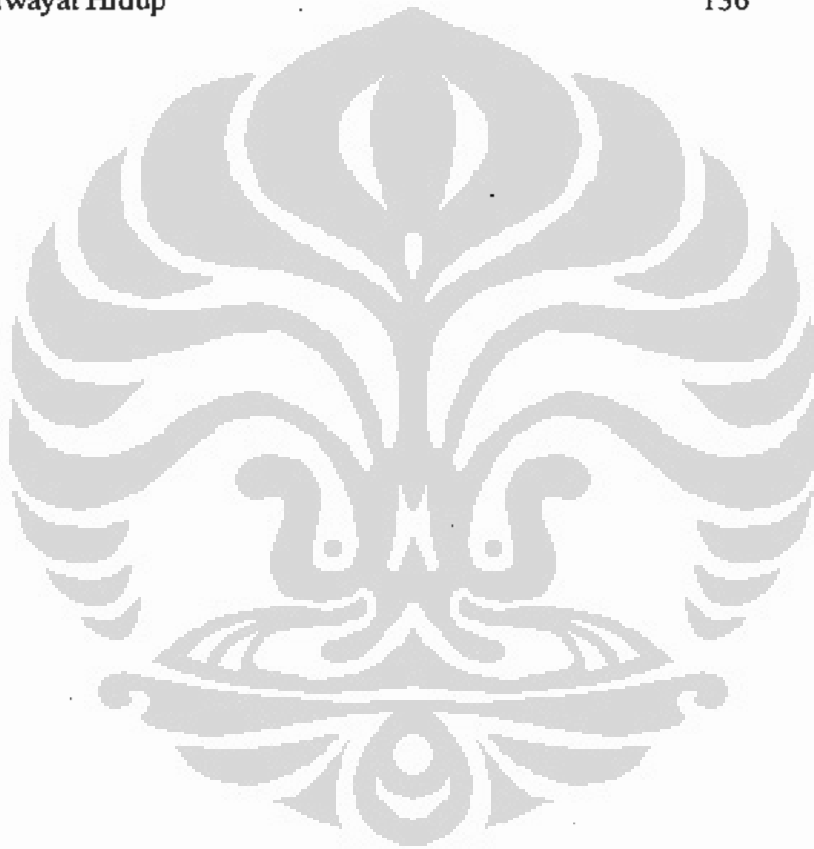
No	Singkatan	Kepanjangan
1	µg	: Microgram
2	µl	: Mikroliter
3	A (ALA)	: Asam amino Alanin
4	A452G	: Mutasi nukleotida A menjadi G pada posisi 452
5	Arg224	: Asam amino pada posisi 224 yaitu arginin
6	AUG	: <i>start</i> kodon
7	BspHI	: <i>Bacillus species H</i>
8	C (CYS)	: Asam Amino Sistein
9	<u>C</u> AT	: kodon histidin
10	CCD	: <i>Charge Coupled Device</i>
11	CDC	: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
12	cDNA	: complementary DNA
13	CM2	: <i>channel</i> membran
14	CT	: <i>Cycle threshold</i>
15	CTV	: <i>Cycle threshold value</i>
16	D (ASP)	: Asam amino Asam Aspartat
17	D151D/G	: campuran <i>wildtype</i> dan Mutasi asam aspartat menjadi glisin pada asam amino posisi 151
18	D151G	: Mutasi asam aspartat menjadi glisin pada asam amino posisi 151
19	D151N	: Mutasi asam aspartat menjadi asparagin pada asam amino posisi 151
20	D198N	: Mutasi asam aspartat menjadi asparagin pada asam amino posisi 198
21	ddATP	: dideoksiadenosin trifosfat
22	ddCTP	: dideoksisitosin trifosfat
23	ddGTP	: dideoksiguanosin trifosfat
24	ddH <sub>2</sub> O	: dideoksi H <sub>2</sub> O
25	ddNTP	: dideoksinukleotida trifosfat
26	ddTTP	: dideoksitimidin trifosfat
27	DNA	: deoxyribonucleic acid
28	E (GLU)	: Asam amino Asam Glutamat
29	E119A	: Mutasi asam glutamat menjadi alanin pada asam amino posisi 119
30	E119D	: Mutasi asam glutamat menjadi asam aspartat pada asam amino posisi 119
31	E119G	: Mutasi asam glutamat menjadi glisin pada asam amino posisi 119

32	E119V	: Mutasi asam glutamat menjadi valin pada asam amino posisi 119
33	E276	: Asam amino posisi 276 yaitu asam glutamat (E)
34	EDTA	: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
35	F (PHE)	: Asam Amino Fenil Alanin
36	FRET	: <i>Florescent Resonance Energy Transfer</i>
37	G (GLY)	: Asam amino Glysin
38	G451A	: Mutasi glisin menjadi alanin pada asam amino posisi 451
39	Glu276	: Asam amino posisi 276 yaitu glisin
40	H (HIS)	: Asam amino Histidin
41	H126N	: Mutasi histidin menjadi asparagin pada asam amino posisi 126
42	H274	: Asam amino posisi 274 yaitu histidin
43	H274Y	: Mutasi histidin menjadi tirosin pada asam amino posisi 274
44	H275	: Asam amino posisi 275 yaitu histidin
45	H275Y	: Mutasi histidin menjadi tirosin pada asam amino posisi 275
46	HA	: Hemagglutinin
47	HEF	: <i>haemagglutinin-esterase fusion</i>
48	His274Tyr	: Mutasi histidin menjadi tirosin pada asam amino posisi 274
49	I (ILE)	: Asam amino Isoleusin
50	IC50	: <i>inhibition concentration 50%</i>
51	IFA	: <i>Immuno Fluorescence Assay</i>
52	IQR	: Inter kuartil
53	K (LYS)	: Asam amino Lysin
54	K329E	: Mutasi lisin menjadi glutamat pada asam amino posisi 329
55	L (LEU)	: Asam Amino Leusin
56	M (MET)	: Asam Amino Metionin
57	M2	: <i>membrane-channel protein</i>
58	MDCK	: Madin-Darby canine kidney
59	MGBNFQ	: non-fluorescent quenchers
60	mM	: Milimolar
61	mRNA	: MessengerRNA
62	MUNANA	: 20-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ DN-acetylneuraminic acid
63	N (ASN)	: Asam amino Asparagin
64	N294S	: Mutasi asparagin menjadi serin pada asam amino posisi 294
65	NA	: Neuraminidase
66	NAI	: Neuraminidase Inhibitor
67	NAMRU	: Naval Medical Research Unit
68	NCBI	: National Center for Biotechnology Information
69	NCBI CY002626	: kode gen bank referensi virus influenza A/New York/230/2003 H1N1

70	NCBI EU516028	: kode gen bank oseltamivir A/Massachusetts/05/2007 H1N1
71	NI	: neuraminidase inhibitor
72	NP	: Nucleoprotein
73	NS1	: protein nonstruktural
74	NS2	: protein nonstruktural
75	P (PRO)	: Asam Amino Prolin
76	PA	: polimerase asam
77	Pb	: Pasangan basa
78	PB1	: polimerase basa 1
79	PB2	: polimerase basa 2
80	PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
81	Q (GLN)	: Asam Amino Glutamin
82	Q3	: kuartil 3
83	R (ARG)	: Asam amino Arginin
84	R152K	: Mutasi arginin menjadi lisin pada asam amino posisi 152
85	R224	: Asam amino posisi 224 yaitu arginin
86	R292K	: Mutasi arginin menjadi lisin pada asam amino posisi 292
87	RFLP	: <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
88	RNA	: Ribonucleic acid
89	RNP	: ribonukleoprotein
90	rRT-PCR	: Real-time Reverse Transcription PCR
91	RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
92	S (SER)	: Asam amino Serin
93	S247N	: Mutasi serin menjadi asparagin pada asam amino posisi 247
94	S274G	: Mutasi serin menjadi glisin pada asam amino posisi 274
95	SD	: standar deviasi
96	SNP	: polimorfisme nukleotida tunggal
97	T (THR)	: Asam Amino Threonin
98	TAT	: kodon tirosin
99	TBE	: Tris Boric EDTA
100	V (VAL)	: Asam amino Valine
101	vRNA	: Virus Ribonukleas Acid
102	W (TRP)	: Asam amino Tryptophan
103	WHO	: World Health Organization
104	Y (TYR)	: Asam amino Tyrosin
105	Y100H	: mutasi tirosin menjadi histidin pada asam amino posisi 100
106	$\alpha$ -Neu5Ac	: N-acetylneuraminic acid

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Lis Sampel	88
2	Hasil Penelitian	91
3	Perhitungan Statistik	101
4	Prediksi 3 Dimensi Protein NA	116
5	Draf Artikel	124
6	Riwayat Hidup	136





## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### I.1. Latar Belakang

Influenza adalah penyakit saluran pernapasan menular yang disebabkan oleh virus influenza. Gejala penyakit influenza bervariasi dari ringan sampai parah. Gejala yang ringan antara lain: demam ( $38 - 40^{\circ}\text{C}$ ), sakit kepala, batuk, nyeri otot, lesu, dan lain-lain. Pada kasus yang parah, virus influenza dapat menyebabkan radang paru-paru, yang dapat menyebabkan kematian terutama pada bayi dan orang tua. Virus influenza terdapat di sekret pernapasan orang yang terinfeksi akut dan ditularkan melalui udara saat batuk dan bersin (Lamb and Krug, 2001).

Virus influenza termasuk famili *Orthomyxoviridae* dan dapat dibedakan menjadi tiga genera (virus influenza A, B, dan C) berdasarkan perbedaan matriks dan nukleoprotein antigennya (Lamb and Krug, 2001). Virus influenza A adalah virus yang paling virulen dari ketiga tipe influenza tersebut. Influenza A dibagi ke dalam beberapa subtipe berdasarkan dua protein permukaan virus yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Ada 16 HA (H1-H16) dan 9 NA (N1-N9) pada subtipe virus influenza A. Hanya tiga jenis HA (H1, H2 dan H3) dan dua jenis NA (N1 dan N2) yang menyebabkan epidemi karena penyebarannya yang luas, proses yang berkelanjutan dan adanya transmisi dari manusia ke manusia (Bouvier and Palese, 2008). Subtipe yang umum ditemukan pada manusia saat ini adalah A (H1N1) dan A (H3N2) yang menyebabkan wabah musiman hampir setiap tahun yang sering disebut influenza musiman/*seasonal influenza* (Nelson dkk., 2007). Subtipe influenza yang ahir-akhir ini sering menimbulkan masalah kesehatan adalah flu burung (H5N1) dan flu babi (H1N1). Virus flu burung yang sangat patogen (H5N1) telah beredar di Eurasia selama lebih dari satu dekade dan telah menyebar ke lebih dari 60 negara. Berdasarkan data WHO hingga 8 Juni 2010, H5N1 telah menginfeksi 499 manusia

dan menewaskan 295 orang (WHO, 2009a). Virus flu burung (H5N1) menginfeksi manusia di Indonesia pertama kali tahun 2005 (Dharmayanti dan Indriani, 2007). Virus flu babi (H1N1) yang muncul bulan April tahun 2009 lalu juga tak kalah menakutkan. Strain virus H1N1 baru itu telah menyebar ke 214 negara, menginfeksi lebih dari 182.166 orang, dan menyebabkan kematian 18.156 orang (WHO, 2009b).

Hasil survey terhadap 1544 pasien yang memiliki gejala seperti influenza (*influenza like illness/ILI*) tahun 1999-2003 di 6 kota di Indonesia (Tangerang, Jakarta, Bandung, Yogyakarta, Bali dan Makasar), menunjukkan bahwa 172 relawan terinfeksi virus influenza (11,1%) dan influenza subtype A (H1N1), A (H3N2) dan tipe B bersirkulasi di semua kota (Beckett dkk., 2004). Tahun 2004-2007 survey diperluas di 17 kota di Indonesia, 14296 relawan berpartisipasi dalam studi ILI. Sebanyak 3247 (22,7%) relawan terinfeksi virus influenza yang dideteksi dengan metode RT-PCR yang terdiri dari tipe B (35,2%), subtype A (H1N1) sebanyak 22,1% dan subtype A (H3N2) sebanyak 42,6% (Kosasih, 2009).

Karena peran NA yang penting dalam siklus hidup virus influenza, dan fakta bahwa situs aktif dari protein neuraminidase sangat mirip pada semua virus influenza A, maka protein neuraminidase dijadikan target untuk obat anti-influenza. Obat anti NA yang diizinkan oleh WHO untuk pengobatan influenza A dan B, yaitu zanamivir (Relenza<sup>®</sup>) dan oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>). Inhibitor ini menghambat neuraminidase influenza A dan B untuk memecah residu asam sialat pada permukaan sel yang terinfeksi, yang mengakibatkan ketidakmampuan progeni virion untuk melepaskan diri dari sel inang yang terinfeksi (Ferraris dan Lina, 2008).

Oseltamivir efektif untuk menghambat virus influenza tipe A dan B termasuk flu burung H5N1, flu babi H1N1. Oseltamivir dijual dalam bentuk tidak aktif dengan nama dagang Tamiflu<sup>®</sup> berupa kapsul atau sirup yang dapat dikonsumsi secara oral (Tullu, 2009). Walaupun oseltamivir efektif untuk virus influenza tipe A maupun B, namun pada anak-anak efektifitas untuk tipe A lebih tinggi dibanding tipe B. Penggunaan oseltamivir juga lebih menguntungkan untuk anak-anak berusia dibawah 6 tahun (Sato dkk, 2008). Terapi influenza tipe B pada anak-anak berusia diatas 4

tahun dan orang dewasa lebih efektif menggunakan zanamivir (Kawaii dkk., 2008). Zanamivir dipasarkan sebagai bubuk kering yang dikonsumsi secara inhalasi ke saluran pernapasan menggunakan inhaler. Bentuk ketersediaan zanamivir ini membuat keterbatasan penggunaannya untuk anak-anak balita. Zanamivir hanya dapat dipergunakan untuk anak-anak berusia 5 tahun atau lebih. Oleh sebab itu penggunaan oseltamivir lebih banyak daripada zanamivir (Moscana, 2005). Oseltamivir telah digunakan untuk mengobati dan mencegah infeksi virus influenza A dan B pada lebih dari 50 juta pasien sejak 1999.

Enzim polimerase virus influenza tidak mempunyai kemampuan *proofreading*. Diperkirakan hal tersebut berperan dalam kesalahan replikasi sekitar 1 basa dalam setiap 104 basa (Holland dkk., 1982). Replikasi RNA virus yang rawan kesalahan menyebabkan banyak terjadi mutasi, termasuk mutasi yang mengarah pada resistensi terhadap obat anti-virus. Penggunaan oseltamivir sebagai obat anti influenza dapat menyeleksi mutasi pada virus influenza yang menyebabkan resistensi terhadap oseltamivir. Stephenson dkk. menyatakan bahwa setelah terapi oseltamivir pada anak-anak, tingkat terjadinya resistensi obat pada virus influenza subtipe A (H1N1) lebih tinggi daripada influenza subtipe A (H3N2) atau virus influenza B (Stephenson dkk., 2009).

Telah dilaporkan adanya beberapa mutasi pada gen yang menyandi protein N1 yang terkait dengan berkurangnya kepekaan terhadap oseltamivir seperti mutasi H126N, S247N, S274G, dan H275Y (Ferraris dan Lina, 2008; Sheu dkk., 2008). Program surveilans resistensi obat anti NA menemukan bahwa mutasi pada gen neuraminidase mempunyai pola spesifik terhadap subtipe tertentu, di mana mutasi H275Y lebih banyak ditemui pada virus influenza A subtype N1 (Escuret, 2008). Mutasi H275Y adalah mutasi substitusi yang menghasilkan perubahan asam amino urutan ke 275 pada protein neuraminidase dimana histidin (CAT) berubah menjadi tirosin(TAT) (Carr dkk., 2008).

Kawai dkk. menyatakan bahwa efektivitas klinis oseltamivir untuk virus influenza A (H1N1) pada musim 2008-09 berkurang dibandingkan dengan musim

sebelumnya, terutama pada anak-anak, mungkin karena mutasi H275Y (Kawai dkk., 2009). Sangat mengkhawatirkan bahwa virus influenza subtipe A (H1N1) yang resisten oseltamivir telah dilaporkan beredar di seluruh dunia termasuk Afrika (dan belahan bumi selatan), Amerika, Eropa, Norwegia, Jepang dan Cina (Besselaar dkk., 2008; Cheng, 2009; Dharan, 2009; Hauge, 2009; Kawakami, 2009; Meijer, 2009; Moscona, 2009; Weinstock, 2009).

Kenaikan jumlah virus influenza A (H1N1) dengan mutasi H275Y yang resisten terhadap oseltamivir pertama kali dilaporkan oleh Norwegia pada Januari 2008 (Lackenby, 2008). Survei di beberapa negara lain di belahan bumi utara selama tahun 2007-2008 menunjukkan bahwa ada 15% (1077 dari 6978) isolat influenza A (H1N1) yang diuji fenotip dan genotipnya memperlihatkan resistensi terhadap oseltamivir (WHO, 2009). Sebanyak 1.155 virus influenza A (H1N1) dari 45 negara bagian di Amerika Serikat diuji, 142 isolat (12,3%) diantaranya resisten terhadap oseltamivir yang berasal dari 24 negara bagian. Resistensi ini tampaknya tidak terkait dengan penggunaan oseltamivir, dan gejala penyakit tampak mirip dengan virus A (H1N1) yang sensitif oseltamivir. Diperkirakan peredaran virus A (H1N1) yang resisten oseltamivir akan terus berlangsung dengan prevalensi tinggi selama musim 2008-2009 (Dharan dkk., 2009). Hal itu sesuai dengan laporan WHO bahwa prevalensi virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir di belahan bumi utara pada musim influenza tahun 2008/2009 terus meningkat. Dari semua wilayah WHO, 30 negara melaporkan adanya resistensi terhadap oseltamivir dengan total proporsi 95% (1.291 dari 1.362) dari semua virus A(H1N1) yang dianalisis. Prevalensi resistensi oseltamivir sangat tinggi terjadi di Kanada (52 dari 52 virus yang diuji), Hong Kong SAR (72 dari 80), Jepang (420 dari 422), Republik Korea (268 dari 269), dan Amerika Serikat (237 dari 241). Di Eropa, sebaran virus A (H1N1) sedikit, namun prevalensi resistensi terhadap oseltamivir sangat tinggi, misalnya di Perancis (12 dari 12 virus yang diuji), Jerman (66 dari 67), Irlandia (9 dari 10), Italia (16 dari 16), Swedia (11 dari 12) dan Inggris (61 dari 62). Prevalensi resistensi relatif rendah di Cina (6 dari 44). Di beberapa negara belum ditemukan virus A (H1N1) yang resisten seperti di Madagaskar (0 dari 7), Argentina (0 dari 1),

dan Costa Rica (0 dari 1). Pada periode 1 April 2008-30 September 2008 WHO melaporkan bahwa belum ada virus A (H1N1) yang resisten oseltamivir di Malaysia (0 dari 8), Thailand (0 dari 12), India (0 dari 1) Peru (0 dari 9), Panama (0 dari 9) dan Nikaragua (0 dari 13) (WHO, 2009).

Penggunaan oseltamivir untuk pengobatan influenza di Indonesia masih sangat jarang. Namun, penggunaan oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>) untuk mengobati individu yang diduga terinfeksi influenza H5N1 telah berlangsung sejak tahun 2005. Untukantisipasi penyebaran H5N1, maka Departemen Kesehatan Indonesia telah menyalurkan oseltamivir ke puskesmas-puskesmas rujukan di seluruh Indonesia. Pada tahun 2005-2006 dari total 553 orang yang diduga terinfeksi virus influenza A(H5N1) mendapat pengobatan oseltamivir. Dari 553 orang tersebut, ternyata 72,9% diantaranya negatif, hanya 8,5% yang positif A (H5N1) dan sisanya terinfeksi influenza musiman yaitu 6,1% terinfeksi oleh influenza A (H1N1), 3,7% terinfeksi influenza A (H3N2), 6.1% terinfeksi influenza A (subtipe tidak dapat ditentukan), dan 2,7% terinfeksi influenza B (Kosasih, 2006). Riwayat penggunaan oseltamivir, dapat bertransmisinya virus influenza A (H1N1) mutan yang resisten terhadap oseltamivir dan fakta bahwa resistensi oseltamivir belum diteliti di Indonesia membuat studi karakterisasi virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir di Indonesia sangat penting dilakukan. Untuk memenuhi kebutuhan ini, virus influenza A (H1N1) yang dikoleksi selama surveilan di Indonesia tahun 2007-2008 diuji untuk melihat resistensi terhadap oseltamivir. Penelitian yang fokus pada virus influenza A(H1N1) ini, diharapkan dapat memberikan dasar keahlian teknis yang dapat digunakan untuk memeriksa resistensi virus influenza tipe/subtipe lain terhadap anti-NA di masa yang akan datang.

## **L2. Masalah Penelitian**

1. Apakah ada virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir dan mempunyai mutasi H275Y di Indonesia?

2. Apakah ada mutasi lain yang menyebabkan resistensi terhadap oseltamivir di samping H275Y pada virus influenza A (H1N1) di Indonesia?

### **I.3. Hipotesis Penelitian**

1. Ada virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir dan mempunyai mutasi H275Y di Indonesia.
2. Mutasi H275Y merupakan mutasi utama yang menyebabkan resistensi oseltamivir di Indonesia.

### **I.4. Tujuan Penelitian**

1. Menentukan prevalensi resistensi oseltamivir pada virus influenza A (H1N1) di Indonesia.
2. Menentukan variasi urutan basa gen neuraminidase virus influenza A (H1N1) di Indonesia tahun 2007-2008 yang mengakibatkan resistensi terhadap oseltamivir.
3. Mendapatkan metode efektif untuk menentukan resistensi virus influenza terhadap oseltamivir.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

Influenza adalah penyakit saluran pernapasan akut yang sangat menular, disebabkan oleh virus influenza. Penyakit infeksi virus ini merupakan penyebab utama masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dan di seluruh dunia. Infeksi influenza dimulai dari sel epitel *tracheobronchial* dan menyebar ke seluruh saluran pernapasan. Propagasi virus influenza sangat cepat karena infektifitas virus tinggi dan masa inkubasi pendek sehingga titer virus dalam sekret pernapasan selama fase *shedding* tinggi. Replikasi virus terjadi dalam sel di sepanjang saluran pernapasan. Siklus replikasi membutuhkan waktu 4 jam, selanjutnya virus melepaskan diri dari sel inang untuk menginfeksi sel berikutnya, beberapa jam sebelum sel terinfeksi mati. Setelah replikasi virus dan penyebaran infeksi ke seluruh saluran pernapasan bagian atas dan bawah. Virus akan menumpuk pada sekret nasofaring selama 5 sampai 10 hari. Cara penyebaran influenza pada manusia terutama melalui virus yang terdapat pada sekret pernapasan orang yang terinfeksi akut yang menyebar melalui udara saat batuk dan bersin, baik dengan kontak langsung atau tidak langsung. Masa inkubasi virus influenza berkisar antara 1-7 hari, tetapi biasanya 2-3 hari. Gejala influenza antara lain demam dengan suhu badan  $>37,8^{\circ}\text{C}$ , sakit kepala, pusing, nyeri otot, nyeri sendi, batuk, berdahak, sesak nafas, sakit bagian dada, sakit menelan, pilek, serak, muntah, tidak nafsu makan, lemas dan diare. Komplikasi multi sistem dapat mempengaruhi paru-paru, jantung, otak, hati, ginjal dan otot. Kematian dapat disebabkan oleh infeksi primer virus atau infeksi sekunder oleh bakteri pneumonia (Lamb and Krug, 2001; Nicholson, 1998).

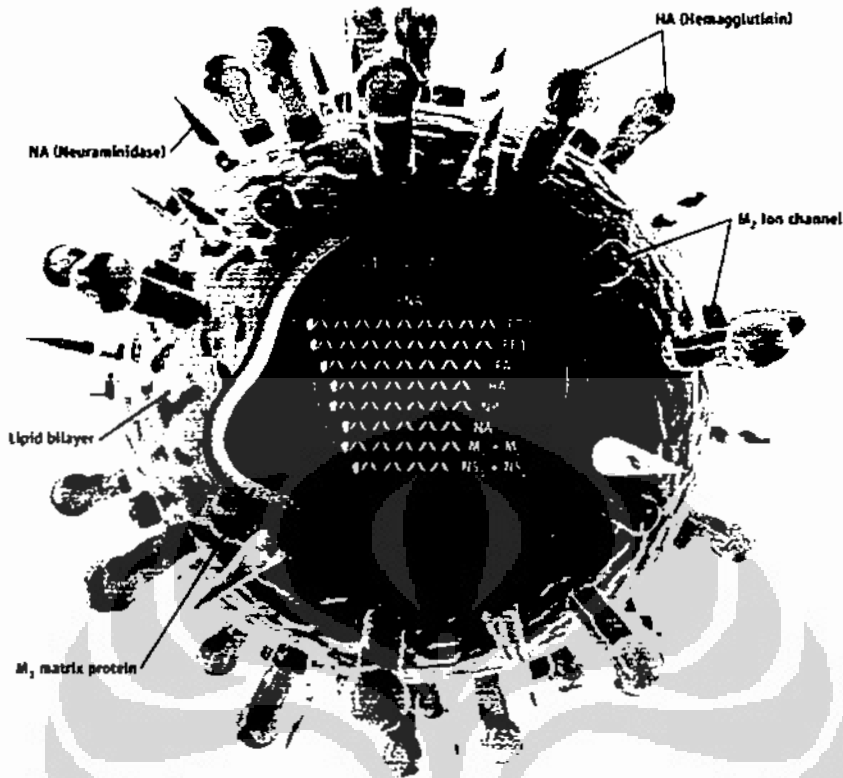
Selama tahun 2004-2007 sekitar 22,7% relawan surveilan influenza di Indonesia terinfeksi virus influenza. Penderita influenza tersebut berjenis kelamin wanita (45,8%) dan pria (54,2%) dari kelompok usia 0-5 tahun (16,9%), 6-14 tahun (29,7%), 15-60 tahun (20,9%) dan lebih dari 60 tahun (20,4%). Kasus influenza tersebut disebabkan oleh virus influenza subtype A (H3N2) sebanyak 42,6%, tipe B

sebanyak 35,2% dan sub tipe A (H1N1) sebanyak 22,1% (Kosasih, 2009). Pada studi perbandingan keparahan penyakit akibat infeksi virus influenza periode akhir tahun 1970 hingga awal tahun 1980 menunjukkan bahwa infeksi oleh virus influenza A (H3N2) menyebabkan sakit yang lebih parah dibandingkan sub tipe H1N1 sedangkan infeksi oleh virus influenza B menyebabkan keparahan antara A (H3N2) dan A (H1N1) (Nicholson, 1998).

## 2.1. Virus Influenza A

Virus influenza A diisolasi pertama kali pada tahun 1933 (Nicholson, 1998), berbentuk bola dengan diameter 80-120 nm. Genom virus influenza A berupa 8 segmen RNA untai tunggal dengan polaritas negatif. Masing-masing segmen RNA tersebut dibungkus oleh nukleoprotein (NP) dan dihubungkan dengan kompleks polimerase. Komplek polimerase tersebut terdiri dari protein polimerase basa 2 (PB2), polimerase basa 1 (PB1), dan polimerase asam (PA). Partikel subviral yang terdiri dari rantai RNA virus (vRNA), NP dan kompleks polimerase disebut ribonukleoprotein (RNP). Delapan partikel RNP tersebut dibungkus oleh protein M1 dan diselubungi oleh membran berupa lemak (*lipid membrane*). Di sekeliling membran terdapat tiga protein berbentuk duri yaitu haemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), dan *membrane-channel protein* M2 seperti tampak pada gambar 1 (Lamb dan Choppin, 1983; Sullivan dkk., 2010).





Gambar 1. Morfologi virus influenza.

Materi genetik berupa RNA berbentuk segmen berjumlah 8 buah dibungkus oleh protein matrik M1. Dibagian permukaan matrik tersebar 3 buah protein berbentuk duri yaitu hemagglutinin, neuraminidase dan kanal ion M2 (sumber: Sullivan dkk, 2010).

Hemagglutinin (HA) terdiri dari trimer subunit yang identik, mempunyai kemampuan mengikat reseptor virus dan aktivitas fusi membran yang bekerja pada pH rendah dalam endosom pada waktu virus masuk ke dalam sel (Wharton dkk., 1990). Sampai saat ini sudah teridentifikasi 16 HA (H1-H16) pada subtipe virus influenza A (Russel dkk., 2006). Ke 16 subtipe HA dibedakan berdasarkan reaktivitasnya terhadap serum subtipe-spesifik hiper-imun dan variasi urutan asam amino mereka hingga 60%. Secara genetis HA memiliki 5 *clade* yang membentuk 2 Kelompok: 3 *clade* di kelompok 1, dan 2 *clade* di kelompok 2. Perbedaan struktural antara kedua kelompok tersebut adalah perubahan struktural pada pH yang sesuai untuk fusi. (Skehel, 2009).

Neuraminidase terdiri dari tetramer subunit yang identik yang mempunyai aktifitas menghancurkan reseptor untuk membebaskan virus baru dari permukaan sel yang terinfeksi (Colman, 1989). Ada 9 macam NA yang sudah teridentifikasi (N1-N9). Sembilan sub tipe NA juga membentuk 2 kelompok genetik berdasarkan perbedaan struktur di daerah dekat situs aktif enzim, perbedaan dalam kepekaan terhadap inhibitor NA yang digunakan sebagai anti-virus (oseltamivir dan zanamivir) dan juga perbedaan varian akibat mutasi yang dapat menyebabkan resistensi obat (Skehel, 2009). Berdasarkan eksperimennya, Russel dkk. (2006) mengelompokkan neuraminidase menjadi 3 kelompok berdasarkan struktur 3 dimensinya, yaitu:

- Grup N1 yang terdiri dari N1, N4, N5, dan N8
- Grup N2 yang terdiri dari N2, N3, N6, N7 dan N9
- Grup B yang terdiri dari neuraminidase B

Grup N1 memiliki situs aktif di dekat ligand binding domain sedangkan grup N2 tidak. Ferraris dkk. (2005) menyatakan bahwa Grup N1 dan B lebih sensitif terhadap zanamivir sedangkan grup N2 lebih sensitif terhadap oseltamivir.

Struktur protein kanal membran M2 adalah tetramer (Sugrue dan Hay 1991; Pinto dkk., 1992). *Channel* ini kemungkinan berperan pada proses asidifikasi dalam virus ketika melewati endosom asam yang dibutuhkan untuk membebaskan partikel RNP ke dalam sitoplasma setelah melalui tahap fusi membran (Burkrinskaya dkk., 1982; Hay dkk., 1985; Wharton dkk., 1990; Martin dan Helenius, 1991).

Kedelapan segmen genom virus influenza A mengkode tujuh protein structural virion (PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, and M1) dan tiga protein nonstruktural (NS1, NS2 dan M2) yang hanya ditemui dalam sel yang terinfeksi. Pada genom virus Influenza A, segmen 1 mengkode protein PB2, segmen 2 mengkode protein PB1, segmen 3 mengkode protein PA, segmen 4 mengkode protein HA, segmen 5 mengkode protein NP, segmen 6 mengkode protein NA, segmen 7 mengkode protein M (M1 dan M2) dan segmen 8 mengkode protein NS (NS1 dan NS2)(Lamb dan Choppin, 1983).

### 2.1.1. Perbedaan Virus Influenza A Dibanding Influenza B dan C

Virus influenza A menginfeksi unggas, manusia dan mamalia lain khususnya kuda dan babi, sedangkan influenza B sebagian besar hanya menginfeksi manusia. Virus Influenza C mampu menginfeksi manusia, anjing, dan babi. Kasus penyakit manusia karena influenza C biasanya subklinis, oleh sebab itu jarang dilaporkan (Daly dkk., 1998). Virus influenza A dan B mempunyai delapan segmen RNA, sedangkan virus influenza C mempunyai tujuh segmen RNA (Lamb dan Choppin, 1983).

Struktur influenza A dan B hampir sama, walaupun bentuk virus B lebih teratur/reguler. Perbedaan utama virus A dan B yaitu pada virus A mempunyai protein kanal membran M2 (Zabedee dan Lamb, 1988) dikode oleh fragmen mRNA gen segmen 7 yang juga mengkode M1 (Lamb dkk., 1981). Pada virus B protein NB yang dikode oleh RNA segmen 6 mempunyai *overlapping reading frame* pada mRNA yang sama untuk mengkode NA (Shaw dkk., 1983). Pada virus C, *channel* membran adalah CM2 dan dikode oleh RNA segmen 6 (Hongo dkk., 1997)

Perbedaan lainnya antara virus A dan B adalah ukuran genomnya yaitu virus A berukuran 13.588 nukleotida dan virus B berukuran 14.639 nukleotida. Perbedaan ini tidak merefleksikan ukuran protein tetapi pada RNA virus B mempunyai *non-coding* lebih panjang. Sekuen *non-coding* ini kemungkinan mengandung sinyal yang spesifik pada tiap tipe untuk mengemas virus baru (Ruigrok, 1995).

Perbedaan besar antara virus A dan B dengan virus C adalah virus C tidak mempunyai NA, hanya mempunyai satu glikoprotein permukaan yaitu *haemagglutinin-esterase fusion* (HEF) (Compans dkk., 1977; Herrler 1979, 1981). Glikoprotein tersebut mempunyai kemampuan fusi dan mengikat reseptor seperti protein HA pada virus A dan B (Herrler dkk., 1981; Kitame dkk., 1982) Glikoprotein tersebut juga mempunyai kemampuan menghancurkan reseptor seperti pada protein NA pada virus A dan B (Kendal, 1975). Pada virus influenza A dan B, HA berikatan dengan reseptor yang mengandung N-acetylneuraminic acid sedangkan HEF pada

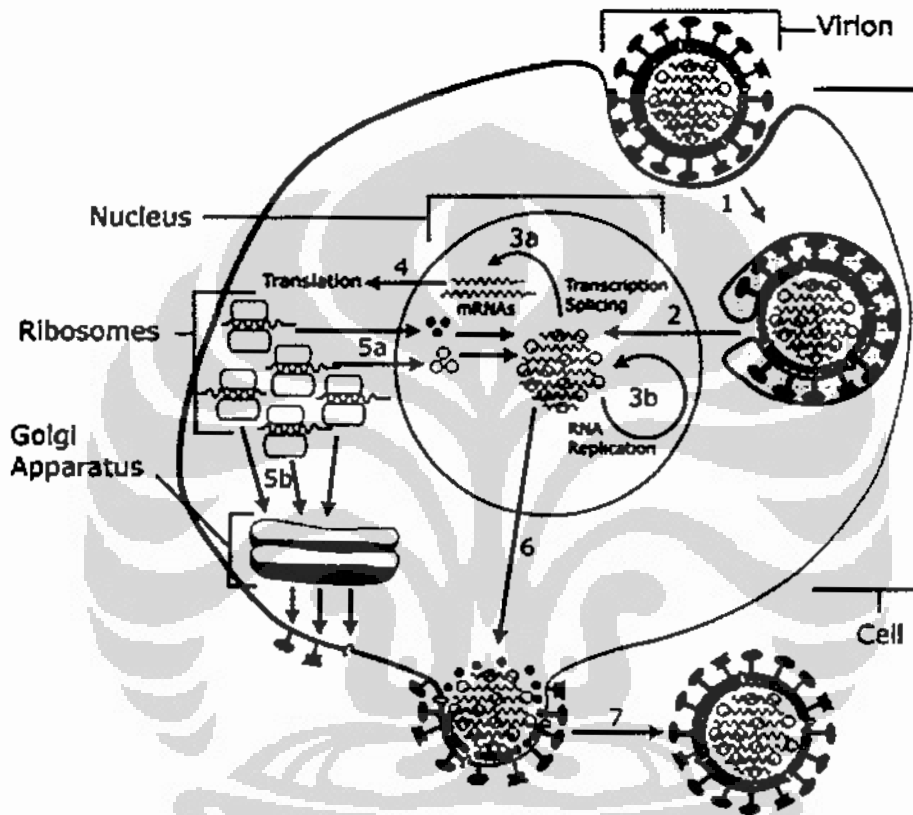
influenza C berikatan dengan reseptor yang mengandung 9-O-acetyl N-acetylneuraminic acid (modifikasi dari N-acetylneuraminic acid) (Hay, 1998). Segmen 4 virus influenza A dan B mengkode hemagglutinin (HA) sedangkan pada influenza C mengkode protein HEF.

RNA segmen 6 pada virus influenza A dan B mengkode neuraminidase (NA); virus influenza C tidak memiliki neuraminidase, tetapi fungsinya dilakukan oleh protein HEF. RNA segmen 6 pada virus influenza B juga mengkode protein NB. Dua protein yaitu NA dan NB ditranslasi dari *reading frame overlapping bicistronic* mRNA; NB menginisiasi pertama pada AUG, sedang empat nukleotida sebelum AUG menginisiasi translasi NA (Shaw dkk., 1983). Sebanyak 300 nukleotida mengkode 100 asam amino NB, sedang sekuen nukleotida sebanyak 1398 mengkode 466 asam amino NA yang menempati sebagian besar transkrip mRNA. Berdasarkan kemiripan dan aktivitas *ion channel* diperkirakan bahwa NB mempunyai fungsi yang mirip dalam *uncoating* virus seperti pada M2 yang merupakan produk gen M virus influenza A (Betakova dk k., 1996; Brassard dkk.,1996).

## 2.2. Siklus Hidup Virus Influenza A

Virus influenza melekat pada sel inang melalui ikatan antara glikoprotein permukaan virus (haemagglutinin) dengan reseptor sel inang yang mempunyai residu asam sialat (N-acetylneuraminic acid / $\alpha$ -Neu5Ac). Setelah berikatan dengan reseptor, virus diinternalisasi melalui proses endositosis. Kanal ion M2 akan menciptakan kondisi pH rendah (pH 5-6) sehingga memicu fusi antara membran virus dan membran endosom yang dikatalisa oleh perubahan struktur HA sehingga virus dapat melepaskan RNAny. RNA virus ini kemudian diimpor ke dalam inti sel inang. RNA negatif *strand* diubah menjadi mRNA (positif *strand*) oleh RNA polimerase virus untuk ekspresi gen. Sintesis protein dan perakitan partikel virus di dalam sel inang akan membentuk virion baru, kemudian membentuk tunas yang siap keluar dari sel inang. Enzim neuraminidase mengkatalisa pemecahan ikatan  $\alpha$ -ketosidik antara residu asam sialat pada permukaan sel inang dan D-galaktosa atau D-galaktosamin

glikoprotein virion baru. Aktivitas pemecahan ikatan oleh neuraminidase virus itu memungkinkan progeni virion yang mengumpul di permukaan sel inang dapat lepas dari sel terinfeksi dan siap menginfeksi sel inang baru (Hay, 1998). Siklus hidup virus influenza A dapat dilihat pada gambar 2.

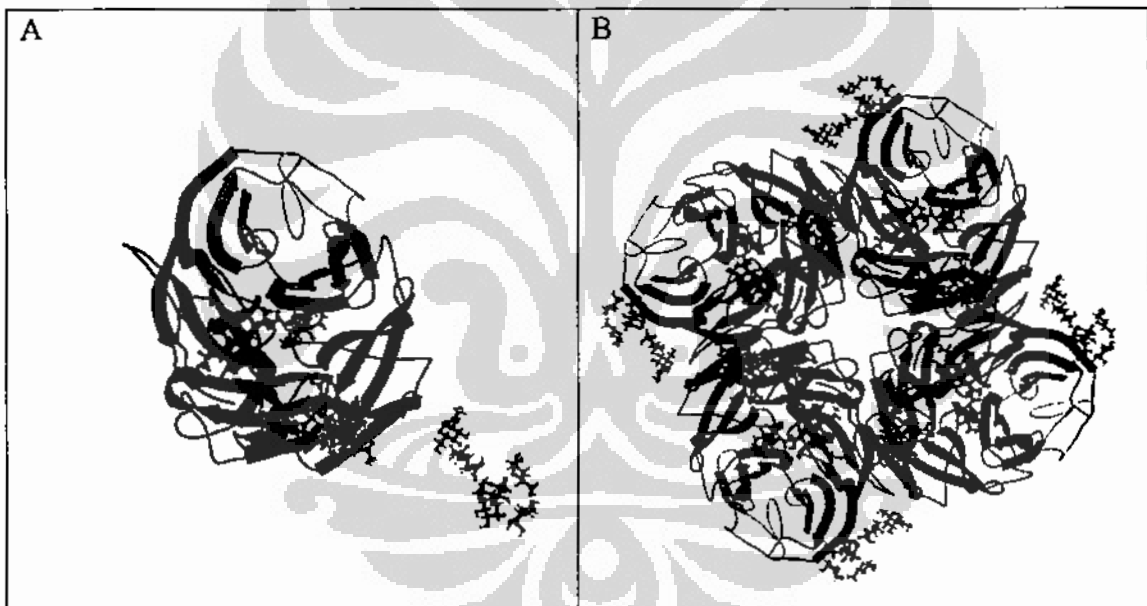


Gambar 2. Siklus hidup virus influenza.

