

**DETEKSI VIRUS INFLUENZA TIPE A SUBTIPE H5N1  
DARI APUSAN TENGGOROKAN  
PENDERITA *INFLUENZA LIKE ILLNESS* (ILI)  
DI MAKASSAR DENGAN TEKNIK *REAL TIME* RT-PCR**



**MASHURI MASRI  
P1506205001**

**KONSENTRASI MIKROBIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOMEDIK  
PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2008**

**DETEKSI VIRUS INFLUENZA TIPE A SUBTIPE H5N1  
DARI APUSAN TENGGOROKAN  
PENDERITA *INFLUENZA LIKE ILLNESS* (ILI)  
DI MAKASSAR DENGAN TEKNIK *REAL TIME* RT-PCR**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Biomedik / Mikrobiologi

**MASHURI MASRI**

Kepada

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2008**

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS**

Yang Bertanda Tangan di Bawah Ini :

Nama : Mashuri Masri  
NIM : P1506205001  
Program Studi : Biomedik / mikrobiologi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 Agustus 2008

Yang Menyatakan,

**MASHURI MASRI**

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Nabiullah Muhammad SAW yang dengan cintanya telah menebarkan ajaran agama islam yang mulia. Tesis ini merupakan salah satu syarat pada Program Pendidikan Biomedik mikrobiologi Pasca sarjana Universitas Hasanuddin makassar. Walaupun cukup banyak kendala penulis hadapi dalam menyusun tesis ini, tetapi atas bantuan berbagai pihak maka penulisan ini akhirnya dapat penulis selesaikan.

Pada kesempatan ini dengan segala hormat dan ketulusan hati, penulis menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada dr. Muh. Nasrum Massi Ph.D dan Prof dr. Moch. Hatta Ph.D, Sp. MK yang dengan tulus ikhlas telah membimbing kami sejak awal sampai akhir penulisan ini. Dan melalui kesempatan ini pula penulis sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Hasanuddin, Direktur Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mengikuti program Pendidikan Pascasarjana.
2. Ketua Program Studi Biomedik, ketua konsentrasi Mikrobiologi Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah mendidik dan menanamkan didiplin kepada kami.
3. Kepala Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta staf yang telah mendidik dan meletakkan dasar-dasar ilmu mikrobiologi dan terapannya kepada kami.

4. Prof. Dr. drh. Surung Karo Karo, M.S., Prof. Dr. Ir. Akbar Tahir, M.Sc dan Dr. dr. Burhanuddin Bahar, M.S yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran mereka yang begitu berharga sebagai penguji kami.
5. Orang tua kami Hj. Djunarti (alm) dan H. Masri Sanusi, SP yang telah memberikan segalanya kepada kami, juga kepada mertua kami Faidah Salam dan Djunaid Abbas atas doa dan dukungannya. Istri Kami tercinta, Rusny Djunaid, SP, anak kami Elena Istiqamah dan Alena Istiqamah (alm) yang telah mendoakan dan membantu kami. Adik-adikku, Srinamirah, Arafah RN, Zainal Masri atas doa dan dukungannya.
6. Rektor Universitas Muhammadiyah Pare-pare, dosen dan Staf yang telah membimbing dan mengarahkan kami dalam mengikuti Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.
7. Seluruh teman-teman angkatan 2005 peserta konsentrasi Mikrobiologi, Program Studi Biomedik Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar atas kerjasama dan bantuannya.
8. Ketua Badan Pembina Yayasan dan ketua Yayasan Mega rezky Makassar yang telah memberikan kebijaksanaannya kepada kami. Ketua, dosen dan Staf STIKES Mega rezky yang telah membantu kami.
9. Hasniati, Harlina, Anti, Esse, Risna, Yayu, Isra, dan seluruh mahasiswa Program Studi S1 Keperawatan dan DIII Kebidanan atas doa dan kerjasamanya. Kami doakan suatu saat kalian akan melakukan proses penulisan tesis seperti ini, Amin.

Makassar, 29 Agustus 2008

MASHURI MASRI

## ABSTRAK

MASHURI MASRI. Deteksi Virus Influenza Tipe A Subtipe H5N1 dari Hapusan Tenggorok Penderita *Influenza-Like Illness* (ILI) di Makassar dengan Teknik *Real Time* RT-PCR

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah hapusan tenggorok dari pasien penderita *Influenza-Like Illness* di Makassar dapat menjadi sumber spesimen untuk mendeteksi Virus Influenza Tipe A dan B dengan metode *Real Time* RT-PCR dan untuk mengetahui apakah teknik *simplex* RT-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi virus H5N1 dari virus influenza tipe A.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Regional Flu Burung Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar selama bulan Juli-Agustus 2008. Sampel yang diperiksa sebanyak 51 hapusan tenggorok dari pasien penderita *Influenza-Like Illness* di Makassar yang terdiri dari dua bagian yakni *Nasopharyngeal* dan *Oropharyngeal*. Teknik *Real Time* RT-PCR dilakukan untuk mendeteksi Flu A dan Flu B pada hapusan tenggorokan tersebut. Sampel yang positif flu A kemudian dilanjutkan pemeriksaan dengan teknik *simplex* RT-PCR untuk mendeteksi sub tipe H5N1. Primer yang digunakan merupakan Primer spesifik flu A Z46392 dengan target band 260 bp, Primer spesifik Flu B D38646 dengan target band 159 bp dan Primer spesifik H5N1 EF 541402 dengan target band 81 bp (H5) dan 80 bp (N1). Data dianalisis secara deskriptif dan korelasi *bivariate* untuk mengetahui hubungan antara jenis kelamin, umur terhadap Flu A dan Flu B, Nilai *Threshold cycle* (*Ct*) dari *Oropharyngeal Swab* (*Ct Ts*) dan *Nasopharyngeal Swab* (*Ct Ns*) dari pasien penderita flu A dan flu B dianalisis untuk melihat hubungan antara flu A dan Flu B terhadap nilai *Ct Ts* dan *Ct Ns*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 15 sampel positif Flu A, 20 sampel positif Flu B, 14 sampel negatif Flu A dan Flu B, dan 2 sampel positif Flu A dan Flu B. Dari hasil analisis statistik untuk umur diperoleh nilai signifikan (2-sided) 0.767, untuk jenis kelamin diperoleh nilai signifikan (2-sided) 0.198, untuk *Threshold cycle* (*Ct*) dari *Oropharyngeal Swab* (*Ct Ts*) diperoleh nilai signifikan (2-tailed) 0.603, untuk *Nasopharyngeal Swab* (*Ct Ns*) diperoleh nilai signifikan (2-tailed) 0.872. Baik umur, jenis kelamin, *Ct Ts* dan *Ct Ns* semuanya tidak signifikan karena nilainya lebih besar dari  $P = 0.05$ . Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan antara jenis kelamin, umur, *Ct Ts* dan *Ct Ns* dengan Flu A dan Flu B.

