

Virus Influenza Novel H1N1 Babi di Indonesia

NLP Indi Dharmayanti¹, Atik Ratnawati¹, & Dyah Ayu Hewajuli¹

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata 30, Bogor

E-mail: nlpdharmayanti@yahoo.com

ABSTRACT

Novel H1N1 influenza virus in Swine in Indonesia. Novel H1N1 influenza virus occurred since April 2009 has caused mortality in human population. In Indonesia, this situation require intensive surveillance to prevent reassortant probability between the H5N1 virus and novel H1N1 virus. This study conduct preliminary surveillance of novel H1N1 virus circulation by using *Real Time-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), that validated by CDC to detect novel H1N1 virus. Result of this study revealed that the influenza novel H1N1 virus was detected in swine/pigs in Indonesia especially in Bulan island and two individual sample from Kapok slaughter house in Jakarta. These findings showed that in Indonesia the novel H1N1 virus is not only found in human but also has circulated in swine in Indonesia.

Key words: pig/swine, influenza novel H1N1 virus

PENDAHULUAN

Virus influenza A/H1N1 pertama kali diisolasi dari babi pada tahun 1930 (Shope 1931). Mulai dari tahun 1930-an sampai akhir tahun 1990 virus *swine influenza* pada babi yang bersirkulasi di USA relatif stabil. Antigenisitas virus ini relatif stasis sampai tahun 1998 dan selama waktu itu *antigenic drift* terjadi pada virus H1 manusia yang akhirnya menciptakan suatu jarak antara virus *swine influenza* dengan virus *seasonal flu* pada manusia (Garten *et al.* 2009).

Pada tanggal 29 April 2009, *World Health Organization* (WHO) mengumumkan bahwa telah terjadi penyebaran yang sangat cepat (*rapid global spread*) virus influenza strain H1N1 yang dideteksi pada minggu sebelumnya dan dengan cepat menjadi pandemi fase 5 (*global pandemic alert level to*

phase 5) (www.who.int/csr/disease/swineflu/). Fase 5 mengindikasikan transmisi virus dari manusia ke manusia dari strain influenza yang berasal dari hewan dari satu bagian negara di dunia dan dengan cepat menyebar ke bagian lain di dunia.

Pada akhir bulan April, genom komplet virus ini sudah diketahui dan diketahui sebagai *novel reassortant* (Dawood *et al.* 2009). Virus ini dengan cepat menginfeksi populasi manusia hampir di seluruh negara dan menciptakan pandemi yang banyak menimbulkan kerugian akibat morbiditas dan mortalitasnya pada populasi manusia.

Ratusan laporan penelitian, *review* dan kesimpulan tentang virus ini telah dipublikasi dalam waktu enam bulan. Semua studi menyimpulkan bahwa virus novel H1N1 yang menginfeksi populasi manusia kemungkinan terjadi sekitar

bulan Januari 2009 (Smith *et al.* 2009; Traser *et al.* 2009). Semua laporan penelitian tersebut menyetujui bahwa enam dari gen virus yaitu yang mengkode protein polimerase (PB2, PB1 dan PA), hemagglutinin (HA), nukleoprotein (NP) dan non-struktural (NS) menunjukkan *triple reassortant* dari virus influenza yang ditemukan pada babi di Amerika Utara pada tahun 1998, sedangkan gen lainnya yaitu yang mengkode protein neuraminidase (NA) dan protein matrix (MP) dari *Eurasian avian-like virus lineage* yang diisolasi di Eropa sekitar tahun 1979 (Brockwell *et al.* 2009; Shinde *et al.* 2009; Olsen *et al.* 2002; Richt *et al.* 2003; Pensaert *et al.* 1981; Brown *et al.* 1997; Scholtissek *et al.* 1983; Webster *et al.* 1992).