Virus menempel pada sel inang melalui HA kemudian terjadi endositosis. Kanal ion M2 menciptakan suasana asam sehingga RNA dilepaskan menuju inti sel inang. RNA ditranskripsi dan ditranslasi membentuk protein komponen virus. Perakitan virus terjadi di bagian membran inang sehingga terbentuk tunas virus. Terahir virus melepaskan diri dari sel inang dan siap menginfeksi sel lainnya (Flint dkk., 2000)

### 2.3. Struktur Dan Fungsi Protein NA Pada Virus Influenza A

Neuraminidase merupakan protein membran integral dengan berat molekul 240 kDa yang dikode oleh gen pada RNA segmen ke 6 yang tersusun atas 1413 basa. Protein neuraminidase mempunyai 5 situs glikosilasi dan terdiri dari 454 - 470 asam amino, jumlah ini bervariasi tergantung pada strain virus. Struktur neuraminidase seperti kelompok 4 buah jamur (tetramer) yang simetris lipat 4. Struktur NA virus influenza dapat dilihat pada gambar 3. Struktur tiga dimensi kepala NA menunjukkan tiap monomer terdiri atas 6 lembaran  $\beta$  identik yang tersusun seperti bilah baling baling, tiap lembar terdiri dari 4 helai pita yang tersusun antiparalel (Varghese dkk, 1992).



Gambar 3. Struktur NA

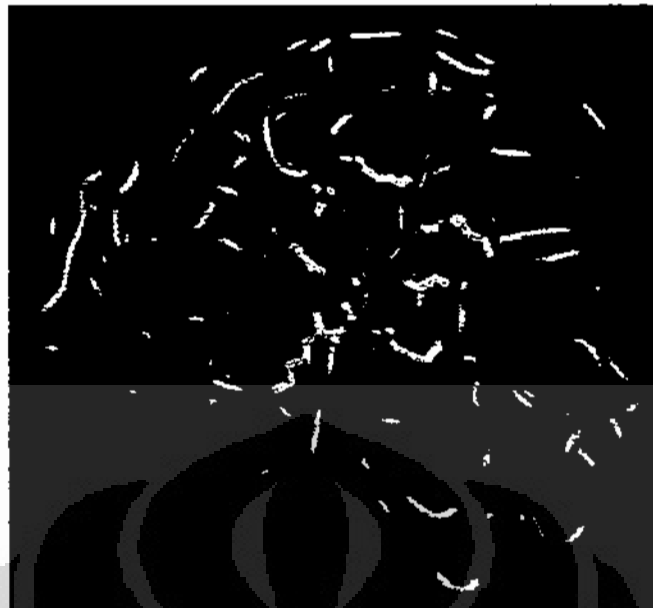
Sub unit NA terdiri dari 6 buah lembaran  $\beta$  (gambar A) dan molekul tetramer NA yang terdiri dari 4 subunit (gambar B) (sumber: Flint dkk., 2000)

NA tertanam pada membran virus melalui tangkai (*stalk*) berupa protein hidrofobik yang tersusun dari 29 asam amino di daerah N-terminal (Varghese dkk., 1983). Protein tangkai ini bertanggung jawab untuk membran *anchoring* sedangkan bagian kepala yang berbentuk globular mengandung situs aktif enzim dan situs

antigenik dari molekul NA (Laver, 1978). Sekuensing asam amino dan gen NA menunjukkan bahwa membran anchor terletak daerah N-terminal (residu 7-35) dan tempat pemotongan enzim protease terletak dekat residu 80 (Laver, 1978).

Enzim NA mengkatalisa pemotongan ikatan glikosidik antara virus influenza dengan asam sialat sel inang. Fungsi NA antara lain memfasilitasi virus melalui lendir di sepanjang saluran pernapasan. Saat memasuki saluran pernapasan manusia, virus influenza akan dihambat oleh sistem imun nonspesifik, virus akan diselubungi oleh lendir. Aktivitas enzim neuraminidase memungkinkan virus untuk melepaskan diri dari hambatan lapisan lendir pada saluran pernapasan dengan memutus ikatan sialoglikoprotein antara virus dan lendir, sehingga memungkinkan virus untuk mencapai sel-sel epitel target (Matrosovich, 2004). NA juga membantu penyebaran infeksi dari satu sel ke sel lain karena aktivitas enzim *receptor-destroying* NA pada protein viral permukaan sel menyebabkan virus baru terlepas dari ikatan pada permukaan sel terinfeksi sehingga dapat menginfeksi sel lainnya. Hal itu juga berguna untuk mencegah agregasi anakan virus, secara nyata agregasi tersebut menurunkan infektivitas virus (Palese dan Young, 1982). Selain itu, NA dapat mengaktifasi transformasi faktor pertumbuhan  $\beta$  dengan menghidrolisis asam sialat pada protein faktor pertumbuhan  $\beta$  yang inaktiv. Faktor pertumbuhan  $\beta$  yang aktif akan menginduksi apoptosis sel yang terinfeksi (Flint dkk, 2000).

Ada 8 asam amino pada neuraminidase yang berhubungan langsung dengan substrat (asam sialat) dan terlibat langsung dalam katalisis enzimatik, disebut residu katalitik (R-118, D-151, R-152, R-224, E-276, R-292, R-371, Y-406) dan 11 asam amino yang berperan pada stabilisasi struktur, mereka tidak membuat kontak langsung dengan substrat tetapi mendukung residu katalitik agar tetap di tempat untuk mengikat dan mengkatalis substrat, disebut residu *framework* (E-119, R-156, W-178, S-179, D-198, I-222, E-227, H-274, E-277, N-294, E-424) (gambar 4). Residu katalitik berupa kantung tempat terikatnya substrat yang bentuknya bervariasi bergantung strain virus. Kantung ini terletak di pusat pada sumbu baling baling keenam lembaran  $\beta$  di ujung N-terminal (Colman dkk, 1983).

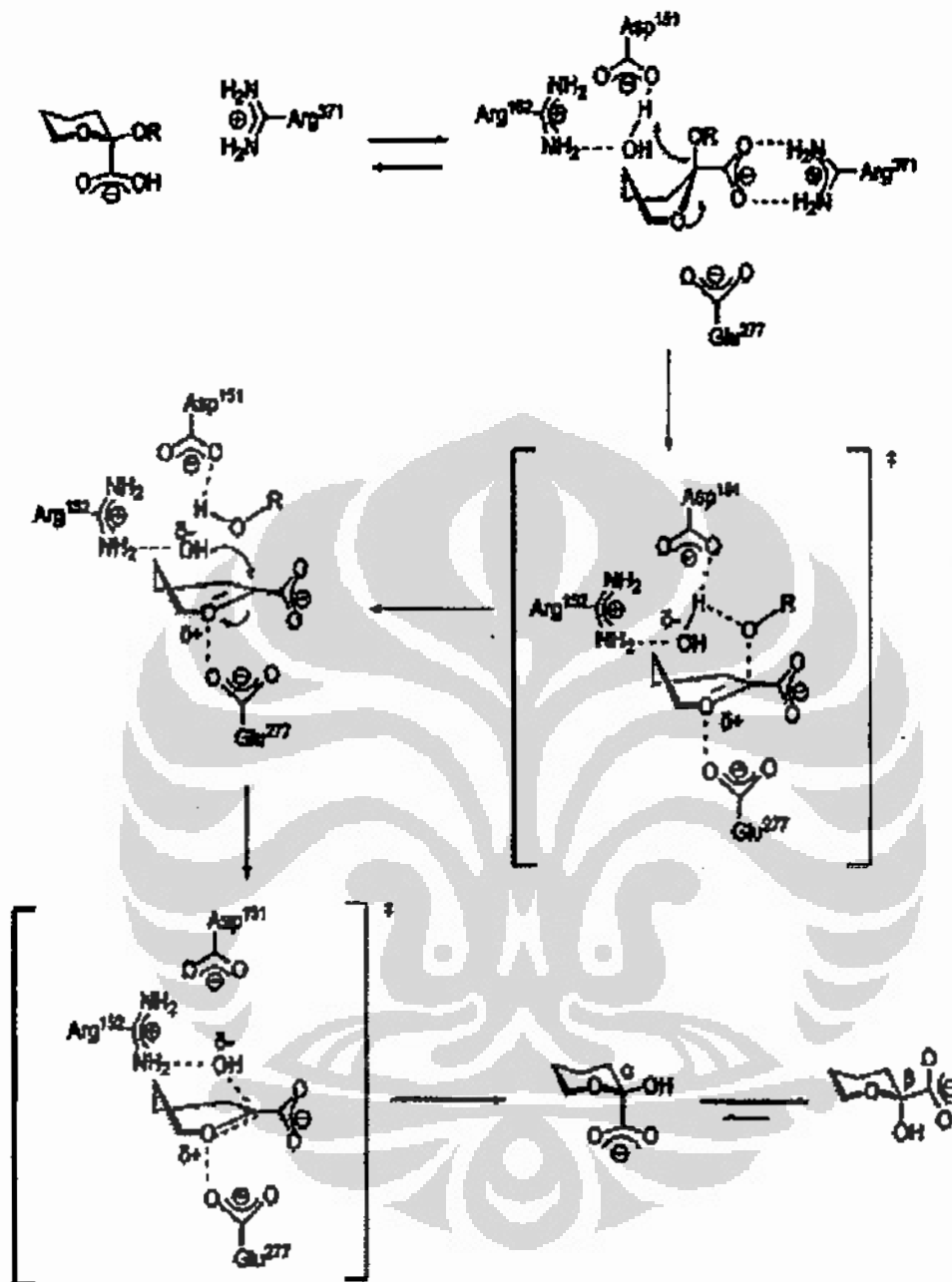


Gambar 4. Struktur situs aktif neuraminidase virus influenza A. Warna kuning merupakan residu katalitik, warna hijau merupakan substrat, warna merah merupakan residu *framework* (Colman dkk., 1993).

Proses katalisasi enzim NA pada hidrolisis asam sialat seperti pada gambar 5:

1. NA berikatan dengan asam sialat sehingga terjadi perubahan konformasi asam sialat
2. Pemindahan ion negatif (kation) dari karbon intermediate, sehingga berubah menjadi muatan positif
3. Perubahan konformasi dan pelepasan glikan
4. Melepas asam sialat, kemudian asam sialat berotasi dari bentuk  $\alpha$  menjadi bentuk  $\beta$





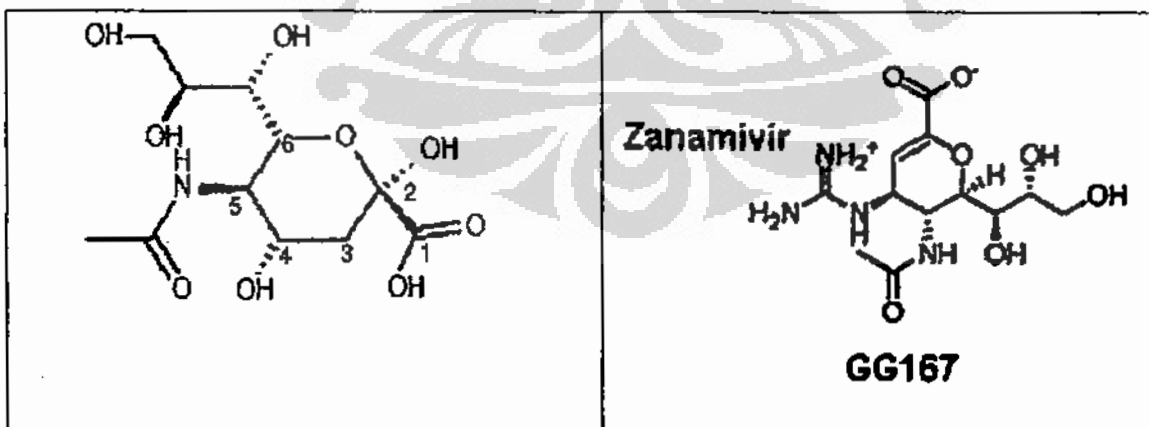
Gambar 5. Mekanisme katalisis enzim neuraminidase virus influenza  
(sumber: Itzstein, 2007)

#### 2.4. Anti Neuraminidase: Oseltamivir

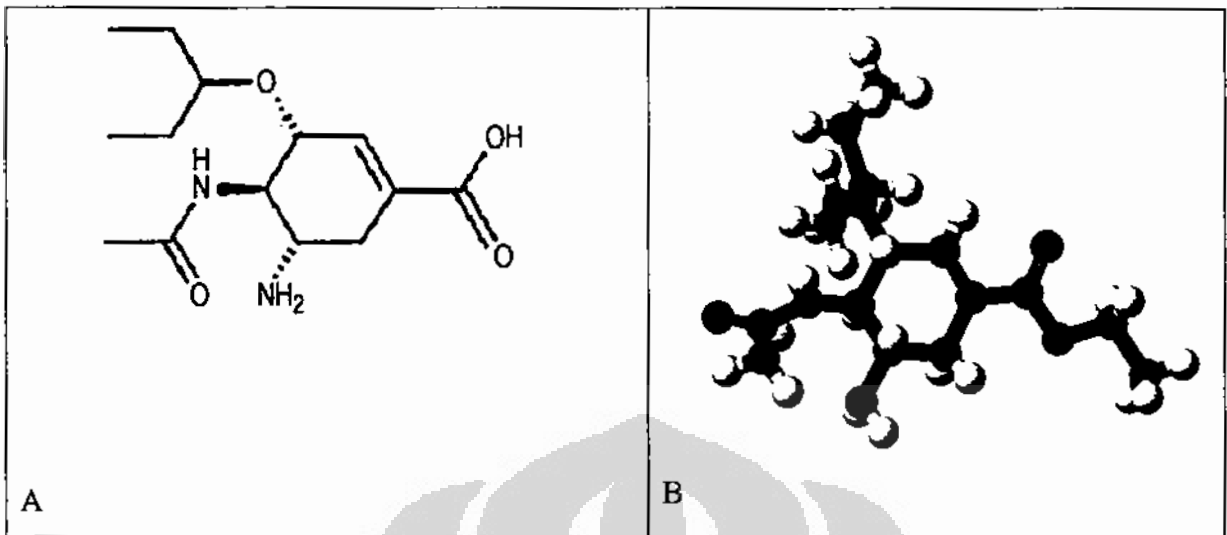
Karena peran NA yang penting dalam siklus hidup virus influenza, dan fakta bahwa situs aktif dari protein neuraminidase sangat mirip pada semua virus influenza,

maka protein neuraminidase dijadikan target untuk obat anti-influenza. Sejak tahun 1966 telah dicoba mencari inhibitor NA sebagai obat antivirus, berupa turunan dari analog asam sialat (gambar 6). Obat anti NA yang diizinkan oleh WHO untuk pengobatan influenza A dan B, yaitu zanamivir (Relenza<sup>®</sup>) dan oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>). Kedua anti NA itu dirancang berdasarkan pendekatan kemiripan struktur dengan asam sialat. Zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en) merupakan substitusi atom C posisi ke 4 dengan guanidin (gambar 6) sedangkan oseltamivir (gambar 7) merupakan turunan dari asam cyclohexene-carboxylic (4-N-acetyl-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid) (Colman, 1998). Inhibitor ini menghambat neuraminidase influenza A dan B untuk berikatan dan memecah residu asam sialat pada permukaan sel yang terinfeksi, yang mengakibatkan ketidakmampuan progeni virion untuk melepaskan diri dari sel inang (Ferraris dan Lina, 2008).

Zanamivir dipasarkan sebagai bubuk kering yang dikonsumsi secara inhalasi ke saluran pernapasan menggunakan inhaler. Hal ini membuat keterbatasan penggunaan zanamivir untuk anak-anak. Oleh sebab itu penggunaan oseltamivir lebih banyak daripada zanamivir (Moscana, 2005).

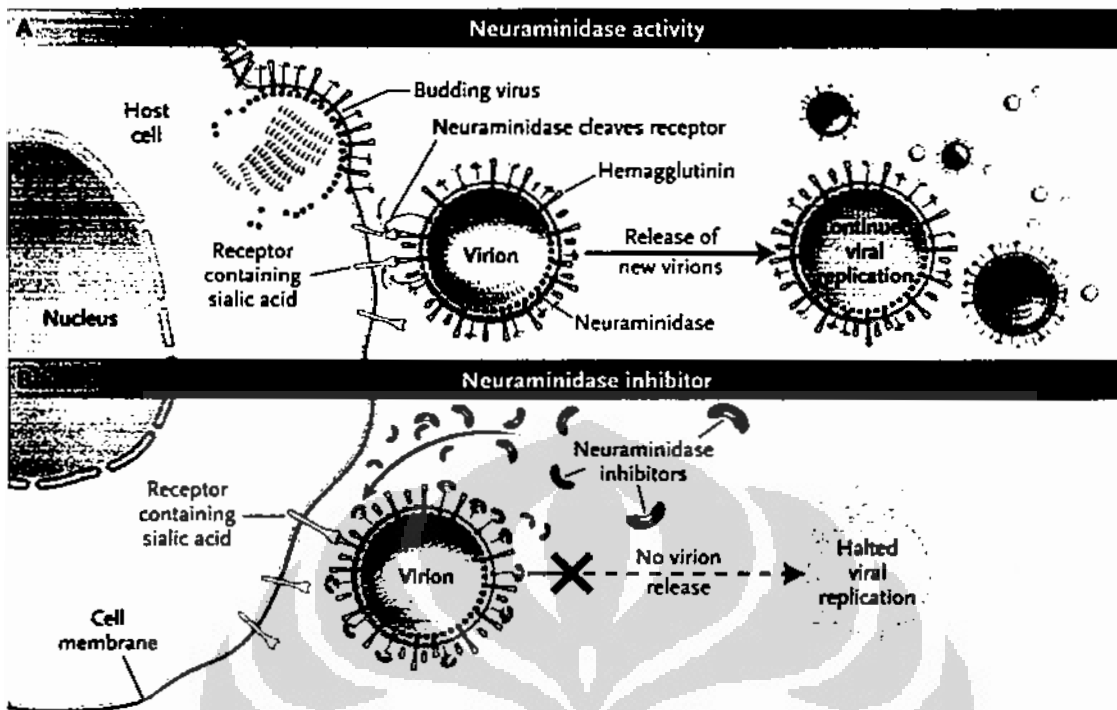


**Gambar 6. Struktur kimia Asam sialiat *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) (kiri) dan zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en) (kanan) (sumber: Colman, 2002)**



**Gambar 7. Struktur kimia (A) dan tiga dimensi (B) Oseltamivir karboksilat, GS4071, 4-*N*-acetyl-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid.**  
(sumber: Colman, 2002)

Oseltamivir adalah obat antivirus yang memperlambat penyebaran virus influenza dari satu sel ke sel lain di dalam tubuh dengan menghambat kemampuan enzim NA memotong ikatan kimia antara virus baru dengan sel inang. Obat ini menghambat proses hidrolisis asam sialat (gambar 8), terutama antara *N*-asetilase dan molekul karbohidrat. Penghambatan aktifitas neuramidase ini menghambat penetrasi virus melalui lendir dan mencegah pelepasan tunas virion dari permukaan sel terinfeksi (Tullu, 2009).



**Gambar 8. Mekanisme kerja Neuraminidase Inhibitor.**

Panel A menunjukkan peran neuraminidase untuk kelanjutan replikasi virus influenza pada infeksi berikutnya. Replikasi itu dihambat oleh neuraminidase inhibitor (Panel B), sehingga menghambat virion dilepaskan dari permukaan sel terinfeksi (Sumber: Moscona, 2005)

Osetamivir dijual dalam bentuk tidak aktif dengan nama dagang Tamiflu<sup>®</sup> berupa kapsul atau sirup yang dapat dikonsumsi secara oral. Osetamivir menjadi aktif dalam tubuh setelah melewati hati. Melalui proses hidrolisis ester di hati, osetamivir nonaktif berubah menjadi osetamivir karboksilat [ethyl-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate]. Metabolit aktif ini yang didistribusikan ke seluruh tubuh. Dalam waktu 30 menit, metabolit aktif dapat terdeteksi dalam plasma dan mencapai konsentrasi maksimum setelah 3-4 jam. Waktu paruh obat adalah 6-10 jam. Obat ini diekskresikan terutama melalui ginjal (Tullu, 2009).

Osetamivir diindikasikan untuk pengobatan dan pencegahan infeksi akibat virus influenza A dan B pada manusia yang berusia lebih dari satu tahun. Dosis dewasa yang biasa untuk pengobatan influenza adalah 75 mg dua kali sehari selama 5 hari, dimulai saat muncul gejala dengan penurunan dosis untuk anak-anak dan pasien dengan gangguan ginjal. Osetamivir dapat diberikan sebagai tindakan pencegahan baik selama terjadi wabah di komunitas atau mengalami kontak dekat dengan individu yang terinfeksi. Profilaksis yang telah terbukti aman dan efektif diberikan selama enam minggu dengan dosis standar 75 mg sekali sehari untuk pasien yang berusia 13 tahun atau lebih. Pentingnya perawatan dini adalah bahwa inhibisi protein NA lebih efektif dalam 48 jam pertama. Jika virus telah bereplikasi dan banyak sel terinfeksi, efektivitas obat ini akan menjadi sangat berkurang (Roche, 2008; CDC, 2009).

## **2.5. Mutasi Pada Gen NA Tipe 1 (N1) Yang Menyebabkan Resistensi Terhadap Osetamivir**

Karena virus influenza tidak mempunyai sistem *proofreading* maka replikasi RNA virus rawan kesalahan sehingga menyebabkan banyak terjadi mutasi, termasuk mutasi yang mengarah pada resistensi terhadap obat anti-virus. Penggunaan osetamivir sebagai obat anti influenza dapat menyeleksi mutasi pada virus influenza A (H1N1) yang menyebabkan resisten terhadap osetamivir dan mutan yang resisten itu dapat bertransmisi, sehingga timbullah virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap osetamivir (Tullu, 2009). Telah dilaporkan adanya beberapa mutasi pada gen yang menyandi protein N1 (H126N, S247N, S274G, dan H275Y) yang terkait dengan kurangnya kepekaan terhadap osetamivir (Ferraris dan Lina, 2008; Sheu, 2008). Penomoran asam amino mengikuti sistem penomoran protein N2 karena struktur 3 dimensi N2 yang pertama kali ditentukan. NA tipe N1 mempunyai tambahan asam amino sistein di posisi 146, sehingga posisi H274 pada N2 menjadi H275 pada N1 (Varghese dkk., 1983).

Program surveilan resistensi obat anti NA menemukan bahwa mutasi pada neuraminidase mempunyai pola spesifik terhadap subtype tertentu, di mana mutasi H275Y lebih banyak ditemui pada virus influenza A subtype N1 (Escuret dkk, 2008). Mutasi H275Y adalah mutasi substitusi yang menghasilkan perubahan asam amino urutan ke 275 pada protein neuraminidase N1 dimana histidin (CAT) berubah menjadi tirosin(TAT). Mutasi H275Y resisten terhadap oseltamivir namun masih sensitif terhadap zanamivir.

Sheu dkk. menetapkan 2 kriteria yang harus dipenuhi oleh isolat virus untuk dinyatakan resisten karena obat anti NA:

1. Memiliki nilai IC50 diatas nilai ambang batas yang ditentukan untuk setiap subtype dan obat.
2. Gen NA harus memiliki mutasi yang telah dinyatakan sebagai mutasi yang menyebabkan resistensi pada pasien yang diobati dengan anti NA (Sheu dkk., 2008).

## 2.6. Uji Kemiluminesen

Metode yang paling sederhana dan jelas untuk mengukur sensitivitas virus influenza terhadap neuraminidase inhibitor (NI) adalah dengan uji inhibisi enzim. Ada dua tes yang dapat digunakan untuk uji inhibisi enzim yaitu fluorometrik dan kemiluminesen. Kedua tes itu menggunakan substrat berbeda, yang paling banyak digunakan adalah substrat 20-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ DN-acetylneuraminic acid (Mun atau MUNANA). Degradasi MUNANA oleh neuraminidase menghasilkan methylumbelliferone yang berpendar. Dengan demikian jumlah fluoresensi berhubungan langsung dengan jumlah aktivitas enzim. Uji kedua menggunakan substrat 20-(4-NA-Star)- $\alpha$ DN-acetylneuraminic acid (NA-Star) yang dijual dalam bentuk kit khusus (Miller dkk., 2009). Ferraris dkk. dan Escuret dkk. menggunakan metode fluorometrik asay dengan (4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ DN-acetylneuraminic acid sebagai substrat. Mereka menggunakan *cutoff* IC50 lebih besar dari rata-rata IC50 + 2.5 standar deviasi (Ferraris dkk.,2005; Escuret dkk., 2008). Mishin dkk. Juga menggunakan teknik fluorometrik namun mereka menggunakan *cutoff* IC50  $\geq$  15 nM

atau peningkatan nilai IC50 minimal 8 kali IC50 kontrol sensitif dalam percobaan (Mishin dkk., 2005). Sheu dkk. lebih memilih kemiluminesen assay (1,2-dioxetane sebagai substrat) daripada fluorogenik (MUNANA sebagai substrat) untuk studi surveilan resistensi obat anti influenza karena linearitas dari sinyal dan sensitivitasnya yang tinggi dalam mengukur aktivitas NA dibandingkan dengan yang lain. Mereka menggunakan *cutoff* IC50 lebih besar dari rata-rata IC50 + 3 standar deviasi (SD) atau  $IC50 > Q3 + 3 IQR$ , untuk menyeleksi virus yang resisten (*outlier*) baik yang ekstrim atas atau bawah (Sheu dkk., 2008).

*NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit* dapat mengukur tingkat resistensi isolat virus influenza tipe A dan B terhadap inhibitor neuraminidase, baik virus yang menyerang manusia, unggas, babi dan kuda. Uji NA-Star kemiluminesen telah dibandingkan dengan tes fluoresensi MUNANA menggunakan isolat influenza subtipe A (H1N1), A H(3N2) dan tipe B, termasuk strain yang sensitif dan resisten terhadap NI. Tes kemiluminesen dengan substrat 1,2-dioxetane memberikan sensitivitas 50 kali lebih tinggi dengan sinyal 3-4 kali lebih linier daripada tes fluoresensi dengan substrat MUNANA. Reaksi kemiluminesen mengkonversi energi kimia menjadi energi cahaya, berupa emisi cahaya. Substrat NA-Star adalah 1,2-dioxetane yang memiliki struktur seperti asam sialat (Miller dkk. 2009).

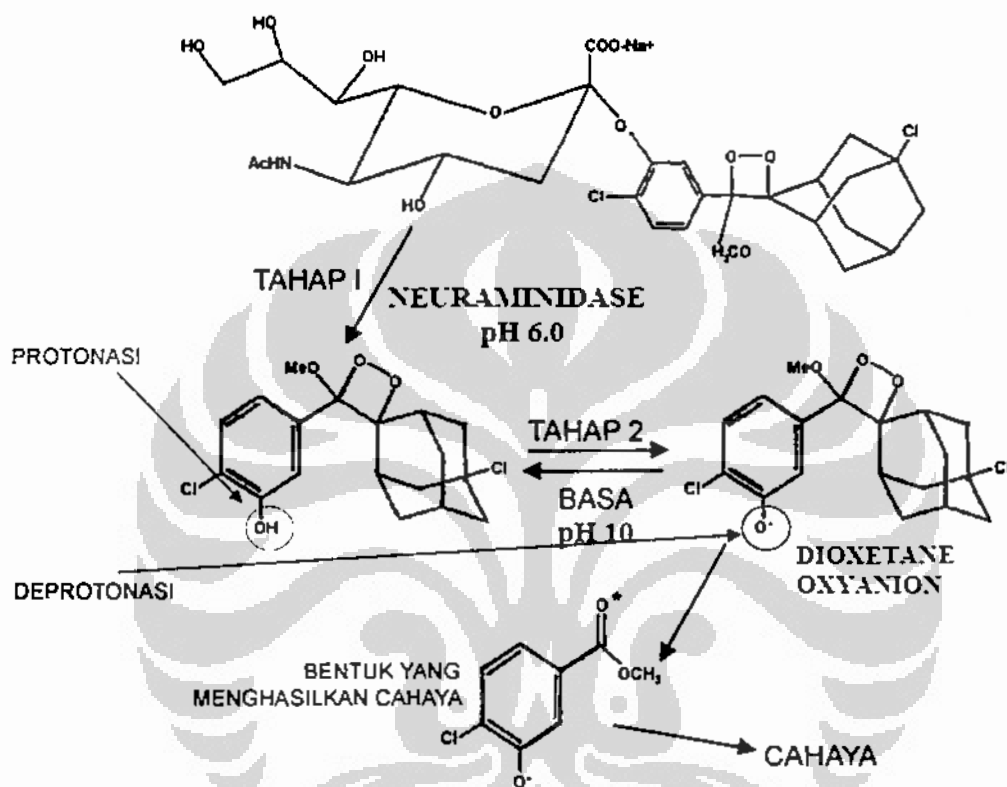
Untuk melakukan uji NA-Star, langkah pertama adalah menginkubasi pengenceran virus (dari supernatan kultur sel) dengan neuraminidase inhibitor. Kemudian ditambahkan substrat dan diinkubasi pada kondisi yang optimal untuk kerja neuraminidase, selama 30 menit akan terjadi degradasi substrat. Penambahan akselerator akan memicu emisi yang akan diukur menggunakan sebuah luminometer. Analisis data untuk menentukan nilai IC50 dari inhibitor neuraminidase masing-masing isolat virus dilakukan menggunakan kurva dosis respon non-linear dengan bantuan perangkat lunak (Miller dkk., 2009).

Mekanisme reaksi yang terjadi pada uji kemiluminesen (gambar 9) yaitu:

1. Substrat yang didegradasi oleh neuraminidase pada pH asam (pH 6) menghasilkan produk berupa dioxetane terprotonasi (dioxetane tidak bercahaya saat terprotonasi)

2. Penambahan akselerator menyebabkan perubahan pH menjadi basa (pH 10) sehingga terjadi deprotonasi dioxetane yang menghasilkan dioxetane oxyanion dan meningkatkan emisi cahaya

3. Dioxetane oxyanion menghasilkan produk yang melepaskan energi cahaya



Gambar 9. Mekanisme Reaksi Uji Kemiluminesen (anonin, Applied Biosystem)

## 2.7. Real-time Reverse Transcription PCR

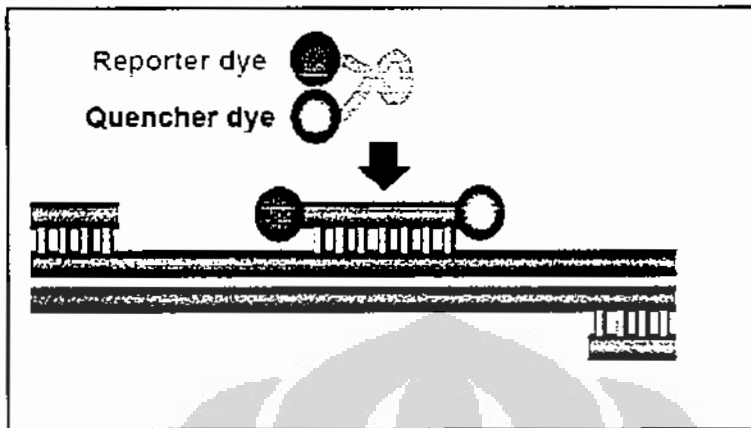
Teknik Real-time Reverse Transcription PCR (rRT-PCR) telah merevolusi bidang biologi molekular dan makin sering digunakan dalam tes diagnostik klinis. Teknik ini telah diterapkan untuk mendeteksi dengan cepat adanya mutasi titik, varian resisten obat dan genotip beberapa virus. Keunggulan dalam hal sensitivitas, spesifisitas, rendah resiko kontaminasi, dan kecepatan uji telah membuat teknik ini menjadi metode alternatif untuk mendiagnosis penyakit infeksi selain dengan kultur sel atau pengujian berbasis immunoassay. Metode rRT-PCR merupakan teknik yang



paling akurat untuk mendeteksi *viral load* dan memantau hasil terapi (Manojkumar dan Mrudula, 2006).

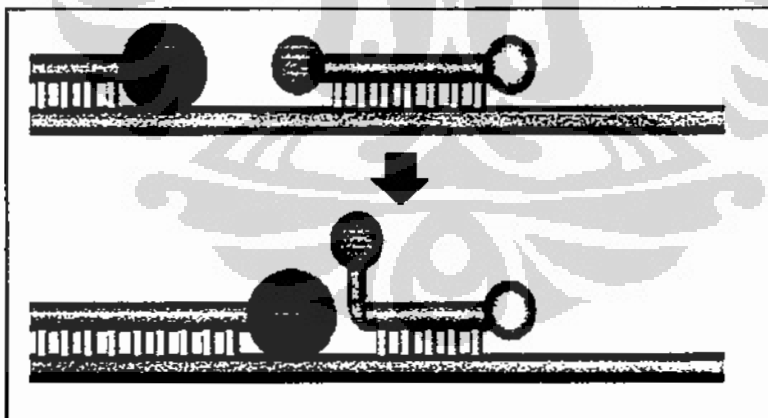
Metode yang biasa digunakan untuk mendeteksi mutasi H275Y adalah dengan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) diikuti sekuensing nukleotida. Meski akurat, metode ini memiliki keterbatasan dari segi waktu, tenaga kerja dan mahal. Karena itu, Carr dkk. mengembangkan teknik real time RT-PCR (rRT-PCR) yang dapat dengan cepat (2 jam) mendeteksi mutasi ini pada gen N1 virus influenza manusia tipe A dan tidak memerlukan penggunaan virus isolasi. Chutinimitkul dkk. melakukan pendekatan yang sama untuk mendeteksi mutasi H274Y pada virus flu burung H5N1 berbagai spesies (burung, kucing, anjing, harimau, babi dan manusia) dari berbagai spesimen (Chutinimitkul dkk., 2007). Namun ada sedikit homologi urutan basa gen N1 antara burung dan manusia. AD RT-PCR assay yang diperkenalkan oleh Carr dkk. benar-benar khusus untuk influenza manusia A (H1N1). Sensitivitas tes ini mencapai 10 kopi per reaksi dan mampu mendeteksi mutasi resistensi antivirus pada campuran wild type H275 dan mutan H275Y. Teknik ini menggunakan dua probe berbeda yang dilabel fluoresen untuk membedakan polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) di posisi 823 (C atau T). Probe untuk virus yang sensitif oseltamivir dilabel dengan VIC dan probe untuk virus yang resisten oseltamivir dilabel dengan FAM. Fluoresensi yang ditimbulkan akan dideteksi oleh mesin Real Time PCR. Rata-rata Ct *value* replikasi berkisar antara 26,5-37,8 untuk wildtype dan 30,4-37,2 untuk mutan yang resisten terhadap oseltamivir (Carr dkk., 2008).

Dalam proses rRT-PCR probe TaqMan ditambahkan ke campuran reagen PCR master. Sekuen probe dirancang agar menempel pada urutan basa tertentu sehingga terletak antara primer *forward* dan *reverse* (gambar 10).

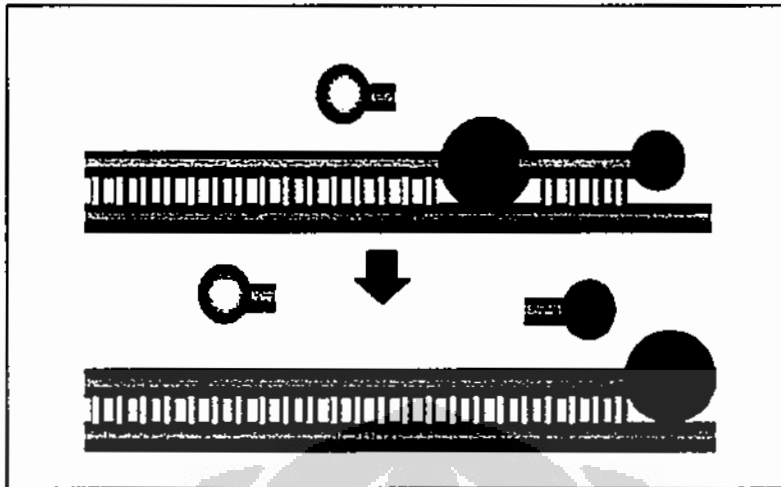


Gambar 10. Probe terletak antara primer *forward* dan *reverse* (sumber: anonim, Applied Biosystem).

Probe akan terletak di jalur enzim polimerase yang mengkopi DNA atau cDNA. Ketika enzim mencapai probe yang telah menempel, aktivitas enzim 5' exonuclease akan memotong probe (gambar 11 dan 12).

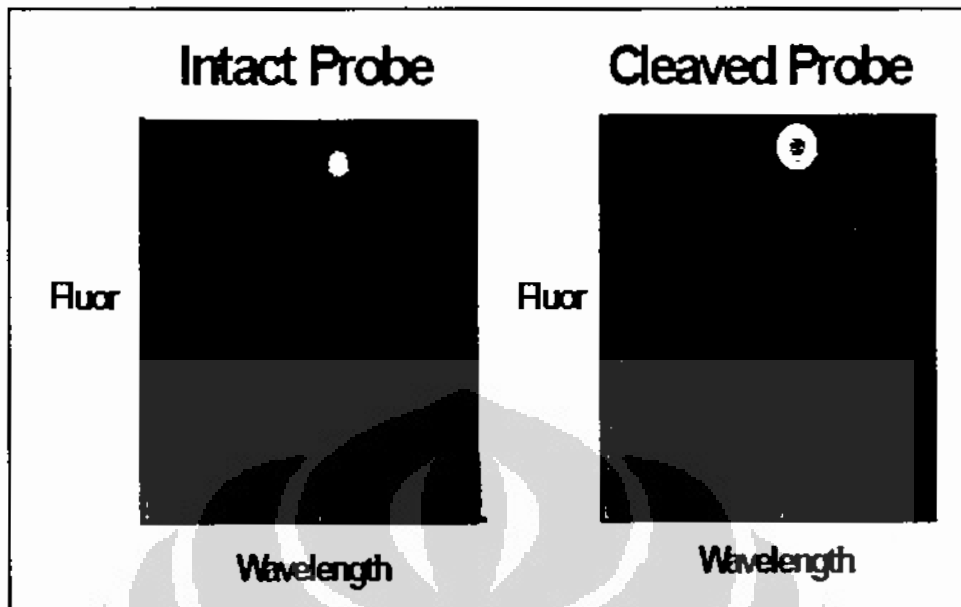


Gambar 11. Enzim polimerase mencapai probe. (sumber: anonim, Applied Biosystem).



Gambar 12. Aktivitas 5' exonuklease memotong probe sehingga *reporter* dan *quencher* terpisah (sumber: anonim, Applied Biosystem).