Kata kunci : Flu A, Flu B, Sub Tipe H5N1, Hapusan Tenggorok, *Influenza-Like Illness* (ILI), *Real Time* RT-PCR, *Simplex* RT-PCR, *Threshold cycle* (*Ct*), *Threshold Cycle Oropharyngeal Swab* (*Ct Ts*), *Threshold Cycle Nasopharyngeal Swab* (*Ct Ns*).

## ABSTRAK

MASHURI MASRI. Detection of Influenza Type A Subtype H5N1 at Swab Throat Influenza-Like Illness (ILI) patient in Makassar Using Real Time RT-PCR test.

The study aims to identify if swab throat Influenza-Like Illness (ILI) patient in Makassar could be specimen to detect Influenza Virus Type A and B using Real Time RT-PCR test, and to identify if *simple* RT-PCR method could be used to detect H5N1 Virus from Influenza Virus Type A.

The Study was carried out in molecular biology and immunology laboratory of the faculty of medicine of Hasanuddin University since July until August 2008. 51 samples from swab throat Influenza-Like Illness (ILI) patient in Makassar, each samples are two parts, *Nasopharyngeal* swab dan *Oropharyngeal* swab. Its were identify to detect Influenza Virus Type A and B using Real Time RT-PCR test. Then Influenza Virus Type A Positive samples were identify to detect H5N1 virus using Simple RT-PCR test. The study used specific Primer Influenza A Z46392 with target band 260 bp, Influenza B D38646 with target band 159 bp and Influenza H5N1 EF 541402 with target band 81 bp (H5) and 80 bp (N1). The data were analysed descriptively using frequency and bivariate test to describe the correlation between The ages as well as The sexes and The Influenza Type A and B.

The Study indicates that 15 samples are found to be influenza A positive, 20 samples are found to be influenza B negative, 2 samples are found to be influenza A and B, 14 samples are found to be influenza negative influenza A and B. The statistical analysis indicated some significance values (2-tailed) in the correlation between the age and the Influenza Type A Type B which is 0.767, between the sex and the Influenza Type A Type B which is 0.198, between Treshold cycle (Ct) from *Oropharyngeal* Swab (Ct Ts) and the Influenza Type A Type B which is 0.603, and in that between Treshold cycle (Ct) from *Nasopharyngeal* Swab (Ct Ns) and the Influenza Type A Type B which is 0.872. They are insignificant because the values tested are bigger than  $P = 0.05$ . Therefore, it can be concluded there is no correlation between the age, the sex, Ct Ts, Ct Ns and Influenza Type A Type B.

Keyword : Influenza type A, Influenza type B, Sub Type H5N1, Throat swab, Influenza-Like Illness (ILI), Real Time RT-PCR, Simple RT-PCR, Treshold cycle (Ct), Treshold Cycle *Oropharyngeal* Swab (Ct Ts), Treshold Cycle *Nasopharyngeal* Swab (Ct Ns).

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
<b>PRAKATA</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRAK</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	6
E. Defenisi dan Istilah	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Virus H5N1	9
B. Pathogenesis Influenza	13
C. Definisi Kasus	15
D. Gambaran Klinis	18

E. Gambaran Radiologis	19
F. Diagnosis Laboratorium	19
G. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	20
H. Thermal Cyclers	26
I. <i>Real Time</i> PCR	27
J. <i>Reverse Transcriptase</i> PCR (RT-PCR)	35
K. Kerangka Konsep	39

### **BAB III. METODE PENELITIAN**

A. Jenis Penelitian	41
B. Waktu dan Tempat Penelitian	41
C. Variabel Penelitian	41
D. Bahan dan Alat Penelitian	42
E. Cara Pengumpulan Data	43
F. Cara Kerja	44
G. Kerangka Operasional Penelitian	56
H. Analisis Data	57

### **BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

A. Hasil Penelitian	58
B. Pembahasan	76

**BAB V PENUTUP**

A. Kesimpulan 81

B. Saran 82

**DAFTAR PUSTAKA 83**

**LAMPIRAN 86**

## DAFTAR TABEL

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Hubungan Antara Banyaknya Siklus Dengan Jumlah DNA yang Dihasilkan	22
2. Total Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	58
3. Kelompok Umur Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan Flu B	59
4. Jenis Kelamin Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	60
5. Lama Demam Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	61
6. Riwayat Kontak dengan Ternak Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	62
7. Riwayat Peternakan di Lingkungan Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	63
8. Riwayat Penderita Flu di Lingkungan Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	64
9. Temperatur Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	65
10. Batuk pada Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	66
11. Dyspnea pada Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	67
12. Sakit Tenggorokan pada Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	68
13. Pilek pada Penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	68
14. Myalgia pada penderita Flu A, Flu B, Negatif Flu A dan Flu B, Flu A dan flu B	69

15. Gejala Lain pada Penderita Flu A, flu B	69
16. Nilai Treshold Cycle (Ct) Flu A pada Apusan Tenggorokan	70
17. Nilai Treshold Cycle (Ct) Flu B pada Apusan Tenggorokan	71
18. Hasil Amplifikasi Langsung dari Instrumen IQ5	74

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Skema Virus Influenza	10
2. Virus Tipe H5N1	12
3. Kurva amplifikasi	23
4. Skema Tahapan PCR	25
5. <i>Thermal Cycler</i>	26
6. Data Grafik Amplifikasi <i>Real Time</i> PCR	28
7. Flourescen (RFU) yang dipancarkan pada tiap siklus	29
8. Hubungan antara Ct dengan Starting Quantity	30
9. Sintesis DNA Menggunakan Probe Taqman	32
10. Pemantauan Sintesis DNA (dengan <i>Probe</i> Sybr Green)	34
11. Sintesis cDNA	36
12. Amplifikasi DNA	38

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Nomor</b>	<b>Halaman</b>
1. Isolasi RNA Virus Flu A, Flu B	86
2. Urutan Nuleutida Virus Influenza Tipe A Z46392	87
3. Urutan Nuleutida Virus Influenza Tipe B D38646	90
4. Urutan Nuleutida Virus Avian Influenza H5N1 EF541402	93
5. Hasil Analisis Statistik Uji T Parametrik	96
6. Data Penderita Flu A, Flu B, Positif flu A dan Flu B Negatif Flu A dan Flu B	109

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Avian Influenza (AI) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus influenza A subtype H5N1 dan telah mengakibatkan kematian dan pemusnahan massal terhadap unggas serta mengakibatkan kematian pada manusia di berbagai penjuru dunia. AI pada manusia pertama kali ditemukan di Hongkong pada tahun 1997 dan menginfeksi 18 orang dan 6 orang di antaranya meninggal dunia. Kemudian pada awal tahun 2003 ditemukan 2 orang penderita dengan 1 orang meninggal dunia. Virus H5N1 kemudian merebak di Asia sejak pertengahan Desember 2003 sampai sekarang. Di Indonesia, virus ini menyerang ternak ayam sejak Oktober 2003 sampai Februari 2004 dan dilaporkan sebanyak 4,7 juta ayam mati. Laporan WHO pada tanggal 18 Juni 2007 menyebutkan jumlah kasus AI pada manusia di Indonesia sebanyak 100 orang dan 80 di antaranya meninggal dunia. Angka ini merupakan angka tertinggi di dunia. Data terakhir WHO, tanggal 19 juni 2008 menyebutkan jumlah kasus AI pada manusia di Indonesia sebanyak 135 orang dan 110 di antaranya meninggal dunia. (WHO, 2007, 2008).