Hampir semua negara di dunia melaporkan telah terinfeksi virus novel H1N1 termasuk Indonesia. Di Indonesia, data jumlah kumulatif infeksi Flu A H1N1 sampai dengan 23 Agustus 2009 sebanyak 1.005 orang dengan 5 orang di antaranya meninggal dunia. (www.depkes.go.id). Hal ini harus diwaspadai karena Indonesia masih mempunyai masalah dengan virus influenza H5N1 dan telah menjadi endemis, sehingga dengan teridentifikasinya novel H1N1 pada manusia di Indonesia, tentu menjadi hal serius yang perlu diperhatikan diantaranya adalah kemungkinan terjadinya *reassortant* antara virus H5N1 dengan virus influenza lainnya termasuk virus novel H1N1.

Babi berperan penting dalam ekologi virus influenza dikarenakan babi sensitif terhadap reseptor mamalia dan unggas. Sel saluran nafas babi mengandung

reseptor *sialyloligosac-charides* yang memiliki reseptor avian yaitu N-acetylneuraminic acid-a2,3-galactose dan N-acetylneuraminic acid-a2,6-galactose yang merupakan reseptor virus influenza untuk mamalia (Ito *et al.* 1998; Rogers & Paulson 1983) atau salah satu peyebab babi diduga berperan sebagai *mixing vessel virus* influenza dari spesies berbeda dan menyediakan tempat untuk *reassortant* adaptasi bagi inang (Scholtissek 1990).

Babi yang dapat berperan sebagai *mixing vessel* dari virus influenza ini, menjadi kunci utama untuk memulai *surveilans*, pendataan dan evaluasi mengetahui situasi virus influenza yang bersirkulasi di Indonesia. Pada penelitian ini dilakukan pengambilan sampel di beberapa lokasi sebagai upaya untuk mengetahui penyebaran virus influenza terutama virus influenza novel H1N1 pada babi di Indonesia. Pada studi ini dilakukan pendeteksian virus novel H1N1 pada babi dari rumah potong hewan (RPH) Kapok, Jakarta, peternakan babi di pulau Bulan-Riau (pengekspor babi untuk Singapura) dan Kota Batam yang dekat dengan dengan Singapura. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2009 sampai Nopember 2010.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pool/individual usapan nasal babi dilakukan isolasi RNA. RNA yang dihasilkan kemudian dijadikan *template* untuk uji RT-PCR dan qRT-PCR. Pengujian RT-PCR menggunakan primer *Nucleoprotein*, primer H1, H5 dan primer N1 untuk mendeteksi adanya virus

avian influenza subtype H1N1; pengujian qRT-PCR dilakukan dengan menggunakan primer dan probe sesuai dengan *CDC protocol realtime RT-PCR* untuk influenza A (H1N1) (WHO 2009).

Prosesing sampel yang berasal dari usapan nasal dilakukan sesuai dengan prosedur CDC (2009). Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan QIAmp RNA mini kit (*Qiagen*) yang tersedia secara komersial. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript III one Step RT-PCR system (Invitrogen)*. Primer NP, H5 dan H1 serta program RT-PCR yang digunakan sesuai dengan Lee *et al.* (2001). Prosedur dan program untuk subtiping N1 yang digunakan sesuai dengan Wright *et al.* (1995). Hasil amplifikasi divisualisasi dengan *uv transluminator*. Pengujian qRT-PCR dilakukan dengan menggunakan primer dan probe sesuai dengan *CDC protocol realtime RT-PCR for influenza A (H1N1)* (WHO 2009).

Swab nasal babi yang teridentifikasi positif virus influenza atau novel H1N1 dengan metode qRT-PCR dan RT-PCR ditanam pada sel MDCK. Semua pekerjaan pembuatan inokulum dan inokulasi virus pada sel MDCK dilakukan di Laboratorium dengan fasilitas BSL-3.

HASIL

Identifikasi virus novel H1N1 pada RPH Kapuk Jakarta

Pada bulan Mei 2009, sebanyak 103 *pool* sampel usapan nasal berhasil dikoleksi dari 558 babi dari beberapa supplier/kongsi babi di Jakarta yang

sebagian besar memperoleh babi tersebut dari Jawa Tengah (Tabel 1). Seluruh babi berumur sekitar 6-8 bulan berasal dari spesies lokal.