Probe TaqMan dirancang dengan pewarna berenergi tinggi yang disebut *reporter* pada ujung 5', dan molekul berenergi rendah disebut *quencher* pada ujung 3'. Dalam keadaan utuh, probe senang dengan sumber cahaya, letak *reporter* dan *quencher* yang berdekatan menyebabkan emisi *Reporter* ditekan oleh *quencher*. *Florescent Resonance Energy Transfer* (FRET) yaitu teknologi transfer energi resonansi fluoresen. Teknologi ini yang dimanfaatkan pada proses pemotongan probe oleh 5' nuklease. Prinsipnya adalah bahwa ketika pewarna energi tinggi dekat dengan pewarna rendah energi, akan ada transfer energi dari tinggi ke rendah. Bila probe dipotong oleh aktivitas enzim 5' nuklease, maka jarak antara *reporter* dan *quencher* menjadi jauh, menyebabkan transfer energi berhenti. Emisi fluoresen *reporter* akan meningkat dan peredaman oleh *quencher* menurun (gambar 13). Peningkatan sinyal *reporter* akan ditangkap oleh pendeteksi instrumen dan ditampilkan oleh perangkat lunak. Jumlah kenaikan sinyal *reporter* sebanding dengan jumlah produk yang diproduksi oleh sampel yang diuji (anonim, Applied Biosystem).



Gambar 13. Aliran energi dari *reporter* ke *quencher*

Saat probe utuh, energi fluoresen *reporter* dialirkan ke *quencher* (kiri). Saat probe terpotong dan jarak *reporter* dan *quencher* semakin jauh, aliran energi dari *reporter* terhenti (kanan) (sumber: anonim, Applied Biosystem).

Selain menggunakan teknik realtime PCR, mutasi H275Y juga dapat dideteksi menggunakan teknik RT-PCR/Restriction fragment length polymorphism (RFLP) seperti yang dirancang oleh Guo dkk. Primer *reverse* yang digunakan pada proses RT-PCR akan menghasilkan situs restriksi untuk enzim BspHI sehingga rantai DNA hasil RT-PCR dapat dipotong menggunakan enzim tersebut (Guo dkk., 2009). Dibandingkan dengan teknik RT-PCR/RFLP, teknik rRT-PCR lebih simpel karena tidak memerlukan tahap pemotongan dengan enzim restriksi dan tahap elektroforesis.

## 2.8. Sekuensing

DNA sekuensing merupakan suatu teknik untuk membaca urutan basa dari fragmen DNA tertentu. Untuk membaca urutan basa dibutuhkan DNA untai tunggal sebagai cetakan, primer yang akan berkomplementasi dengan ujung 3' DNA cetakan, dNTP yang salah satunya dilabel dengan radioaktif dan ddNTP. Fungsi ddNTP adalah sebagai penghenti polimerisasi rantai DNA pada empat nukleotida yang berbeda. Penghentian polimerisasi terjadi jika ddNTP berikatan dengan ujung 3' DNA nascent karena ddNTP tidak mempunyai gugus hidroksil di ujung 3' (Owen, 1984).

Hingga kini dikenal dua macam metode sekuensing DNA, yaitu metode sekuensing Maxam-Gilbert dan metode sekuensing dideoksi Sanger. Metode sekuensing Maxam-Gilbert menggunakan pemutusan secara kimiawi sebagai prinsip dasar dari reaksi sekuensing DNA, sedangkan prinsip dasar dari metode sekuensing dideoksi menurut Sanger adalah penggunaan dideoksinukleotida untuk menghentikan elongasi untai DNA (Hillis dkk., 1996).

Metode sekuensing Maxam-Gilbert menggunakan modifikasi reagen kimia untuk memutuskan reaksi secara spesifik. Sebagai langkah awal, untai tunggal dari DNA target dilabel dengan radioaktif  $^{32}\text{P}$ , kemudian dipisahkan menjadi empat macam sampel. Pada sampel pertama ditambahkan dimetil sulfat dan piperidin yang menghambat proses metilasi guanin, sehingga reaksi sekuensing terputus pada posisi guanin. Pada sampel kedua ditambahkan asam format dan piperidin yang merusak cincin nitrogen pada purin, sehingga reaksi terhenti pada posisi adenin dan guanin. Pada sampel ketiga ditambahkan hidrazin dan piperidin, sehingga reaksi terhenti pada posisi timin dan sitosin. Sampel keempat ditambahkan hidrazin, NaCl, dan piperidin, sehingga reaksi terhenti pada sitosin (Hillis dkk., 1996).

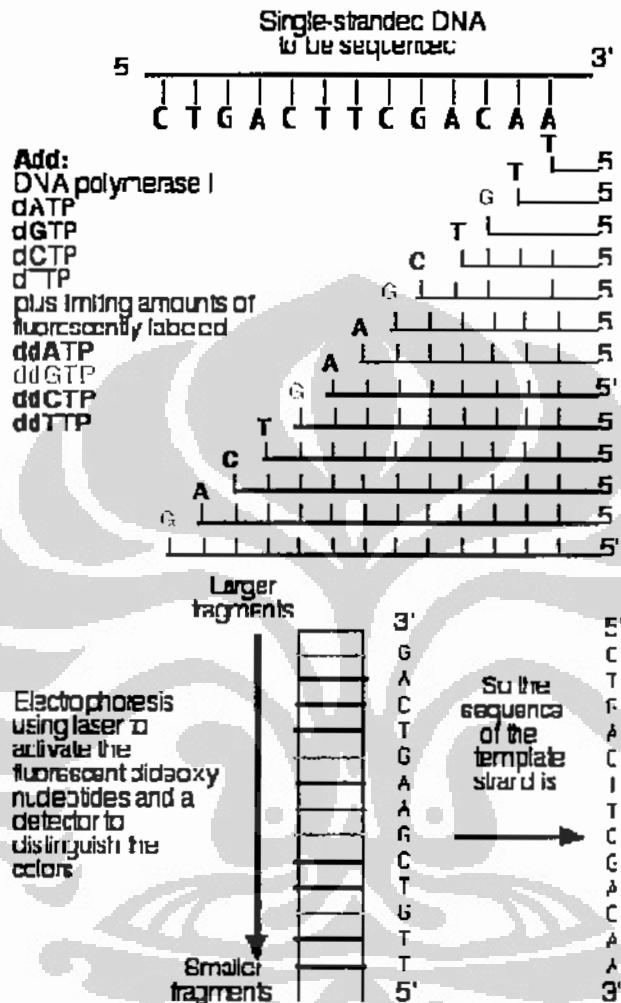
Metode sekuensing dideoksi Sanger menggunakan inhibitor elongasi untai DNA sebagai dasar dari reaksi sekuensing. Inhibitor tersebut adalah senyawa 2',3'-dideoksiadenosin trifosfat (ddATP), 2',3'-dideoksiguanosin trifosfat (ddGTP), 2',3'-dideoksisitidin trifosfat (ddCTP), dan 2',3'-dideoksitimidin trifosfat (ddTTP). Tahap

awal dari reaksi dimulai dengan denaturasi untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA. Proses *annealing* selanjutnya dilakukan dengan primer oligonukleotida dan sampel dibagi menjadi empat macam reaksi. Tiap reaksi dimasukkan empat macam deoksinukleosida trifosfat (dNTP) dan satu macam dideoksinukleosida trifosfat (ddNTP). Untuk mendeteksi tiap fragmen yang terbentuk dari reaksi, salah satu dNTP dilabel dengan zat radioaktif. Proses polimerisasi fragmen DNA dilakukan menggunakan enzim DNA polimerase. Fragmen yang terbentuk pada tiap reaksi dipisahkan melalui elektroforesis menggunakan gel poliakrilamida dan divisualisasi dengan autoradiografi (Howe & Ward, 1991).

Metode sekuensing Sanger dideoksi memiliki keunggulan lebih dibandingkan dengan metode sekuensing Maxam-Gilbert. Metode sekuensing Sanger dapat digunakan untuk sekuensing DNA dan RNA, sedangkan metode sekuensing Maxam-Gilbert hanya dapat digunakan untuk sekuensing DNA saja. Selain itu, metode sekuensing dideoksi Sanger mampu membaca tiap nukleotida pada fragmen dengan tepat. Sementara metode sekuensing Maxam-Gilbert tidak dapat menentukan nukleotida yang tepat untuk beberapa fragmen. Misalnya reagen asam format dan piperidin serta reagen hidrazin dan piperidin menghasilkan dua macam fragmen, sehingga sulit untuk menentukan jenis nukleotidanya (Hillis dkk., 1996).

DNA sekuenser mendeteksi fluoresen dari 4 warna yang berbeda yang digunakan untuk mengidentifikasi reaksi ekstensi A, G, C, dan T. Dengan pelabelan warna terminator, setiap 4 dideoxy terminators (ddNTP) diberi tanda dengan pewarna fluoresen yang berbeda. Oleh karena itu rantai yang sedang tumbuh diakhiri secara bersamaan dan dilabel dengan pewarna yang berhubungan dengan basa itu. Fragmen yang dilabel dengan fluoresen yang bermigrasi melalui gel, akan melewati sinar laser pada dasar gel. Setiap warna memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang berbeda ketika tereksitasi oleh sinar laser dan sinar laser mengeksitasi molekul fluoresen yang mengirimkan cahaya, yang mengirim keluar cahaya dari panjang gelombang yang jelas berbeda dikumpulkan dan difokuskan oleh lensa-lensa menuju spektograf. Berdasarkan panjang gelombang, spektograf memisahkan cahaya melalui

kamera CCD (*Charge Coupled Device*) sehingga menghasilkan sebuah printout dari suatu sekuens seperti pada gambar 14.



Gambar 14. Hasil Sekuensing Otomatis

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini dilakukan analisis genetika dan aktivitas neuraminidase virus influenza A (H1N1) yang terdistribusi di Indonesia sejak 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008. Metode yang digunakan adalah metode virologi dan biologi molekuler. Metode virologi dalam penelitian ini meliputi pengukuran titer virus dan uji *in vitro* sensitivitas oseltamivir. Metode biologi molekuler pada penelitian ini adalah realtime RT-PCR, sekuensing fragmen gen NA serta analisis bioinformatika termasuk prediksi struktur tiga dimensi protein NA. Penelitian dilakukan di laboratorium virologi, NAMRU 2 jalan percetakan negara no 23 Jakarta Pusat dan laboratorium Eijkman jalan Diponegoro no 68 Jakarta Pusat. Penelitian dibiayai oleh Departemen *Viral Disease Program*, NAMRU 2 Jakarta.

#### 3.1. Pemilihan dan Pengumpulan Sampel

Virus influenza A (H1N1) yang digunakan berupa isolat dari kultur sel Madin-Darby canine kidney (MDCK) dari sampel usap hidung dan tenggorok pasien pada surveilan influenza di Indonesia sejak 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008. Sampel dikumpulkan dari 17 rumah sakit, 8 puskesmas dan 1 klinik pabrik yang berlokasi di 16 kota di seluruh Indonesia. Tipe dan sub tipe virus ditentukan dengan teknik RT-PCR, IFA, dan penghambatan HA menggunakan monoklonal antibody dan antiserum referensi yang diperoleh dari *US Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Dari 258 isolat influenza A (H1N1) yang tersedia, dipilih berdasarkan stratifikasi acak (pengambilan minimal 25%) agar sampel dapat mewakili strain, waktu dan lokasi. Waktu dibagi ke dalam musim hujan (Oktober sampai Maret) dan musim kemarau (April sampai September). Enam belas kota besar dikelompokkan menjadi 6 kelompok berdasarkan lokasi geografis:

1. Sumatera: Medan, Padang, Palembang



2. Jawa (Jawa Barat: Bandung, Jakarta, Tangerang; Jawa Tengah: Yogyakarta; Jawa Timur: Jember)
3. Bali, Mataram dan Kupang
4. Kalimantan: Pontianak dan Balikpapan
5. Sulawesi: Manado dan Makassar
6. Ambon, Timika dan Jayapura

Seratus enam isolat influenza A (H1N1) yang terpilih, terdiri dari 91 strain virus New Caledonia dan 15 virus strain Kepulauan Salomon. Keterangan lengkap mengenai semua isolat tersebut dapat dilihat pada tabel 11 di lampiran 1.

### 3.2. Strategi Eksperimen

NA inhibitor assay (NAI), realtime RT-PCR (rRT-PCR), dan sekuensing digunakan dalam studi ini. Semua isolat virus influenza A (H1N1) dicek apakah memiliki mutasi H275Y menggunakan realtime RT-PCR (Carr dkk., 2008). Uji ini memungkinkan untuk deteksi mutasi H275Y dengan cepat. Dalam pengujian ini, dua probe berbeda yang dilabel fluoresen digunakan untuk membedakan antara polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) di posisi 823 (C atau T) yang mengindikasikan baik kepekaan atau resistensi terhadap oseltamivir.

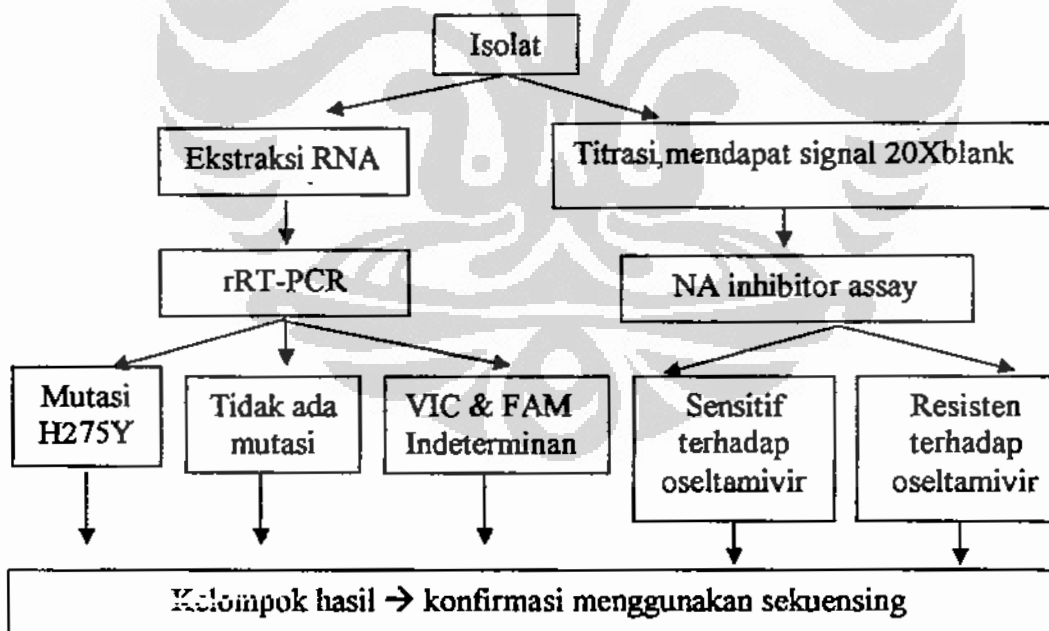
Tes kemiluminesen NA inhibisi (NAI) (menggunkan 1,2-dioxetane sebagai substrat) memiliki linearitas sinyal dan sensitivitas yang tinggi dalam mengukur aktivitas NA. Semua isolat diuji dengan menggunakan assay ini menggunakan *cutoff* IC50 (konsentrasi obat yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim) lebih besar dari  $3 + 3X$  selisih kuartil (IQR) untuk memilih *outlier* dari virus yang sensitif.

Uji rRT-PCR akan memberikan hasil adanya isolat yang memiliki mutasi H275Y, isolat yang tidak memiliki mutasi, dan hasil yang tidak dapat ditentukan (indeterminan). NAI assay akan memberikan hasil fenotipe resisten dan sensitif.

Dengan kedua teknik ini akan didapatkan 5 kriteria hasil yang dari masing-masing dilakukan tes sekuensing DNA lebih lanjut, yaitu:

- Perwakilan dari isolat dengan mutasi H275Y dan fenotip resisten terhadap oseltamivir.
- Semua isolat dengan mutasi H275Y tapi fenotip sensitif terhadap oseltaamivir.
- Semua isolat yang tidak memiliki mutasi H275Y tapi fenotip resisten terhadap oseltamivir.
- Perwakilan isolat tanpa mutasi H275Y dan fenotip sensitif terhadap oseltamivir.
- Semua isolat dengan fenotipe tidak pasti.

Rancangan alur penelitian:



Tabel 1. Kelompok Hasil dari Uji NAI dan rRT-PCR untuk sekuensing

Kelompok hasil	Mutasi H275Y	IC50 > Q3 + 3 IQR	Sekuensing DNA
1	ada	ya	Untuk konfirmasi apakah hanya ada mutasi H275Y
2	ada	tidak	Untuk memastikan apakah mutasi H275Y benar-benar ada
3	tidak ada	ya	Untuk menentukan mutasi lainnya
4	tidak ada	tidak	Untuk konfirmasi tidak ada mutasi H275Y atau ada mutasi lain yang tidak menyebabkan resistensi
5	Tidak terdeteksi	ya / tidak	Untuk menentukan apakah mutasi H275Y ada dan mengapa assay tidak mendeteksi H275Y

### 3.3 Alat, Bahan dan Cara Kerja

#### 3.3.1. Uji Neuraminidase Inhibitor (NAI)

Anti Neuraminidase: Oseltamivir karboksilat (metabolit aktif dari prodrug oseltamivir) diperoleh dari Hoffman-La Roche (selanjutnya akan disebut oseltamivir saja, untuk kesederhanaan dari nama lengkap, oseltamivir karboksilat).

NAI kemiluminesen assay dilakukan dengan menggunakan kit yang tersedia secara komersial, NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), yang terdiri dari NA-Star buffer (26 mM asam morpholineethansulfonik, 4 mM CaCl<sub>2</sub> [pH 6,0]), NA-Star substrat, NA-Star akselerator, dan plat 96-sumur berwarna putih solid. Pengenceran setengah-log 10 NA inhibitor (0.03 hingga 1.000 nM) dibuat menggunakan NA-Star buffer dan dapat

disimpan pada kulkas 4°C selama maksimum 2 minggu. Sebagai kontrol digunakan enzim neuraminidase (New England Biolabs). Pengujian dilakukan menurut protokol yang direkomendasikan oleh pabrik. Aktivitas NA virus (titer NA) ditentukan sebelum NAI assay dilakukan, dengan cara menguji pengenceran serial virus. Virus diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi akhir yang memiliki sinyal 20 kali sinyal blank. Dua puluh lima mikro liter dari masing-masing pengenceran NA inhibitor ditambahkan ke masing-masing sumur pada plat NA-Star *detection microplate* (Applied Biosystem), yang kemudian ditambahkan 25 ul dari masing-masing pengenceran virus menggunakan pipet multi *channel*. Plat berisi virus dengan obat akan diinkubasi dalam inkubator (Napco) pada suhu 37°C selama 20 menit. Sepuluh mikro liter dari 10 mM NA-Star substrat, yang sudah diencerkan 1:1.000 dalam NA-Star assay bufer (konsentrasi akhir 0,01 mM), ditambahkan ke masing-masing sumur menggunakan pipetor (Pipetman), kemudian plat akan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit tanpa pengocokan. Enam puluh mikro liter NA-Star akselerator disemprotkan ke dalam tiap sumur-sumur dalam plat, pendaran cahaya akan segera dibaca selama 0,5 detik pada tiap titik. Luminesen diukur dengan menggunakan Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) *reader* yang dilengkapi dengan alat injeksi otomatis untuk akselerator. Sebagai kontrol digunakan referensi virus yang sensitif oseltamivir (A/Massachusetts/06/2006 H1N1) dan resisten oseltamivir (A/Massachusetts/05/2007 H1N1) dari US CDC, Atlanta.

#### 3.3.1.1. IC50 analisis.

Nilai IC50 (konsentrasi obat yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas enzim sebesar 50%) ditentukan menggunakan kurva fit dengan menggunakan komputer dengan perangkat lunak Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) dan GraphPad Prism 5.

### 3.3.1.2. Analisis data.

Persentase isolat virus influenza A (H1N1) yang resisten dan yang memiliki mutasi H275Y ditentukan. Kerentanan Enzim terhadap oseltamivir (IC50) dianalisis menggunakan Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) dan GraphPad Prism 5. Nilai rata rata dan SD IC50 (jika distribusi data normal) atau nilai Q3 dan IQR (jika distribusi data tidak normal) ditentukan dan dianalisis secara kumulatif selama dua musim, dari 2007 sampai 2008. Persentase mutasi dan resistensi virus dalam 6 wilayah dan 2 musim dibandingkan. Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program stata dan SPSS. Nilai  $P < 0,05$  digunakan sebagai signifikan secara statistik

### 3.3.2. Realtime RT-PCR (rRT-PCR)

#### 3.3.2.1. Ekstraksi RNA Virus

RNA di ekstrak dari isolat virus dalam biosafety kabinet kelas II (NUAIRE tipe A/B3). Ekstraksi RNA virus dilakukan dengan menggunakan QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Crawley Inggris, cat.no#52906). Sebanyak 560 ul bufer AVL (AVL mengandung RNA *carrier* dengan konsentrasi ahir 1 ug/ul) diambil dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml. Setelah itu ditambahkan 140 ul kultur virus dan dicampur menggunakan vortek (Genie 2) selama lima belas detik dan di inkubasi selama 10-15 menit pada temperatur ruang. Setelah inkubasi, larutan sampel tersebut disentrifugasi selama 5 detik kemudian ditambahkan etanol absolut (MERCK, cat.no#UN 1170) sebanyak 560 ul dan divortex selama 15 detik, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 5 detik. Sebanyak 630 ul larutan tersebut dimasukkan ke dalam kolom QIAamp dan disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya kolom diletakkan ke dalam tabung penampung yang baru dan ditambahkan 500 ul bufer AW1 ke dalam kolom dan disentrifugasi selama 1 menit. Selanjutnya kolom diletakkan ke dalam tabung penampung yang baru dan ditambahkan 500

ul bufer AW2 ke dalam kolom dan disentrifugasi 14000 rpm selama 3 menit. Kolom diletakkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml baru dan ditambahkan 60 ul bufer AVE serta diinkubasi pada temperatur ruang selama 1 menit dan kemudian disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Elutan RNA disimpan dalam freezer pada temperatur -20°C jika tidak langsung diuji .

### 3.3.2.2. Realtime Reverse Transcription PCR (rRT-PCR)

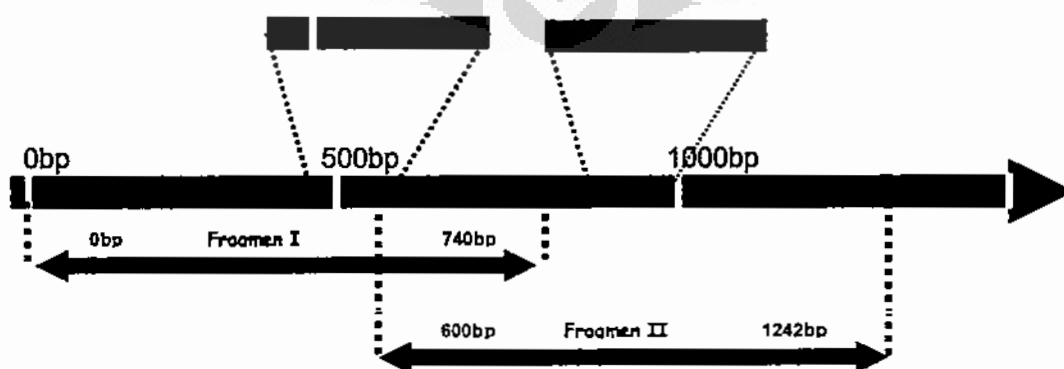
Uji realtime Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR) menggunakan Probe Taqman dilakukan dengan cara menambahkan 4 ul elutan RNA kedalam tabung PCR microAmp (Applied Biosystem) berisi total volume reaksi 20 ul Superscript III Platinum one-step qRT-PCR System (Invitrogen) menggunakan mesin realtime PCR Applied Biosystems 7.900 SDS dengan kondisi sebagai berikut: 50°C selama 15 menit, 40 siklus pada kondisi 95°C selama 15 detik dan 60°C selama 2 menit. Akuisisi data dilakukan di kedua filter FAM (530 nm) dan VIC (560 nm) selama fase annealing atau ekstensi. Primer oligonukleotida (konsentrasi akhir 900 uM; Applied Biosystems) yang digunakan untuk rRT-PCR adalah sebagai berikut: FluAN1-H275F 5 '-CCGCCTCGTACAAAATCTTCAAGA-3' (sense); FluAN1-H275R 5 'CAGTGTCTGGGTAACAGGAACATT-3' (anti-sense) yang menghasilkan fragmen DNA sepanjang 108 pb. Konsentrasi akhir masing-masing probe alel spesifik yang digunakan adalah 200 uM dengan pewarna *reporter* (VIC atau FAM) pada ujung 5' dan *minor groove binding non-fluorescent quenchers* (MGBNFQ) pada ujung 3': FluAN1-H275 VIC-5 '-CTCATAAT G AAAATTGMGBNFQ (probe untuk sensitif oseltamivir) dan FluAN1 - H275Y FAM-5 '-CCTCATAAT A AAAATTG-MGBNFQ (probe untuk resistansi oseltamivir). Rata-rata nilai CT diharapkan dalam kisaran 26,5-37,8 untuk wildtype dan 30,4-37,2 untuk mutan yang resisten oseltamivir. Sebagai kontrol digunakan virus referensi yang sensitif terhadap oseltamivir (A H1N1/Massachusetts/06/2006) dan resisten terhadap oseltamivir (A H1N1/Massachusetts/05/2007) yang diperoleh dari US CDC, Atlanta.

### 3.3.3. Sekuensing nukleotida.

Sampel RNA diubah menjadi cDNA dengan teknik Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) menggunakan kit Superscript III one step RT-PCR system (Invitrogen) sebanyak 25 ul/reaksi. Setiap reaksi terdiri dari larutan 2x reaction mix sebanyak 12,5 ul, kemudian ditambahkan sebanyak 0.5 ul untuk masing-masing primer *reverse* dan *forward* dengan konsentrasi 10 uM/ul, cetakan RNA sebanyak 5 ul, RNaseout sebanyak 0,5 ul, enzim Taq/RT sebanyak 0,5 ul dan *RNasefree water* sebanyak 5,5 ul. Gen neuraminidase dibagi menjadi 2 fragmen (gambar 15), di amplifikasi menggunakan primer yang ditandai dengan M13 seperti yang tercantum dalam tabel 2.

Tabel 2. Sekuen Primer sekuensing Gen NA tipe 1 virus influenza A (H1N1)

Segmen Gen	Nama Primer	5' → 3'
Fragmen 1		Basa 0-740 = 740 pb
1F	N1_N2_0_M13_F	TGTA AAAACGACGGCCAGTAGCAA AAGCAGGAGT
2R	N1_740_M13_R	CAGGAAACAGCTATGACCGGRCCATCGGTCATTATG
Fragmen 2		Basa 600-1242 = 643 pb
3F	N1_600_M13_F	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGAATTCYGGTCCAG
4R	N1_1242_M13_R	CAGGAAACAGCTATGACCCCTGTTAACTCAGGATGTTG



Gambar 15. Strategi amplifikasi gen Neuraminidase tipe 1 (N1)

RT-PCR dilakukan menggunakan mesin PCR (Applied Biosystem tipe 9600/9700) dengan kondisi sebagai berikut:

1. Tahan pada 48 ° C: 45 menit
2. Tahan pada 94 ° C: 2 menit
3. 30 siklus dari:

94 ° C selama 15 detik

55 ° C selama 30 detik

68 ° C selama 45 detik

4. Tahan pada 68 ° C: 7 menit
5. 4 ° C ~ (selamanya)

### 3.3.3.1. Elektroforesis

Amplikon dielektroforesis pada agarosa gel 2% (AMRESCO cat.no#0710-500G) dengan pewarna etidium bromida (Sigma, cat.no#E 1510), gel diletakkan dalam bak elektroforesis (Bio Rad Sub-Cell model 192) direndam dalam bufer TBE hingga sekitar 1 mm di atas permukaan gel. Kemudian sebanyak 2 ul loading dye bufer (Invitrogen) diletakkan di atas parafilm. Selanjutnya kedalam loading dye bufer ditambahkan sampel (hasil RT-PCR) sebanyak 4-5 ul dan disuspensikan hingga merata. Larutan sampel dan *loading dye* bufer yang telah tercapur merata dimasukkan dalam sumur yang terdapat pada gel sesuai dengan nomor sampel. Salah satu sumur kosong diisi dengan penanda/marka DNA yang telah diketahui ukurannya (dalam penelitian ini digunakan  $\Phi$ X174 yang dipotong dengan *HaeIII*). Bak elektroforesis kemudian ditutup, dihubungkan dengan power supply (Bio-Rad model 200/2.0 atau 3000Xi) dan diatur arus listriknya sebesar 150 volt selama 1 jam. Setelah elektroforesis selesai, arus listrik dimatikan dan baki elektroforesis diambil dengan



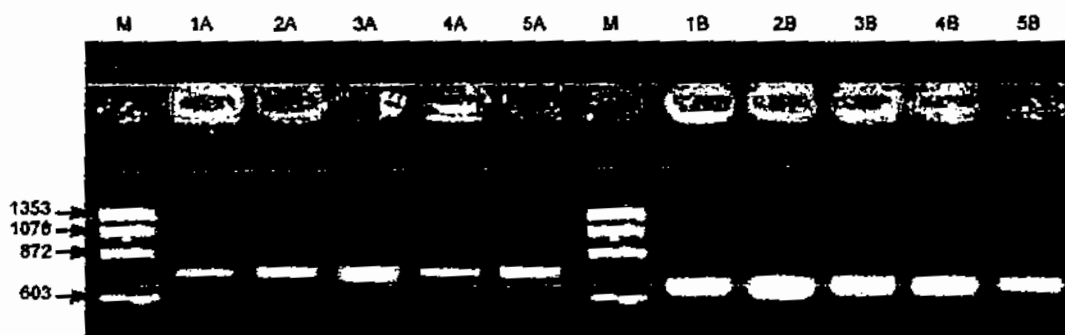
menggunakan sarung tangan. Gel hasil elektroforesis diletakkan pada UV transilluminator dan didokumentasikan dengan geldoc (Bio-Rad).

### 3.3.3.2. Purifikasi

Amplikon dipurifikasi menggunakan *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Bufer sebanyak 5 X volume produk PCR ditambahkan (produk PCR=25 ul, maka bufer yang ditambahkan = 125 ul) dan dicampur dengan memvorteks. pH campuran dilihat, seharusnya berwarna kuning. Jika berwarna oranye atau ungu, harus diambahkan 3 M sodium asetat pH 5 sebanyak 10 ul sehingga campuran berubah warna menjadi kuning. *Column* diletakkan di tabung koleksi 2 ml. Campuran produk PCR+buffer dituangkan ke dalam QIAquick column lalu disentrifus 10.000Xg selama 1 menit menggunakan mesin sentrifugasi (Eppendorf tipe 5417R). Cairan di tabung koleksi dibuang lalu QIAquick column diletakkan kembali ke tabung koleksi yang sama. DNA dicuci dengan menambahkan 0.75 ml buffer PE ke QIAquick column lalu disentrifus selama 1 menit. Cairan di tabung koleksi dibuang, QIAquick column diletakkan kembali ke tabung koleksi yang sama dan disentrifus dengan kecepatan 10.000Xg selama 1 menit. QIAquick column diletakkan ke tabung 1.5 ml yang bersih. Sebanyak 50 ul buffer EB ditambahkan di tengah QIAquick membran, didiamkan selama 5 menit, disentrifus dengan kecepatan 10.000Xg selama 1 menit

### 3.3.3.3. Elektroforesis Hasil Purifikasi

Produk PCR yang sudah dipurifikasi di elektroforesis pada agarose 2% (1 volume loading dye + 5 volume DNA yang sudah dipurifikasi) pada voltase 150 volt selama 1 jam. Tujuannya untuk melihat apakah DNA yang sudah dipurifikasi masih ada (gambar 16).



Gambar 16. Hasil purifikasi DNA

M = Penanda DNA ( $\emptyset$ X174), 1A-5A = fragmen 1 sampel 1-5 (740 pb), 1B-5B = fragmen 2 sampel 1-5 (643 pb)

#### 3.3.3.4. Siklus Sekuensing

DNA direaksikan dengan reagen untuk sequencing, total volume reaksi 15 ul. Primer M13 F (forward)/R (reverse) 3 uM 1 ul, Bigdye 6 ul, ddH<sub>2</sub>O 4 ul, DNA yang sudah dipurifikasi 20-25 ng/ul. Kondisi sekuensing yaitu:

- Denaturasi awal 96°C selama 3 menit
  - 25 siklus:
    - ❖ Denaturasi 96°C selama 10 detik
    - ❖ Annealing 50°C selama 5 detik
    - ❖ Ekstensi 60°C selama 4 menit
- Tahan 60 ° C selama 2 menit
- Penyimpanan 4°C selamanya

#### 3.3.3.5. Presipitasi Hasil Sekuensing

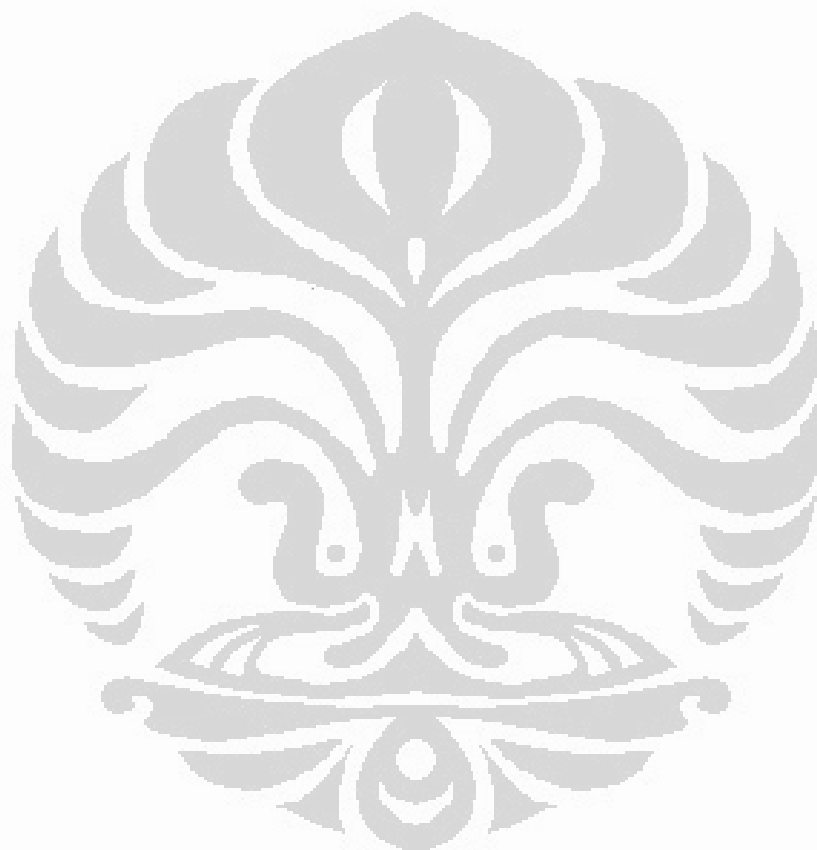
Kedalam 15 ul produk sekuensing ditambahkan 37,5 ul 95% etanol, 1,5 ul 3M NaAc pH 5,2 dan 1,5 ul EDTA 125 M dicampur sampai rata dengan memvorteks lalu diinkubasi pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian disentrifus pada suhu 4°C

dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang menggunakan pipet, lalu ditambahkan 250 ul 70% etanol. Lalu disentrifus pada suhu 4<sup>0</sup>C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang menggunakan pipet, dan DNA dikeringkan menggunakan speed vac selama 7-10 menit. Sampel dapat disimpan pada suhu -20<sup>0</sup>C dan lindungi dari cahaya dengan membungkus menggunakan aluminium foil. Sebanyak 11 ul HiDi formamide ditambahkan pada DNA yang sudah kering, dicampur dengan cara memvoetex selama 30-40 detik, lalu dipindahkan ke 96 well reaction plate. Plat dipanaskan pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 3 menit lalu langsung dipindahkan ke suhu 4<sup>0</sup>C (ice plate) selama 3 menit (plate diletakkan di frozen rack). Plat dimasukkan ke mesin sequencer dan mesin dijalankan untuk elektroforesis hasil sekuensing selama 1 jam. Hasil elektroforesis dibaca dan dianalisis hasilnya.

#### 3.3.3.6. Analisis Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing berupa data elektroferogram dari mesin Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystem) diverikasi ulang dan dibandingkan dengan data sekuen nukleotida fragmen gen virus referensi dari NCBI sesuai dengan gen target yang tersedia. Sekuen nukleotida fragmen gen yang memiliki data elektroferogram bagus dianalisis, jika data elektroferogram kurang bagus, maka dilakukan sekuensing ulang atau bahkan PCR ulang sampai dihasilkan data elektroferogram yang bagus. Fragmen sekuen yang telah diperiksa, diperbaiki dan digabungkan dengan fragmen yang lain, sesuai dengan strategi sekuensing yang dilakukan untuk gen tersebut. Hal ini dilakukan dengan bantuan software Sequencer versi 4,9. Data sekuen nukleotida lengkap dari gen neuraminidase yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis bersama dengan data sekuen yang tersedia pada influenza H1N1 database dan NCBI. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan software BioEdit versi 7 (<http://www.mbio.nosu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Pembuatan multiple alignment dengan menggunakan BioEdit, versi 7. Pohon filogenetik dihasilkan dengan menggunakan *neighborhood joining bootstrap analysis* (1,000 replicates) dengan

menggunakan Tamura-Nei algorithm dalam MEGA, versi 4 (<http://www.megasoftware.net>). Sekuen yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen strain virus influenza yang sensitif dan resisten dari bank gen. Prediksi struktur 3 dimensi protein dilakukan menggunakan program I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>).



## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan uji NAI dan rRT-PCR pada 106 isolat virus influenza A (H1N1) yang diambil dari 1 klinik pabrik, 8 puskesmas dan 17 rumah sakit di 16 kota di seluruh Indonesia sejak 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008. Isolat tersebut terdiri dari 91 strain New Caledonia dan 15 strain Kepulauan Solomon.

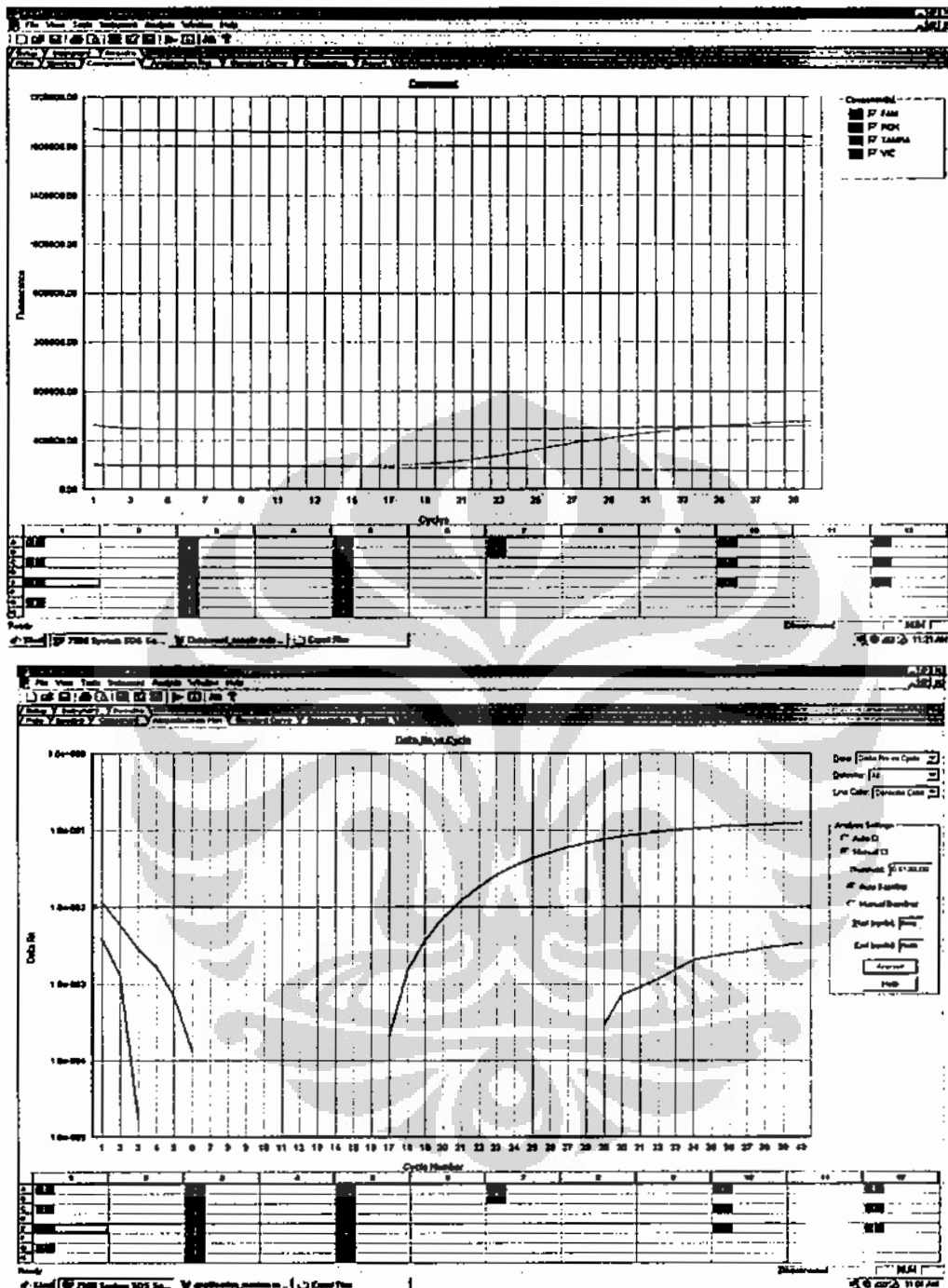
#### 4.1. Hasil Uji NAI

Sebaran data untuk nilai IC50 tidak normal (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4), maka tidak dapat digunakan nilai rata rata untuk menentukan *outlier* tapi menggunakan nilai median. Perhitungan interkuartil untuk menentukan pencilan jauh (*outlier*) dilakukan menggunakan program stata. Diperoleh batas bawah = -0,3565, batas atas = 1,3915 dan batas atas jauh = 2,047. Virus influenza A (H1N1) yang memiliki nilai IC50 lebih besar dari batas atas jauh yaitu  $Q3 + 3 IQR$  (2,047) dinyatakan sebagai virus yang resisten terhadap oseltamivir. Ditemukan 19 isolat resisten dengan nilai IC50 berkisar antara 2.116- 674 nM. Sisanya, sebanyak 87 isolat masih sensitif terhadap oseltamivir dengan kisaran nilai IC50 antara 0,026- 1,949 nM.