Virus influenza adalah virus dengan materi genetik asam ribo-nukleat (*ribonucleic acid/RNA*) serat tunggal (*single stranded/ss*), berpolaritas negatif (-) yang terpisah dalam 8 segmen (McGeoch dkk. 1976), dari Familia *Orthomyxoviridae* (Webster dan Hulse 2004; Horimoto dan Kawaoka 2001). Virus-virus dari keluarga

ini dikelompokkan menjadi klas A, B, dan C berdasarkan perbedaan antigenik nukleoprotein (NP) and matriks (M1) (Fouchier dkk. 2005; Horimoto dan Kawaoka 2005).

Virus influenza yang menyerang unggas digolongkan ke dalam kelompok virus influenza A, termasuk di dalamnya virus penyebab AI. Selain menyerang unggas, virus influenza A juga dapat menyerang mamalia. Golongan virus influenza A dibagi ke dalam sub tipe berdasarkan determinan antigeniknya yaitu Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA). Baik Hemagglutinin maupun Neuraminidase adalah protein antigenik yang terdapat pada permukaan virus influenza tipe A. Hemagglutinin berfungsi untuk berlekatan dengan reseptor sel host, sementara Neuraminidase berperan dalam eksositosis virus setelah replikasi di dalam sel host. Hemagglutinin terdapat sebanyak 16 tipe, dan Neuraminidase sebanyak 9 tipe. Sebagian besar anggota golongan virus influenza A hanya mengakibatkan gejala lemah (*Low Pathogenic AI*, LPAI) pada makhluk hidup yang diserangnya, akan tetapi tipe H5 dan H7 dapat menyebabkan gejala yang parah (*High Pathogenic AI*, HPAI) pada makhluk hidup yang diserangnya. Virus penyebab AI patogenik yang kita kenal selama ini adalah virus tipe H5N1 (De Jong *et al.*, 2006).

Avian influenza umumnya menular dari unggas ke manusia. Orang-orang yang bekerja mengolah unggas umumnya rentan terhadap penularan AI. Penularan juga dapat terjadi melalui pernapasan, mengolah unggas yang sakit, bermain dengan unggas, dan konsumsi darah unggas atau daging unggas yang belum matang. Gejala yang ditunjukkan penderita AI umumnya adalah demam tinggi (lebih dari 38°C), dan

gejala seperti influenza (*Influenza Like Illness*). Pada beberapa pasien juga terjadi diare, muntah, sakit perut, dan perdarahan pada hidung dan gusi (Beigel *et al.*, 2005).

Walaupun penularan antar manusia belum umum terjadi, ada kekhawatiran akan terjadi pandemi apabila virus H5N1 beradaptasi menjadi virus yang dapat menular dari manusia ke manusia. Hal ini dapat terjadi antara lain akibat mutasi bertahap (*Genetic Drift*), mutasi mendadak (*Genetic Shift*), atau oleh pertukaran materi genetik antara virus influenza H5N1 dengan virus influenza yang menyerang manusia apabila kedua macam virus tersebut menyerang sebuah inang secara bersamaan.

Virus Flu mengalami perubahan pada dasarnya melalui dua cara yaitu: antigenik drift dan antigenic shift. Perubahan dengan cara antigenik drift jika virus berubah sedikit demi sedikit secara terus menerus dalam jangka waktu yang lama. Proses ini akan menghasilkan virus strain baru yang tidak dapat dikenali oleh antibodi virus yang lama. Karena adanya virus strain baru yang terus menerus inilah orang dapat terserang flu beberapa kali.

Cara perubahan antigenik shift berbeda. Virus flu A tidak berubah sedikit demi sedikit tetapi mendadak dan menghasilkan virus flu A yang baru, yang dapat menginfeksi manusia. Virus ini juga mempunyai hemagglutinin dan neuraminidase yang tidak teridentifikasi oleh manusia. Kalau virus strain baru ini menginfeksi manusia dan manusia tidak mempunyai kekebalan terhadap strain baru ini, maka virus dapat menyebar dari manusia ke manusia (*Reassortment*) (Goldrick, 2007).

Untuk mencegah menyebarnya wabah AI diperlukan deteksi dini akan keberadaan kasus AI pada Virus Influenza Tipe A Dan B. Deteksi dini kasus AI akan memacu perawatan dan antisipasi penularan AI pada kontak penderita AI serta usaha pengawasan dan perbaikan lingkungan di sekitar penderita AI. Deteksi dini yang sensitif untuk AI saat ini adalah metode *Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)*. Walaupun kultur virus AI merupakan standar emas, akan tetapi metode ini memakan waktu yang lama dan membutuhkan kerja yang berat. Metode *Real Time RT-PCR* di lain pihak telah terbukti merupakan deteksi yang sensitif dan cepat dalam mendeteksi kasus AI (Ng *et al.*, 2006).

Pada penelitian terhadap virus AI strain Indonesia dan strain Vietnam yang dilakukan oleh Smith *et al.* (2006), virus strain Indonesia digolongkan ke dalam 3 kelompok yaitu kelompok A (Jawa, Sulawesi Selatan, dan Timor Barat ), kelompok B (Jawa, Bali, Flores, dan Timor Barat), dan kelompok C (Jawa, Sumatra, dan Pulau Bangka). Penyebaran virus AI terjadi baik melalui jalur perdagangan unggas maupun melalui perpindahan unggas di dalam negeri namun tidak ada introduksi ulang dari luar Indonesia. Semua virus di Indonesia berasal dari nenek moyang yang sama. Namun demikian, virus dari grup C bersifat khusus karena resisten terhadap amantadine, sebagai salah satu obat anti virus yang digunakan untuk melawan AI (Smith, *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini akan dilakukan pemeriksaan *Real Time* RT-PCR dari spesimen hapusan tenggorok yang terdiri dari *Oropharyngeal swab* dan *Nasopharyngeal swab* dari sampel penderita *Influenza Like Illness*.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dikaji dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah metode *Real Time* RT-PCR dapat mendeteksi Virus Influenza Tipe A dan B pada penderita *Influenza Like Illness* di Makassar
2. Apakah hapusan tenggorok dari pasien penderita *Influenza Like Illness* dapat menjadi sumber spesimen untuk mendeteksi Virus Influenza Tipe A dan B dengan metode *Real Time* RT-PCR

## **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan :

1. Untuk mengetahui apakah metode *Real Time* RT-PCR dapat mendeteksi Virus Influenza Tipe A dan B pada penderita *Influenza Like Illness* di Makassar.
2. Untuk mengetahui apakah hapusan tenggorok dari pasien penderita *Influenza Like Illness* dapat menjadi sumber spesimen untuk mendeteksi Virus Influenza Tipe A dan B dengan metode *Real Time* RT-PCR.
3. Apakah sampel RT-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi virus H5N1 dari virus influenza tipe A.