Seratus tiga *pool* usapan nasal yang diidentifikasi dengan primer influenza A dan subtype H5 hanya dua sampel yang positif terdeteksi adanya virus H5N1 yaitu kode *pool* sampel D19 dan D100 dari kongsi yang berbeda tetapi berasal dari daerah yang sama yaitu Solo, Jawa Tengah. Seratus satu sampel sisanya tidak terdeteksi adanya virus influenza A, sedangkan identifikasi virus yang dilakukan setahun kemudian tepatnya pada bulan Mei 2010, memperlihatkan sebanyak 102 *pool* swab nasal yang dikoleksi dari 460 babi umur 6-8 bulan, tidak terdeteksi adanya infeksi virus influenza A (Tabel 1). Identifikasi selanjutnya pada bulan Oktober-Nopember 2010, delapan sampel individual yang dikoleksi dari RPH Kapuk (iriman dari BKHI Jakarta) menunjukkan 2 sampel positif teridentifikasi virus influenza novel H1N1.

Identifikasi virus novel H1N1 pada peternakan babi di pulau Bulan

Pool sampel nasal babi yang diduga terinfeksi virus novel H1N1 dari pulau Bulan. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa *pool* sampel S1, S2, S10 dan S11 selain terdeteksi adanya virus *swine flu* H1 juga terdeteksi adanya virus novel H1N1 yang merupakan virus pandemi saat ini. *Pool* sampel S5 merupakan *pool* sampel yang terdeteksi adanya virus novel H1N1 dan subtype H5, dan Pada *pool* sampel S6 terdeteksi adanya virus H1 *seasonal flu*, H5 dan novel

Tabel 1. Identifikasi sampel swab nasal babi dari RPH Kapok dengan menggunakan RT-PCR konvensional dan RealTime RT-PCR menggunakan beberapa set primer

Lokasi dan Bulan Pengambilan sampel	Jumlah babi/ Pool sampel	Hasil RT-PCR/qRT-PCR
RPH Kapok (Mei 2009)	558/103	2 Pool sampel positif H5N1
RPH Kapok (Mei 2010)	460/102	Semua pool sampel negatif influenza A
RPH Kapok (Okt-Nop 2010)	8 individual	2 individual sampel positif Novel H1N1

H1N1, sedangkan S7 dan S8 kemungkinan terdeteksi adanya virus H1 seasonal flu karena tidak dapat terdeteksi ketika diamplifikasi dengan primer *Swine Flu A*. Pool sampel S9 terdeteksi adanya virus subtipe H5 dan H1 (Tabel 2). Keberhasilan mengidentifikasi virus influenza subtipe H1 *seasonal* flu dan H5 pada babi mengindikasikan bahwa babi dapat terinfeksi virus avian influenza dan virus influenza manusia.

Sampel *swab* nasal babi yang dikoleksi dari Kota Batam, Kepulauan Riau yang relatif dekat dengan Singapura menunjukkan bahwa tidak terdeteksi adanya virus novel H1N1 (Tabel 3).

Infeksi sel MDCK dengan virus novel H1N1

Sel MDCK yang diinfeksi oleh inokulum sampel positif virus novel H1N1 secara qRT-PCR memperlihatkan adanya *Cytopathic Effect* (CPE) yang menunjukkan adanya pertumbuhan virus (Gambar 1). Selanjutnya sel MDCK yang membentuk CPE diidentifikasi ulang dengan menggunakan metode qRT-PCR seperti yang telah dilakukan sebelumnya. Hasil identifikasi ulang menunjukkan

bahwa sel MDCK yang membentuk CPE positif terdeteksi adanya virus novel H1N1 (Gambar 1b). Hasil identifikasi ulang virus dari supernatan sel MDCK menunjukkan positif virus novel H1N1.