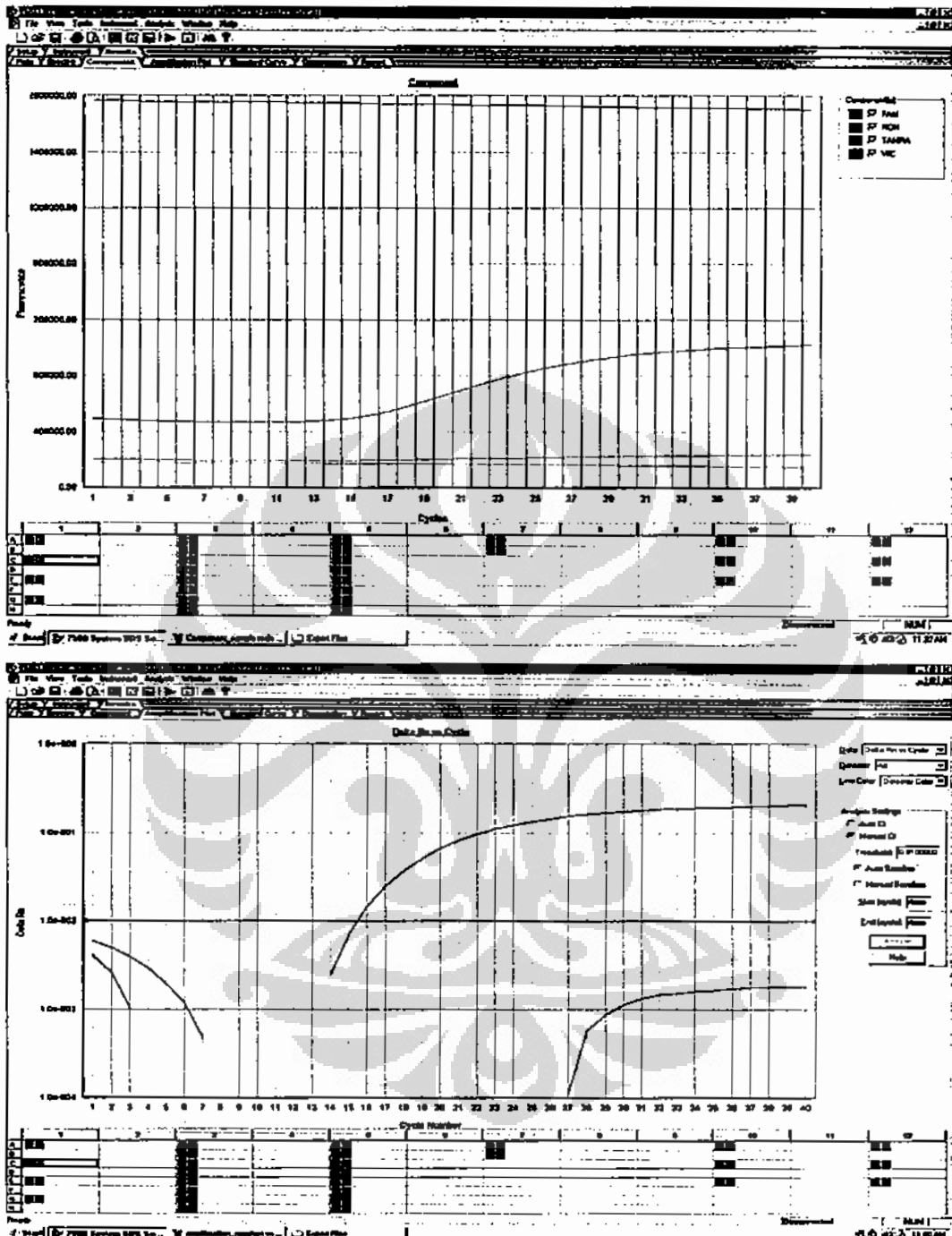
Mengamati grafik hasil transformasi data pada lampiran 2 gambar 31 dan 32, tampak ada perbedaan pola antara virus yang sensitif dan yang resisten. Virus yang sensitif mempunyai grafik yang menunjukkan nilai sinyal yang cenderung menurun sejalan dengan meningkatnya konsentrasi oseltamivir seperti grafik transformasi data virus kontrol yang sensitif terhadap oseltamivir pada gambar 31. Sebaliknya virus yang resisten mempunyai grafik yang konstan sampai konsentrasi tertentu lalu mengalami penurunan seperti yang ditunjukkan oleh grafik transformasi data virus kontrol yang resisten terhadap oseltamivir pada gambar 32.

## 4.2. Hasil Uji rRT-PCR

Dari uji rRT-PCR yang telah dilakukan, diperoleh 17 isolat virus influenza A (H1N1) yang memiliki mutasi H275Y. Isolat virus yang memiliki mutasi H275Y memiliki nilai CT (*cycle threshold*) pada *reporter* FAM (probe untuk mutan H275Y) dan *undetermined* pada *reporter* VIC (probe untuk *wildtype*), sedangkan isolat yang tidak memiliki mutasi menunjukkan nilai CT pada *reporter* VIC dan *undetermined* pada *reporter* FAM. Kontrol negatif yang tidak berisi virus (hanya air) memberikan hasil *undetermined* pada kedua *reporter*. Dari hasil uji rRT-PCR diperoleh nilai CT untuk mutan berkisar antara 15,39 - 31,79 sedangkan untuk *wildtype* berkisar antara 16,39 - 37,45. Pada gambar "siklus vs fluoresen" tampak ada 4 garis berwarna yang masing masing mewakili *reporter* FAM (merah), ROX (biru), *quencher*/TAMRA (hijau) dan *reporter* VIC (ungu). Pada gambar "siklus vs reaksi" tampak garis berwarna biru (mewakili *reporter* VIC) dan merah (mewakili *reporter* FAM). Nilai CT ditunjukkan dari titik perpotongan grafik *reporter* dengan garis *threshold* yang berwarna hijau seperti pada gambar 17, 18 dan 19.



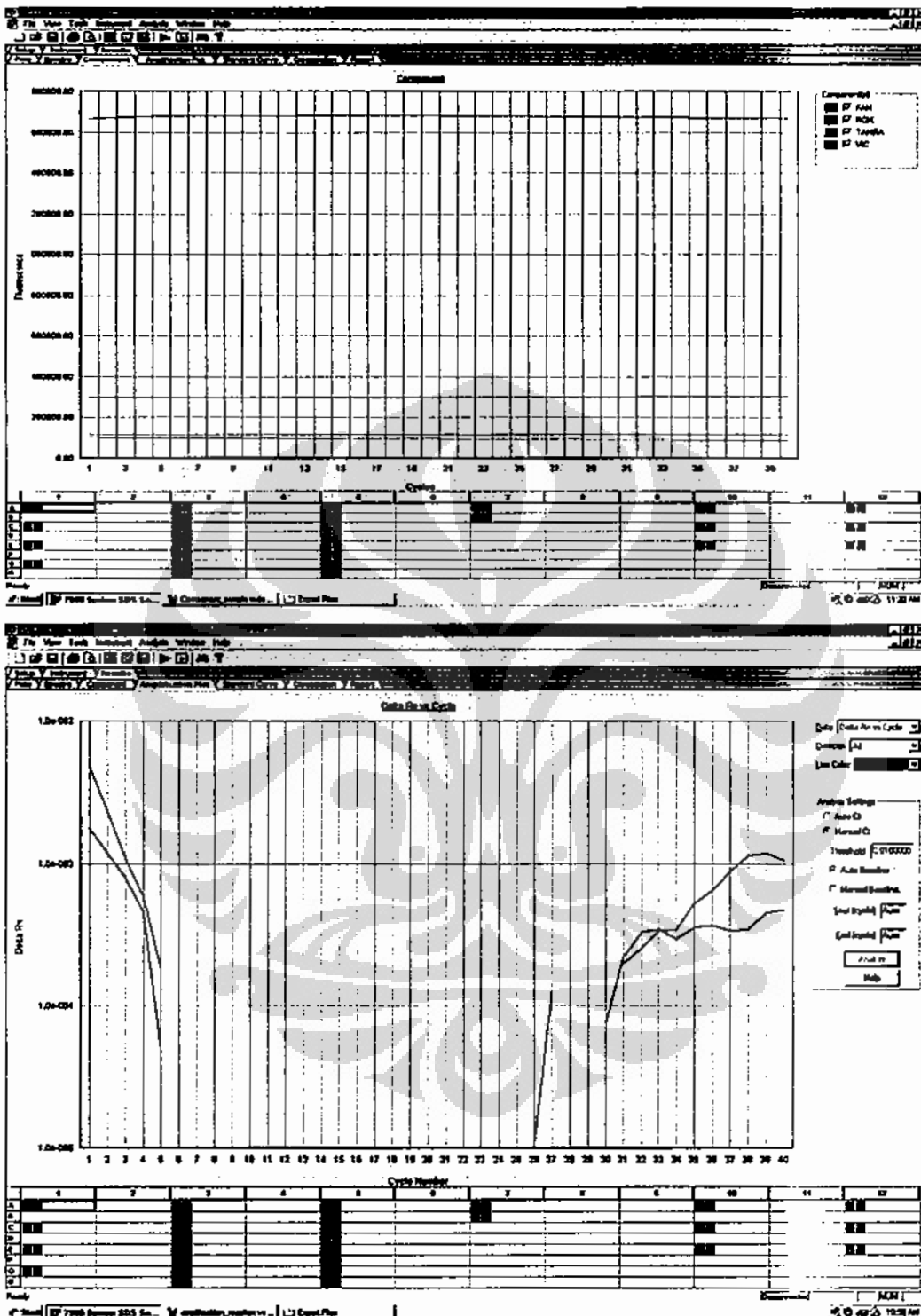
Gambar 17. Hasil tes rRT-PCR isolat yang tidak mempunyai mutasi H275Y. Semua garis tampak datar, hanya garis berwarna ungu (*reporter VIC* untuk *wildtype*) yang mengalami peningkatan pada gambar “siklus vs fluoresen”(atas). Pada gambar “siklus vs reaksi” garis biru mewakili *reporter VIC* mengalami peningkatan dan dipotong oleh garis hijau/*threshol*. Titik potong menunjukkan nilai CT (bawah)



Gambar 18. Hasil tes rRT-PCR isolat yang mempunyai mutasi H275Y.

Semua garis tetap datar, hanya garis berwarna merah (*reporter* FAM untuk mutan) yang mengalami peningkatan pada gambar “siklus vs fluoresen”(atas). Pada gambar “siklus vs reaksi” garis merah mewakili *reporter* FAM mengalami peningkatan dan dipotong oleh garis hijau/*threshol*d. Titik potong menunjukkan nilai CT (bawah)





Gambar 19. Hasil tes rRT-PCR kontrol tanpa isolat virus.

Keempat garis tampak datar pada gambar “siklus vs fluorensen”(atas) dan tidak ada grafik yang dipotong *threshold* pada gambar “siklus vs reaksi” (bawah)

Pada uji rRT-PCR ditentukan nilai CT (*cycle threshold*). Hasil penelitian menunjukkan nilai CT yang berkisar antara 15,39 - 31,79 untuk mutan sedangkan untuk *wildtype* berkisar antara 16,39 - 37,45. Perbedaan nilai CT itu antara lain dipengaruhi oleh jumlah awal RNA virus yang digunakan sebagai cetakan dalam tiap mikroliter sampel. Makin banyak jumlah cetakan awal maka makin kecil nilai CT (Bustin, 2004). Hasil uji NAI dan rRT-PCR dapat dilihat pada tabel 11 di lampiran 2.

Diperoleh virus yang resisten terhadap oseltamivir sebanyak 19 isolat berdasarkan uji NAI dan 17 isolat diantaranya mempunyai mutasi H275Y seperti tampak pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji rRT-PCR dan NAI pada semua isolat secara keseluruhan

Kriteria	Resisten	Sensitif
Mutasi H275Y	17 (16%)	89 (84%)
Fenotip NA	19 (17,9%)	87 (82,1%)

Adanya mutasi H275Y dianggap sebagai virus yang resisten terhadap oseltamivir dan yang tidak mempunyai mutasi H275Y dianggap sensitif. Untuk membedakan kedua uji NAI dan rRT-PCR sebagai metode untuk mendeteksi resistensi dilakukan uji statistik seperti pada lampiran 3.

Untuk membandingkan apakah sebaran virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir dipengaruhi oleh musim, dilakukan uji statistik seperti pada lampiran 3. Pada musim kemarau jumlah virus yang resisten berdasarkan kedua uji sama, namun ada perbedaan jumlah virus yang resisten berdasarkan kedua uji pada musim hujan seperti pada tabel 4.

Tabel 4. Sebaran virus influenza yang resisten di musim hujan dan musim kemarau

Musim	H275Y		NAI	
	Ada mutasi	Tidak ada	Resisten	Sensitif
Musim Hujan (93 isolat)	17 (18,3%)	76 (81,7%)	15 (16,1%)	78(83,9%)
Musim Kemarau (13 isolat)	2(15,4%)	11(84,6%)	2 (15,4%)	11(84,6%)

Untuk mengetahui apakah mutasi juga dipengaruhi oleh strain, apakah ada strain spesifik pada mutasi H275Y dilakukan perhitungan statistik yang dapat dilihat pada lampiran 4. Untuk strain New Caledonia tidak ada perbedaan jumlah isolat yang resisten berdasarkan kedua uji, namun pada strain Kepulauan Solomon ada perbedaan jumlah isolat yang resisten berdasarkan kedua uji seperti tampak pada tabel 5.

Tabel 5. Sebaran virus influenza yang resisten berdasarkan strain

Strain	H275Y		NAI	
	Ada mutasi	Tidak ada	Resisten	Sensitif
New Caledonia (91 isolat)	15 (16,5%)	76(83,5%)	15 (16,5%)	76(83,5)
Kepulauan Solomon (15 isolat)	2 (13,3%)	13(86,7%)	4 (26,7%)	11(73,3%)

Karena isolat dalam penelitian ini dipilih untuk mewakili 6 region, maka ingin diketahui juga apakah resistensi terhadap oseltamivir dipengaruhi oleh region, apakah ada perbedaan pada keenam region tersebut. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4. Data sebaran virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir berdasarkan uji NAI dapat dilihat pada tabel 6 sedangkan yang berdasarkan hasil uji rRT-PCR dapat dilihat pada tabel 7. Perwakilan virus pada region 4,5 dan 6 lebih sedikit namun persentase yang resisten tampak cukup besar.

Tabel 6. Hasil uji NAI untuk melihat aktifitas NA terhadap oseltamivir tiap region

Region	Total isolat	Nilai IC50 hasil uji NAI	
		IC50 > Q3+3 IQR (resisten)	IC50 < Q3 +3IQR (sensitif)
1	13	1 (7,7%)	12
2	72	11 (15,3%)	61
3	11	1 (9,1%)	10
4	3	1 (33,3%)	2
5	3	2 (66,7%)	1
6	4	3 (75%)	1

Tabel 7. Hasil uji rRT-PCR untuk melihat adanya mutasi H275Y pada 6 region

Region	Jumlah isolat	Mutasi H275Y	
		ada	tidak ada
1	13	1 (7,7%)	12
2	72	9 (12,5%)	63
3	11	1 (9,1%)	10
4	3	1 (33,3%)	2
5	3	2 (66,7%)	1
6	4	3 (75%)	1

#### 4.3. Hasil Sekuensing

Dari hasil uji NAI dan rRT-PCR diperoleh 3 kelompok hasil yang masing masing diambil perwakilan untuk melihat sekuen gen NA (tabel 8). Telah dipilih 5 isolat yang mewakili ketiga kelompok tersebut seperti pada tabel 9.

Tabel 8. Tiga Kelompok Hasil untuk Sekuensing

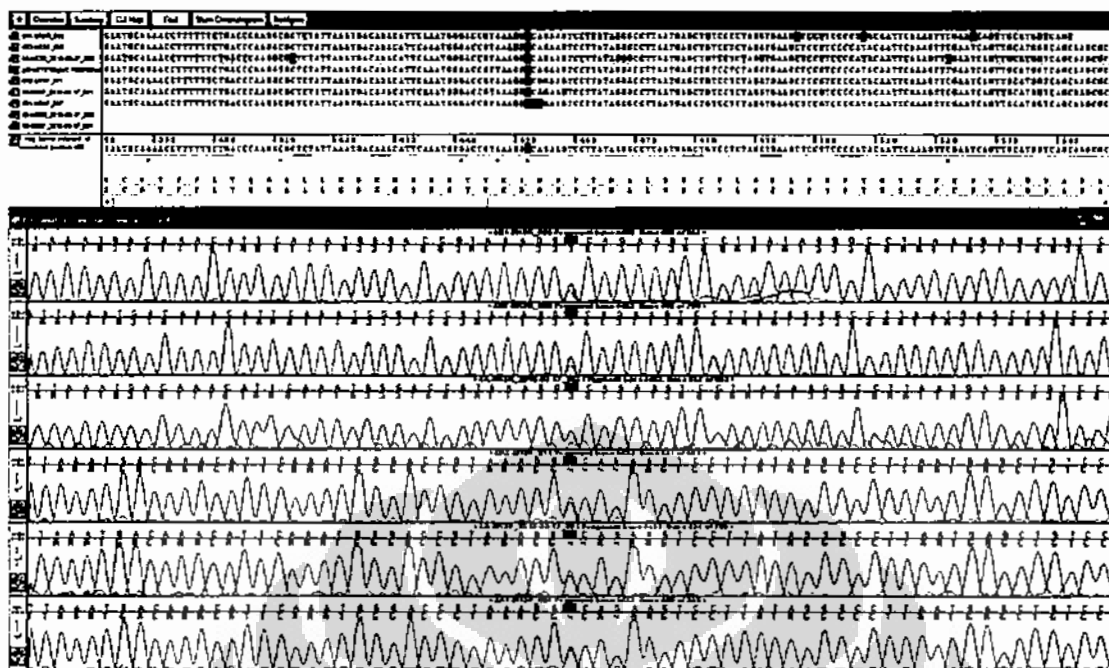
Kelompok hasil	Mutasi H275Y	IC50> Q3 + 3 IQR	Sekuensing
1. Ada 17 isolat	ada	ya	dipilih 2 isolat dengan nilai IC50 terendah dan tertinggi untuk konfirmasi apakah hanya ada mutasi H275Y
2. Ada 2 isolat	tidak ada	ya	disekuen semua isolat untuk menentukan mutasi lain selain H275Y yang menyebabkan resistensi
3. Ada 87 isolat	tidak ada	tidak	dipilih satu isolat untuk konfirmasi tidak ada mutasi H275Y atau ada mutasi lain yang tidak menyebabkan resistensi

Tabel 9. Data 5 isolat yang disekuen

Sampel	Strain	H275Y	IC50 > Q3 + 3 IQR	IC50 NA Star	Tahun	Region	Kota
1	H1N1 New Caledonia	Resisten	Resisten	674.000	2007	5	MANADO
2	H1N1 New Caledonia	Sensitif	Sensitif	1.007	2007	2	YOGYAKARTA
3	H1N1 New Caledonia	Resisten	Resisten	2.116	2007	2	JEMBER
4	H1N1 Solomon	Sensitif	Resisten	17.660	2008	2	BANDUNG
5	H1N1 Solomon	Sensitif	Resisten	2.553	2008	2	BANDUNG

Gen NA dibagi menjadi 2 fragmen yaitu posisi nukleotida 0-740 (fragmen 1) dan 600-1242 (fragmen 2). Tiap fragmen disekuen menggunakan dua primer yaitu *forward* dan *reverse*. Gambar elektroferogram hasil sekuensing dapat dilihat di lampiran 3.

Sekuen nukleotida kelima isolat yang disekuensing disejajarkan dengan virus A/California/2003 sebagai referensi untuk melihat apakah ada perubahan nukleotida. Hasil pensejajaran nukleotida dapat dilihat pada gambar 21. Sekuen Gen N1 sampel 4 mengindikasikan ada 2 populasi virus, dengan variasi nukleotida posisi 452 A atau G. Basa A adalah wildtype sedangkan basa G adalah hasil mutasi titik A452G. Hasil sekuen menggunakan primer *forward* menampilkan puncak grafik tertinggi untuk basa A sedangkan hasil sekuen dengan primer *reverse* menunjukkan puncak grafik basa G tampak paling tinggi dari puncak grafik ketiga basa lainnya (gambar 20). Pengulangan sekuensing menggunakan primer yang sama dan primer yang berbeda menunjukkan hasil yang tidak berbeda. Dapat disimpulkan sampel 4 mempunyai mutasi D151D/G.



Gambar 20. Sekuen nukleotida posisi 452 sampel 4 yang menunjukkan adanya dua populasi virus pada isolat. Hasil sekuen menggunakan primer *forward* menampilkan puncak grafik tertinggi untuk basa A sedangkan hasil sekuen dengan primer *reverse* menunjukkan puncak grafik basa G tampak paling tinggi dari puncak grafik ketiga basa lainnya. Pengulangan sekuensing menggunakan primer yang sama dan primer yang berbeda menunjukkan hasil yang tidak berbeda

Sekuen nukleotida kelima isolat itu disejajarkan (*align*) dengan menggunakan referensi virus influenza A/New York/230/2003 H1N1 (kode gen bank NCBI CY002626). Hasil pensejajaran urutan nukleotida dapat dilihat pada gambar 21. Sekuen protein kelima isolat disejajarkan dengan protein virus kontrol yang sensitif terhadap oseltamivir A/Massachusetts/6/2006 H1N1 (kode gen bank NCBI EU100634), virus kontrol yang resisten terhadap oseltamivir A/Massachusetts/05/2007 H1N1 (kode gen bank NCBI EU516028), dan A/New York/230/2003 H1N1 (kode gen bank NCBI CY002626). Hasil pensejajaran urutan asam amino dapat dilihat pada gambar 22.

Pada pensejajaran nukleotida yang tampak pada gambar 21 terlihat adanya mutasi substitusi beberapa posisi nukleotida. Mutasi itu ada yang menyebabkan

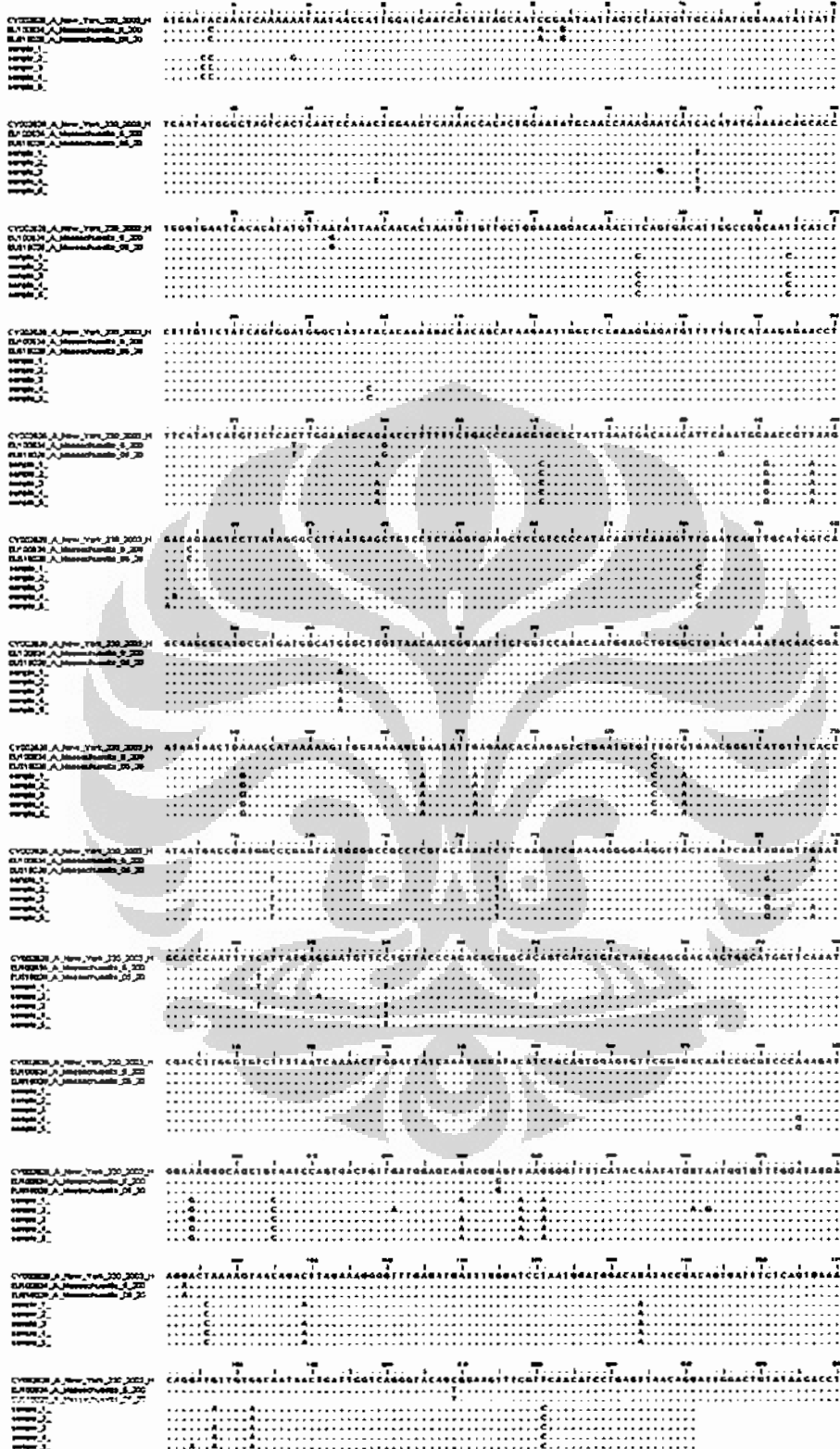
perubahan asam amino (mutasi nonsinonim) dan ada juga yang tidak menyebabkan perubahan asam amino (mutasi sinonim)

Substitusi nukleotida yang terjadi biasanya dihubungkan dengan evolusi virus. Biasanya hal ini dilakukan dengan membandingkan rata-rata substitusi non sinonim ( $K_a$ ) dengan substitusi sinonim ( $K_s$ ). Nilai  $K_a < K_s$  diartikan sebagai akibat seleksi negatif,  $K_a > K_s$  diartikan sebagai seleksi positif dan  $K_a = K_s$  diartikan sebagai tidak ada seleksi (Hurst, 2002). Hasil analisis substitusi nukleotida pada gen NA kelima virus yang disekuensing menunjukkan bahwa semua virus yang disekuensi mempunyai nilai  $K_a < K_s$  (tabel 10).

Tabel 10. Jumlah substitusi nukleotida non sinonim dan sinonim pada gen NA

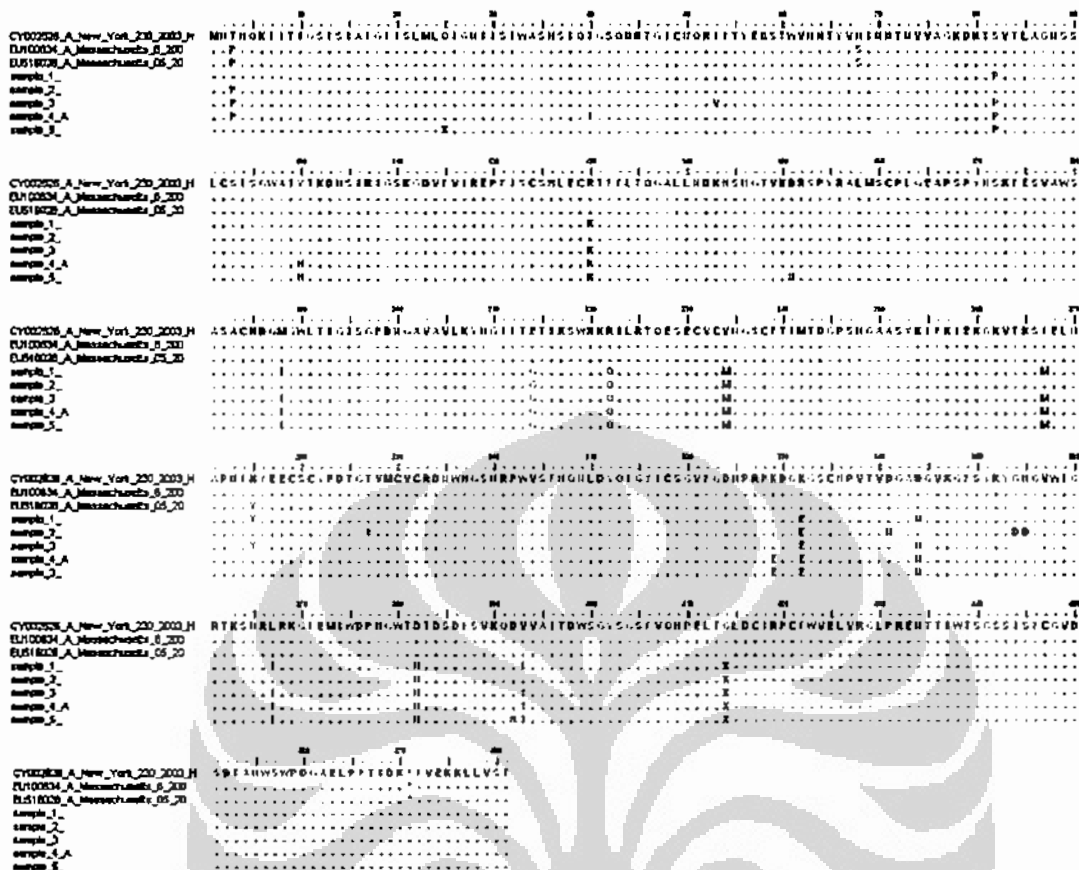
No	virus	Kota asal	Substitusi nukleotida Gen NA	
			Non Sinonim ( $K_a$ )	Sinonim ( $K_s$ )
1	H1N1 New Caledonia	MANADO	12	18
2	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	10	16
3	H1N1 New Caledonia	JEMBER	14	19
4	H1N1 Solomon	BANDUNG	15	21
5	H1N1 Solomon	BANDUNG	15	19

Tampak semua isolat virus mempunyai nilai  $K_a$  yang lebih kecil dari  $K_s$ .



Gambar 21. Hasil penesejajaran nukleotida kelima isolat



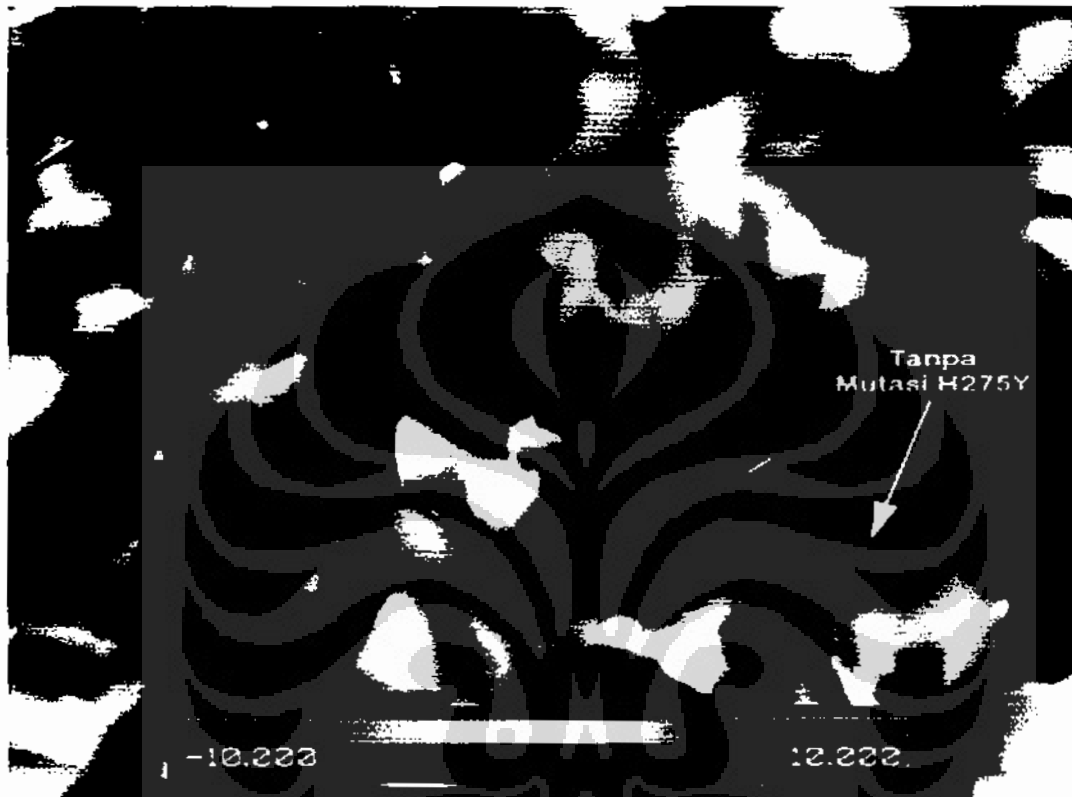


Gambar 22. Hasil Pensejajaran sekuen asam amino.

Tanda titik berarti asam amino sampel sama dengan referensi, tanda huruf berarti asam amino berbeda dengan referensi (terjadi mutasi).

Dari gambar 22 tampak adanya mutasi asam amino pada residu framework yaitu pada asam amino posisi 275 dan 151, mutasi yang lain bukan termasuk residu katalitik atau framework.

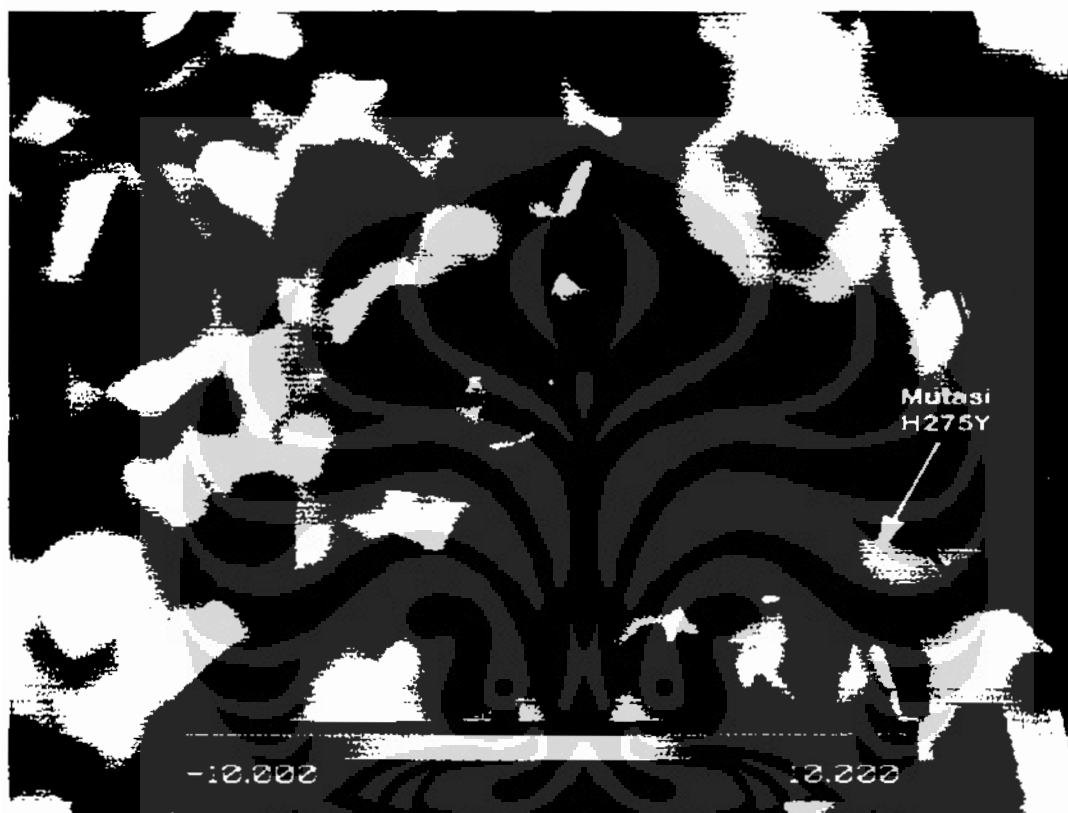
Model 3 dimensi protein NA yang sensitif terhadap oseltamivir menggunakan program pymol:



Gambar 23. Protein NA yang sensitif terhadap oseltamivir.

Asam amino histidin (H) bermuatan negatif (berwarna merah) pada gambar ditunjuk oleh tanda panah. Merah = asam amino yang bermuatan negatif, putih = asam amino yang tidak bermuatan, biru = asam amino yang bermuatan positif.

Model 3 dimensi protein NA dengan mutasi H275Y yang resisten terhadap oseltamivir menggunakan program pymol:

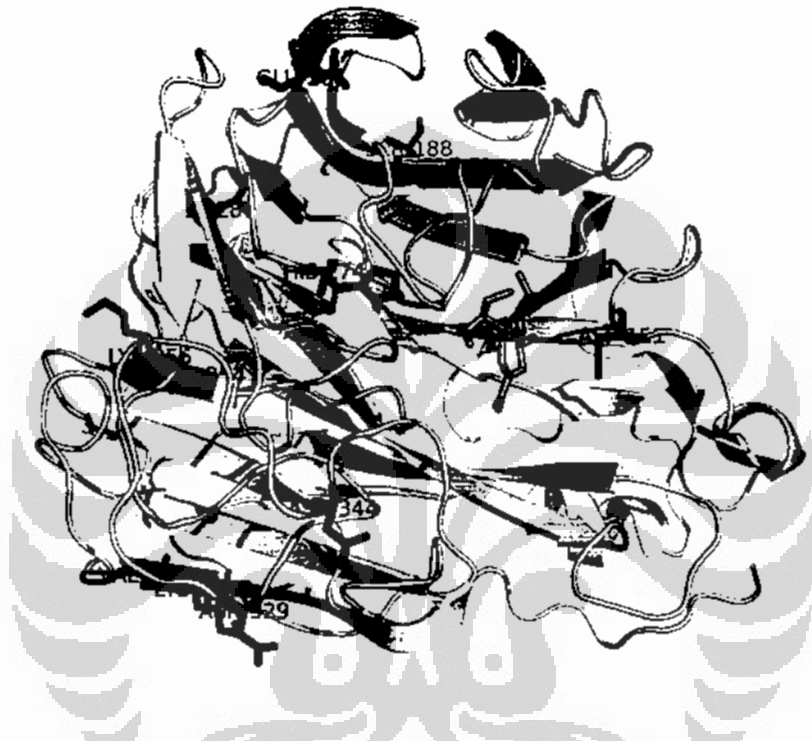


Gambar 24. Protein NA dengan mutasi H275Y yang resisten terhadap oseltamivir.