#### **D. Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini yaitu :

1. Untuk mengembangkan ilmu terutama dalam pendeteksian Virus Influenza Tipe A dan B pada penderita *Influenza Like Illness*.
2. Dengan melakukan penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar diagnostik kasus flu burung (khususnya H5N1) di kota Makassar.

#### **E. Defenisi dan Istilah**

1. AI

Merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus influenza A sub tipe H5N1.

2. Virus tipe A dan B

Pengelompokan virus penyebab influenza ke dalam 3 kelompok yaitu kelompok A, B dan C.

3. H5N1

Suatu strain virus influenza tipe A yang sangat virulen (ganas) dapat menyebabkan AI.

4. ILI

*Influenza Like Illness* (penyakit yang menyerupai influenza) adalah penyakit-penyakit yang secara klinis mempunyai gejala seperti influenza yaitu panas, batuk, pilek, nyeri tenggorokan, kepala pusing, dan nyeri otot.

## 5. Tenggorok

Terdiri dari dua bagian yakni *Nasopharyngeal* dan *Oropharyngeal*. *Nasopharyngeal*.

## 6. *Nasopharyngeal*

Bagian Pharyng yang terletak di bagian dalam hidung.

## 7. *Oropharyngeal*

Bagian *Pharynx* yang terletak di bagian langit-langit mulut, yakni Langit-langit keras (*Pallatum Durum*) dan Langit-langit lunak (*Pallatum Mole*).

## 8. Simpel *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Simpel RT-PCR)

Suatu cara sederhana dan cepat untuk memperbanyak sekuen DNA/cDNA spesifik yang diinginkan dengan ukuran tertentu. Prinsip dasar dari metode ini adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup. Hal pertama yang dilakukan adalah merubah sekuen RNA spesifik dengan ukuran tertentu yang diinginkan menjadi cDNA dengan bantuan enzim *Reverse Transcriptase*. Kemudian sekuen cDNA diamplifikasi melalui mekanisme perubahan suhu. kemudian hasil amplifikasi produk PCR akan dijalankan dalam gel elektroforesis untuk menentukan dan melihat secara kasad mata hasil PCR tadi.

#### 9. *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)*

Suatu cara sederhana dan cepat untuk memperbanyak sekuen DNA/cDNA spesifik yang diinginkan dengan ukuran tertentu. Prinsip dasar dari metode ini adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup. Hal pertama yang dilakukan adalah merubah sekuen RNA spesifik dengan ukuran tertentu yang diinginkan menjadi cDNA dengan bantuan enzim *Reverse Transcriptase*. Kemudian sekuen cDNA diamplifikasi melalui mekanisme perubahan suhu. Tetapi kita dapat mengetahui apakah cDNA berhasil untuk diperbanyak atau tidak selama proses amplifikasi masih berlangsung, hal inilah yang membedakan *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)* dengan *Simpel Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Simpel RT-PCR)*.

#### 10. Sensitivitas

Adalah Kepekaan atau kemampuan suatu uji dalam mendeteksi substansi dalam jumlah yang amat kecil secara tepat. Rendahnya angka sensitivitas akan menghasilkan negatif palsu.

#### 11. Spesivitas

Adalah Kemampuan suatu uji mendeteksi hanya satu senyawa tunggal secara benar. Rendahnya angka spesivitas akan menghasilkan positif palsu.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

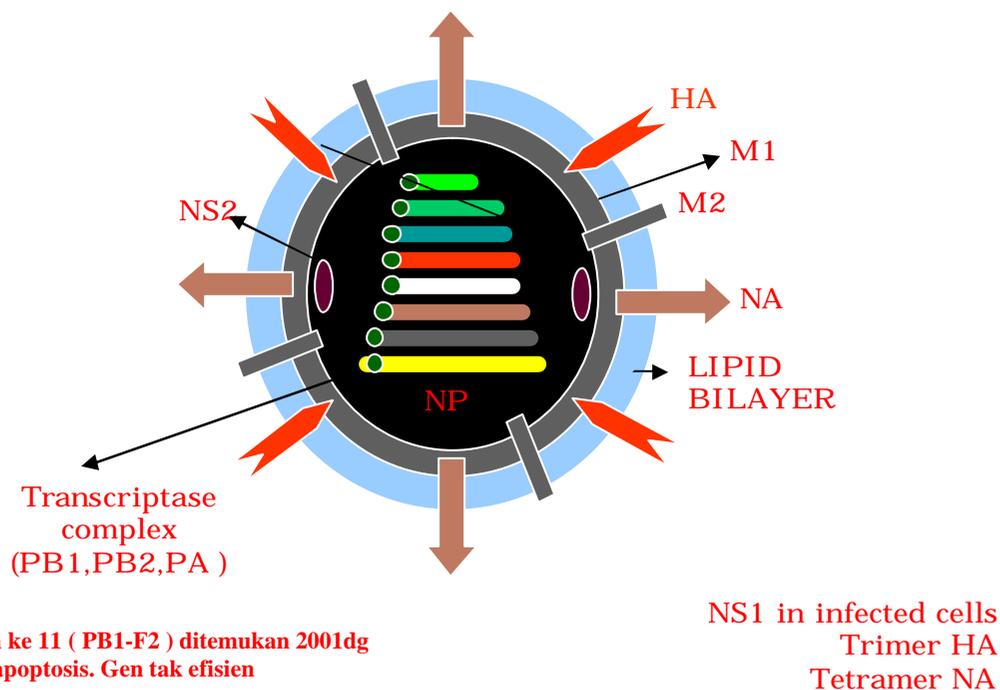
#### **A. Virus H5N1**

Penyebab flu burung adalah virus influenza tipe A . Virus influenza termasuk famili *Orthomyxoviridae*. Virus influenza tipe A dapat berubah-ubah bentuk (*Drift, Shift*), dan dapat menyebabkan epidemi dan pandemi. Virus influenza tipe A terdiri dari *Hemagglutinin* (H) dan *Neuraminidase* (N), kedua huruf ini digunakan sebagai identifikasi kode sub tipe flu burung yang banyak jenisnya. Pada manusia hanya terdapat jenis H1N1, H2N2, H3N3, H5N1, H9N2, H1N2, H7N7. Sedangkan pada binatang H1-H5 dan N1-N9 (Bapelkes, 2007).

Strain yang sangat virulen/ganas dan menyebabkan flu burung adalah dari sub tipe A H5N1. Virus tersebut dapat bertahan hidup di air sampai 4 hari pada suhu 22 °C dan lebih dari 30 hari pada 0 °C. Virus akan mati pada pemanasan 60 °C selama 30 menit atau 56<sup>0</sup> C selama 3 jam dan dengan detergent, desinfektan misalnya formalin, serta cairan yang mengandung iodine (Bapelkes, 2007).