Penelitian ini menunjukkan bahwa telah berhasil diidentifikasi virus novel H1N1 pada babi di Indonesia meskipun dalam lokasi yang terbatas. Mengapa hal ini terjadi masih belum diketahui dengan pasti, apakah babi terinfeksi dari manusia yang lebih dahulu terinfeksi oleh virus novel H1N1. Hal ini memerlukan kajian lebih lanjut.

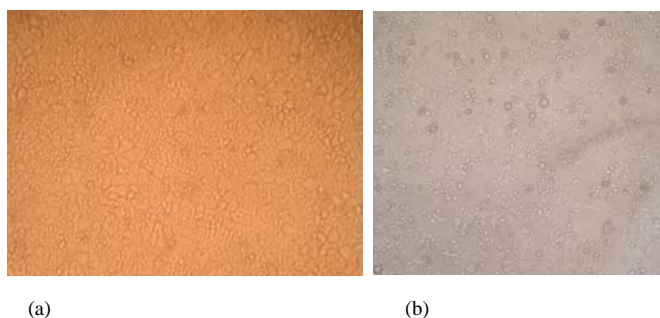
PEMBAHASAN

Sirkulasi virus novel H1N1 yang tercatat sampai tanggal 13 Juni 2010, menunjukkan bahwa lebih dari 214 negara termasuk Indonesia melaporkan kasus konfirmasi *pandemic* influenza H1N1 2009 dan lebih dari 18.172 meninggal dunia akibat infeksi virus ini (WHO 2010). Di lain pihak sirkulasi virus ini pada babi, khususnya di Indonesia sampai penelitian ini di lakukan belum pernah dilaporkan kejadian infeksi virus novel H1N1 pada babi. Pada penelitian

Tabel 2. Identifikasi sampel swab nasal babi dari pulau Bulan(*) dengan menggunakan RT-PCR konvensional dan RealTime RT-PCR menggunakan beberapa set primer

Kode pool sampel	Hasil Identifikasi dengan RT-PCR dan qRT-PCR dengan set primer					
	Flu A	H5	N1	H1	SwFluA (qRT-PCR)	SwHI(qRT-PCR) novel
	S1	+	-	-	+	+
S2	+	-	-	+	+	+
S3	+	-	-	-	-	-
S4	+	-	-	-	-	-
S5	++	+	-	-	-	+
S6	+	+	-	+	-	+
S7	+	-	-	+	-	-
S8	+	-	-	+	-	-
S9	+	+	-	+	-	-
S10	+	-	-	+	+	+
S11	+	-	-	+	+	+

(*) Kiriman dari BPPV Bukittinggi



Gambar 1. Sel MDCK (a) normal (sel tampak penuh dan *confluent*) ; (b) Sel MDCK diinfeksi sampel S10 yang positif terdeteksi adanya virus influenza novel H1N1 (sel tampak terpisah-pisah dan bergerombol).

ini virus novel H1N1 berhasil dideteksi pada babi di pulau Bulan dan beberapa babi yang berasal dari rumah potong babi di Jakarta. Hasil pengamatan klinis memperlihatkan bahwa babi-babi tersebut tampak sehat dan tidak menunjukkan gejala klinis influenza. Berdasarkan data penelitian Lange *et al.*

(2009) menyebutkan bahwa penelitian ekperimental pada babi yang diinfeksi dengan virus novel H1N1 (A/Regensburg/D6/09/H1N1) secara intranasal menimbulkan gejala klinis khas influenza berupa demam, bersin, keluarnya lendir dari hidung dan diare terjadi mulai satu hari setelah inokulasi

Tabel 3. Identifikasi sampel *swab nasal* babi dari Kota Batam (*) dengan menggunakan RT-PCR konvensional dan RealTime RT-PCR menggunakan beberapa set primer