Merah = asam amino yang bermuatan negatif, putih = asam amino yang tidak bermuatan, biru = asam amino yang bermuatan positif. Pada NA dengan mutasi H275Y, asam amino pada posisi 275 (Histidin) yang bermuatan negatif (berwarna merah) berubah menjadi asam amino Tirosin yang tidak bermuatan (berwarna putih).

Pada gambar ditunjuk oleh panah.

Posisi macam-macam mutasi asam amino pada protein NA yang ditemui pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 25.

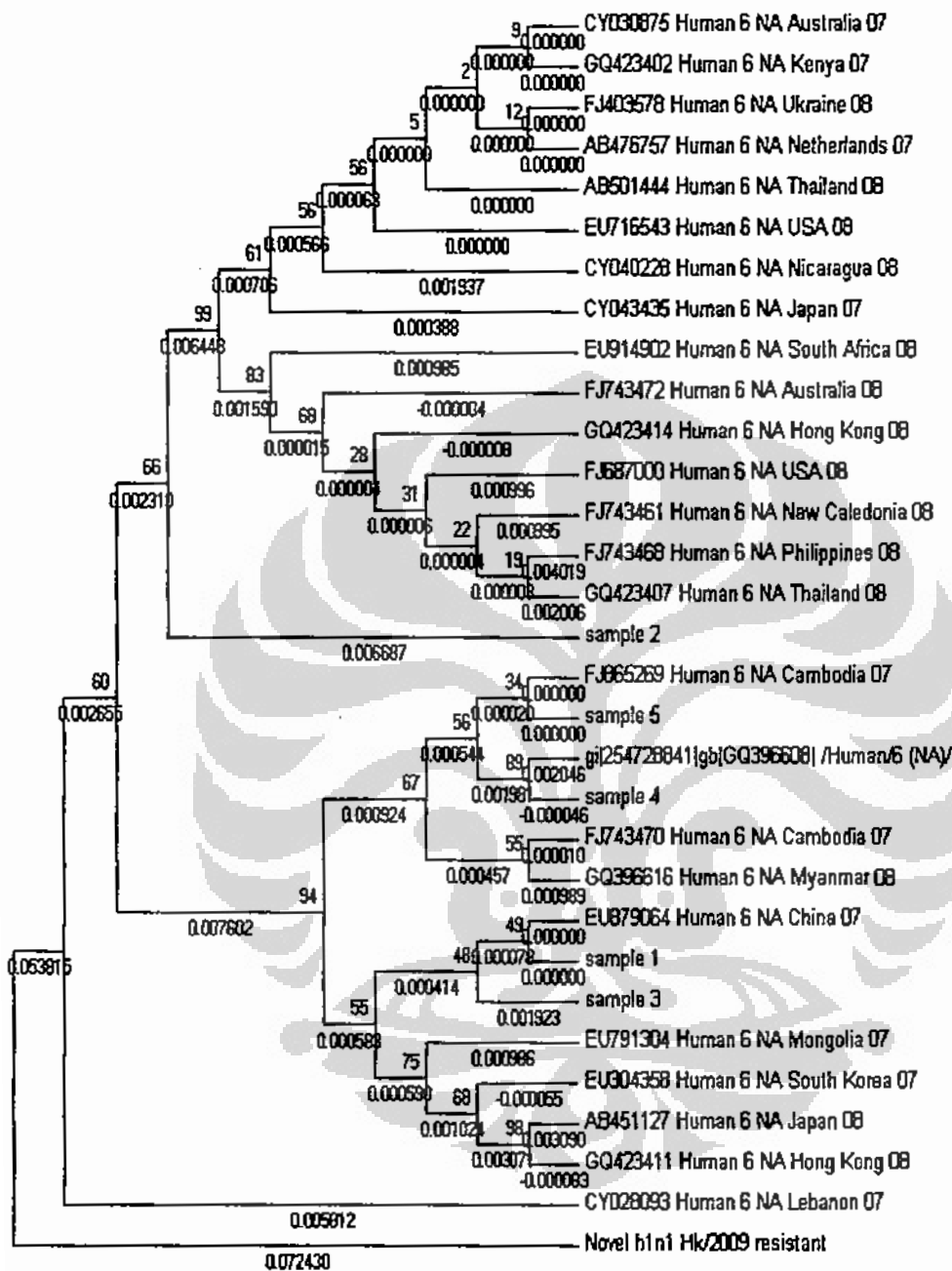


Gambar 25. Macam-macam mutasi asam amino pada protein NA yang ditemui dalam penelitian.

Semua mutasi substitusi nukleotida yang menyebabkan perubahan asam amino pada kelima isolat yang disekuen di lihat pengaruhnya terhadap ikatan antara enzim NA dengan oseltamivir. Macam macam mutasi yang ditemui dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 16 di lampiran 2. Posisi semua mutasi nonsinonim itu dapat dilihat pada bentuk 3 dimensi protain NA pada gambar 28. Semua mutasi asam amino berada pada posisi yang tidak mempengaruhi ikatan antara oseltamivir dan enzim NA kacuali mutasi pada posisi 275 dan 151.

Untuk mengetahui struktur 3 dimensi protein NA kelima isolat yang disekuensing, dilakukan prediksi struktur 3 dimensi menggunakan program I-Tasser. C-skor adalah skor keyakinan untuk memperkirakan kualitas model yang diprediksi oleh I-TASSER. C-skor dihitung berdasarkan kebermaknaan pensejajaran model dengan cetakan dan parameter konvergensi simulasi perakitan struktur. nilai C-skor pada kisaran antara -5 sampai 2, di mana makin tinggi nilai C-skor berarti makin tinggi kepercayaan model yang diperoleh dan demikian pula sebaliknya. Menggunakan sepuluh cetakan yang berasal dari protein data base (PDB), I-Tasser memberikan 5 model. Yang dipergunakan dalam hasil penelitian ini adalah model yang mempunyai nilai c-skor yang paling tinggi. C-skor sampel 1 = -1.11, C-skor sampel 2 = -1.58, C-skor sampel 3 = -1.87, C-skor sampel 4A = -1.54, C-skor sampel 4G = -1.58, C-skor sampel 5 = -0.67. Struktur 3 dimensi protein NA dan perkiraan asam amino yang berhubungan dengan situs pengikatannya dapat dilihat pada gambar 33-48 di lampiran 4. Jika dibandingkan dengan asam amino situs aktif protein NA menurut Colman dkk., maka kelima isolat virus memiliki beberapa perbedaan asam amino yang berperan pada situs pengikatannya. Sampel I mempunyai susunan asam amino yang paling banyak perbedaannya dengan situs aktif menurut publikasi (tabel 17).

Pohon kekerabatan virus influenza A (H1N1) asal Indonesia dibandingkan dengan isolat virus A (H1N1) dari negara lain dapat dilihat pada gambar 27. Tampak virus sampel 1-5 yang disekuensi terkelompok sesuai dengan karakternya. Sampel 2 yang sensitif terhadap oseltamivir tampak terpisah dengan keempat virus yang resisten.



Gambar 26. Pohon kekerabatan virus influenza A (H1N1) asal Indonesia.

## BAB 5

### PEMBAHASAN

Pada uji NAI yang telah dilakukan, aktivitas enzim neuraminidase virus influenza A (H1N1) dihambat oleh obat anti NA yaitu oseltamivir karboksilat (bentuk aktif dari oseltamivir). Pada saat virus diinkubasi bersama oseltamivir, oseltamivir berikatan dengan situs aktif enzim NA karena molekul oseltamivir memiliki struktur yang mirip dengan substrat alami NA (asam sialat). Hal ini menyebabkan kemampuan enzim untuk mengkatalisa proses hidrolisa substrat yang ditambahkan pada reaksi menjadi terhambat. Dengan demikian substrat yang terpecah menjadi berkurang, emisi cahaya yang dipancarkan berkurang, dan nilai sinyal yang dihasilkan juga berkurang jika dibandingkan dengan virus yang tidak diberi oseltamivir. Kemampuan oseltamivir menghambat kerja enzim berbanding terbalik dengan sinyal yang dihasilkan. Makin kecil sinyal makin banyak enzim NA yang berhasil dihambat. Pada uji NAI ditentukan konsentrasi oseltamivir yang dapat menghambat sebesar 50% aktivitas enzim NA yang disebut dengan nilai IC50 (*inhibition concentration 50%*).

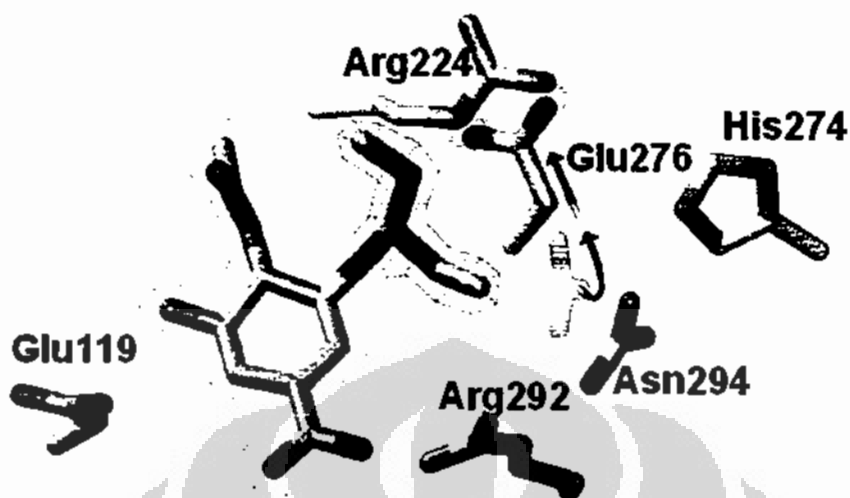
Pada penelitian ini virus yang sensitif terhadap oseltamivir dianggap sebagai anggota populasi, sedangkan virus yang resisten terhadap oseltamivir tidak dianggap sebagai anggota populasi (*outlier*). Sebaran nilai IC50 yang diperoleh pada penelitian ini tidak normal (perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 4) sehingga penentuan *outlier* (virus yang resisten) tidak dapat menggunakan rumus nilai IC50 > rata-rata IC50 + 3SD tetapi menggunakan rumus nilai IC50 > Q3 + 3 IQR . Kedua *cutoff* itu digunakan oleh Sheu dkk. (Sheu dkk., 2008). Berdasarkan perhitungan statistik, virus yang memiliki nilai IC50 antara -0,3565 sampai 2,047 nM dianggap sensitif terhadap oseltamivir, sedangkan virus yang mempunyai nilai IC50 lebih besar dari 2,047 nM dianggap resisten terhadap oseltamivir. Virus kontrol influenza A (H1N1) yang sensitif oseltamivir menunjukkan nilai IC50 sebesar 0,2991 nM sedangkan virus kontrol yang resisten terhadap oseltamivir mempunyai nilai IC50 sebesar 167,5 nM (tabel 4). Dari 106 isolat yang diuji dengan NAI diperoleh 19 isolat

(17,9%) yang resisten terhadap oseltamivir yaitu memiliki IC50 lebih dari Q3+3 IQR (=2,047 nM). Nilai IC50 tersebut berkisar antara 2,116 – 674 nM. Menurut Mishin dkk. virus yang resisten memiliki peningkatan nilai IC50 paling tidak 8 kali IC50 dibandingkan virus kontrol ( $8 \times 0,2991 = 2,3928$  nM). *Cutoff* ini tidak dipergunakan karena virus dengan IC50 2,116 nM menjadi tidak termasuk dalam kriteria resisten padahal virusnya mempunyai mutasi His275Tyr (H275Y). Oleh sebab itu digunakan *cutoff* Q3+3 IQR (=2,047 nM) karena lebih berkorelasi dengan adanya mutasi pada virus. Jika dibandingkan dengan IC50 virus kontrol yang sensitif oseltamivir, IC50 paling tinggi pada penelitian ini yaitu 674 nM menunjukkan peningkatan 2.253 kali lipat dari IC50 kontrol. Hal itu sesuai dengan yang dinyatakan oleh Okomo-Adhiambo dkk. bahwa virus yang resisten memiliki nilai IC50 antara 100-3000 kali lebih besar dari virus yang sensitif (Okomo-Adhiambo dkk., 2009).

Melalui uji rRT-PCR pada 106 isolat didapat 17 isolat (16%) yang memiliki mutasi H275Y. Dari 19 isolat virus yang menunjukkan aktivitas NA yang resisten terhadap oseltamivir pada uji NAI, terdapat 17 isolat yang memiliki mutasi H275Y. Tampak mutasi H275Y merupakan mutasi penyebab resistensi yang umum pada virus influenza A (H1N1) di Indonesia. Seperti dinyatakan oleh Colman dkk. bahwa asam amino histidin termasuk dalam residu kerangka (*framework*) yang berfungsi untuk membantu residu katalitik mempertahankan struktur 3 dimensi agar posisi oseltamivir tetap pada tempatnya (Colman dkk., 1983).

Analisis struktur kristal menunjukkan bahwa ikatan dengan oseltamivir memerlukan rotasi Glu276 (E276) lalu berikatan dengan Arg224 (R224) sehingga membentuk kantung untuk rantai samping oseltamivir. Mutasi H275Y menghalangi rotasi ini dan menghambat pembentukan kantung sehingga menghalangi ikatan dengan oseltamivir seperti pada gambar 30 (Moscano, 2009).





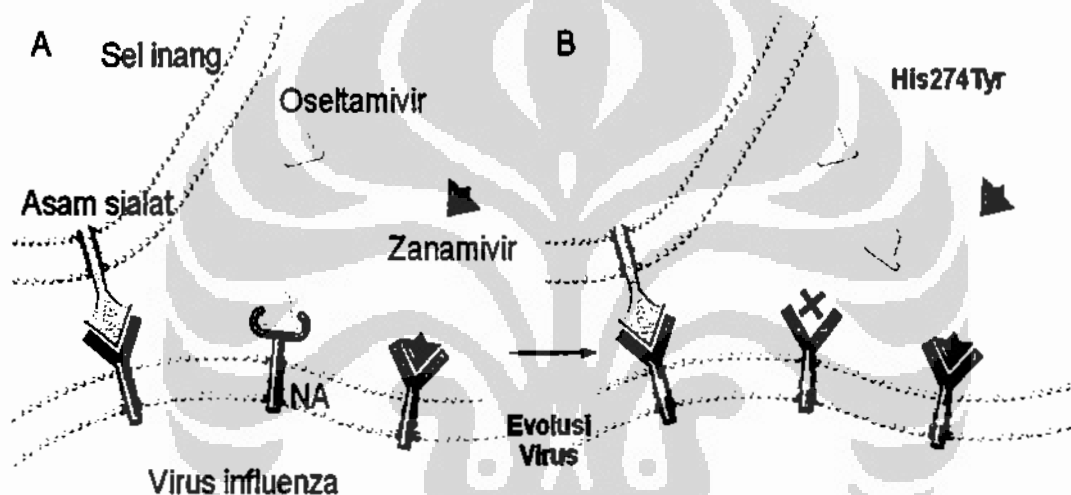
Gambar 27. Perubahan formasi asam amino pada NA untuk berikatan dengan oseltamivir (sumber: Moscana, 2009).

Menurut Wang dkk. penggantian histidin pada posisi 274 dengan asam amino yang memiliki rantai samping dengan ukuran berbeda menunjukkan bahwa penggantian dengan residu yang berukuran lebih besar seperti tirosin, akan mencegah asam glutamat pada posisi 276 untuk reorientasi sehingga tidak mampu membentuk jembatan garam dengan arginin pada posisi 224 yang dibutuhkan pada pengikatan oseltamivir karboksilat dengan NA. Penggantian dengan residu kecil seperti glisin atau asparagina mengakibatkan sensitivitas terhadap oseltamivir yang lebih tinggi atau tidak berubah (Wang dkk., 2000).

Prediksi tiga dimensi protein yang memiliki mutasi H275Y pada gambar 23 dan 24 menunjukkan adanya perubahan muatan. Asam amino histidin yang bermuatan negatif (warna merah) digantikan oleh asam amino tirosin yang tidak bermuatan (warna putih). Adanya perubahan muatan dari negatif menjadi tidak bermuatan ini mempengaruhi afinitas ikatan protein NA dengan oseltamivir, sehingga oseltamivir menjadi sulit masuk ke dalam kantung NA atau oseltamivir yang telah

masuk ke dalam kantung menjadi mudah lepas karena tidak adanya daya tolak dari muatan negatif asam amino posisi 275 terhadap oksigen pada oseltamivir.

Asam sialat dan zanamivir tidak memerlukan rotasi E276 untuk berikatan dengan NA, sehingga walaupun ada mutasi H275Y asam sialat dan zanamivir tetap dapat berikatan dengan NA (Moscana, 2009). Oleh sebab itu virus yang mempunyai mutasi H275Y tetap dapat melepaskan diri dari sel terinfeksi dan menginfeksi sel berikutnya. Berdasarkan hal itu, pasien yang terinfeksi virus influenza A (H1N1) yang mempunyai mutasi H275Y masih dapat diobati dengan zanamivir seperti tampak pada gambar 28 (Escuret dkk., 2008).

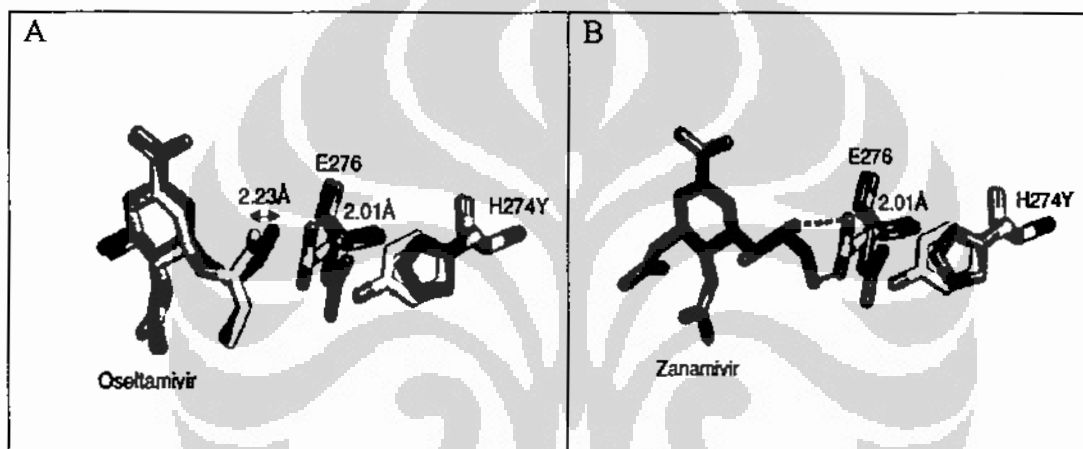


Gambar 28. Mekanisme resistensi terhadap oseltamivir tapi tetap sensitif terhadap zanamivir.

Situs aktif neuraminidase harus melakukan perubahan bentuk terlebih dahulu sehingga membentuk kantung yang dapat berikatan dengan oseltamivir (gambar A) mutasi H275Y menghalangi formasi situs aktif sehingga menghalangi ikatan dengan oseltamivir tapi tetap dapat berikatan dengan asam sialat dan zanamivir (gambar B) (sumber: Moscana, 2009)

Adanya perbedaan cara berikatan antara oseltamivir dan zanamivir disebabkan oleh adanya sedikit perbedaan struktur. Zanamivir memiliki struktur yang lebih menyerupai struktur asam sialat dibandingkan oseltamivir. Apabila dilakukan

perbandingan dengan yang *wildtype*, mutasi H274Y menyebabkan pergeseran posisi yg signifikan pada rantai samping asam amino E276 yang berada disebelah tirosin. Hal ini menyebabkan perpindahan dari gugus dietoksi oseltamivir, yang menghasilkan afinitas ikatan menjadi lebih lemah dan akhirnya menyebabkan resistensi (gambar A). Mutasi ini tidak berpengaruh pada zanamivir karena gugus dietoksi dari zanamivir (dihidroksi) lebih memilih untuk membentuk ikatan hidrogen dengan E276. Sebaliknya, pergerakan rantai samping dari E276 justru menguntungkan (gambar B) (Hurt dkk., 2009).



Gambar 29. Perbandingan struktur oseltamivir dan zanamivir (sumber: Hurt dkk., 2009)

Dari hasil penelitian ini telah ditemukan virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir diantara virus influenza yang ada di Indonesia yang dikoleksi antara tahun 2007-2008. Sebagian besar virus yang resisten itu mempunyai mutasi H275Y, jadi terbukti bahwa mutasi H275Y merupakan mutasi paling umum penyebab resistensi oseltamivir pada virus A (H1N1) di Indonesia. Virus dengan mutasi H275Y yang resisten terhadap oseltamivir telah diisolasi dari pasien yang diterapi dengan oseltamivir (Gubareva et al., 2001; Ward et al., 2005; Weinstock et al., 2003; Whitley et al, 2001.), maupun dari pasien tidak diobati dengan oseltamivir (Sheu et al., 2008; Dharan et al., 2009; Lackenby et al., 2008a; Besselaar et al, 2008). Berdasarkan fakta itu, adanya virus mutan H275Y di Indonesia dimungkinkan karena

dua hal, pertama karena adanya pemakaian oseltamivir Indonesia sejak tahun 2005. Seperti telah dipublikasikan oleh beberapa publikasi sebelumnya bahwa pemakaian oseltamivir dapat menyeleksi mutasi yang menyebabkan resisten terhadap oseltamivir. Penyebab kedua seperti yang sudah dipublikasikan juga bahwa virus yang mempunyai mutasi H275Y dapat bertransmisi dari pengidap flu ke orang lain. Walaupun tidak ada riwayat penggunaan oseltamivir, ada kemungkinan virus yang menyerang adalah virus yang resisten terhadap oseltamivir. Berdasarkan data kuesioner pasien yang virusnya resisten, tidak ada riwayat minum obat anti NA oseltamivir sebelum pasien datang ke dokter dan sampel diambil pada saat pasien belum mendapatkan pengobatan dari dokter. Selain itu isolat yang resisten tersebut berasal dari banyak daerah yang tidak dilaporkan adanya kasus flu burung. Jadi bisa dipastikan mutan itu bukan disebabkan oleh pengobatan oseltamivir pada pasien yang menjadi relawan pada penelitian ini. Walaupun oseltamivir sudah digunakan di Indonesia sejak tahun 2005, namun pada penelitian ini 17 virus yang mempunyai mutasi H275Y berasal dari pasien yang tidak mempunyai catatan minum obat oseltamivir sebelum sampel virus diambil, pasien tidak diduga flu burung sehingga tidak mendapatkan pengobatan oseltamivir (tamiflu<sup>®</sup>). Berdasarkan hal itu mutasi tidak diakibatkan oleh adanya pengobatan menggunakan oseltamivir tapi dimungkinkan pasien terinfeksi oleh virus flu yang memang sudah memiliki mutasi H275Y.

Dari perhitungan substitusi nukleotida yang non sinonim dan sinonim pada gen NA, diperoleh nilai  $K_a < K_s$  seperti pada tabel 14. Hal itu menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi diakibatkan oleh seleksi negatif yaitu mutasi yang merugikan akan musnah, banya mutasi yang menguntungkan yang dapat bertahan. Seleksi alam dan mutasi adalah dua mekanisme yang saling melengkapi. Modifikasi evolusioner berasal dari mutasi secara acak yang terjadi pada struktur genetik virus influenza. Sifat-sifat yg ditimbulkan oleh mutasi kemudian diseleksi melalui mekanisme seleksi alam, dengan demikian virus influenza berevolusi. Seleksi alam menyatakan bahwa makhluk-makhluk hidup yang lebih mampu menyesuaikan diri dengan kondisi alam habitatnya akan mendominasi dengan cara memiliki keturunan yang mampu bertahan

hidup sebaliknya yang tidak mampu akan punah. Pada seleksi negatif, mutasi yang menghasilkan sifat yang merugikan akan punah.

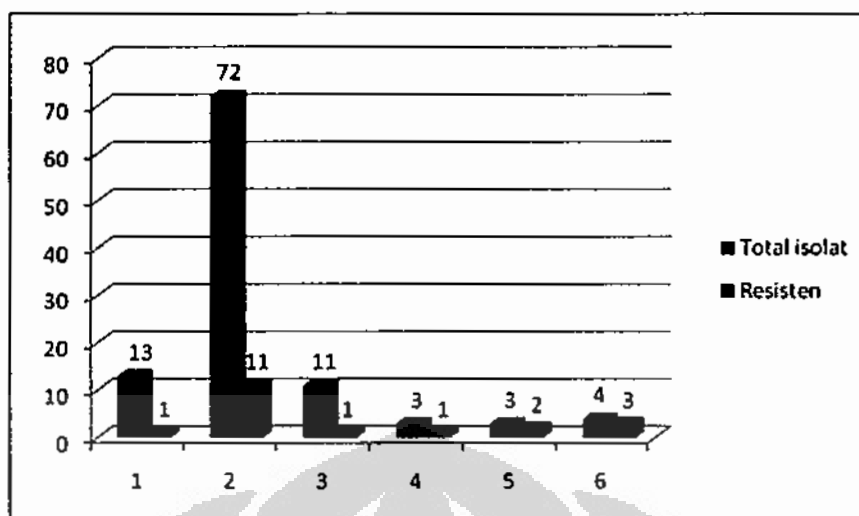
Untuk menentukan apakah uji NAI dan rRT-PCR berkorelasi dalam mendeteksi resistensi virus influenza A (H1N1) terhadap oseltamivir, dilakukan seperti pada lampiran 3. Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang berarti antara kedua uji tersebut. Keduanya dapat digunakan untuk mendeteksi resistensi virus influenza A (H1N1) musiman pada manusia terhadap oseltamivir. Namun karena resistensi terhadap oseltamivir tidak hanya disebabkan oleh mutasi H275Y maka spektrum penggunaan uji NAI menjadi lebih luas cakupannya daripada uji rRT-PCR. Dengan uji NAI dapat dijangkit penyebab resistensi yang baru pada virus. Disamping itu uji NAI dapat digunakan untuk menguji resistensi semua tipe virus influenza baik tipe A (termasuk flu burung H5N1 dan flu babi H1N1) maupun tipe B terhadap berbagai obat anti NA yang lain selain oseltamivir, misalnya zanamivir. Uji rRT-PCR sangat spesifik hanya untuk melihat adanya mutasi H275Y tidak dapat melihat mutasi lain dan hanya terbatas pada virus influenza subtipe A (H1N1) musiman pada manusia.

Untuk periode yang sama yaitu tahun 2007/2008, persentase virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir di Indonesia hampir sama dengan persentase resistensi di Amerika Serikat (12,3%) dan beberapa negara di belahan bumi utara (15%). Merujuk pada data resistensi beberapa negara di dunia yang melaporkan tingkat resistensi virus influenza A (H1N1) terhadap oseltamivir kepada WHO tahun 2008/2009, terjadi peningkatan persentase resistensi terhadap oseltamivir hingga mencapai diatas 90% yaitu di Kanada, Amerika, Hongkong, Jepang, Korea, Perancis, Jerman, Irlandia, Italia, Swedia, dan Inggris. Perlu dilakukan surveilan serupa untuk virus influenza A (H1N1) di Indonesia tahun 2008/2009 agar diketahui apakah terjadi peningkatan persentase yang cukup tinggi atau tidak. Terdapat perbedaan kriteria pasien yang diambil sampel virusnya dimana surveilan resistensi WHO mengambil sampel dari pasien yang mendapatkan pengobatan dengan oseltamivir sedangkan pada penelitian ini sampel diambil dari pasien yang mempunyai gejala seperti influenza (Influenza like illness/ILI).

Menurut Beckett dkk. penyebaran virus influenza dipengaruhi oleh musim. Virus influenza tipe A lebih banyak ditemukan pada musim hujan (Oktober sampai Maret) dan tipe B lebih banyak dijumpai pada musim kemarau (April sampai September) (Beckett dkk., 2004). Hal itu didukung oleh Lowen dkk. yang menyatakan bahwa transmisi virus influenza bergantung pada kelembaban dan suhu udara (Lowen dkk., 2007). Pernyataan tersebut sesuai dengan jumlah perwakilan virus pada penelitian ini yang dikoleksi pada musim hujan berjumlah lebih banyak (93 isolat) daripada di musim kemarau (13 isolat). Dalam penelitian ini dilihat apakah penyebaran virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir dipengaruhi oleh musim atau tidak. Dari hasil perhitungan statistik (lampiran 4), ternyata tidak ada perbedaan yang berarti antara musim hujan dan musim kemarau terhadap penyebaran virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir.

Tampak adanya subtipe virus spesifik pada mutasi gen NA yang menyebabkan resistensi terhadap oseltamivir. Mutasi H275Y lebih umum ditemukan pada subtipe A (H1N1) dan menyebabkan resisten terhadap oseltamivir pada subtipe A (H1N1) tapi tidak pada subtipe A (H3N2). Analisis apakah mutasi hanya ditemukan pada strain tertentu saja menunjukkan bahwa persentase yang mengalami mutasi H275Y pada kedua strain (New Caledonia dan Kepulauan Solomon) adalah sama. Sementara itu pada kelompok resisten berdasarkan uji NAI ditemukan persentase lebih tinggi pada strain Kepulauan Solomon dibandingkan dengan strain New Caledonia, namun perbedaan ini tidak bermakna secara statistik. Dengan demikian, resistensi virus influenza A (H1N1) terhadap oseltamivir tidak dipengaruhi oleh strain.

Berdasarkan uji NAI, di region 1 (Sumatera) ditemukan 7,7% virus A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir, region 2 (Jawa) mempunyai 15,3% virus resisten, 9,1% di region 3 (Bali, Mataram dan Kupang), region 4 (Kalimantan) memiliki 33,3%, sebanyak 66,7% di region 5 (Sulawesi) dan region 6 (Ambon, Timika dan Jayapura) mempunyai 75% virus influenza A (H1N1) yang resisten oseltamivir. Sebaran virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir dapat dilihat pada gambar 30.



Gambar 30. Sebaran virus influenza A (H1N1) dengan enzim NA resisten terhadap oseltamivir pada tiap region

Secara statistik terdapat perbedaan persentase jumlah virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir di antara keenam region tersebut, yaitu antara region 1 dan 5 ( $p=0,0183$ ; proporsi region 1 lebih kecil dari region 5), 1 dan 6 ( $p=0,0055$ ; proporsi region 1 lebih kecil dari region 6), region 2 dan 5 ( $p=0,0212$ ; proporsi region 2 lebih kecil dari region 5), region 2 dan 6 ( $p=0,0027$ ; proporsi region 2 lebih kecil dari region 6), region 3 dan 5 ( $p=0,0312$ ; proporsi region 3 lebih kecil dari region 5), region 3 dan 6 ( $p=0,0107$ ; proporsi region 3 lebih kecil dari region 6). Walaupun perwakilan virus influenza A (H1N1) di wilayah Sulawesi, Ambon dan Irianjaya sedikit namun persentase virus yang resisten tinggi, lebih dari 50%. Tingginya persentase resistensi di wilayah itu dimungkinkan karena jumlah sampel yang sedikit.

Dari Uji NAI dan rRT-PCR diperoleh tiga kelompok hasil. Kelompok pertama memiliki aktivitas NA yang resisten terhadap oseltamivir dan mempunyai mutasi H275Y (17 isolat virus). Kelompok kedua memiliki aktivitas NA yang resisten terhadap oseltamivir tetapi tidak mempunyai mutasi H275Y sebanyak 2 isolat virus. Kelompok terakhir memiliki aktivitas NA yang sensitif terhadap oseltamivir dan tidak mempunyai mutasi H275Y (87 isolat virus).

Sekuensing gen NA virus yang mewakili ketiga kelompok tersebut dilakukan untuk mengkonfirmasi adanya mutasi H275Y pada virus yang memiliki aktivitas NA yang resisten terhadap oseltamivir, tidak adanya mutasi H275Y pada virus yang memiliki aktivitas NA yang sensitif terhadap oseltamivir dan melihat jika ada mutasi lain selain H275Y yang mungkin menyebabkan resistensi terhadap oseltamivir pada virus yang memiliki aktivitas NA yang resisten terhadap oseltamivir tapi tidak mempunyai mutasi H275Y.

Hanya ditemukan dua isolat yang menunjukkan resistensi terhadap oseltamivir pada aktivitas NA tetapi tidak memiliki mutasi H275Y. Dimungkinkan kedua isolat tersebut memiliki mutasi lain yang menyebabkan resistensi. Kedua isolat itu dikoleksi dari Bandung tahun 2008 yang merupakan virus influenza A (H1N1) strain Kepulauan Solomon. Hasil sekuensing menunjukkan kedua isolat yang memiliki aktivitas NA resisten tapi tidak mempunyai mutasi H275Y itu memiliki mutasi di residu *framework* pada asam amino ke 151. Sampel 4 memiliki mutasi pada basa A452G sehingga terjadi mutasi asam amino D151G, namun ada campuran virus yang tidak mengalami mutasi basa pada posisi 452, sehingga sampel 4 memiliki mutasi campuran D151D/G. Sampel 5 memiliki mutasi pada basa G451A sehingga asam amino berubah D151N (Gambar 25 dan 26). Sampel 4 dan 5 juga mempunyai mutasi mutasi lain yang menyebabkan perubahan asam amino dan tidak dimiliki oleh sampel resisten lain (sampel 1 dan 3), yaitu Y100H dan K329E. Prediksi 3 dimensi protein NA pada gambar 28 menunjukkan bahwa selain mutasi pada posisi 151, mutasi lain yang terjadi pada sampel 4 dan 5 tidak mempengaruhi ikatan antara NA dan oseltamivir. Mutasi yang terjadi di daerah katalitik dan kerangka NA dapat mengakibatkan resistensi terhadap inhibitor NA (Gubareva dkk., 1997). Asam amino posisi 151 termasuk dalam residu kerangka yang posisinya di mulut kantung, diperkirakan berfungsi untuk menahan oseltamivir agar tidak lepas. Muatan negatif dari asam amino D akan mendorong oksigen dari oseltamivir yang terletak berdekatan dengan asam amino D sehingga oseltamivir tidak dapat keluar dari kantung. Mutasi asam amino pada posisi 151 menyebabkan asam amino D berubah menjadi G pada sampel 4 dan berubah menjadi N pada sampel 5. Perubahan asam



amino D yang bermuatan negatif menjadi asam amino G atau N yang tidak bermuatan menyebabkan afinitas ikatan antara protein NA dan oseltamivir menjadi berkurang.

Mutasi D151 menjadi G,N,V,A, G/D telah dilaporkan oleh Sheu dkk. Virus dengan mutasi-mutasi tersebut menunjukkan resistensi terhadap oseltamivir dengan nilai IC50 lebih dari nilai ambang batas. Mutasi ini dijumpai pada virus influenza A (H3N2) atau B. Sheu dkk. menetapkan 2 kriteria yang harus dipenuhi oleh isolat virus untuk dinyatakan resisten karena obat:

1. Memiliki nilai IC50 diatas nilai ambang batas yang ditentukan untuk setiap subtype dan obat.
2. Gen NA harus memiliki mutasi yang telah dinyatakan sebagai mutasi yang menyebabkan resistensi pada pasien yang diobati dengan anti NA (Sheu dkk., 2008). Namun karena virus yang memiliki mutasi pada posisi 151 itu mereka peroleh dari pasien yang tidak diberi pengobatan dengan oseltamivir maka mereka tidak mengatakan mutasi itu sebagai resistensi obat (Sheu dkk., 2008).

Pada penelitiannya, Okomo-Adhiambo menemukan 53 (7,3%) virus A (H1N1) yang memiliki mutasi asam amino pada posisi 151 dimana asam amino D menjadi E (7 sampel)/G (10 sampel)/N (36 sampel). Berdasarkan analisis sekuen gen NA pada isolat virus dan virus dari sampel klinik asli (28 sampel), mutasi pada posisi 151 ditemukan hanya pada virus yang dikultur di sel MDCK tetapi tidak ditemukan pada spesimen klinik asli. Hal itu menunjukkan bahwa varian ini adalah hasil seleksi kultur di sel atau varian ini hadir di sampel klinik dalam proporsi yang sangat rendah sehingga tidak terdeteksi. Temuan ini memberikan bukti bahwa perbanyakan virus influenza di luar inang alamiah dapat mengakibatkan seleksi virus yang memiliki mutasi pada gen NA yang mempengaruhi kepekaan terhadap NA inhibitor. Dari hasil percobaan mereka, mutasi H275Y yang disertai dengan mutasi D151G atau D151N menunjukkan peningkatan IC50 dibanding mutasi H275Y sendiri, sedangkan mutasi D151G atau D151N sendiri tanpa dibarengi H275Y tidak menyebabkan resistensi (Okomo-Adhiambo dkk., 2009). Hal itu bertentangan dengan hasil pada penelitian ini dimana virus yang memiliki mutasi D151G atau D151N tanpa disertai mutasi H275Y mempunyai IC50 yang menunjukkan resistensi terhadap oseltamivir yaitu 8,5 kali

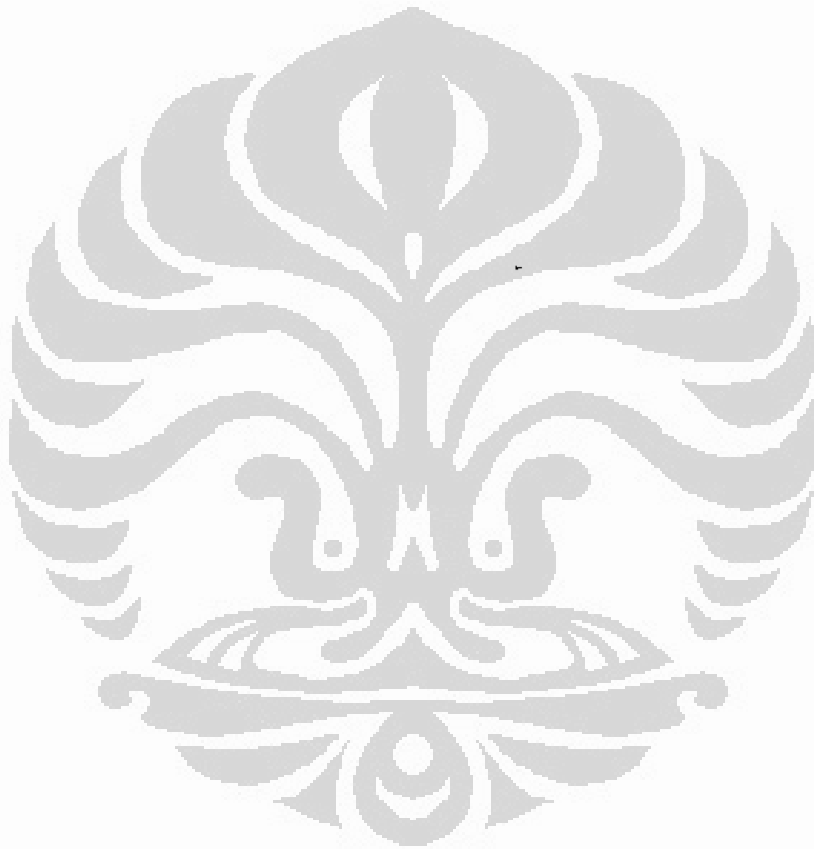
(D151G) dan 59 kali (D151N) dibanding nilai IC50 kontrol sensitif. Perlu dilakukan sekuensing sampel 4 dan 5 menggunakan virus dari sampel klinik asli untuk melihat apakah virus di sampel klinik mempunyai mutasi di posisi 151. Jika sampel klinik tidak mempunyai mutasi pada posisi 151, maka bisa dipastikan bahwa mutasi itu terjadi karena seleksi oleh sel MDCK saat virus dikultur.