Virus tipe H5N1 berukuran 80 hingga 120 nanometer, berbentuk filamen, dan memiliki *envelope*. Genom bersegmen terdiri atas 8 RNA untai tunggal berorientasi negatif, yang mengkode 11 macam protein. Kedelapan segmen/untai RNA tersebut adalah HA (mengkode Hemagglutinin), NA (mengkode Neuraminidase), NP (mengkode Nukleoprotein), M (mengkode protein matriks M1 dan M2), NS (mengkode protein non struktural NS1 dan NEP), PA (mengkode RNA polimerase),

PB1 (mengkode sebuah RNA polimerase, dan sebuah enzim penginduksi apoptosis yaitu PB1-F2), dan PB2 (mengkode RNA polimerase) (De *et al.*, 2006 ; Ng *et al.*, 2006).



Gambar 1. Skema Virus Influenza

### Karakter Penting Komponen Virion Influenza

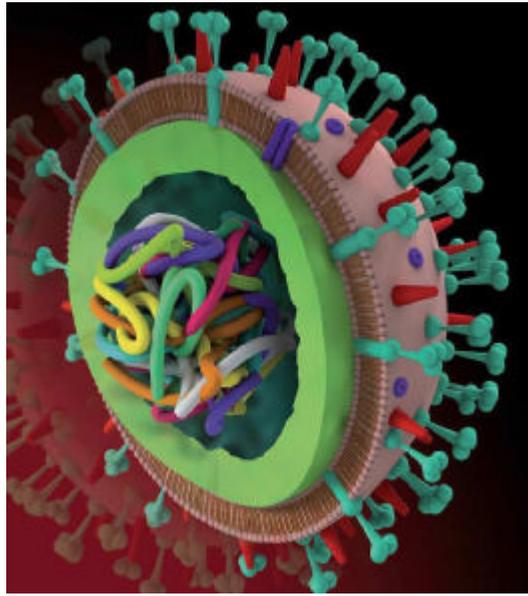
#### 1. Protein NP :

1. Protein ini menginduksi antibodi reaktif silang dengan influenza A lain, seperti M1 dan M2
2. Protein ini juga meninduksi CTL reaktif/protektif silang

#### 2. HA

1. HA menginduksi 5 antibodi netralisasi

2. HA juga melekatkan virus pada reseptor di sel, yang berupa glikolipid atau gugus asam sialat yang terikat pada galaktosa dengan ikatan  $\alpha$ 2,6 dan  $\alpha$ 2,3 (Horimoto dan Kawaoka 2005; 2001)
3. Ikut berperan pada penetrasi virus ke dalam sel. Kemampuan dipecah menjadi HA1 dan HA2 merupakan marka virulensi.
4. Mutasi HA1 lebih cepat dari HA2 dan berperan dalam seleksi alamiah



Keterangan :



= hemaglutinin



= M2



= Neuraminidase



= M1



= Nukleoprotein

Gambar 2. Virus Tipe H5N1

## B. Pathogenesis Influenza

Virus influenza tidak serta-merta mudah mengjangkiti manusia meski banyak terdapat di udara. Banyak faktor yang menentukan virus masuk ke tubuh manusia, di antaranya strain virus harus memiliki kecocokan dengan tubuh sebagai reseptor. Meski diserang virus, kalau tubuh manusia tidak membuka diri sebagai reseptor, penyakit itu tidak akan hinggap (www. Pikiran Rakyat.com, 2008)

Virus yang menyerang unggas memiliki afinitas terhadap reseptor asam sialat yang memiliki ikatan  $\alpha$  2,3 terhadap galaktosa dan reseptor ini terdapat secara dominan pada sel epitel paru-paru unggas. Virus yang menyerang manusia memiliki afinitas terhadap reseptor asam sialat yang memiliki ikatan  $\alpha$  2,6 terhadap galaktosa dan reseptor ini terdapat secara dominan pada sel epitel paru-paru manusia. Reseptor asam sialat  $\alpha$  2,3 ditemukan dalam jumlah kecil pada manusia, dan sebaliknya reseptor asam sialat  $\alpha$  2,6 ditemukan dalam jumlah kecil pada unggas. Babi memiliki reseptor asam sialat  $\alpha$  2,3 dan  $\alpha$  2,6 dalam jumlah yang nyaris sebanding (De *et al.*, 2006 ; Ng *et al.*, 2006).

Penularan penyakit influenza dapat terjadi secara kontak langsung atau tidak langsung. "Umumnya, penularan terjadi melalui cairan air ludah/liur yang diproduksi mukosa mulut dan terpercik keluar saat penderita bercakap-cakap atau batuk maupun bersin. Selain itu, virus juga bisa terbawa oleh lendir hidung maupun tinja (www. Pikiran Rakyat.com, 2008).

Periode masuknya virus penyebab sampai timbulnya gejala dan tanda penyakit influenza rata-rata 2 hari dengan rentang jarak 1-4 hari, sedangkan kemungkinan penularan mulai dapat terjadi 1-2 hari sebelum dan 4-5 hari setelah gejala penyakit (www. Pikiran Rakyat.com, 2008).

Penyakit influenza dimulai dengan infeksi virus pada sel epitel saluran pernafasan. Virus influenza ini kemudian memperbanyak diri (replikasi) dengan sangat cepat hingga mengakibatkan lisis sel epitel dan terjadi deskuamasi lapisan epitel saluran pernafasan (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2008)

Pada tahap infeksi awal, respons imun innate akan menghambat replikasi virus. Apabila kemudian terjadi re-eksposure, respons imun adaptif yang bersifat antigen spesifik mengembangkan memori imunologis yang akan memberikan respons yang lebih berat (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

Replikasi virus akan merangsang pembentukan proinflammatory cytokine termasuk IL-1, IL-6 dan TNF-Alpha yang kemudian masuk ke sirkulasi sistemik dan pada gilirannya menyebabkan gejala sistemik influenza seperti demam, malaise, myalgia dan lain-lain. Pada umumnya influenza merupakan penyakit yang *self limiting* dan virus terbatas pada saluran napas. Pada keadaan tertentu seperti kondisi sistem imun yang menurun virus dapat lolos masuk sirkulasi darah dan ke organ tubuh lain (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

Bila strain/subtipe virus baru yang menginfeksi maka situasi akan berbeda. Imunitas terhadap virus subtipe baru yang samasekali belum terbentuk dapat menyebabkan keadaan klinis yang lebih berat. Sistem imunitas belum memiliki

immunological memory terhadap virus baru. Apalagi bila virus subtype baru ini memiliki tingkat virulensi atau patogenesis yang sangat tinggi seperti virus H5N1 (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