Kode pool sampel	Hasil Identifikasi dengan RT-PCR dan qRT-PCR					
	Flu A	H5	N1	H1	SwFluA (qRT-PCR)	SwH1 (qRT-PCR) novel
SA1	+	-	-	-	-	-
SA2	+	-	-	-	-	-
SA3	+	-	-	-	-	-
SA4	+	-	-	-	-	-
SA5	+	-	-	-	-	-
SA6	+	-	-	-	-	-
SA7	+	-	-	-	-	-
SA8	+	-	-	-	-	-
SA9	+	-	-	-	-	-
SA10	+	-	-	-	-	-
SA11	+	-	-	-	-	-
SA12	+	-	-	-	-	-
SA13	+	-	-	-	-	-
SA14	+	-	-	-	-	-
SA15	+	-	-	-	-	-
SA16	+	-	-	-	-	-
SA17	+	-	-	-	-	-

(*) Kiriman dari BPPV Bukittinggi

virus. Babi yang terinfeksi ini dapat menularkan babi lainnya tetapi tidak dapat menginfeksi ayam yang ditandai dengan tidak adanya gejala klinis, sero konversi ataupun ekskresi virus. Tidak dapat terinfeksi ayam oleh virus novel H1N1 juga didukung oleh penelitian Babiuk *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa virus novel H1N1 tidak patogen pada ayam. Data yang menunjukkan bahwa ayam tidak peka terhadap virus ini memberikan sedikit keuntungan terhadap kita karena situasi virus H5N1 yang masih

bersirkulasi pada ayam di Indonesia, setidaknya tidak bertambah buruk dengan hadirnya virus novel H1N1 ini. Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar babi yang diteliti pada penelitian ini memperlihatkan tidak terdeteksinya virus novel H1N1 menginfeksi babi di Indonesia kecuali babi di pulau Bulan dan individual sampel *swab nasal* babi dari RPH Kapuk yang dikoleksi sekitar Oktober-Nopember 2010. Terdeteksinya virus novel H1N1 dari babi di RPH Kapuk pada akhir tahun

2010, menunjukkan bahwa peran *surveilans* dan monitoring virus ini masih harus terus dilakukan. Kekhawatiran akan terjadinya *reassortant* virus H5N1 dan virus H1N1 atau dengan virus seasonal flu lainnya harus tetap diwaspadai, dikarenakan babi sangat peka terhadap infeksi avian dan influenza virus manusia, *genetic reassortment* antara avian dan influenza manusia dapat terjadi ketika virus ini menginfeksi secara bersama-sama pada seekor babi (Scholtissek 1990). Potensi meningkatnya virulensi yang kemungkinan terjadi reassortant antara highly pathogenic H5N1 dengan virus novel H1N1 khususnya di Indonesia membutuhkan suatu perencanaan kemungkinan terjadinya pandemi reassortant virus-virus tersebut (Brockwell-Staats *et al.* 2009).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa di Indonesia telah terdeteksi virus novel H1N1 pada babi pada salah satu peternakan di Pulau Bulan pada tahun 2009 dan dua sampel dari RPH Kapuk juga berhasil diideteksi adanya virus novel H1N1. Hal ini memperlihatkan bahwa sirkulasi virus influenza novel H1N1 masih harus diwaspadai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada drh Yuli Miswati dan drh M Syibli (BPPV Bukittinggi) serta drh Irma Budiarti (BKHI Jakarta) atas kontribusinya. Ucapan terima kasih juga kepada Nana

Suryana dan Teguh Suyatno atas bantuan teknisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Babiuk, S., R. Albrecht, Y. Berhene, P. Marszal, JA. Richt, A. Garcia-Satre, J. Pasick, & Weingartl, H. 2010. 1908 and 2009 H1N1 influenza viruses are not pathogenic in birds. *J. Gen Virol.* 91 : 339-342
- Brockwell-Staats C., RG.Webster, & RJ. Webby. 2009. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 3: 207-213
- Brown IH., S. Ludwig, CW. Olsen, C. Hannoun, C. Scholtissek , VS. Hinshaw, PA. Harris, JW. McCauley, I. Strong, & DJ. Alexander. 1997. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. *J. Gen. Vir.* 78: 553-562
- Dawood FS, S. Jain, L. Finelli, MW. Shaw, S. Lindstrom, RJ. Garten, LV. Gubareva, X. Xu, CB. Bridges, TM. Uyeki. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 360 : 2605-615
- Garten, RJ, CT. Davis, CA. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, WM. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J Barnes, CB. Smith, SL. Emery, MJ. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf,