Timbul pertanyaan, apakah mungkin mutasi H275Y juga disebabkan karena adanya seleksi oleh sel inang saat mengkultur virus? Kemungkinan itu tentu saja ada, namun Escuret dkk. telah membuktikan bahwa mutasi H275Y ditemukan pada gen N1 baik pada virus hasil kultur atau virus yang asli dari sampel klinik pasien yang diterapi dengan oseltamivir. (Escuret dkk., 2008).

Sekuen asam amino kelima sampel yang disekuensing dan virus kontrol dibuat prediksi struktur 3 dimensinya menggunakan program I-Tasser. Berdasarkan hasil dari I-Tasser, kelima isolat memiliki struktur paling mirip dengan protein neuraminidase tipe 4 (N4) dengan kode pada protein data bank (PDB) 2htv. Hal itu dapat diterima karena secara struktur N1 dan N4 termasuk dalam satu kelompok yaitu kelompok N1 (Russel dkk.2006). Asam amino yang berperan pada ikatan antara enzim NA dan oseltamivir juga diprediksi oleh program I-Tasser. Dibandingkan dengan asam amino yang menyusun situs aktif enzim NA menurut Colman dkk. (1983), ada beberapa perbedaan yang dimiliki oleh kelima isolat pada penelitian ini. Dari total 19 asam amino di situs aktif (8 asam amino pada residu katalitik dan 11 asam amino pada residu kerangka), ada 4 asam amino yang tidak menjadi situs pengikatan (situs aktif) kelima isolat dalam penelitian ini, yaitu asam amino Asp-198 (D198), Arg-371 (R371), Tyr-406 (Y406), dan Glu-424 (E424), sedangkan asam amino Tyr-275 hanya dijumpai pada situs pengikatan sampel 3. Hanya sampel 1 yang asam amino penyusun situs pengikatannya sangat berbeda dengan struktur Colman, tidak satupun asam amino penyusun situs pengikatan pada sampel 1 yang sama dengan struktur Colman. Mungkin hal ini yang menyebabkan resistensi virus sampel 1 paling tinggi nilai IC50 nya.

Pada pohon kekerabatan pada gambar 26 tampak bahwa sampel 2 yang merupakan virus yang sensitif terhadap oseltamivir terpisah clade dengan 4 sampel

lain yang resisten terhadap oseltamivir. Sampel 1 dan sampel 3 yang resisten dan memiliki mutasi H275Y terpisah dengan sampel 4 dan 5 yang resisten tapi tidak mempunyai mutasi H275Y. Sampel 1 dan 3 lebih dekat dengan virus yang berasal dari Cina, sedangkan sampel 4 dan 5 lebih dekat dengan virus yang berasal dari Kamboja.



## BAB 6

### KETERBATASAN PENELITIAN

Keterbatasan dan hambatan penelitian ini adalah:

1. Rencana awal seperti yang tercantum dalam proposal, penelitian dilaksanakan sepenuhnya di laboratorium virology US NAMRU 2. Namun karena US NAMRU 2 harus berhenti beroperasi, penelitian dilanjutkan ke laboratorium Eijkman untuk merampungkan data yang belum lengkap, yaitu untuk tes rRT-PCR dan sekuensing, sedangkan tes NAI untuk 9 isolat tidak dapat dilengkapi karena keterbatasan alat. Dari total 115 isolat virus yang direncanakan diuji pada penelitian ini, hanya 106 isolat yang mempunyai hasil lengkap. Dengan demikian perwakilan virus yang mewakili kota Padang (region 1), Tangerang, Yogyakarta (region 2), Denpasar, Kupang, Mataram (region 3), dan Jayapura (region 6) menjadi berkurang.
2. Pada hasil sekuensing isolat yang aktivitas NAny menunjukkan resistensi terhadap oseltamivir tapi tidak memiliki mutasi H275Y ditemukan adanya mutasi lain. Ditemukannya virus yang mengalami *genetic drift* memerlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan apakah mutasi tersebut berakibat pada berkurangnya sensitifitas virus terhadap obat anti NA oseltamivir, apakah mutasi disebabkan oleh seleksi sel inang yang digunakan untuk mengkultur virus. Pada penelitian ini tidak dilakukan hal tersebut.

## **BAB 7**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Kesimpulan**

Berdasarkan uraian pembahasan dari hasil penelitian maka hipotesa diterima, ada virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir dengan mutasi H275Y sebagai penyebab utamanya. Kesimpulan yang dapat ditarik adalah sebagai berikut:

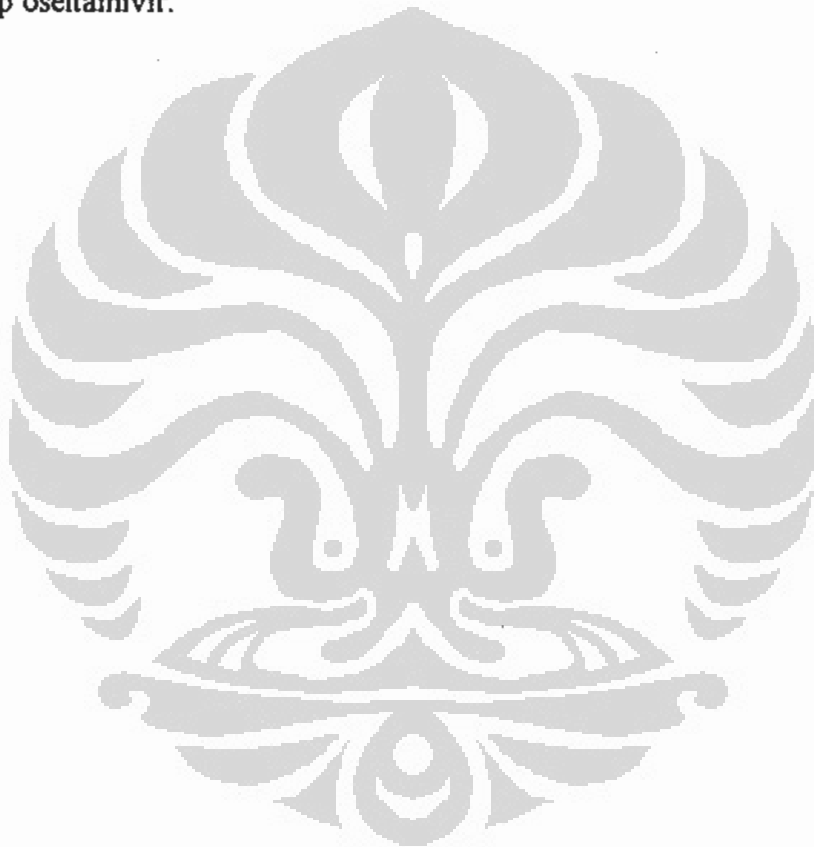
1. Ditemukan virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir diantara virus influenza A (H1N1) yang bersirkulasi di Indonesia sejak 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008.
2. Prevalensi virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir di Indonesia adalah 17,9% (19 dari 106)
3. Resistensi terhadap oseltamivir pada virus influenza A (H1N1) di Indonesia paling banyak disebabkan oleh mutasi H275Y dengan prevalensi 16% (17 dari 106).
4. Mutasi lain yang memperlihatkan fenotip resisten terhadap oseltamivir adalah D151D/G dan D151N, namun masih memerlukan pembuktian lebih lanjut.
5. Metode NAI dan rRT-PCR sama baiknya untuk mendeteksi resistensi terhadap oseltamivir pada virus influenza A (H1N1) musiman pada manusia di Indonesia, namun metode NAI dapat digunakan untuk tipe virus influenza lain dan anti NA yang lain.

#### **7.2. Saran**

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka diajukan saran sebagai berikut:

1. Hasil penelitian menunjukkan ditemukannya virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir, untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk virus influenza musiman yang lainnya yaitu subtipe A (H3N2), A (H5N1) dan tipe B, juga terhadap obat anti NA yang lain seperti zanamivir.

2. Perlu diadakan monitoring virus yang resisten terhadap obat anti influenza melalui program surveilans.
3. Ditemukannya mutasi D151D/G dan D151N memerlukan penelitian lebih lanjut menggunakan virus langsung dari sampel klinik untuk melihat apakah mutasi itu disebabkan oleh seleksi saat virus dikultur di sel MDCK. Selain itu perlu dilakukan juga penelitian lebih lanjut apakah mutasi D151D/G dan D151N benar benar mengakibatkan berkurangnya sensitifitas NA virus terhadap oseltamivir.



## DAFTAR REFERENSI

1. Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*.2010;5:725-738.
2. Anonim, Applied Biosystem . diunduh dari [http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr\\_vs\\_tradpcr.pdf](http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf)
3. Beckett CG, Kosasih H, Ma'roef C, Listiyaningsih E, Elyazar I.R.F, Wuryadi S. et al. Influenza surveillance in Indonesia: 1999-2003. *Clin Infect Dis*. 2004;39(4):443-9
4. Besselaar TG, Naidoo D, Buys A, Gregory V, McAnerney J, Manamela JM, et al. Widespread oseltamivir resistance in influenza A viruses (H1N1), South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1809-10.
5. Betakova T, Nermut MV and Hay AJ.The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus.*J.Gen.Virol*.1996;77:2689-94.
6. Bouvier N.M dan Palese P. The biology of influenza viruses.*Vaccine*. 2008; 26S: D49-53.
7. Brassard DL, Leser GP, and Lamb RA.Influenza B NB glycoprotein is a component of virions.*Virology*.1996;220:350-60.
8. Burkinskaya AG, Vorkunova NK, Kornilayeva GV, Narmanbetakova RA and Vorkunova GK. Influenza virus uncoating in infected cells and effect of rimantadine.*J.Gen.Virol*.1982;60:49-59.
9. Bustin, S.A. A-Z of quantitative PCR. California: International University Line. 2004.
10. Carr M.J, Sayre N, Duffy M, Connell J, Hall W.W. Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. *J. Virol.method*. 2008;153:257-62.
11. CDC, 2009. [Diakses pada tanggal 15 Mei 2009] tersedia dari <http://www.cdc.gov/h1n1flu/eua/pdf/tamiflu-hcp.pdf>

12. Cheng PK, Leung TW, Ho EC, Leung PC, Ng AY, Lai MY, et al. Oseltamivir and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). *Emerg Infect Dis.* 2009;15:966-8.
13. Chutinimitkul S, Suwannakarn K, Chieochansin T, Mai Le Q, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, et al. H5N1 oseltamivir-resistance detection by real-time PCR using two high sensitivity labeled TagMan probes. *J. Virol. Methods.* 2007;139:44-49.
14. Colman P. Neuraminidase inhibitors as antivirals. *Vaccine.* 2002 ;20:S55-S58
15. Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC. Sequence and structure alignment of paramyxovirus haemagglutinin-neuraminidase (HN) with influenza virus neuraminidase. *J Virol.* 1993;67:2972-2980.
16. Colman PM. Influenza virus neuraminidase: Enzyme and antigen. In: Krug RM, ed. *The influenza viruses.* New York: Plenum Press, 1989; p 175-218.
17. Colman PM. Structure and function of the neuraminidase. In: Nicholson, K.G., R.G. Webster dan A.J. Hay. eds. *Textbook of influenza.* Oxford: Blackwell science, 1998; p.65-73.
18. Compans RW, Bishop DHL, and Meier-Ewert H. Structural components of influenza C viruses. *J. Virol.* 1977;21:658-68.
19. Daly, J.M., J.M. Wood dan J.S. Robertson. Cocirculating and divergence of human influenza viruses. In: Nicholson, K.G., R.G. Webster dan A.J. Hay. eds. *Textbook of influenza.* Oxford: Blackwell science, 1998; p.168-77.
20. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA.* 2009;301:1034- 41.
21. Dharmayanti, N.L.P.I. dan Indriani, R. Patogenesis molekuler virus avian influenza yang diisolasi pada tahun 2005. *MKH.* 2007;23(2):68-73
22. Escuret V, Frobert E, Buscambert-Duchamp M, Sabatier M, Grog I, Valette, et al. Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Clin. Virol.* 2008;41: 25-28



23. Ferraris O, dan Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J. Clin. Virol.* 2008;41:13–19.
24. Ferraris O, Kessler N and Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: A study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res.* 2005;68:43–48.
25. Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: A study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res.* 2005;68:43–48.
26. Flint dkk. *Principles of virology.* Washington D.C. 2000
27. Gubareva LV, Robinson MT, Bethell RC, Webster RG. Catalytic and framework mutation in the neuraminidase active site of influenza viruses that are resistant to a 4-guanidino-neu5ac2en. *J. virol.* 1997;71:3385-90.
28. Guo, L., R.J.Garten, A.S.Foust, W.M.Sessions, M,Okomo-adhiombo, L.V.GubarEva et.el. Rapid identification of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses with H274Y mutation by RT-PCR/restriction fragment length polymorphism assay. *Antiviral Res.* 2009;82: 29-33.
29. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis* 2009;15:155-62.
30. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ and Smith MH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 1985;4:3021-24.
31. Hay AJ. The virus genome and its replication. In: Nicholson KG, Webster RG dan Hay AJ. editors. *Influenza texbook.* Oxford: Blackwell science, 1998; p 43-53
32. Herrler G, Compans RW, and Meier-Ewart H. A Precursor glycoprotein in influenza C virus. *Virology.* 1979;99:49-56.
33. Herrler G, Nagele A, Meier-Ewart H and Bhowm. Isolation and structural analysis of influenza C virion glycoprotein. *Virology.* 1981;113:439-51.

34. Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK dan Zimmer EA. Nucleic acids IV: Sequencing and cloning. *Dalam*: Hillis, DM, Moritz C & Mable BK, editors. Molecular systematics. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1996; p. 321-84.
35. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, dan VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 1982; 215:1577-85.
36. Hongo S, Sugawara K, Muraki Y, Kitame F, and Nakamura K. Characterization of second protein (CM2) encoded by RNA segment 6 of influenza C virus. *J. Virol.* 1997;71:2786-92.
37. Howe CJ & Ward SE. DNA sequencing. *Dalam*: Brown TA, editor. Essential molecular biology: A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1991; p.157-84.
38. Hurst, L.D. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends in genetic*. 2002;18:486-87.
39. Itzstein MV. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitor. *Nature*. 2007;6:967-74.
40. Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Kondou K, Hirotsu N, Kawashima T, et al. Clinical effectiveness of oseltamivir for influenza A(H1N1) virus with H274Y neuraminidase mutation. *J Infect*. 2009;59: 207-212.
41. Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Maeda T, Kanazawa H, Kawashima T, et al. A comparison of the effectiveness of zanamivir and oseltamivir for the treatment of influenza A and B. *Journal of Infection*. 2008;56:51-57
42. Kawakami C, Obuchi M, Saikusa M, Noguchi Y, Ujike M, Odagiri T, et al. Isolation of Oseltamivir-resistant influenza A/ H1N1 virus of different origins in Yokohama city, Japan, during the 2007-2008 influenza season. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62:83-6.
43. Kendal AP. A comparison of influenza C with prototype myxovirus reseptor-destroying activity (neuraminidase) and structural polypeptides. *Virology*. 1975;65:87-99.

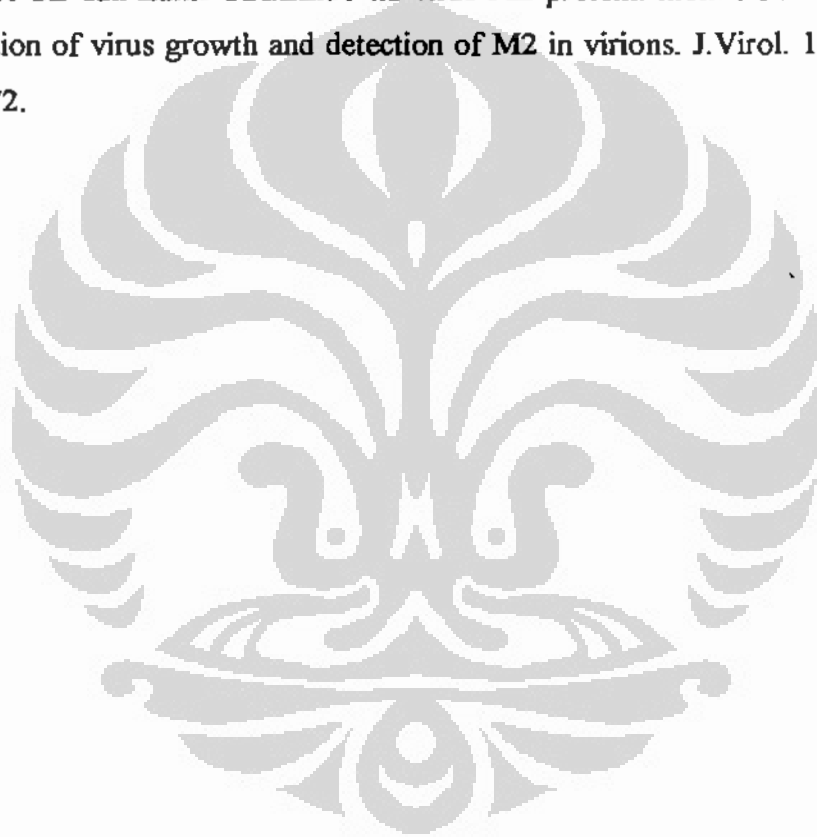
44. Kitame F, Suguwara K, Ohwada K, and Homma M. Proteolytic activation of haemolysis and fusion by influenza C virion. *Arch Virol.* 1982;73:757-61.
45. Kosasih H. Clinical and laboratory comparison of human infections with dengue, influenza or avian influenza A (H5N1) viruses in Indonesia. Oral presentation in the 1st international conference on avian influenza in humans; 2006 June 29-30; Paris, France.
46. Kosasih, H. Influenza surveillance 2004-2007. Poster pada Lokakarya ILI di Batam. 2009.
47. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Eurosurveillance.* 2008;13
48. Lamb RA and Chopin PW. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:467-506.
49. Lamb RA dan Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al., editors. *Field Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1487-531.
50. Lamb RA, Lai CJ and Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNA code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 1981;78:4170-74.
51. Laver WG. Crystallization and peptide maps of neuraminidase heads from H2N2 and H3N2 influenza virus strain. *Virology.* 1978;137:314-24.
52. Manojkumar R dan Mrudula V. Application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction in clinical virology laboratories for the diagnosis of human diseases. *Am. J. Infectious Dis.* 2006;2(4):204-09.
53. Martin K dan Helenius A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell.* 1991;67:117-30.
54. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol.* 2004;78:12665-7.

55. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van der Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007- 08 season. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:552-60.
56. Miller C.E., Skaare K, Mihali A, Chiulli AC, Lackenby A, Baldevarona J, et al. The NA-STAR Influenza neuraminidase inhibitor resistance detection kit: chemiluminescence assay for detection and quantification of influenza neuraminidase activity. 2009. Diunduh dari: [http://www.nisn.org/documents/Cbemiluminescence\\_paper.pdf](http://www.nisn.org/documents/Cbemiluminescence_paper.pdf).
57. Mishin, V.P., F.G.Hayden, dan L.V.Gubareva. Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrob Agent chemother.* 2005;49(11):4515-20.
58. Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med.* 2009;360:953-6.
59. Moscona A. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N Engl J Med.* 2005; 353:13
60. Nelson ML, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveal the global migration of seasonal influenza A viruses. *Plos Pathog.* 2007;3(9):1220-8.
61. Nicholson KG. Human Influenza. In: Nicholson KG, Webster RG dan Hay AJ. editors. *Influenza textbook.* Oxford: Blackwell science, 1998; p.219-64.
62. Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Sleeman K, Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, et al. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: implications for drug resistance monitoring in A (H1N1) viruses. *Antiviral Res.* 2009; 85:381-88.
63. Owen MJ. DNA sequence determination using dideoxy analogs. Dalam: Walker JM, editor. *Methods in molecular biology volume 2: Nucleic acid.* New Jersey: Humana Press. Inc. Clifton, 1984 ; xiv + 375 hlm.
64. Palese P and Young JF. Variation of influenza A, B and C viruses. *Science.* 1982; 215: 1468-74.

65. Pinto LH, Holsinger LJ and Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 1992;65:517-28.
66. Roche Laboratories, Inc Tamiflu produk informasi. 2008. [Diakses pada tanggal 15 Mei 2009] tersedia dari <http://www.rocheusa.com/products/tamiflu/pi.pdf> )
67. Ruigrok RW and Baudin F. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J. Gen Virol*. 1998;76:1009-14.
68. Russell RJ, Lesley F, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ & Skehel JJ. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*. 2006; 443:45-49.
69. Sato M, Saito R, Sato I, Tanabe N, Shobugawa Y, Sasaki A, et al. Effectiveness of oseltamivir treatment among children with influenza A or B virus infections during four successive winters in Niigata city, Japan. *Tohoku J. Exp. Med*. 2008;214:113-120.
70. Shaw MW, Choppin PW and Lamb RA. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:4879-83.
71. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide in 2004-2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3284-92.
72. Skehel J. An overview of influenza haemagglutinin and neuraminidase. *Biologicals*. 2009; 37:177-78
73. Stephenson I, J. Democratis, A. Lackenby, T. McNally, J. Smith, M. Pareek, et al. Neuraminidase Inhibitor Resistance after Oseltamivir Treatment of Acute Influenza A and B in Children. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48:389-96

74. Sugrue RJ dan Hay AJ. Structural characteristics of M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*. 1991;180:617-24.
75. Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, and Poland GA. 2009 H1N1 Influenza. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(1):64-76
76. Tullu, MS. Oseltamivir. *J Postgrad Med*. 2009; 55(3): 225-30.
77. Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Caldwell JB, Kortt AA, and Colman PM. The Structure of the Complex Between Influenza Virus Neuraminidase and Sialic Acid, the Viral Receptor. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. 1992;14:327-32.
78. Wang Z.M., Tai C.Y., Mendel D.B. Studies on the mechanism by which mutations at His274 alter sensitivity of influenza A virus neuraminidase type 1 to GS4071 and zanamivir. *Antivir. Res*. 2000;46:A60 Abstract 81.
79. Weinstock DM, Zuccotti G. The evolution of influenza resistance and treatment. *JAMA* 2009;301:1066-9.
80. Wharton SA, Hay J, Sugrue A, Skehel JJ, Weis WI, and Wiley DC. Membrane fusion by influenza viruses and mechanism of action of amantadine. In Laver WG and Air GM (eds). *Use of X-ray crystallography in the design of antiviral agents*. Orlando: Academic press, 1990;p.1-12
81. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO [diunduh tanggal 12 Juni 2010a] tersedia di [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2010\\_06\\_08/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_06_08/en/index.html)
82. WHO. Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir 2008/2009 influenza season, northern hemisphere [cited 2009 Nov 16] available from: [http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1\\_table/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html)
83. WHO. Pandemik (H1N1) 2009 update 104 [diunduh tanggal 12 Juni 2010b] tersedia di [http://www.who.int/csr/don/2010\\_06\\_11/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_06_11/en/index.html)

84. WHO. Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir: last quarter 2007 to first quarter 2008. [cited 2009 Nov 16] available from: [http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir\\_summarv/en/index.htm](http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summarv/en/index.htm).
85. Yang Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics. 2008;9:40.
86. Yang Zhang. I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. Proteins. 2009;S9:100-113.
87. Zabedee SL dan Lamb RA. Influenza virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J. Virol. 1988; 62: 2762-72.



## LAMPIRAN 1

## LIS SAMPEL

Tabel 11. Lis Sampel yang digunakan pada penelitian

No	Region	Tahun	Bulan	Strain Virus Influenza	Kota	Rumah Sakit/Puskesmas/Klinik	NO ID
1	1	2007	1	H1N1 New Caledonia	PADANG	RS. M. DJAMIL	2007905239
2	1	2007	1	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2007905508
3	1	2007	2	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2007908711
4	1	2007	3	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2007910010
5	1	2007	6	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2007923152
6	1	2007	8	H1N1 New Caledonia	MEDAN	RS. ADAM MALIK	2007929595
7	1	2007	8	H1N1 New Caledonia	MEDAN	RS. ADAM MALIK	2007929590
8	1	2007	10	H1N1 New Caledonia	PADANG	RS. M. DJAMIL	2007934671
9	1	2007	11	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2007938886
10	1	2007	12	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2007941721
11	1	2008	1	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2008902262
12	1	2008	2	H1N1 New Caledonia	MEDAN	RS. ADAM MALIK	2008902584
13	1	2008	4	H1N1 New Caledonia	PALEMBANG	RS. CHARITAS	2008909378
14	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2007905847
15	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2007905790
16	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. PERSAHABATAN	2007905111
17	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SULIANTI SAROSO	2007904021
18	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SUMBER WARAS	2007905606
19	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2007905342
20	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEAN2	2007903746
21	2	2007	1	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS JETIS	2007905367
22	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2007907370
23	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2007908599
24	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SULIANTI SAROSO	2007908769
25	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SUMBER WARAS	2007909274
26	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	JEMBER	RSK. PARU	2007907896
27	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS JAMBE	2007908867
28	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS PANONGAN	2007909387
29	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2007907815
30	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEAN2	2007907144
31	2	2007	2	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS JETIS	2007907153
32	2	2007	3	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2007911133



33	2	2007	3	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SULIANTI SAROSO	2007910046
34	2	2007	3	H1N1 New Caledonia	JEMBER	RSK PARU	2007909990
35	2	2007	3	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS JAMBE	2007911046
36	2	2007	3	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEANI	2007910110
37	2	2007	3	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS JETIS	2007910982
38	2	2007	6	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SUMBER WARAS	2007922372
39	2	2007	7	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2007924191
40	2	2007	9	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2007941763
41	2	2007	9	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2007941756
42	2	2007	11	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2007941778
43	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2007941713
44	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2007940677
45	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SULIANTI SAROSO	2007940237
46	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SUMBER WARAS	2007941652
47	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS JAMBE	2007941940
48	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2007941782
49	2	2007	12	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEAN2	2007940455
50	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2008902294
51	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. HASAN SADIKIN	2008902326
52	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2008902280
53	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SULIANTI SAROSO	2008901916
54	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS JAMBE	2008902459
55	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS PANONGAN	2008902393
56	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS TELUK NAGA	2008902500
57	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2008903197
58	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEAN1	2008902210
59	2	2008	1	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEAN2	2008901487
60	2	2008	1	H1N1 Solomon	BANDUNG	GRANDTEX	2008901302
61	2	2008	1	H1N1 Solomon	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2008901636
62	2	2008	1	H1N1 Solomon	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2008903211
63	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2008904092
64	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS JAMBE	2008903897
65	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS LEGOK	2008904879
66	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS PANONGAN	2008904843
67	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2008903830
68	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEANI	2008904052
69	2	2008	2	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS JETIS	2008904034
70	2	2008	2	H1N1 Solomon	BANDUNG	GRANDTEX	2008903412
71	2	2008	2	H1N1 Solomon	TANGERANG	PUSKESMAS TELUK NAGA	2008903372

72	2	2008	2	H1N1 Solomon	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2008903234
73	2	2008	2	H1N1 Solomon	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEANI	2008903334
74	2	2008	2	H1N1 Solomon	YOGYAKARTA	PUSKESMAS GODEAN2	2008903351
75	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2008908809
76	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	RS. IMMANUEL	2008904303
77	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	JAKARTA	RS. SUMBER WARAS	2008909645
78	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS LEGOK	2008904885
79	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	PUSKESMAS TELUK NAGA	2008908602
80	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	TANGERANG	RSU. TANGERANG	2008904985
81	2	2008	3	H1N1 New Caledonia	YOGYAKARTA	PUSKESMAS JETIS	2008909282
82	2	2008	3	H1N1 Solomon	BANDUNG	GRANDTEX	2008904531
83	2	2008	4	H1N1 New Caledonia	BANDUNG	GRANDTEX	2008909750
84	2	2008	4	H1N1 New Caledonia	JEMBER	RSK. PARU	2008909894
85	2	2008	4	H1N1 Solomon	BANDUNG	GRANDTEX	2008909758
86	3	2007	1	H1N1 New Caledonia	DENPASAR	RS. SANGLAH	2007903827
87	3	2007	11	H1N1 New Caledonia	KUPANG	RS. PROF. JOHANNES	2007939506
88	3	2008	1	H1N1 New Caledonia	MATARAM	RSU. MATARAM	2008902310
89	3	2008	1	H1N1 Solomon	MATARAM	RSU. MATARAM	2008902044
90	3	2008	2	H1N1 New Caledonia	DENPASAR	RS. SANGLAH	2008904124
91	3	2008	2	H1N1 New Caledonia	MATARAM	RSU. MATARAM	2008904741
92	3	2008	2	H1N1 Solomon	DENPASAR	RS. SANGLAH	2008903099
93	3	2008	2	H1N1 Solomon	KUPANG	RS. PROF. JOHANNES	2008903165
94	3	2008	3	H1N1 Solomon	DENPASAR	RS. SANGLAH	2008904638
95	3	2008	3	H1N1 Solomon	KUPANG	RS. PROF. JOHANNES	2008904244
96	3	2008	4	H1N1 New Caledonia	KUPANG	RS. PROF. JOHANNES	2008909582
97	4	2007	1	H1N1 New Caledonia	BALIKPAPAN	RS. DR. KANUJOSO DJATTWIBOWO	2007905830
98	4	2007	2	H1N1 New Caledonia	BALIKPAPAN	RS. DR. KANUJOSO DJATTWIBOWO	2007908490
99	4	2007	3	H1N1 New Caledonia	BALIKPAPAN	RS. DR. KANUJOSO DJATTWIBOWO	2007911107
100	5	2007	1	H1N1 New Caledonia	MANADO	RS. MALALAYANG	2007902571
101	5	2007	2	H1N1 New Caledonia	MANADO	RS. MALALAYANG	2007907899
102	5	2008	4	H1N1 New Caledonia	MANADO	RS. MALALAYANG	2008909447
103	6	2007	1	H1N1 New Caledonia	AMBON	RS. GPM AMBON	2007905586
104	6	2007	1	H1N1 New Caledonia	JAYAPURA	RSU. ABEPURA	2007905779
105	6	2007	1	H1N1 New Caledonia	TIMIKA	PUSKESMAS TIMIKA	2007903570
106	6	2008	2	H1N1 New Caledonia	TIMIKA	PUSKESMAS TIMIKA	2008904008

## LAMPIRAN 2

### HASIL PENELITIAN

Pada tes NAI, pertama kali titer virus diukur untuk menentukan pengenceran virus yang mempunyai sinyal sekitar 20X sinyal blank.

**Tabel 12. Hasil titrasi virus pada tes NA inhibitor**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Blank	NA kontrol	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Sinyal 1	0.0009	0.0258	0.0765	0.0366	0.0157	0.0084	0.0058	0.0029	0.0015	0.0008	0.0008	0.0008
Sinyal 2	0.0008	0.0298	0.0772	0.0294	0.0148	0.0077	0.0037	0.0026	0.0012	0.0008	0.0007	0.0008
Rata rata sinyal	0.00085	0.0278	0.0769	0.033	0.0153	0.0081	0.0048	0.0028	0.0014	0.0008	0.0008	0.0008

Pengenceran virus ditentukan dengan perhitung sebagai berikut:

Dari hasil pada tabel 5a, 20X sinyal blank =  $20 \times 0,00085 = 0,017$

Pengenceran virus yang mempunyai nilai sinyal mendekati 20X sinyal blank pada data diatas yaitu pada pengenceran 1/20 sebesar 0,0153

Misal P adalah pengenceran yang dicari.

$$1/20 = 0,0153$$

$$P=0,017$$

$$\text{Maka } 0,0153P = 1/20 \times 0,017$$

$$0,0153P = 0,017/20$$

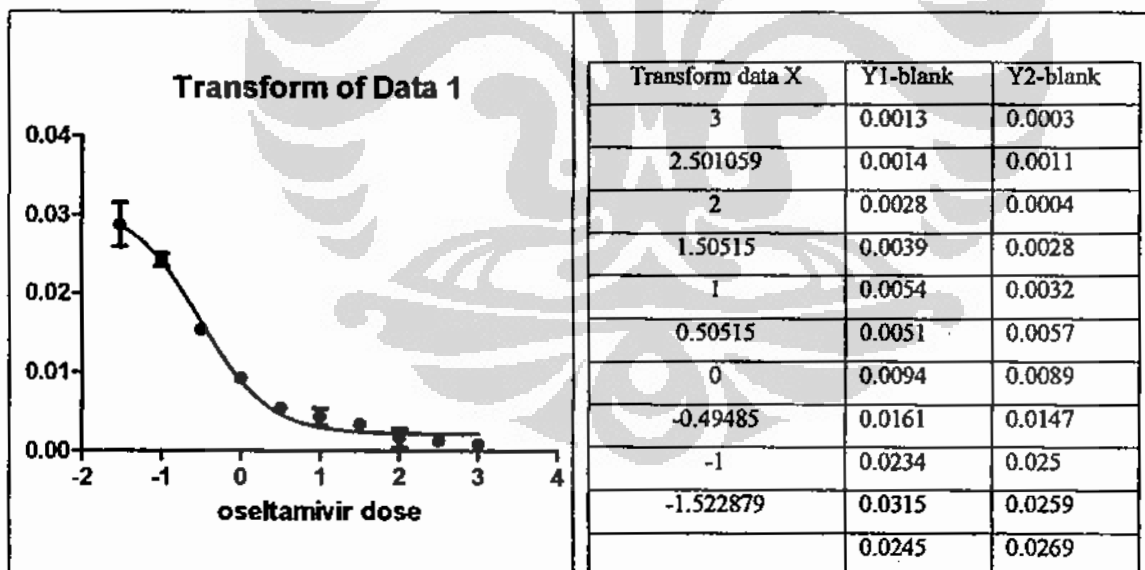
$$P = 0,017 / (20 \times 0,0153) = 0,017 / 0,306 \rightarrow \text{disederhanakan (dibagi dengan } 0,017 / 0,017) \text{ menjadi } 1/18$$

Jadi pengenceran virus yang menghasilkan sinyal sekitar 20X sinyal blank adalah 1/18 atau 1 bagian virus ditambah dengan 17 bagian pengencer.

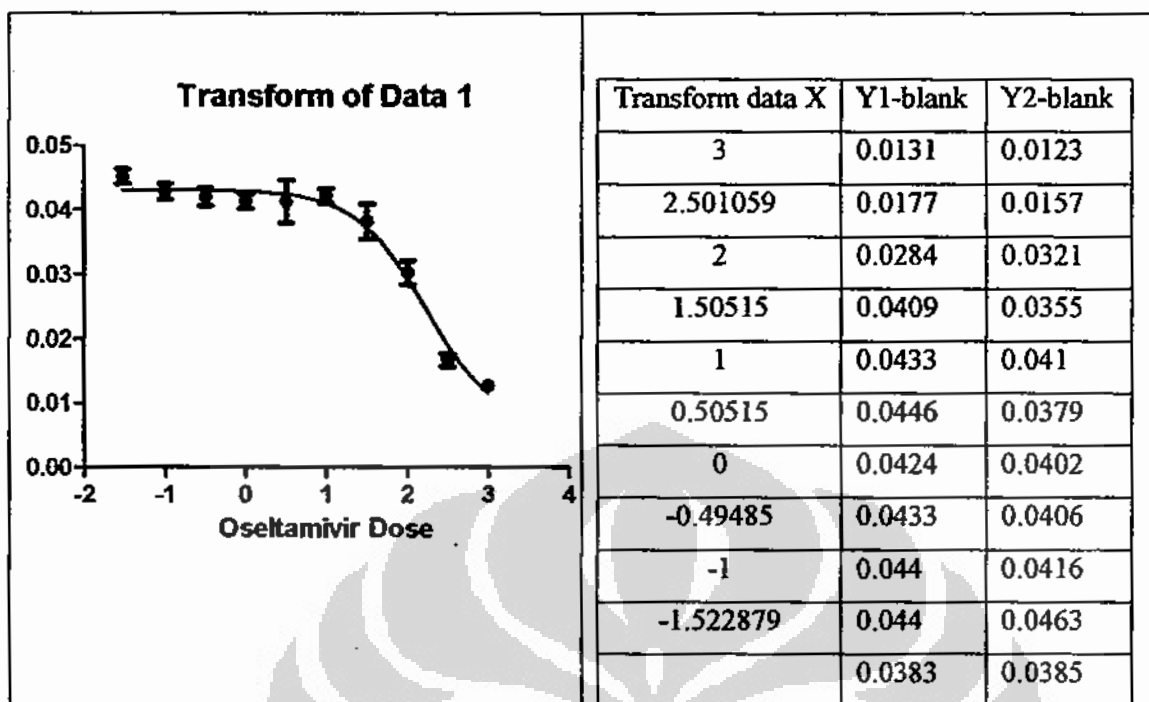
Tabel 13. Hasil tes anti neuraminidase

X= dosis oseltamivir	Y1=signal 1	Y2=signal 2	Y1-blank	Y2-blank
1000	0.0018	0.0011	0.0013	0.0003
317	0.0019	0.0019	0.0014	0.0011
100	0.0033	0.0012	0.0028	0.0004
32	0.0044	0.0036	0.0039	0.0028
10	0.0059	0.004	0.0054	0.0032
3.2	0.0056	0.0065	0.0051	0.0057
1	0.0099	0.0097	0.0094	0.0089
0.32	0.0166	0.0155	0.0161	0.0147
0.1	0.0239	0.0258	0.0234	0.025
0.03	0.032	0.0267	0.0315	0.0259
0	0.025	0.0277	0.0245	0.0269

Data X yang diperoleh dari hasil tes anti neuraminidase pada tabel 13 ditransform menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism ( $X=\log X$ ), sehingga diperoleh grafik seperti gambar 31 dan 32.



Gambar 31. Grafik transform data A (H1N1) kontrol sensitif pada tes NA inhibitor Sumbu X adalah konsentrasi oseltamivir dalam skala logaritma dan sumbu Y adalah aktivitas NA dalam RLU (*relative light units*).



Gambar 32. Grafik transform data A (H1N1) kontrol resisten pada tes NA inhibitor. Sumbu X adalah konsentrasi oseltamivir dalam skala logaritma dan sumbu Y adalah aktivitas NA dalam RLU (*relative light units*).

Setelah ditransform, data dianalisis menggunakan kurva linear inhibitor vs response untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> seperti pada tabel 14.