Tipe virus yang berbeda akan menyebabkan respons imun dan gejala klinis yang mungkin berbeda, data klinis menyatakan bahwa pada infeksi oleh virus influenza A H5N1 terjadi pembentukan sitokin yang berlebihan (*Cytokine Storm*) untuk menekan replikasi virus, tetapi justru hal ini yang menyebabkan kerusakan jaringan paru yang luas dan berat. Terjadi pneumonia virus berupa pneumonitis interstitial. Proses berlanjut dengan terjadinya eksudasi dan edema intraalveolar, mobilisasi sel sel radang dan juga eritrosit dari kapiler sekitar, pembentukan membran hyalin dan juga fibroblast. Sel radang akan memproduksi banyak sel mediator peradangan. Secara klinis keadaan ini dikenal dengan ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*). Difusi oksigen terganggu, terjadi hipoksia/anoksia yang dapat merusak organ lain (*Anoxic Multiorgan Dysfunction*). Proses ini biasanya terjadi secara cepat dan penderita dapat meninggal dalam waktu singkat karena proses yang irreversibel (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

### **C. Definisi kasus (WHO Agustus 2006)**

WHO pada bulan Agustus 2006 membuat definisi baru tentang kasus infeksi virus Influenza H5N1 pada manusia untuk kepentingan pelaporan, pembakuan bahasa untuk tujuan berkomunikasi dan perbandingan data (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

### 1. Orang yang dalam investigasi

Adalah seseorang yang telah diputuskan oleh pejabat kesehatan yang berwenang dalam kesehatan masyarakat untuk diinvestigasi mengenai kemungkinan infeksi H5N1 (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

### 2. Kasus suspek AI

Seseorang dengan penyakit saluran pernafasan bawah yang tidak bisa dijelaskan disertai demam  $>38^{\circ}\text{C}$ , batuk dan sesak atau kesulitan bernapas dan satu atau lebih keadaan di bawah ini (dalam 7 hari sebelum terjadi gejala):

- a. Kontak dekat (jarak 1 meter) dengan orang seseorang (merawat, berbicara, bersentuhan) yang dicurigai, *probable* atau yang sudah dipastikan menderita AI
- b. Terpapar ayam, unggas atau bangkai unggas, lingkungan tercemar kotoran unggas di daerah yang dicurigai atau dipastikan terjadi infeksi H5N1 pada unggas atau manusia dalam satu bulan terakhir
- c. Mengonsumsi bahan baku atau produk ternak ayam yang tidak dimasak sempurna di daerah yang dicurigai atau telah dikonfirmasi ada kasus H5N1 pada unggas atau manusia dalam 1 bulan terakhir
- d. Kontak dengan binatang (bukan unggas) yang sudah dipastikan tertular H5N1
- e. Kontak dengan bahan pemeriksaan (hewan maupun manusia) yang dicurigai mengandung virus H5N1

### 3. Kasus *probabel*

Definisi 1: Kriteria kasus suspek dan satu atau lebih keadaan di bawah ini:

- a. Infiltrate atau bukti suatu pneumonia akut pada gambaran foto toraks ditambah bukti gagal napas (hipoksemia, takipnu berat) atau
- b. Konfirmasi laboratorium positif untuk influenza A tetapi untuk infeksi H5N1 belum terbukti positif.

Definisi 2:

Seseorang yang meninggal karena penyakit saluran pernafasan akut yang tidak bisa dijelaskan penyebabnya, secara epidemiologi dengan kasus *probabel* atau *confirm AI*

### 4. Kasus pasti (*confirm*)

Kasus suspek atau *probabel* dan satu dari hasil laboratorium ini:

- a. Kultur virus menunjukkan positif influenza A/ H5N1
- b. PCR positif H5N1
- c. Peningkatan titer antibodi netralisasi untuk H5N1 empat kali lipat atau lebih antara fase akut dan fase konvalesen. Titer antibody netralisasi harus 1:80 atau lebih tinggi
- d. Titer antibodi mikroneutralisasi untuk H5N1 1:80 atau lebih dari serum hari 14 atau sesudahnya setelah gejala timbul dan suatu hasil positif menggunakan assay yang berbeda. (misalnya HI 1:160 atau lebih, atau *western blot* )

Di Indonesia definisi WHO baru-baru ini masih belum sepenuhnya diterima karena untuk criteria suspek mensyaratkan adanya infeksi saluran pernafasan bawah sehingga ada keawatiran terlambat didiagnosis (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2008)

#### **D. Gambaran Klinis**

Pada keadaan penyakit yang awal atau ringan gejala sulit dibedakan dengan penyakit Infeksi Saluran Pernapasan Atas (ISPA) atau ILI, dan pada keadaan berat sulit dibedakan dari pneumonia tipikal/bakterial atau ARDS pada umumnya. Riwayat kontak dengan unggas yang sakit, spesimen dan sumber penularan lain sangat penting namun ada kalanya tidak dapat ditetapkan dengan jelas.

Berdasarkan data klinis yang ada, penderita flu burung umumnya datang dengan demam ( $38^{\circ}\text{C}$  atau lebih), batuk dan sesak napas yang umumnya timbul antara 1-16 hari (median 5 hari). Gejala lain yang dapat menyertai antara lain sakit tenggorokan, nyeri otot, konjungtivitis, diare, muntah, nyeri abdomen, nyeri pleuritik, ensefalopati, perdarahan hidung dan gusi, serta dilaporkan kasus dengan kejang.

Pada pemeriksaan jasmani didapatkan tanda tanda kelainan saluran pernafasan bawah seperti ronkhi, pernapasan yang cepat (takipnu) dan tanda distres pernapasan. Perjalanan klinis berlangsung cepat. Median antara timbul gejala dan masuk perawatan rumah sakit adalah 5 hari dengan rentang 2-6 hari (WHO Jakarta), rata-rata meninggal 10 hari setelah timbul gejala.

Faktor resiko untuk beratnya penyakit, komplikasi yang membutuhkan perawatan intensif dan bantuan ventilasi adalah umur lanjut, periode gejala yang panjang sebelum masuk rumah sakit, pneumonia, lekopenia dan limfopenia. ARDS terjadi dalam waktu singkat setelah timbul gejala (median: 6 hari) dan berhubungan dengan terjadinya kematian (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

### **E. Gambaran Radiologis**

Kelainan radiologis terjadi pada hari ke 7 setelah timbul demam (rentang : 3 – 17 hari). Gambaran radiologis pada penderita pneumonia AI berbagai macam pola, umumnya berupa infiltrat bilateral yang luas. Dapat terjadi kolaps lobar, konsolidasi fokal, air bronchogram, infiltrat interstitial, bercak inhomogen (*patchy infiltrate*). Pada umumnya terjadi perburukan radiologis dalam waktu singkat yang dramatis. Di Indonesia dijumpai beberapa kasus dengan efusi pleura yang tidak dijumpai pada laporan kasus di negara lain (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007).

### **F. Diagnosis Laboratorium**

Bahan pemeriksaan terbaik untuk deteksi virus influenza H5N1 adalah aspirat nasofaring yang diambil dalam 3 hari pertama sejak timbulnya gejala. Pemeriksaan yang dapat dilakukan termasuk:

- a. Isolasi/kultur virus, hasil dalam 2-10 hari . Virus perlu diidentifikasi dengan imunofloresensi atau HI.