- D F. Burke, RAM. Fouchier, C Pappas, CM. Alpuche-Aranda, H. López-Gatell, H. Olivera, I. López, CA. Myers, D. Faix, PJ. Blair, C. Yu, KM. Keene, PD Dotson, Jr., DBoxrud, AR. Sambol, SH. Abid, K St. George, T. Bannerman, AL. Moore, DJ. Stringer, P. Blevins, Gail J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, HF. Guevara, EA. Belongia, PA. Clark, ST. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, CB. Bridges, M. Shaw, DB. Jernigan, TM. Uyeki, DJ. Smith, AI. Klimov, & NJ. Cox. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 325:197-201
- Ito T, JN. Couceiro JN, & S. Kelm. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*. 72:7367-7373.
- Lee, MS., PC. Chang, JH. Shien, MC. Cheng, & HP. Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods*. 97: 13-22.
- Lange, E., D. Kalthoff, U. Blohm, JP. Teifke, A. Breithaupt, C. Maresh, E. Starick, S. Fereidouni, B. Hoffman, TC. Mettenleiter, M. Beer, & TW. Vahlenkamp. 2009. Pathogenesis and transmissibility of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J. Gen Virol*. 90: 2119-2123
- Olsen, CW. 2002. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*. 85:199-210.
- Pensaert, M., K. Ottis, J. Vanderputte, MM. Kaplan, & PA. Buchmann. 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential for man. *Bulletin of the World Health Organization*. 59:75-78
- Richt, JA., KM. Lager, BH. Janke, RD. Woods, RG. Webster, & RJ. Webby. 2003. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J. Clin. Microbiol*. 41:3198-3205
- Rogers, GN., JC. Paulson. 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virol*. 127:361-373.
- Scholtissek, C., H. Burger, PA. Bachmann, & C. Hannoun. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*. 129:521-523
- Scholtissek C. 1990. Pigs as the "mixing vessel" for the creation of new pandemic influenza A viruses. *Med Principles Pract*. 2:65-71
- Shinde V, Bridges CB, TM. Uyeki, B. Shu, A. Balish, X. Xu, S. Lindstrom, LV. Gubareva, V. Deyde, RJ.

- Garten, M. Harris, S. Gerber, F. Vagasky, F. Smith, MD, Neal Pascoe, K. Martin, D. Dufficy, K. Ritger, C. Conover, P. Quinlisk A. Klimov, JS. Bresee, & L. Finelli. 2009. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N. Engl. J. Med.* 360: 2616-2625
- Shope, RE. 1931. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med.* 54 : 373-385
- Smith, GJ., D. Vijaykrishna, J. Bahl, SJ. Lycett, M. Worobey, OG. Pybus, SK. Ma, CL. Cheung, & J. Raghvani. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* 459 : 1122-1125
- Webster, RG., WJ. Bean, OT. Gorman, TM. Chambers, & Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56:152-179.
- WHO, 2010. Pandemic (H1N1) 2009 - update 105. <http://www.who.int/diakses> 20 Juni 2010.
- WHO, 2009. *CDC Protocol of realtime RT-PCR for influenza A (H1N1)*. Revision 30 April 2009. The WHO Collaborating Centre for influenza at CDC Atlanta, United States of America.
- Wright, KE., GAR. Wilson, GD. Novosad, C. Dimock, D. Tan, D & JM. Weber. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J. Clin Microbiol.* 33:1180-1184

Memasukkan: Februari 2011

Diterima: Juni 2011