Tabel 14. Hasil penghitungan IC<sub>50</sub> menggunakan software GraphPad v.5

log(inhibitor) vs. response	
Best-fit values	
Bottom	0.002121
Top	0.0313
LogIC <sub>50</sub>	-0.5242
IC <sub>50</sub>	0.2991
Span	0.02918
Std. Error	
Bottom	0.0004692

Top	0.001355
LogIC50	0.07482
Span	0.001349
95% Confidence Intervals	
Bottom	0.001131 to 0.003111
Top	0.02844 to 0.03416
LogIC50	-0.6821 to -0.3664
IC50	0.2079 to 0.4302
Span	0.02633 to 0.03202
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	17
R <sup>2</sup>	0.9789
Absolute Sum of Squares	0.00003883
Sy.x	0.001511
Number of points	
Analyzed	20

Tabel 15. Hasil Uji NAI dan rRT-PCR pada 106 isolat virus influenza A (H1N1)

IC50 NAI	IC50 > Q3+3 IQR	CT FAM/VIC	MUTASI H275Y	ACC NO	REGION	KOTA	STRAIN
0.026	S	VIC=34.24	T	2007907815	2	TANGERANG	New Caledonia
0.029	S	VIC=36.95	T	2008903412	2	BANDUNG	H1N1 Solomon
0.052	S	VIC=20.38	T	2007905606	2	JAKARTA	New Caledonia
0.093	S	VIC=32.91	T	2008909582	3	KUPANG	New Caledonia
0.099	S	VIC=19.31	T	2008903099	3	DENPASAR	H1N1 Solomon
0.101	S	VIC=23.29	T	2008909758	2	BANDUNG	H1N1 Solomon
0.118	S	VIC=23.04	T	2008904885	2	TANGERANG	New Caledonia
0.127	S	VIC=30.63	T	2008903211	2	TANGERANG	H1N1 Solomon
0.131	S	VIC=20.38	T	2008904008	6	TIMIKA	New Caledonia
0.133	S	VIC=34.74	T	2008903197	2	TANGERANG	New Caledonia
0.138	S	VIC=16.39	T	2007907144	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.144	S	VIC=29.19	T	2008903897	2	TANGERANG	New Caledonia

0.162	S	VIC=21.37	T	2007909274	2	JAKARTA	New Caledonia
0.168	S	VIC=20.25	T	2007934671	1	PADANG	New Caledonia
0.193	S	VIC=23.41	T	2007941721	1	PALEMBANG	New Caledonia
0.204	S	VIC=21.25	T	2008902044	3	MATARAM	H1N1 Solomon
0.205	S	VIC=22.75	T	2008909894	2	JEMBER	New Caledonia
0.222	S	VIC=19.30	T	2007938886	1	PALEMBANG	New Caledonia
0.223	S	VIC=18.95	T	2008901916	2	JAKARTA	New Caledonia
0.232	S	VIC=21.67	T	2008908809	2	BANDUNG	New Caledonia
0.233	S	VIC=23.19	T	2008909282	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.240	S	VIC=20.08	T	2007908867	2	TANGERANG	New Caledonia
0.243	S	VIC=23.75	T	2008904303	2	BANDUNG	New Caledonia
0.252	S	VIC=22.97	T	2007940455	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.254	S	VIC=20.03	T	2008903234	2	TANGERANG	H1N1 Solomon
0.281	S	VIC=19.79	T	2007939506	3	KUPANG	New Caledonia
0.299	S	VIC=23.67	T	2007910010	1	PALEMBANG	New Caledonia
0.309	S	VIC=22.54	T	2007911107	4	BALIKPAPAN	New Caledonia
0.316	S	VIC=21.32	T	2007903746	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.317	S	VIC=25.92	T	2008904879	2	TANGERANG	New Caledonia
0.323	S	VIC=21.59	T	2008902459	2	TANGERANG	New Caledonia
0.330	S	VIC=22.89	T	2007904021	2	JAKARTA	New Caledonia
0.337	S	VIC=22.37	T	2008904092	2	BANDUNG	New Caledonia
0.337	S	VIC=21.74	T	2007905111	2	JAKARTA	New Caledonia
0.338	S	VIC=24.02	T	2007909387	2	TANGERANG	New Caledonia
0.343	S	VIC=24.18	T	2008904741	3	MATARAM	New Caledonia
0.353	S	VIC=22.81	T	2007940237	2	JAKARTA	New Caledonia
0.357	S	VIC=22.92	T	2007908711	1	PALEMBANG	New Caledonia
0.357	S	VIC=19.3	T	2008903334	2	YOGYAKARTA	H1N1 Solomon
0.367	S	VIC=20.59	T	2008903165	3	KUPANG	H1N1 Solomon
0.373	S	VIC=21.51	T	2008902584	1	MEDAN	New Caledonia
0.373	S	VIC=23.18	T	2007941940	2	TANGERANG	New Caledonia
0.374	S	VIC=20.93	T	2008902262	1	PALEMBANG	New Caledonia
0.406	S	VIC=19.23	T	2008903351	2	YOGYAKARTA	H1N1 Solomon
0.429	S	VIC=24.79	T	2008903830	2	TANGERANG	New Caledonia
0.430	S	VIC=21.98	T	2008908602	2	TANGERANG	New Caledonia
0.434	S	VIC=21.13	T	2008902310	3	MATARAM	New Caledonia
0.439	S	VIC=23.37	T	2008904034	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.445	S	VIC=25.85	T	2007922372	2	JAKARTA	New Caledonia
0.446	S	VIC=22.09	T	2007911133	2	BANDUNG	New Caledonia
0.447	S	VIC=20.34	T	2007908490	4	BALIKPAPAN	New Caledonia
0.461	S	VIC=23.53	T	2008902294	2	BANDUNG	New Caledonia

0.463	S	VIC=21.43	T	2008909378	1	PALEMBANG	New Caledonia
0.465	S	VIC=23.35	T	2008902210	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.467	S	VIC=22.01	T	2007941782	2	TANGERANG	New Caledonia
0.479	S	VIC=22.69	T	2008904985	2	TANGERANG	New Caledonia
0.480	S	VIC=24.39	T	2008904052	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
0.484	S	VIC=23.11	T	2007905790	2	BANDUNG	New Caledonia
0.486	S	VIC=21.88	T	2008902393	2	TANGERANG	New Caledonia
0.495	S	VIC=24.04	T	2008904244	3	KUPANG	HINI Solomon
0.507	S	VIC=25.37	T	2007941763	2	TANGERANG	New Caledonia
0.508	S	VIC=22.51	T	2007941652	2	JAKARTA	New Caledonia
0.509	S	VIC=24.64	T	2008902500	2	TANGERANG	New Caledonia
0.515	S	VIC=22.19	T	2007941756	2	TANGERANG	New Caledonia
0.516	S	VIC=16.67	T	2008909645	2	JAKARTA	New Caledonia
0.528	S	VIC=22.42	T	2007905847	2	BANDUNG	New Caledonia
0.529	S	VIC=20.09	T	2008902280	2	BANDUNG	New Caledonia
0.543	S	VIC=20.13	T	2007908769	2	JAKARTA	New Caledonia
0.551	S	VIC=23.09	T	2007941778	2	TANGERANG	New Caledonia
0.553	S	VIC=23.17	T	2007907370	2	BANDUNG	New Caledonia
0.557	S	VIC=20.37	T	2007905342	2	TANGERANG	New Caledonia
0.579	S	VIC=23.95	T	2007905239	1	PADANG	New Caledonia
0.588	S	VIC=22.54	T	2008903372	2	TANGERANG	HINI Solomon
0.601	S	VIC=22.96	T	2007929595	1	MEDAN	New Caledonia
0.609	S	VIC=23.39	T	2008909750	2	BANDUNG	New Caledonia
0.621	S	VIC=25.48	T	2007908599	2	BANDUNG	New Caledonia
0.662	S	VIC=22.06	T	2008904124	3	DENPASAR	New Caledonia
0.677	S	VIC=24.38	T	2007940677	2	BANDUNG	New Caledonia
0.680	S	VIC=37.45	T	2007929590	1	MEDAN	New Caledonia
0.736	S	VIC=21.32	T	2007905508	1	PALEMBANG	New Caledonia
1.007	S	VIC=34.91	T	2007905367	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
1.239	S	VIC=33.02	T	2007907153	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
1.239	S	VIC=27.89	T	2008902326	2	BANDUNG	New Caledonia
1.463	S	VIC=31.17	T	2008909447	5	MANADO	New Caledonia
1.469	S	VIC=30.83	T	2007911046	2	TANGERANG	New Caledonia
1.842	S	VIC=19.59	T	2007903827	3	DENPASAR	New Caledonia
1.949	S	VIC=31.97	T	2008904843	2	TANGERANG	New Caledonia
2.116	R	FAM=15.39	A	2007907896	2	JEMBER	New Caledonia
2.553	R	VIC=20.44	T	2008901636	2	BANDUNG	HINI Solomon
17.660	R	VIC=20.55	T	2008901302	2	BANDUNG	HINI Solomon
58.290	R	FAM=20.39	A	2007905779	6	JAYAPURA	New Caledonia
62.200	R	FAM=31.79	A	2008904638	3	DENPASAR	HINI Solomon



71.550	R	FAM=24.14	A	2007910110	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
72.350	R	FAM=26.06	A	2007905586	6	AMBON	New Caledonia
79.340	R	FAM=17.90	A	2007910982	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
96.940	R	FAM=28.42	A	2007909990	2	JEMBER	New Caledonia
113.900	R	FAM=28.43	A	2007910046	2	JAKARTA	New Caledonia
123.000	R	FAM=29.29	A	2008901487	2	YOGYAKARTA	New Caledonia
124.100	R	FAM=31.79	A	2007941713	2	BANDUNG	New Caledonia
131.400	R	FAM=27.33	A	2007903570	6	TIMIKA	New Caledonia
147.200	R	FAM=21.59	A	2008904531	2	BANDUNG	H1N1 Solomon
172.800	R	FAM=25.64	A	2007905830	4	BALIKPAPAN	New Caledonia
187.900	R	FAM=26.43	A	2007924191	2	BANDUNG	New Caledonia
206.500	R	FAM=20.87	A	2007923152	1	PALEMBANG	New Caledonia
241.200	R	FAM=27.53	A	2007907899	5	MANADO	New Caledonia
674.000	R	FAM=31.36	A	2007902571	5	MANADO	New Caledonia

Keterangan: S=sensitive, R=resisten, VIC=reporter untuk virus yang tidak mempunyai mutasi H275Y, FAM=reporter untuk virus yang mempunyai mutasi H275Y, A=ada mutasi, T=tidak ada mutasi

Tabel 16. Macam macam mutasi asam amino yang ditemui pada penelitian

Posisi A.amino	A.amino Referensi	Kontrol Sensitif	Kontrol Resisten	S1	S2	S3	S4	S5
3	T	P	P		P	P	P	
53	I	I	I	I	I	V	I	I
68	N	S	S	N	N	N	N	N
82	S	S	S	P	S	P	P	P
100	Y	Y	Y	Y	Y	Y	H	H
130	R	R	R	K	R	K	K	K
151	D	D	D	D	D	D	D/G	N
188	M	M	M	I	M	I	I	I
214	E	E	E	G	G	G	G	G
222	R	R	R	O	O	O	O	O
234	V	V	V	M	M	M	M	M
267	I	I	I	M	I	M	M	M

275	H	H	Y	Y	H	Y	H	H
287	T	T	T	T	I	T	T	T
329	K	K	K	K	K	K	E	E
332	K	K	K	E	E	E	E	E
341	D	D	D	D	N	D	D	D
344	D	D	D	N	D	N	N	N
354	G	G	G	G	D	G	G	G
355	N	N	N	N	D	N	N	N
382	D	D	D	N	N	N	N	N
392	D	D	D	D	D	D	D	N
393	V	V	V	I	V	I	I	I

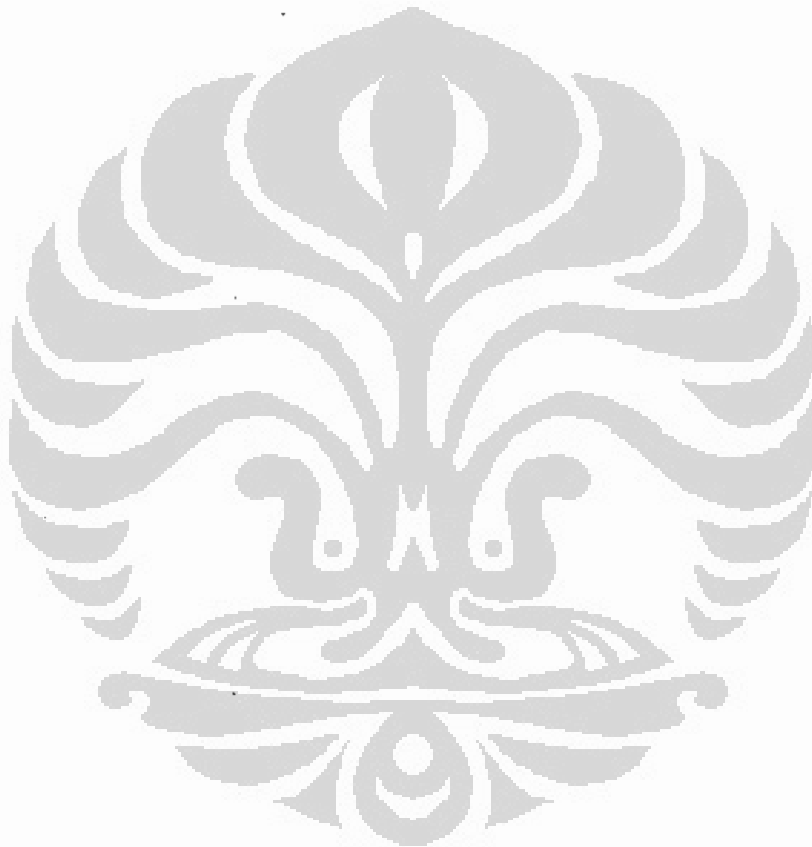
Keterangan: S1=sampel 1, S2=sampel 2, S3=sampel 3, S4=sampel 4, S5=sampel 5. Lambang asam amino berupa huruf berwarna hitam merupakan asam amino yang sama dengan referensi, sedangkan lambang asam amino berupa huruf berwarna merah merupakan asam amino yang berbeda dengan referensi (ada mutasi).

Tabel 17. Asam amino yang berperan pada situs pengikatan protein NA terhadap oseltamivir

Situs pengikatan	S1	S2	S3	S4A	S4G	S5	K.sensitif	K.resisten
GLU:94						GLU:94		
ARG:110	ARG:110							
GLU:111	GLU:111							
		ARG:118	ARG:118	ARG:118	ARG:118		ARG:118	ARG:118
GLU:119		GLU:119	GLU:119	GLU:119	GLU:119		GLU:119	GLU:119
ASN:126						ASN:126		
LEU:134				LEU:134			LEU:134	
ASP:143	ASP:143							
ARG:144	ARG:144							
		ASP:151	ASP:151	ASP:151	GLY:151		ASP:151	ASP:151
		ARG:152		ARG:152	ARG:152		ARG:152	ARG:152
SER:155						SER:155		
ARG:156			ARG:156	ARG:156	ARG:156		ARG:156	
TRP:171	TRP:171							
SER:172	SER:172							

TRP:178		TRP:179	TRP:179	TRP:179	TRP:179		TRP:179	TRP:179
SER:179		SER:180	SER:180	SER:180	SER:180		SER:180	SER:180
ASP:198								
ARG:200						ARG:200		
ILE:215	ILE:215							
ARG:217	ARG:217							
THR:218	THR:218							
GLU:220	GLU:220							
SER:222						SER:222		ARG:222
ILE:222		ILE:223	ILE:223	ILE:223	ILE:223		ILE:223	ILE:223
LEU:224							LEU:224	
		ARG:225	ARG:225	ARG:225	ARG:225		ARG:225	ARG:225
GLU:227		GLU:228	GLU:228	GLU:228			GLU:228	GLU:228
SER:239	SER:239							
SER:247		SER:247	SER:247	SER:247	SER:247		SER:247	SER:247
GLU:252						GLU:252		
ARG:268						ARG:268		
GLU:269	GLU:269							
ASN:270	GLU:270					ASN:270		
HIS:274			TRP:275					
		GLU:277	GLU:277	GLU:277	GLU:277		GLU:277	GLU:277
GLU:277		GLU:278	GLU:278	GLU:278	GLU:278		GLU:278	GLU:278
ARG:285	ARG:285							
ASN:287	ASN:287							
		ARG:293	ARG:293	ARG:293	ARG:293		ARG:293	ARG:293
ASN:294		ASN:295	ASN:295	ASN:295	ASN:295		ASN:295	ASN:295
ALA:335	ALA:335							
ASN:336	ASN:336							
GLY:337	GLY:337							
VAL:338	VAL:338							
ARG:343						ARG:343		
ASP:344							ASP:344	
VAL:346				VAL:346			VAL:346	
ARG:360	ARG:360							
ARG:368		ARG:368	ARG:368	ARG:368	ARG:368		ARG:368	ARG:368
TYR:377						TYR:377		
TYR:394	TYR:394							
TYR:402		TYR:402	TYR:402	TYR:402	TYR:402			TYR:402
GLU:424								

Keterangan: Tiga huruf pertama merupakan singkatan nama asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisi asam amino, merah = residu katalitik, kuning = residu kerangka, biru = mutasi asam amino, S1 = sampel 1, S2 = sampel 2, S3 = sampel3, S4A = sampel 4 tanpa mutasi D151, S4G = sampel 4 dengan mutasi D151, S5 = sampel 5.

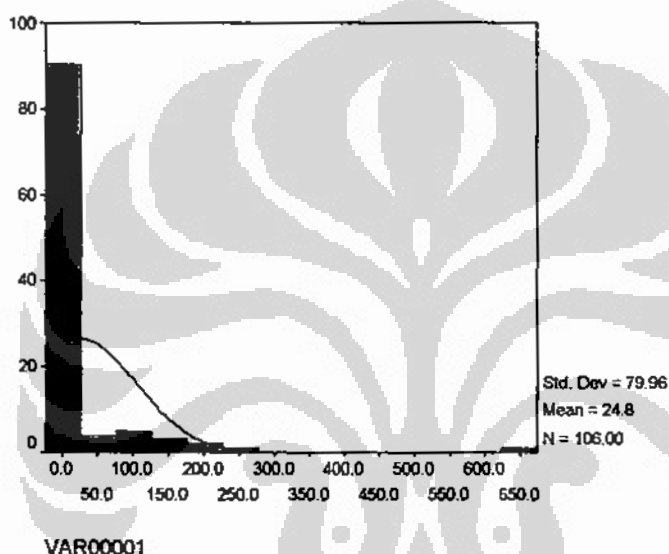


### LAMPIRAN 3

#### PERHITUNGAN STATISTIK

1. Penentuan apakah sebaran data IC50 normal atau tidak normal menggunakan program SPSS, tes kolmogorov-smirnov:

Grafik sebaran data:



#### Descriptives

		Statistic	Std. Error	
IC50	Mean	24.76074	7.76667	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.36086	
		Upper Bound	40.16061	
	5% Trimmed Mean	11.50680		
	Median	.46400		
	Variance	6394.048		
	Std. Deviation	79.96279		
	Minimum	.026		
	Maximum	674.000		
	Range	673.974		
	Interquartile Range	.50925		
	Skewness	5.746	.235	
	Kurtosis	42.008	.465	

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
IC50	.449	106	.000

#### a. Lilliefors Significance Correction

Signifikansi 0,000 → kurang dari 0,05 jadi sebaran data tidak normal (sebaran data normal jika signifikansi > 0,05).

Perhitungan interkuartil untuk menentukan pencilan jauh (*outlier*) menggunakan program stata.

stats | ic50na~r

-----+-----

N | 106

p25 (Q1) | 0,299

p50 (Q2) | 0,464

iqr (Q3-Q1) | 0,437

p75 (Q3) | 0,736

1. Batas bawah =  $Q1 - 1,5 IQR = 0,299 - 1,5(0,437) = -0,3565$
2. Batas atas =  $Q3 + 1,5 IQR = 0,736 + 1,5(0,437) = 1,3915$
3. Batas atas jauh =  $Q3 + 3 IQR = 0,736 + 3(0,437) = 2,047$

2. Penentuan apakah ada korelasi antara uji NAI dan rRT-PCR dalam menentukan resistensi virus influenza terhadap oseltamivir. Perhitungan menggunakan program SPSS, tes kappa:

#### H275Y \* NA Crosstabulation

			NA		Total
			Resisten	Sensitif	
H275Y	Ada mutasi	Count	17	0	17
		Expected Count	3.0	14.0	17.0
	Tidak ada mutasi	Count	2	87	89
		Expected Count	16.0	73.0	89.0
Total		Count	19	87	106
		Expected Count	19.0	87.0	106.0

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	.935	.044	26.936	.000 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.935	.044	26.936	.000 <sup>c</sup>
Measure of Agreement	Kappa	.933	.047	9.629	.000
N of Valid Cases		106			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Nilai kappa 0,933 (0.80 to 1.00 = Very good agreement) berarti kedua uji sama baiknya untuk menentukan resistensi virus influenza terhadap oseltamivir.

3.a. Penentuan apakah penyebaran virus yang resisten terhadap oseltamivir pada musim hujan berbeda dengan musim kemarau (dipengaruhi oleh musim). Perhitungan menggunakan program stata, uji proporsi. Data yang dipergunakan adalah hasil uji rRT-PCR.

X = musin hujan dan Y = musim kemarau

```
. prtesti 93 17 13 2, count
Two-sample test of proportion
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.1827957	.0400781			.1042441 .2613473
y	.1538462	.1000683			-.042284 .3499763
diff	.0289495	.1077957	0.25	0.799	-.1823261 .2402252
under Ho:		.1135718			

```
diff = prop(x) - prop(y)
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0
Pr(Z < z) = 0.6006

Ha: diff != 0
Pr(|Z| < |z|) = 0.7988

Ha: diff > 0
Pr(Z > z) = 0.3994

z = 0.2549
```

```
. prtest1 93 76 13 11, count
```

```
Two-sample test of proportion
```

```
x: Number of obs = 93
y: Number of obs = 13
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.8172043	.0400781			.7386527 .8957559
y	.8461538	.1000683			.6500237 1.042284
diff	-.0289495	.1077957	-0.25	0.799	-.2402252 .1823261
	under Ho:	.1135718			

```
diff = prop(x) - prop(y)
```

```
z = -0.2549
```

```
Ho: diff = 0
```

```
Ha: diff < 0
```

```
Pr(Z < z) = 0.3994
```

```
Ha: diff != 0
```

```
Pr(|Z| < |z|) = 0.7988
```

```
Ha: diff > 0
```

```
Pr(Z > z) = 0.6006
```

$H_0$  (hipotesa awal) yaitu proporsi (x) = proporsi (y), tidak berbeda secara statistik

$H_a$  (hipotesa alternatif) yaitu

- $H_a : \text{diff} \neq 0$  artinya proporsi (x) tidak sama dengan proporsi (y)
- $H_a : \text{diff} < 0$  artinya proporsi (x) < proporsi (y)
- $H_a : \text{diff} > 0$  artinya proporsi (x) > proporsi (y),

Jika nilai P-value  $H_a : \text{diff} \neq 0$   $> 0.05$  maka hipotesa  $H_0$  diterima, tapi jika P-value  $H_a : \text{diff} \neq 0 < 0.05$  maka  $H_a$  yang diterima.

Nilai P-value  $H_a : \text{diff} \neq 0$  adalah 0,7988  $\rightarrow$  lebih besar dari 0,05. Jadi tidak ada perbedaan penyebaran virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir pada musim hujan atau musim kemarau.



3.b. Penentuan apakah penyebaran virus yang resisten terhadap oseltamivir pada musim hujan berbeda dengan musim kemarau (dipengaruhi oleh musim). Perhitungan menggunakan program stata, uji proporsi. Data yang dipergunakan adalah hasil uji NAI:

```
. prtesti 93 15 13 2, count
Two-sample test of proportion          x: Number of obs =    93
                                       y: Number of obs =    13
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.1612903	.0381389			.0865394 .2360413
y	.1538462	.1000683			-.042284 .3499763
diff	.0074442	.1070898	0.07	0.945	-.2024481 .2173364
under Ho: .1086559					

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = 0.0685
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                    Ha: diff != 0                    Ha: diff > 0
Pr(z < z) = 0.5273              Pr(|z| < |z|) = 0.9454              Pr(z > z) = 0.4727
```

```
. prtesti 93 78 13 11, count
Two-sample test of proportion          x: Number of obs =    93
                                       y: Number of obs =    13
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.8387097	.0381389			.7639587 .9134606
y	.8461538	.1000683			.6500237 1.042284
diff	-.0074442	.1070898	-0.07	0.945	-.2173364 .2024481
under Ho: .1086559					

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = -0.0685
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                    Ha: diff != 0                    Ha: diff > 0
Pr(z < z) = 0.4727              Pr(|z| < |z|) = 0.9454              Pr(z > z) = 0.5273
```

Nilai P-value  $H_a : \text{diff} \neq 0$  adalah 0,9454  $\rightarrow$  lebih besar dari 0,05. Jadi tidak ada perbedaan penyebaran virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir pada musim hujan atau musim kemarau.



4. b. Penentuan apakah ada perbedaan resistensi terhadap oseltamivir antara virus influenza strain New Caledonia atau Kepulauan Solomon. Apakah terjadinya resisten terhadap oseltamivir dipengaruhi oleh strain virus. Perhitungan menggunakan program stata, uji proporsi. Data yang dipergunakan adalah hasil uji NAI:

```
. prtesti 91 15 15 4, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 91
y: Number of obs = 15
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
x	.1648352	.0388947			.088603	.2410674
y	.2666667	.1141798			.0428783	.4904551
diff	-.1018315	.1206227			-.3382476	.1345846
	under Ho:	.1068851	-0.95	0.341		

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = -0.9527
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                      Ha: diff != 0                      Ha: diff > 0
Pr(Z < z) = 0.1704                Pr(|Z| < |z|) = 0.3407                Pr(Z > z) = 0.8296
```

```
. prtesti 91 76 15 11, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 91
y: Number of obs = 15
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
x	.8351648	.0388947			.7589326	.911397
y	.7333333	.1141798			.5095449	.9571217
diff	.1018315	.1206227			-.1345846	.3382476
	under Ho:	.1068851	0.95	0.341		

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = 0.9527
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                      Ha: diff != 0                      Ha: diff > 0
Pr(Z < z) = 0.8296                Pr(|Z| < |z|) = 0.3407                Pr(Z > z) = 0.1704
```

Nilai P-value  $H_a : \text{diff} \neq 0$  adalah 0,3407  $\rightarrow$  lebih besar dari 0,05. Jadi tidak ada perbedaan penyebaran virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir antara virus influenza strain New Caledonia dan Kepulauan Solomon.

5.a. Penentuan apakah penyebaran virus yang resisten terhadap oseltamivir di tiap region berbeda atau tidak. Perhitungan menggunakan data hasil uji NAI, menggunakan tes komparasi proporsi program stata:

Region	TOTAL	NO INTEREST	PROP INTEREST	PROP INTEREST OVERALL	EXPECTED
1	13	1	0.077	0.179	0.136
2	72	11	0.153	0.179	0.050
3	11	1	0.091	0.179	0.086
4	3	1	0.333	0.179	0.071
5	3	2	0.667	0.179	0.713
6	4	3	0.750	0.179	1.303
Overall	106	19	0.179		2.359

Chi-sq	16.04
Alpha	0.05
No group (m)	6
DF (m-1)	5
Chi-sq tab	11.07
P_value	0.006737543
Result	significant

P value = 0,0067 < 0.05 jadi ada perbedaan penyebaran virus yang resisten terhadap oseltamivir di tiap region.

5.b. Penentuan apakah penyebaran virus yang resisten terhadap oseltamivir di tiap region berbeda atau tidak. Perhitungan menggunakan data hasil uji rRT-PCR, menggunakan tes komparasi proporsi program stata:

REGION	TOTAL	NO INTEREST	PROP INTEREST	PROP INTEREST OVERALL	EXPECTED
1	13	1	0.077	0.160	0.091
2	72	9	0.125	0.160	0.090
3	11	1	0.091	0.160	0.053
4	3	1	0.333	0.160	0.090
5	3	2	0.667	0.160	0.769
6	4	3	0.750	0.160	1.391
<b>Overall</b>	<b>106</b>	<b>17</b>	<b>0.160</b>		<b>2.483</b>

Chi-sq	18.44
Alpha	0.05
No group (m)	6
DF (m-1)	5
Chi-sq tab	11.07
P_value	0.002442486
Result	significant

P value = 0,0024 < 0.05 jadi ada perbedaan penyebaran virus yang resisten terhadap oseltamivir di tiap region. Untuk itu tes dilanjutkan untuk melihat region mana yang berbeda menggunakan program stata paired t test:

## Region 1 dan region 2

X= region 1 dan Y = region 2

P- value = 0,4697 &gt; 0,05 → tidak ada perbedaan

. prtesti 13 1 72 11, count

Two-sample test of proportion

x: Number of obs = 13  
y: Number of obs = 72

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0769231	.0739053			-.0679287 .2217748
y	.1527778	.0423997			.0696759 .2358796
diff	-.0758547	.085204	-0.72	0.470	-.2428515 .0911421
	under Ho:	.1049312			

diff = prop(x) - prop(y)

z = -0.7229

Ho: diff = 0

Ha: diff &lt; 0

Ha: diff != 0

Ha: diff &gt; 0

Pr(Z &lt; z) = 0.2349

Pr(|Z| &lt; |z|) = 0.4697

Pr(Z &gt; z) = 0.7651

## Region 1 dan region 3

X= region 1 dan Y = region 3

P- value = 0,9017 &gt; 0,05 → tidak ada perbedaan

. prtesti 13 1 11 1, count

Two-sample test of proportion

x: Number of obs = 13  
y: Number of obs = 11

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0769231	.0739053			-.0679287 .2217748
y	.0909091	.0866784			-.0789775 .2607957
diff	-.013986	.1139085	-0.12	0.902	-.2372425 .2092705
	under Ho:	.1132277			

diff = prop(x) - prop(y)

z = -0.1235

Ho: diff = 0

Ha: diff &lt; 0

Ha: diff != 0

Ha: diff &gt; 0

Pr(Z &lt; z) = 0.4508

Pr(|Z| &lt; |z|) = 0.9017

Pr(Z &gt; z) = 0.5492

## Region 1 dan region 4

X= region 1 dan Y = region 4

P- value = 0,2261 &gt; 0,05 → tidak ada perbedaan

```
. prtesti 13 1 3 1, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 13
y: Number of obs = 3
```

variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0769231	.0739053			-.0679287 .2217748
y	.3333333	.2721655			-.2001013 .866768
diff	-.2564103	.2820214	-1.21	0.226	-.809162 .2963415
under Ho:		.2118296			

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = -1.2105
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                      Ha: diff != 0                      Ha: diff > 0
Pr(Z < z) = 0.1131                Pr(|Z| < |z|) = 0.2261                Pr(Z > z) = 0.8869
```

## Region 1 dan region 5

X= region 1 dan Y = region 5

P- value = 0,0183 &lt; 0,005 → ada perbedaan, dimana proporsi region 1 lebih kecil dari region 5.

```
. prtesti 13 1 3 2, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 13
y: Number of obs = 3
```

variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0769231	.0739053			-.0679287 .2217748
y	.6666667	.2721655			.133232 1.200101
diff	-.5897436	.2820214	-2.36	0.018	-1.142495 -.0369918
under Ho:		.25			

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = -2.3590
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                      Ha: diff != 0                      Ha: diff > 0
Pr(Z < z) = 0.0092                Pr(|Z| < |z|) = 0.0183                Pr(Z > z) = 0.9908
```

## Region 1 dan region 6

X = region 1 dan Y = region 6

P- value = 0,0055 < 0,05 → ada perbedaan, dimana proporsi region 1 lebih kecil dari region 6.

. prtesti 13 1 4 3, count

Two-sample test of proportion

x: Number of obs = 13  
y: Number of obs = 4

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0769231	.0739053			-.0679287 .2217748
y	.75	.2165064			.3256553 1.174345
diff	-.6730769	.2287728			-1.121463 -.2246905
	under Ho:	.2425356	-2.78	0.006	

diff = prop(x) - prop(y)

z = -2.7752

Ho: diff = 0

Ha: diff &lt; 0

Ha: diff != 0

Ha: diff &gt; 0

Pr(Z &lt; z) = 0.0028

Pr(|Z| &lt; |z|) = 0.0055

Pr(Z &gt; z) = 0.9972

## Region 2 dan region 5

X = region 2 dan Y = region 5

P- value = 0,0212 < 0,05 → ada perbedaan, dimana proporsi region 2 lebih kecil dari region 5.

. prtesti 72 11 3 2, count

Two-sample test of proportion

x: Number of obs = 72  
y: Number of obs = 3

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.1527778	.0423997			.0696759 .2358796
y	.6666667	.2721655			.133232 1.200101
diff	-.5138889	.2754484			-1.053758 .02598
	under Ho:	.223054	-2.30	0.021	

diff = prop(x) - prop(y)

z = -2.3039

Ho: diff = 0

Ha: diff &lt; 0

Ha: diff != 0

Ha: diff &gt; 0

Pr(Z &lt; z) = 0.0106

Pr(|Z| &lt; |z|) = 0.0212

Pr(Z &gt; z) = 0.9894



## Region 2 dan region 6

X = region 2 dan Y = region 6

P-value = 0,0027 < 0,005 → ada perbedaan, dimana proporsi region 2 lebih kecil dari region 6.

```

. prtesti 72 11 4 3, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 72
y: Number of obs = 4

```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.1527778	.0423997			.0696759 .2358796
y	.75	.2165064			.3256553 1.174345
diff	-.5972222	.220619			-1.029627 -.164817
	under Ho:	.1991392	-3.00	0.003	

```

diff = prop(x) - prop(y)
Ho: diff = 0
z = -2.9990
Ha: diff < 0
Pr(Z < z) = 0.0014
Ha: diff != 0
Pr(|Z| < |z|) = 0.0027
Ha: diff > 0
Pr(Z > z) = 0.9986

```

## Region 3 dan region 5

X = region 3 dan Y = region 5

P-value = 0,0312 < 0,05 → ada perbedaan, dimana proporsi region 3 lebih kecil dari region 5.

```

. prtesti 11 1 3 2, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 11
y: Number of obs = 3

```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0909091	.0866784			-.0789775 .2607957
y	.6666667	.2721655			.133232 1.200101
diff	-.5757576	.2856348			-1.135591 -.0159237
	under Ho:	.2672612	-2.15	0.031	

```

diff = prop(x) - prop(y)
Ho: diff = 0
z = -2.1543
Ha: diff < 0
Pr(Z < z) = 0.0156
Ha: diff != 0
Pr(|Z| < |z|) = 0.0312
Ha: diff > 0
Pr(Z > z) = 0.9844

```

## Region 3 dan region 6

X = region 3 dan Y = region 6

P-value = 0,0107 < 0,05 → ada perbedaan, dimana proporsi region 3 lebih kecil dari region 6.

```
. prtestf 11 1 4 3, count
Two-sample test of proportion          x: Number of obs = 11
                                       y: Number of obs = 4
```

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.0909091	.0866784			-.0789775 .2607957
y	.75	.2165064			.3256553 1.174345
diff	-.6590909	.2332127	-2.55	0.011	-1.116179 -.2020025
	under Ho:	.2581989			

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = -2.5526
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                    Ha: diff != 0                    Ha: diff > 0
Pr(Z < z) = 0.0053              Pr(|Z| < |z|) = 0.0107              Pr(Z > z) = 0.9947
```

## Region 4 dan region 5

X = region 4 dan Y = region 5

P-value = 0,4142 > 0,05 → tidak ada perbedaan

```
. prtestf 3 1 3 2, count
Two-sample test of proportion          x: Number of obs = 3
                                       y: Number of obs = 3
```

variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.3333333	.2721655			-.2001013 .866768
y	.6666667	.2721655			.133232 1.200101
diff	-.3333333	.3849002	-0.82	0.414	-1.087724 .4210572
	under Ho:	.4082483			

```
diff = prop(x) - prop(y)          z = -0.8165
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0                    Ha: diff != 0                    Ha: diff > 0
Pr(Z < z) = 0.2071              Pr(|Z| < |z|) = 0.4142              Pr(Z > z) = 0.7929
```

## Region 4 dan region 6

X = region 4 dan Y = region 6

P-value = 0,2703 &gt; 0,05 → tidak ada perbedaan

```
. prtesti 3 1 4 3, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 3
y: Number of obs = 4
```

variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.3333333	.2721655			-.2001013 .866768
y	.75	.2165064			.3256553 1.174345
diff	-.4166667	.3477773	-1.10	0.270	-1.098298 .2649644
under Ho:		.3779645			

```
diff = prop(x) - prop(y) z = -1.1024
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0 Pr(Z < z) = 0.1351
Ha: diff != 0 Pr(|Z| < |z|) = 0.2703
Ha: diff > 0 Pr(Z > z) = 0.8649
```

## Region 5 dan region 6

X = region 5 dan Y = region 6

P-value = 0,8091 &gt; 0,05 → tidak ada perbedaan

```
. prtesti 3 2 4 3, count
Two-sample test of proportion
x: Number of obs = 3
y: Number of obs = 4
```

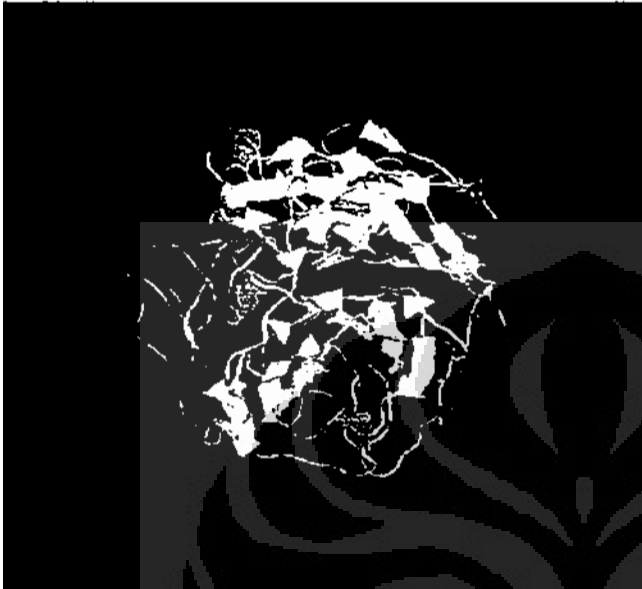
variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
x	.6666667	.2721655			.133232 1.200101
y	.75	.2165064			.3256553 1.174345
diff	-.0833333	.3477773	-0.24	0.809	-.7649644 .5982977
under Ho:		.3450328			