- b. Deteksi antigen (imunofloresen, enzim immunoasay)
- c. Serologi untuk mendeteksi antibodi spesifik (HI, Enzim immunoasay, uji netralisasi). WHO merekomendasi pemeriksaan mikronetralisasi untuk mengukur antibodi spesifik virus H5N1 tetapi karena memerlukan virus hidup hanya laboratorium yang memiliki fasilitas BSL3 yang dapat melakukan uji ini. Uji konfirmasi dengan kultur virus atau *Real Time* PCR. (Pusat Informasi Penyakit Infeksi, 2007)

### ***G. Polymerase Chain Reaction (PCR)***

*Polymerase Chain Reaction (PCR)* yaitu teknik perbanyak molekul DNA dengan ukuran tertentu secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu. PCR dilatarbelakangi oleh penemuan enzim *DNA Polymerase* dari *Eschericia coli* yang mampu melakukan pemanjangan basa-basa nukleutida dari primer yang menempel pada DNA. Enzim tersebut perlu ditambahkan terus-menerus selama reaksi polimerasi, karena pada saat denaturasi (pemisahan rantai DNA pada suhu 94°C) enzim tersebut rusak. Teknik ini menjadi kurang efisien (Dawson dkk, 1996 dalam Muladno, 2001).

PCR menjadi semakin aplikatif setelah ditemukan enzim *DNA Polymerase* yang mampu bertahan sampai pada suhu 94°C yang diisolasi oleh Karl Mullis pada tahun 1983 dari bakteri *Thermus aquaticus* YT 1. Enzim tersebut dikenal *Thermus aquaticus DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase)*. Dengan ditemukannya enzim

tersebut, proses PCR menjadi lebih mudah karena enzim *DNA Polymerase* tidak perlu ditambahkan pada setiap siklus (Newton dan Graham, 1997 dalam Muladno, 2001)

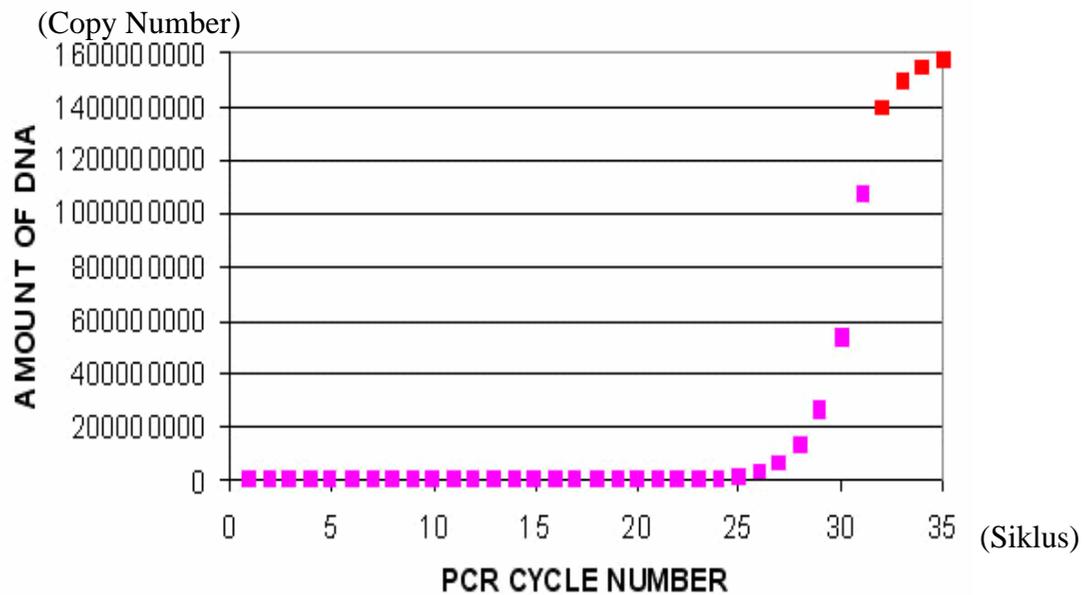
Ada 3 tahap dalam melakukan teknik PCR, yaitu :

1. Denaturasi : 94 °C
2. Annealing : 55 °C
3. Extention : 72 °C

Tahap denaturasi adalah suatu tahap dimana DNA sample yang merupakan DNA dua utas yang terpisah menjadi satu utas diakibatkan oleh suhu yang tinggi yaitu 94 °C. Pada saat DNA menjadi satu utas dan pada saat yang bersamaan suhu diturunkan menjadi 55 °C maka terjadi penempelan primer pada DNA utas tunggal di tempat yang spesifik. Ketika suhu dinaikkan menjadi 72 °C, maka primer dengan bantuan enzim DNA Polimerase melakukan perpanjangan DNA. Perpanjangan ini mengakibatkan DNA yang tadinya satu utas menjadi 2 utas. Perbanyakannya ini mengikuti pola algoritmik, yaitu  $2^n$  di mana  $n$  menunjukkan *cycle* yang terjadi dalam suatu reaksi. Jumlah DNA berlipat untuk setiap siklus setelah 2 siklus:  $2 \times 2$  atau  $(2^2)$  atau 4 kali, setelah 3 siklus:  $2 \times 2 \times 2$  atau  $(2^3)$  atau 8 kali, setelah 4 siklus:  $(2^4)$  atau 16 kali, setelah  $N$  siklus jumlah DNA menjadi  $(2^N)$  kali. Namun reaksi ini tidak berlangsung tanpa batas melainkan akhirnya akan mencapai fase *plateau* (Tabel 1).

Tabel 1. Hubungan Antara Banyaknya Siklus dengan Jumlah DNA yang Dihasilkan (Real Time PCR, 2007).

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



Gambar 3. Kurva Amplifikasi (Real Time PCR, 2007).

Pada gambar 3 dapat kita lihat hubungan antara banyaknya siklus dengan jumlah DNA yang dihasilkan.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam melakukan PCR adalah

1. DNA template : DNA sampel
2. Primer, forward dan reverse : merupakan susunan oligonukleotida berjumlah 18-30 basa. Fungsi primer adalah untuk menempel pada DNA sampel ketika DNA menjadi 1 utas, sebagai awal pemberntukan utas baru. Penempelan ini berguna untuk membantu *DNA Taq Polimerase* melakukan tugasnya, yaitu mengkatalisis perpanjangan DNA.
3. *DNA Taq Polimerase* : merupakan enzim polymerase (*Thermus aquaticus*) yang berfungsi untuk melakukan perpanjangan DNA. Enzim ini akan menempel pada primer untuk tahap awal sehingga ketika enzim menempel

maka itu merupakan tanda bahwa selanjutnya akan terjadi perpanjangan DNA.

Perpanjangan DNA ini membutuhkan bahan-bahan, yaitu basa-basa nukleotida seperti Adenosin (A), Tymin (T), Guanocyn (G), dan Cytosin (C).