```
diff = prop(x) - prop(y) z = -0.2415
Ho: diff = 0
Ha: diff < 0 Pr(Z < z) = 0.4046
Ha: diff != 0 Pr(|Z| < |z|) = 0.8091
Ha: diff > 0 Pr(Z > z) = 0.5954
```

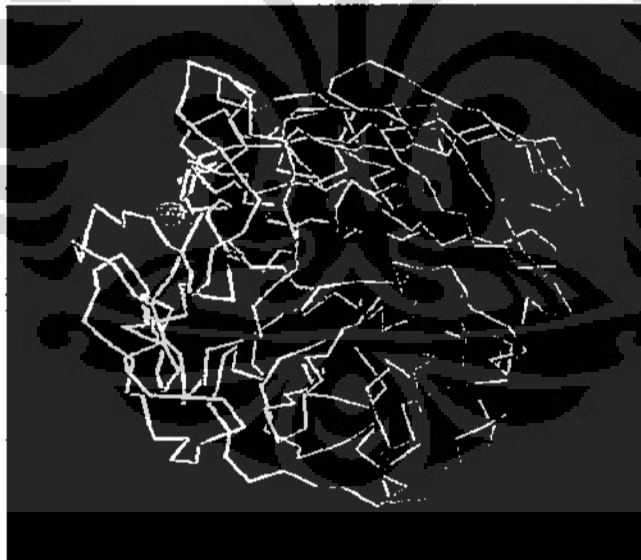
## LAMPIRAN 4

### PREDIKSI 3 DIMENSI PROTEIN NA

Sampel 1



Gambar 33. Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 1 dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



Gambar 34. Situs pengikatan protein NA sampel 1 dari program I-Tasser  
 Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.  
 Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya

ARG: 119	GLY: 111	ASN: 143	ARG: 144	TRP: 171	SER: 172	ILE: 215
ARG: 217	THR: 218	GLU: 220	SER: 239	GLU: 269	GLU: 270	ARG: 285
ASN: 287	ALA: 335	ASN: 336	GLY: 337	VAL: 338	ARG: 360	TYR: 394

## Sampel 2



Gambar 35. Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 2 dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)

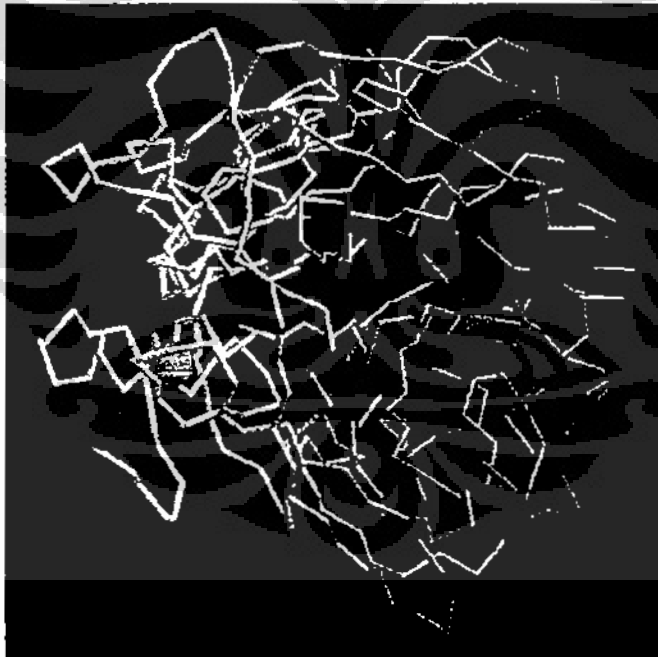


Gambar 36. Situs pengikatan protein NA sampel 2 dari program I-Tasser  
 Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.  
 Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya  
 ARG:118 GLU:119 ASP:151 ARG:152 TRP:179 SER:180 ILE:223 ARG:225  
 GLU:228 SER:247 GLU:277 GLU:278 ARG:293 ASN:295 ARG:368 TYR:402

## Sampel 3



Gambar 37. Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 3 dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



Gambar 38. Situs pengikatan protein NA sampel 3 dari program I-Tasser  
 Bola merah-terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.  
 Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya  
 ARG:118 GLU:119 ASP:151 ARG:156 TRP:179 SER:180 ILE:223 ARG:225  
 GLU:228 SER:247 TYR:275 GLU:277 GLU:278 ARG:293 ASN:295 ARG:368 TYR:402

## Sampel 4A



Gambar 39. Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 4A dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



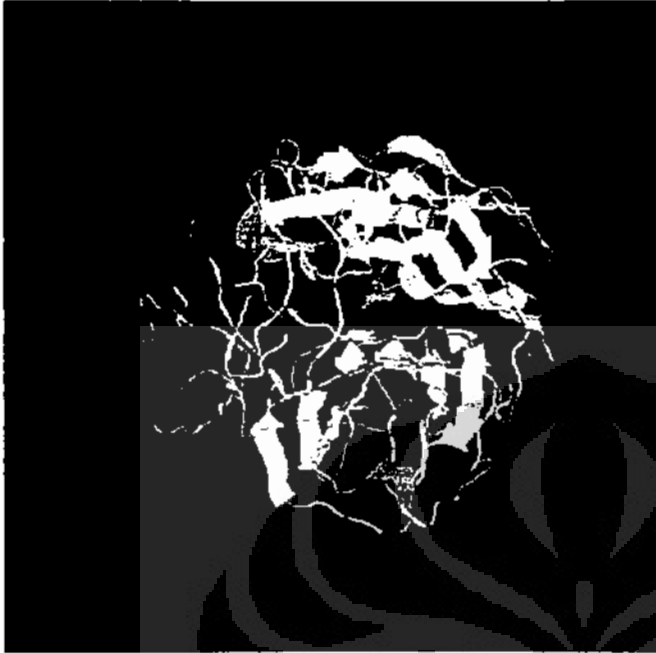
Gambar 40. Situs pengikatan protein NA sampel 4A dari program I-Tasser

Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.

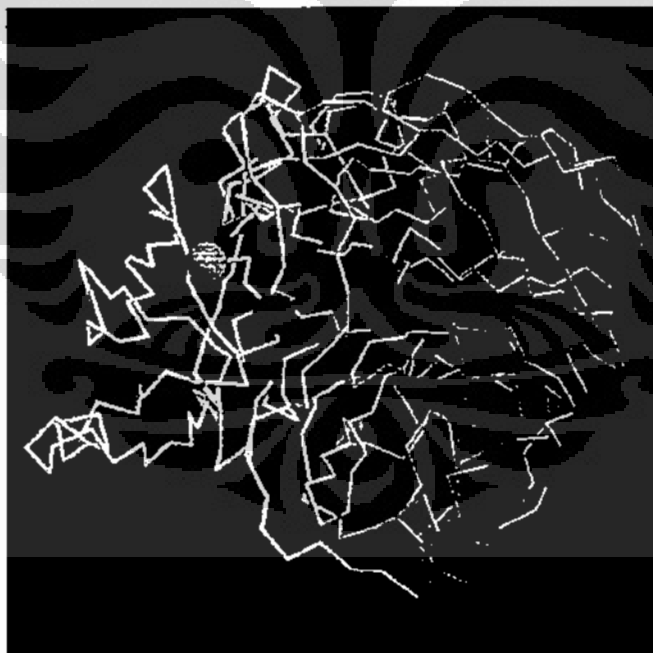
Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya.

ARG:118 GLU:119 LEU:134 ASP:151 ARG:152 ARG:156 TRP:179 SER:180 ILE:223  
 ARG:225 GLU:228 SER:247 GLU:277 GLU:278 ARG:293 ASN:295 VAL:346 ARG:368  
 TYR:402

## Sampel 4G



Gambar 41. Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 4G dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



Gambar 42. Situs pengikatan protein NA sampel 4G dari dari program I-Tasser

Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.

Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya.

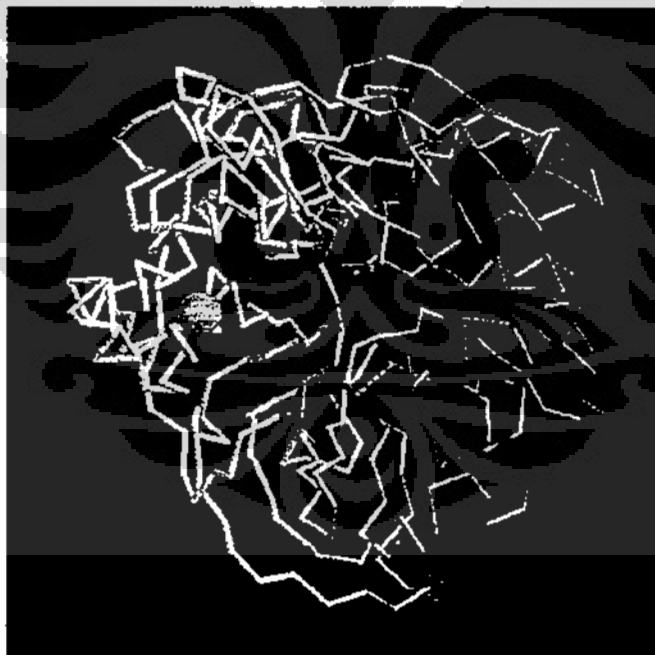
ARG:118 GLU:119 GLY:151 ARG:152 ARG:156 TRP:179 SER:180 ILE:223 ARG:225  
SER:247 GLU:277 GLU:278 ARG:293 ASN:295 ARG:368 TYR:402



## Sampel 5



Gambar 43. Prediksi model 3 dimensi protein NA sampel 5 dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



Gambar 44. Situs pengikatan protein NA sampel 5 dari program I-Tasser

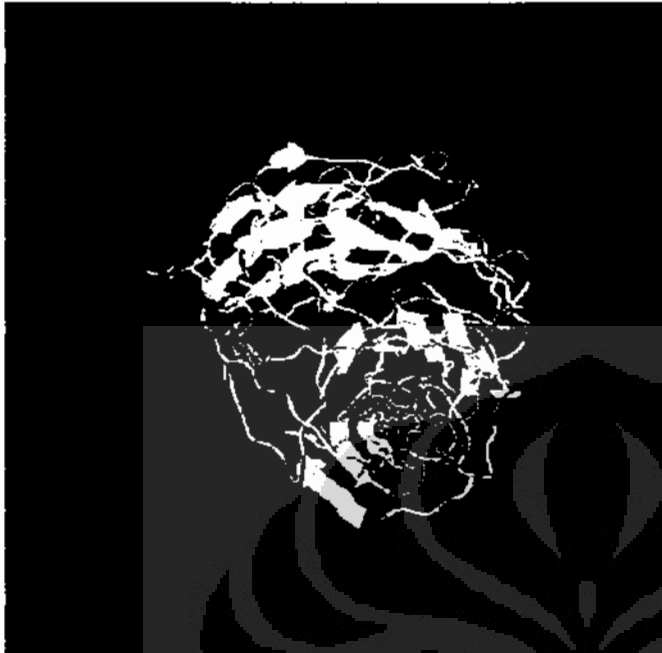
Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.

Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya.

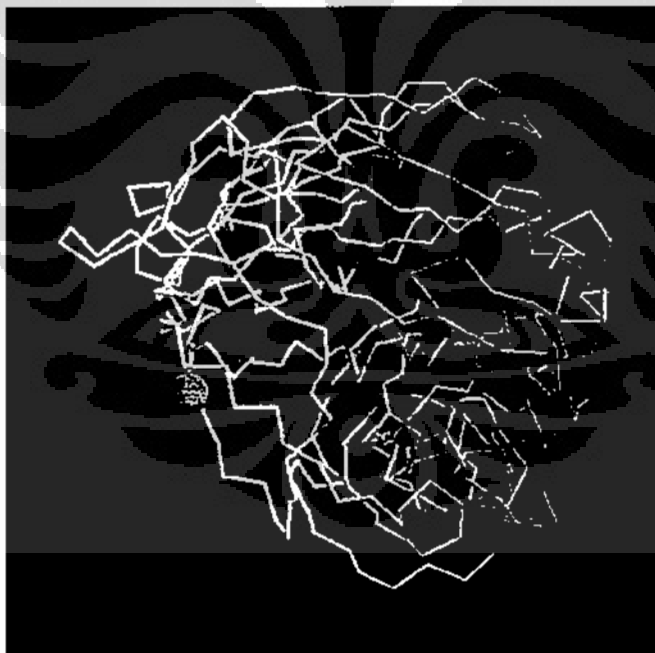
GLU:94 ASN:126 SER:155 ARG:200 SER:222 GLU:252 ARG:268 ASN:270 ARG:343

TYR:377

## Kontrol Sensitif



Gambar 45. Prediksi model 3 dimensi protein NA Kontrol Sensitif dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



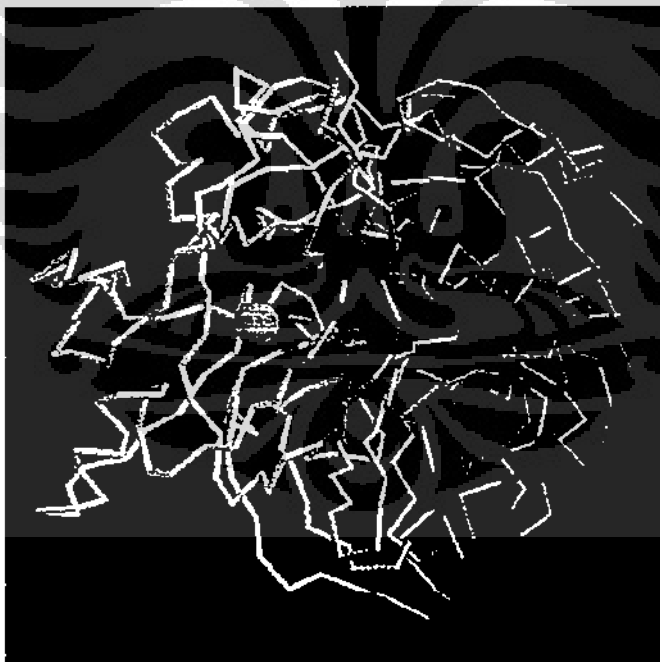
Gambar 46. Situs pengikatan protein NA Kontrol Sensitif dari program I-Tasser  
 Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.  
 Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya.

ARG:118 GLU:119 LEU:134 ASP:151 ARG:152 ARG:156 TRP:179 SER:180  
 ILE:223 LEU:224 ARG:225 GLU:228 SER:247 GLU:277 GLU:278 ARG:293 ASN:295 AS  
 P:344 VAL:346 ARG:368

## Kontrol Resisten



Gambar 47. Prediksi model 3 dimensi protein NA Kontrol Resisten dari program I-Tasser. Cetakan yang digunakan I-Tasser adalah 2htv (Neuraminidase tipe 4). Protein berbentuk lembaran (warna kuning) dan heliks (merah)



Gambar 48. Situs pengikatan protein NA Kontrol Resisten dari program I-Tasser  
 Bola merah=terminal C, bola biru=terminal N, bola ungu=substrat, bola hijau=asam amino.  
 Tiga huruf merupakan singkatan asam amino, angka setelah titik dua menunjukkan posisinya.

ARG:118 GLU:119 ASP:151 ARG:152 TRP:179 SER:180 ARG:222 ILE:223  
 ARG:225 GLU:228 SER:247 GLU:277 GLU:278 ARG:293 ASN:295 ARG:368 TYR:402

**LAMPIRAN 5**  
**DRAF ARTIKEL**

**DETEKSI MUTASI H275Y DAN RESISTENSI VIRUS INFLUENZA  
A (H1N1) TERHADAP OSELTAMIVIR DI INDONESIA TAHUN 2007-2008**

**Rismalia<sup>1</sup>, Purnomo Soeharso,<sup>2</sup> Herman Kosasih<sup>1</sup>, Susana Widjaja<sup>1</sup>, Ungke  
Antonjaya<sup>1</sup>, Maya Williams,<sup>1</sup> Patrick J. Blair<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>US NAMRU 2 Jakarta, <sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Kedokteran Universitas  
Indonesia

**ABSTRAK**

Mutasi H275Y adalah mutasi substitusi pada gen neuraminidase virus influenza yang menghasilkan perubahan asam amino pada urutan ke 275 dari histidin (CAT) menjadi tirosin (TAT). Mutasi ini umum dijumpai pada neuraminidase tipe 1 (N1), misalnya pada virus influenza musiman pada manusia tipe A (H1N1). Telah dibuktikan secara *in vitro* dan *in vivo* bahwa mutasi H275Y menyebabkan virus influenza A (H1N1) menjadi resisten terhadap obat anti neuraminidase oseltamivir.

Sebanyak 106 isolat virus influenza A (H1N1) yang diperoleh dari 16 kota di Indonesia dalam periode 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008, diuji menggunakan metoda real time RT-PCR (rRT-PCR) untuk melihat adanya mutasi H275Y dan kit neuraminidase inhibitor NA-Star untuk melihat aktivitas enzim neuraminidase. Sekuensing dilakukan untuk konfirmasi mutasi tersebut.

Ditemukan adanya virus influenza A (H1N1) yang mempunyai mutasi H275Y sebanyak 16% (17 dari 106) dan 17.9% (19 dari 106) mempunyai fenotip resisten terhadap oseltamivir. Ditemukan pula mutasi lain selain H275Y yang menyebabkan berkurangnya sensitifitas terhadap oseltamivir yaitu mutasi D151D/G dan D151N.

Kata kunci: virus influenza A (H1N1), mutasi gen Neuraminidase, Oseltamivir, Resistensi obat

## 1. LATAR BELAKANG

Influenza adalah penyakit pernapasan menular yang disebabkan oleh virus influenza.<sup>1</sup> Virus influenza yang umum ditemukan pada manusia di Indonesia adalah A (H1N1), A (H3N2) dan B yang menyebabkan wabah musiman hampir setiap tahun.<sup>2-3</sup>

Oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>) sebagai obat anti NA yang diizinkan oleh WHO untuk pengobatan influenza A dan B, menghambat neuraminidase untuk memecah residu asam sialat pada permukaan sel yang terinfeksi, yang mengakibatkan ketidakmampuan progeni virion untuk melepaskan diri dari sel inang sehingga tidak dapat menginfeksi sel lainnya.<sup>4</sup>

Replikasi RNA virus yang rawan kesalahan menyebabkan banyak terjadi mutasi, termasuk mutasi yang mengarah pada resistensi terhadap obat anti-virus. Telah dilaporkan adanya beberapa mutasi pada gen yang menyandi protein N1 virus influenza yang terkait dengan kurangnya kepekaan terhadap oseltamivir yaitu H126N, S247N, S274G, dan H275Y.<sup>4-5</sup> Program surveilan resistensi obat anti NA menemukan bahwa mutasi pada neuraminidase mempunyai pola spesifik terhadap sub tipe tertentu, di mana mutasi H275Y lebih banyak ditemui pada virus influenza A sub tipe N1.<sup>6</sup> Mutasi H275Y adalah mutasi substitusi yang menghasilkan perubahan asam amino urutan ke 275 pada protein neuraminidase dimana histidin (CAT) berubah menjadi tirosin(TAT).<sup>7</sup>

Kenaikan jumlah virus influenza A (H1N1) dengan mutasi H275Y yang resisten terhadap oseltamivir pertama kali dilaporkan oleh Norwegia pada Januari 2008.<sup>8</sup> Survei di beberapa negara lain selama 2007-2008 di belahan bumi utara menunjukkan bahwa ada 16% isolat influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir (0% -67% pernegara).<sup>9</sup> Prevalensi virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir di belahan bumi utara pada musim influenza tahun 2008/2009,

terus meningkat dengan total 30 negara dari semua wilayah WHO melaporkan resistensi terhadap oseltamivir sebanyak 95% (1.291 dari 1.362) dari semua virus A(H1N1) yang dianalisis. <sup>10</sup>

Penggunaan oseltamivir untuk mengobati penyakit influenza di Indonesia masih sangat jarang. Namun, penggunaan oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>) untuk mengobati individu yang diduga terinfeksi influenza H5N1 telah berlangsung sejak tahun 2005. Untukantisipasi penyebaran H5N1, maka Departemen Kesehatan Indonesia telah menyalurkan oseltamivir ke puskesmas-puskesmas rujukan di seluruh Indonesia. Pada tahun 2005-2006 dari total 553 orang yang diduga terinfeksi virus influenza A(H5N1) mendapat pengobatan oseltamivir. Dari 553 orang tersebut 72,9% diantaranya negatif, hanya 8,5% yang positif A (H5N1) dan sisanya terinfeksi influenza musiman (6,1% A (H1N1), 3,7% A (H3N2), 6.1% A (subtipe tidak dapat ditentukan), dan 2,7% B). <sup>11</sup> Riwayat penggunaan oseltamivir dan fakta bahwa resistensi oseltamivir belum diteliti di Indonesia membuat studi karakterisasi virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir di Indonesia sangat penting dilakukan. Untuk memenuhi kebutuhan ini, virus influenza A (H1N1) yang dikoleksi selama surveilan di Indonesia tahun 2007-2008 akan dites untuk melihat resistensi terhadap oseltamivir. Penelitian yang fokus pada virus influenza A(H1N1) ini, diharapkan dapat memberikan dasar keahlian teknis yang dapat digunakan untuk memeriksa resistensi virus influenza tipe/subtipe lain terhadap anti-NA di masa yang akan datang.

## **2.METODE**

### **2.1.Sampel Virus**

Virus influenza A (H1N1) yang akan digunakan berupa isolat hasil kultur di sel Madin-Darby canine kidney (MDCK) dari sampel usap hidung dan tenggorok pada surveilan influenza di Indonesia sejak 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008. Sampel dikumpulkan dari 18 rumah sakit, 8 klinik dan 1 pabrik yang berlokasi di 16 kota di

seluruh Indonesia. Tipe dan subtype virus ditentukan dengan teknik RT-PCR, IFA, dan penghambatan HA menggunakan monoklonal antibody dan antiserum referensi yang diperoleh dari US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Dari 258 isolat influenza A (H1N1) yang tersedia, akan dipilih berdasarkan stratifikasi acak (pengambilan minimal 25%) agar sampel dapat mewakili strain, waktu dan lokasi. Waktu akan dibagi ke dalam musim hujan (Oktober sampai Maret) dan musim kemarau (April sampai September). Enam belas kota besar akan dikelompokkan menjadi 6 kelompok berdasarkan lokasi geografis:

1. Sumatera: Medan, Padang, Palembang
2. Jawa (Jawa Barat: Bandung, Jakarta, Tangerang; Jawa Tengah: Yogyakarta; Jawa Timur: Jember)
3. Bali, Mataram dan Kupang
4. Kalimantan: Pontianak dan Balikpapan
5. Sulawesi: Manado dan Makassar
6. Ambon, Timika dan Jayapura

Seratus lima belas isolat influenza A (H1N1) yang terpilih, terdiri dari 98 strain virus New Caledonia dan 17 virus strain Kepulauan Salomon.

## **2.2. Uji Neuraminidase Inhibitor (NAI)**

Oseltamivir karboksilat (metabolit aktif dari prodrug oseltamivir) diperoleh dari Hoffman-La Roche (selanjutnya akan disebut oseltamivir saja, untuk kesederhanaan dari nama lengkap, oseltamivir karboksilat). Uji NAI kemiluminesen dilakukan menggunakan kit yang tersedia secara komersial, NA-Star<sup>®</sup> Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Protokol dilakukan seperti yang direkomendasikan oleh pabrik. Luminesen diukur dengan menggunakan Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) reader yang dilengkapi dengan alat injeksi otomatis untuk akselerator. Sebagai kontrol digunakan referensi virus yang sensitif oseltamivir (A/Massachusetts/06/2006 H1N1) dan resisten

oseltamivir (A/Massachusetts/05/2007 H1N1) dari US CDC, Atlanta. Nilai IC50 (konsentrasi obat yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas enzim sebesar 50%) ditentukan menggunakan kurva fit dengan menggunakan perangkat lunak Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) dan GraphPad Prism 5. Ambang batas ditentukan dengan formula  $Q3+3IQR$ .

### 2.3. Realtime RT-PCR (rRT-PCR)

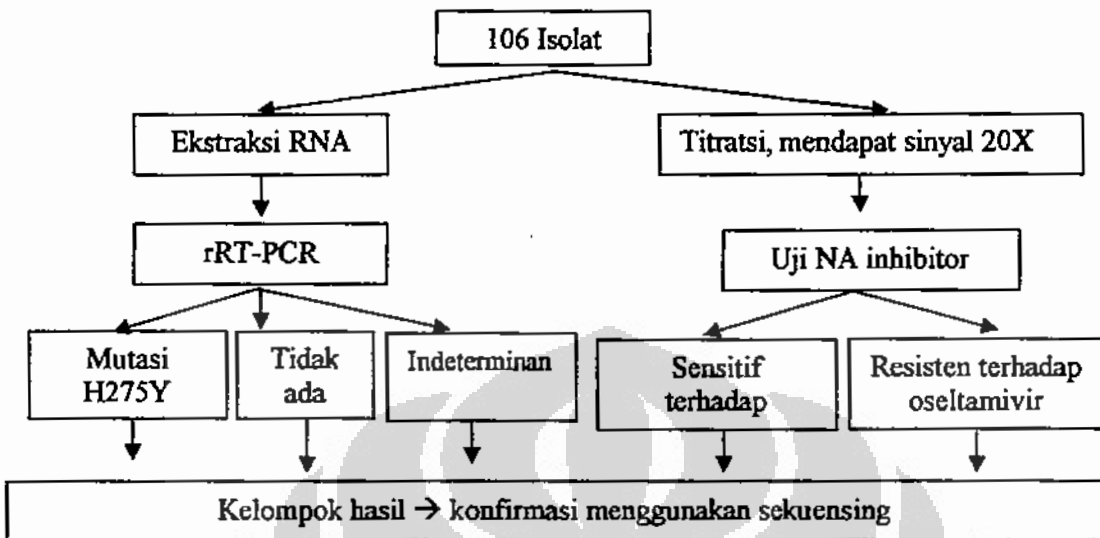
RNA diekstrak dari isolat virus menggunakan QIAamp viral RNA minikit (QIAGEN, Crawley Inggris) mengikuti instruksi pabriknya. Uji rRT-PCR dilakukan menggunakan Probe Taqman mengikuti metode yang dilakukan oleh Carr dkk., 2008.<sup>7</sup> Dalam pengujian ini, dua probe berbeda yang dilabel fluoresen (VIC untuk wildtype dan FAM untuk mutan) digunakan untuk membedakan polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) di posisi 823 (C atau T) yang mengindikasikan baik sensitivitas atau resistensi terhadap oseltamivir.

### 2.4. Sekuensing Gen NA

Gen NA dibagi menjadi 2 fragmen yaitu posisi nukleotida 0-740 (fragmen 1) dan 600-1242 (fragmen 2). Tiap fragmen disekuensi menggunakan primer *forward* dan *reverse*. Sampel RNA diubah menjadi cDNA dan gen neuraminidase diamplifikasi menggunakan primer yang ditandai dengan M13. Amplikon dipurifikasi menggunakan QIAquick PCR purification Kit (Qiagen), dan kemudian berfungsi sebagai template untuk siklus reaksi sekuensing menggunakan BigDye terminator 3,1 (Applied Biosystems) dan primer M13. Kondisi siklus adalah pra pemanasan pada suhu 96°C selama 1 menit, 30 siklus pada suhu 96°C selama 20 detik, 45°C selama 20 detik, 60°C selama 30 detik, dan terakhir pada suhu 60 ° C selama 2 menit. Produk sekuensing dipresipitasi menggunakan etanol dan akan dianalisis menggunakan 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sekuensi yang diperoleh dibandingkan dengan sekuensi strain virus influenza yang sensitif dan resisten dari bank gen.



Skema cara kerja:



## 2.5. Analisis Data

Persentase isolat A (H1N1) yang memiliki fenotip resisten dan persentase mutasi H275Y ditentukan. Persentase mutasi dan resistensi virus dalam 6 wilayah dan 2 musim dibandingkan. Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program stata. Nilai  $P < 0,05$  digunakan sebagai signifikan secara statistik.

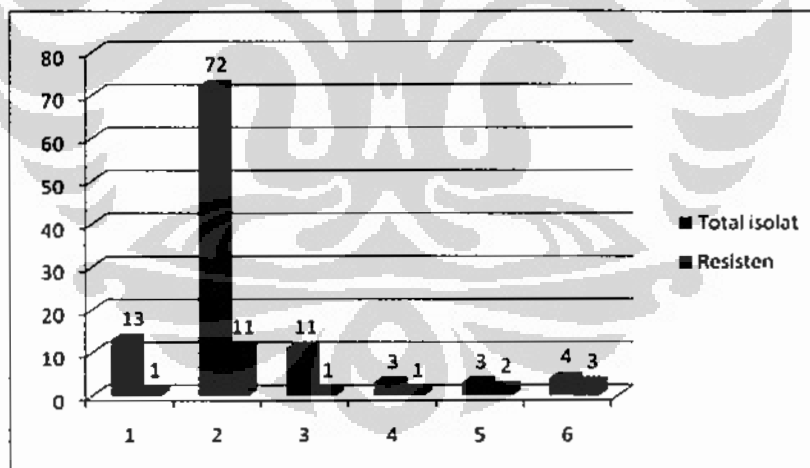
## TEMPAT DAN PENDANAAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Virologi, NAMRU 2-Jakarta dan Lembaga Eijkman, Jakarta. Penelitian dibiayai oleh Departemen Viral Disease Program, NAMRU 2.

## HASIL

Uji NAI menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> terendah 0,026 nM dan tertinggi 674 nM. Nilai IC<sub>50</sub> kontrol sensitif 0,2991 nM dan kontrol resisten 167,5 nM. Ambang batas IC<sub>50</sub> (Q3 + 3 IQR) adalah 2,047 nM. Sebanyak 87 isolat (82,1%) mempunyai fenotip sensitif terhadap oseltamivir dengan nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 2,047 nM (0,026-1,949 nM) dan 19 isolat (17,9%) resisten terhadap oseltamivir dengan nilai IC<sub>50</sub> lebih dari 2,047 nM (2,116-674 nM).

Berdasarkan uji NAI, di region 1 (Sumatera) ditemukan 7,7% virus A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir, region 2 (Jawa) mempunyai 15,3% virus resisten, 9,1% di region 3 (Bali, Mataram dan Kupang), region 4 (Kalimantan) memiliki 33,3%, sebanyak 66,7% di region 5 (Sulawesi) dan region 6 (Ambon, Timika dan Jayapura) mempunyai 75% virus influenza A (H1N1) yang resisten oseltamivir. Sebaran virus influenza A(H1N1) yang mempunyai fenotip resisten terhadap oseltamivir di 6 region Indonesia dapat dilihat pada gambar 1.

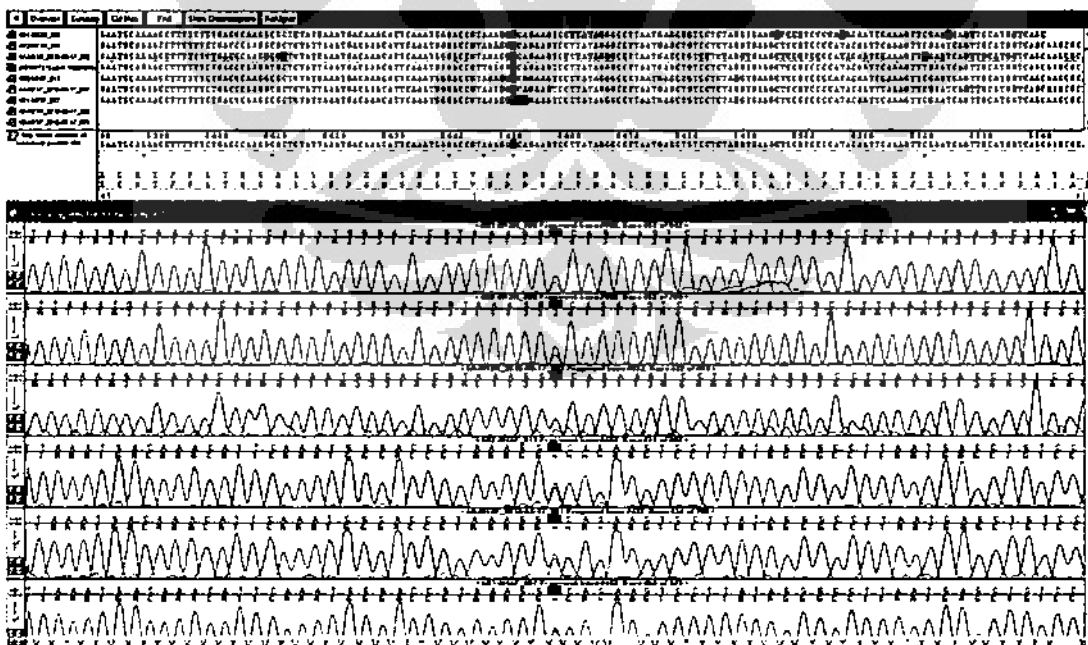


Gambar 1. Sebaran virus influenza A (H1N1) dengan enzim NA resisten terhadap oseltamivir pada tiap region di Indonesia

Sebanyak 16% isolat virus (17 dari 106) mempunyai mutasi H275Y dengan CT berkisar 16,39 - 34,91. Selebihnya 89 isolat (84%) tidak mempunyai mutasi H275Y dengan CT berkisar 17,96 - 37,49. Mutasi H275Y merupakan mutasi yang

paling umum dijumpai pada virus yang mempunyai fenotip NA resisten terhadap oseltamivir. Sebanyak 17 isolat dari 19 isolat yang mempunyai fenotip NA yang resisten oseltamivir, mempunyai mutasi tersebut. Selain mutasi itu, ada 2 isolat yang mempunyai fenotip NA resisten tapi tidak mempunyai mutasi H275Y.

Sekuensing dilakukan pada 5 sampel untuk mewakili 3 kelompok hasil yang diperoleh yaitu sampel 1 dan 3 yang mempunyai mutasi H275Y dan  $IC_{50} > Q_3 + 3IQR$ , sampel 2 yang tidak mempunyai mutasi H275Y dan  $IC_{50} < Q_3 + 3IQR$ , sampel 4 dan 5 yang tidak mempunyai mutasi H275Y tapi  $IC_{50} > Q_3 + 3IQR$ . Analisis sekuensing menunjukkan bahwa kedua isolat yang mempunyai fenotip NA resisten tapi tidak mempunyai mutasi H275Y mempunyai mutasi asam amino Y100H dan K329E serta mutasi di residu framework yaitu pada asam amino posisi 151. Sampel 4 memiliki mutasi basa pada posisi 452 A→G sehingga terjadi perubahan asam amino D151G, namun ada campuran virus yang tidak mengalami mutasi basa pada posisi 452 (gambar 2), sehingga sampel 4 memiliki mutasi campuran D151D/G. Sampel 5 memiliki mutasi basa pada posisi 451 G→A sehingga terjadi mutasi asam amino D151N.



Gambar 2. Sekuen nukleotida posisi 452 sampel 4 yang menunjukkan adanya dua populasi virus. Hasil sekuen menggunakan primer *forward* menampilkan puncak

grafik tertinggi untuk basa A sedangkan hasil sekuen dengan primer *reverse* menunjukkan puncak grafik basa G tampak paling tinggi dari puncak grafik ketiga basa lainnya. Pengulangan sekuensing menggunakan primer yang sama dan primer yang berbeda menunjukkan hasil yang tidak berbeda.

## PEMBAHASAN

Secara statistik kedua uji sama baiknya untuk mendeteksi resistensi virus influenza A (H1N1) terhadap oseltamivir. Namun demikian, uji rRT-PCR sangat spesifik, hanya untuk mendeteksi resistensi terhadap oseltamivir yang disebabkan oleh mutasi H275Y dan hanya untuk virus influenza A (H1N1). Uji NAI lebih universal, dapat mendeteksi resistensi terhadap oseltamivir dan anti NA lainnya pada influenza A dan B.

Resistensi terhadap oseltamivir tidak dipengaruhi oleh musim dan tidak spesifik strain. Menurut perhitungan statistik, ada perbedaan bermakna pada persentase resistensi keenam region terutama untuk region 5 dan 6, namun hal itu lebih disebabkan karena sampel region 5 dan 6 yang jumlahnya sedikit sekali disbanding region yang lain.

Karena sampel virus diambil sebelum pasien mendapatkan pengobatan dan berdasarkan data pasien asal virus yang resisten tidak ada riwayat minum oseltamivir sebelumnya, pasien bukan suspek AI sehingga tidak diobati dg oseltamivir maka dapat dikatakan bahwa mutasi H275Y yang ditemukan tidak disebabkan oleh pengobatan oseltamivir. Sheu dkk., 2008 dan Lackenby dkk., 2008 menemukan virus yang mempunyai mutasi H275Y pada pasien yang tidak diobati dengan oseltamivir.<sup>5,8</sup> Mutasi H275Y adalah mutasi pada residu framework. Menurut Herlocher dkk. 2004 dan Yen dkk., 2005 mutasi pada residu framework dapat ditransmisikan.<sup>12-13</sup> Berdasarkan hal itu dapat dikatakan adanya mutasi H275Y yang ditemukan pada penelitian ini karena infeksi virus yg sudah mempunyai mutasi H275Y.

Mutasi H275Y menyebabkan resistensi terhadap oseltamivir karena tirosin yang berukuran lebih besar dari histidin menghalangi perubahan rotasi E276 untuk

berikatan dengan R224 membentuk kantung untuk rantai samping oseltamivir,<sup>14</sup> selain itu asam amino histidin yang bermuatan negatif digantikan oleh tirosin yang tidak bermuatan menyebabkan afinitas ikatan antara oseltamivir dan NA menjadi berkurang.

Sheu dkk.,2008 melaporkan mutasi asam amino D151 menjadi G,N,V,A,G/D yang mempunyai IC50 diatas ambang batas pada virus A(H3N2) dan B dari pasien tanpa pengobatan oseltamivir.<sup>5</sup> Okomo-Adhiambo dkk., 2009 juga melaporkan adanya mutasi D151 menjadi E,G,N. Setelah dilakukan sekuensing pada 28 sampel yang mempunyai mutasi asam amino D151 menggunakan sampel dari kultur dan sampel klinik, ternyata mutasi asam amino D151 hanya ditemukan pada kultur tidak pada spesimen klinik.<sup>15</sup> Dapat disimpulkan bahwa mutasi D151 disebabkan karena seleksi oleh sel inang saat virus dikultur.

## KESIMPULAN

Berdasarkan uraian pembahasan dari hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut: Ditemukan virus influenza A (H1N1) yang resisten terhadap oseltamivir diantara virus influenza A (H1N1) yang bersirkulasi di Indonesia sejak 1 Januari 2007 hingga 16 Mei 2008 dengan prevalensi 17,9% (19 dari 106). Resistensi terhadap oseltamivir pada virus influenza A (H1N1) di Indonesia paling banyak disebabkan oleh mutasi H275Y dengan prevalensi 16% (17 dari 106). Mutasi lain yang menyebabkan resistensi terhadap oseltamivir adalah D151D/G dan D151N. Metode NAI dan rRT-PCR sama baiknya untuk mendeteksi resistensi terhadap oseltamivir pada virus influenza A (H1N1) musiman pada manusia di Indonesia, namun metode NAI dapat digunakan untuk tipe virus influenza lain dan anti NA yang lain.

## Referensi

1. Lamb RA, Krug RM. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE *et al.*, editors. *Field Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2001.p.1487-531.
2. Beckett, C.G., Kosasih H, Ma'roef C, Listiyaningsih E, Elyazar I.R.F, Wuryadi S. *et al.* Influenza surveillance in Indonesia: 1999-2003. *Clin Infect Dis*. 2004;39(4):443-9
3. Kosasih, H. Influenza surveillance 2004-2007. Poster pada Lokakarya ILI di Batam. 2009.
4. Ferraris, O., and B. Lina. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J. Clin. Virol*. 2008;41:13–19.
5. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, *et al.* Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide in 2004-2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3284-92.
6. Escuret, V., Frobert, E., Buscambert-Duchamp, M., Sabatier, M., Grog, I., Valette, *et al.* Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Clin. Virol*. 2008;41: 25–28.
7. Carr M.J, Sayre N, Duffy M, Connell J, Hall W.W. Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. *J. Virol.method*. 2008;153:257-62.
8. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, *et al.* Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Eurosurveillance*.2008;13
9. No name. Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir: last quarter 2007 to first quarter 2008. [cited 2009 Nov 16] available from: [http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir\\_summary/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summary/en/index.html)

10. WHO. Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir 2008/2009 influenza season, northern hemisphere [cited 2009 Nov 16] available from: [http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1\\_table/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html)
11. Kosasih H. Clinical and laboratory comparison of human infections with dengue, influenza or avian influenza A (H5N1) viruses in Indonesia. Oral presentation in the 1st international conference on avian influenza in humans;2006 june 29-30;Paris,France
12. 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;190:1627-30
13. Yen HL, HerlocherLM, Hoffmann E, Matrosovich MN, Monto AS, Webster RG, et.al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother.*2005;49:4075-84
14. Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med.* 2009;360:953-6.
15. Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Sleeman K, Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, et al. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: implications for drug resistance monitoring in A (H1N1) viruses.*Antiviral Res.* 2009; 85:381-88.

**LAMPIRAN 6**  
**RIWAYAT HIDUP**



**A. DATA PERSONAL**

Nama : Rismalia  
 NPM : 0806419610  
 Tempat tanggal lahir : Palembang, 28 November 1973  
 Alamat : Jl.Daksinapati Tenggara no. 6 Jakarta Timur 13220  
 Email : rismalia99@yahoo.com

**B. PENDIDIKAN**

1981 – 1987 : SDN 5 Kampung Sawah, Bandar Lampung  
 1987 – 1990 : SMPN 2 Tanjungkarang, Bandar Lampung  
 1990 – 1993 : SMAN 2 Tanjungkarang, Bandar Lampung  
 1993 – 1998 : Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia  
 2008 – 2010 : Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

**C. RIWAYAT PEKERJAAN**

1 Juni 2010 - sekarang: Product Manager, PT Dipa Puspa Labsains  
 April 2001 – 23 April 2010: *Medical Research technician*, departemen virologi, US  
 NAMRU-2 Jakarta  
 January 1998 – April 2001: Asisten proyek, Laboratorium genetika, Departemen  
 Biologi FMIPA-UI



#### D. PUBLIKASI ILMIAH

1. **Rismalia**, Chairin Nisa Ma'roef, Andrew Jeremijenko, Herman Kosasih, Agus Suwandono dan Patrick Blair. *Influenza surveillance in Indonesia September 2004 to May 2005*.

Presentasi poster pada Kongres Nasional ke 11 PETRI (Perhimpunan Peneliti Penyakit Tropik dan Infeksi). Solo 22-24 July 2005

2. **Rismalia**, Erlin Listiyaningsih, Chairin Nisa Ma'roef, Ida Faridah, John Newsome, Joko Yuwono, Herman Kosasih, Kevin R. Porter, James Mc.Ardle dan Charmagne Beckett. *Detection and Identification of Influenza Viruses Using a Multiplex Nested RT PCR Assay*.

Presentasi poster pada: Kongres Bioteknologi Indonesia ke 3, Oktober 10-11 2002, ITB Bandung.

3. Herlina Y. Handoko, J. Koji Lum, Gustiani, **Rismalia**, Hannie Kartapradja, Abdul Salam M. Sofro, and Sangkot Marzuki. *Length variations in the COII-tRNALys intergenic region of mitochondrial DNA in Indonesian populations*. *Human Biology* 73.2 (2001) 205 - 223

4. Herlina Y. Handoko, J. Koji Lum, Gustiani, **Rismalia**, Hannie Kartapradja, Abdul Salan M. Sofro, and Sangkot Marzuki. *Polynesian motif in the Indonesian populations*.

Abstrak pada simposium ulang tahun ke 10 IMCB (Institute of Molecular and Cell Biology) 17-18 November 1997, Singapura.

#### E. SUMBER DANA PENELITIAN

Penelitian didanai oleh US NAMRU 2, Jakarta.