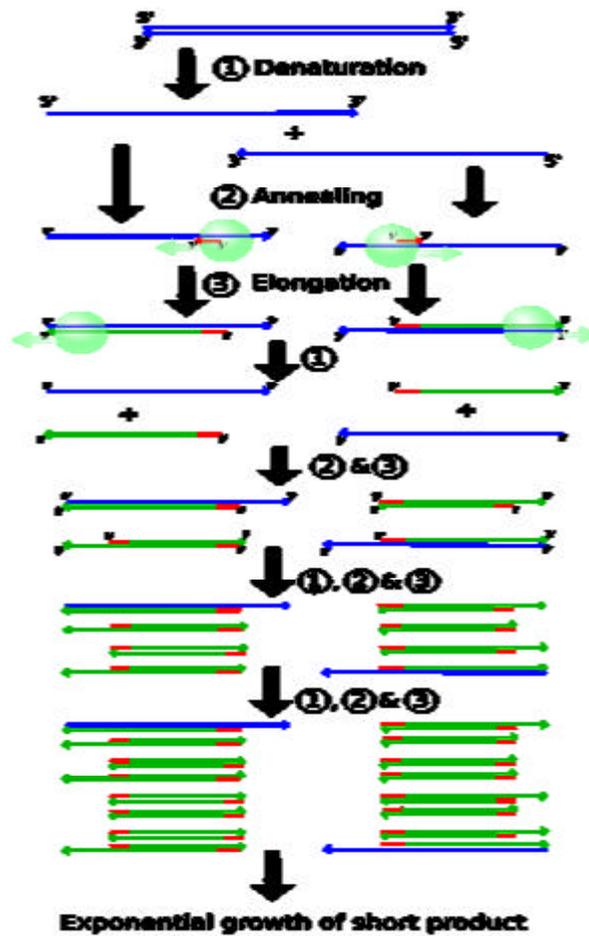
4. dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) : merupakan kumpulan basa-basa penyusun DNA. Terdiri dari 4 macam basa, yaitu A, T, G, dan C. dNTP ini digunakan oleh enzim DNA polimerase sebagai bahan untuk memperpanjang DNA.
5.  $MgCl_2$  : menyediakan ion  $Mg^{2+}$  untuk aktivitas DNA Polymerase
6. Air : sebagai pelarut dalam membantu terjadinya reaksi yang efisien.
7. Bufer : mempertahankan pH (8.3 - 8.8)

Komponen lain yang mungkin ditambahkan:

- Kation monovalen (NaCl atau KCl) untuk membantu penempelan primer
- Gelatin atau albumin serum sapi dan detergen non-ionik (Tween 20 atau Laureth 12) untuk membantu menstabilkan enzim
- Formamida, dimetilsufoksida, glicerol untuk mengurangi penempelan primer tidak pada tempatnya (*mispriming*)

Lamanya proses PCR ini tergantung pada berapa jumlah *cycle* yang digunakan. Semakin banyak *cycle* yang digunakan maka semakin lama proses PCR. Setelah proses PCR selesai maka tahap selanjutnya adalah mencari tahu apakah sampel yang ingin diperbanyak DNA nya benar-benar sudah diperbanyak atau belum. Untuk

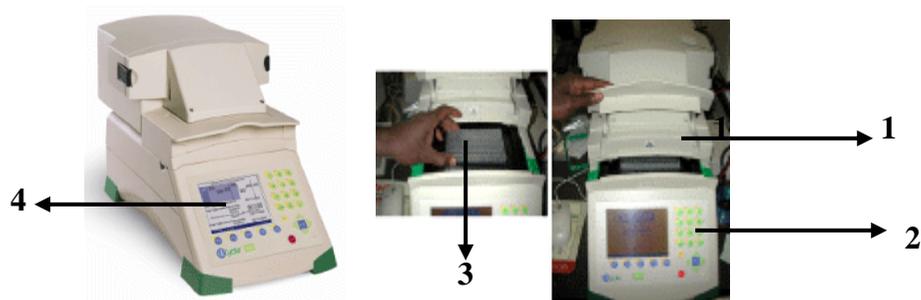
mengetahui hal tersebut, hal yang dapat dilakukan adalah dengan mendeteksinya dengan melakukan elektroforesis DNA. Dengan elektroforesis DNA, hasil perbanyakan DNA dapat dilihat berdasarkan ukuran jumlah daerah/region yang diperbanyak dengan satuan base pair (bp).



Gambar 4. Skema Tahapan PCR (Polymerase, 2008)

## H. Thermal Cyclers

Thermal Cycler merupakan alat untuk melakukan reaksi PCR. Alat ini dilengkapi dengan sistem peltier yang berfungsi sebagai *heater* dan *cooling* dalam reaksi PCR. Program dalam *Thermal Cycler* sangat lengkap. Kita dapat membuat atau mengedit protokol yang ada. Selain itu, Thermal Cycler mempunyai kelebihan dalam hal *thermal gradient*. *Thermal gradient* ini berfungsi apabila kita ingin melakukan optimasi dari primer yang akan kita gunakan. Dengan adanya *thermal gradient*, maka kita dapat dengan mudah untuk mengetahui suhu optimum dari primer yang akan digunakan sehingga produk PCR dapat teramplifikasi dengan baik.



Keterangan Gambar :

1. Penutup tempat gel agarosa
2. Tombol pengatur suhu, jumlah amplifikasi dan lain-lain
3. Gel agarosa
4. Gambaran proses amplifikasi yang sedang berlangsung

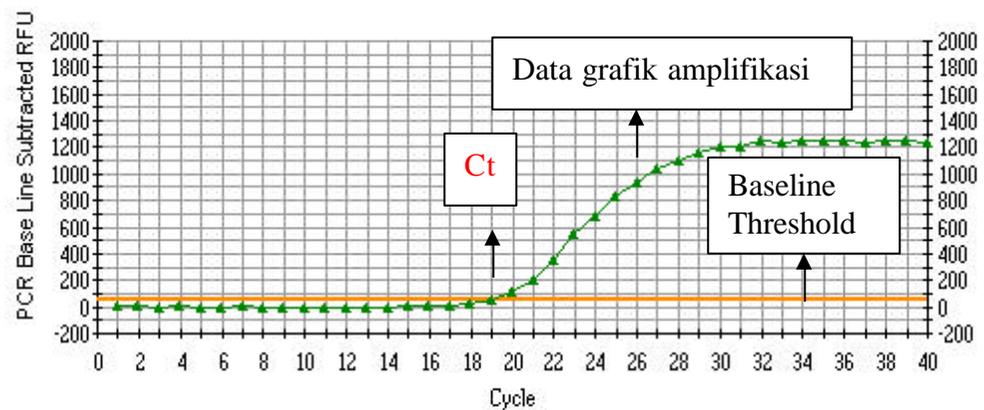
Gambar 5. *Thermal Cycler* (Hunt, 2007)

## I. *Real Time PCR*

*Real Time PCR* berbeda dengan PCR biasa yang dikenal. Pada PCR seperti yang telah dijelaskan di atas bahwa untuk mengetahui apakah DNA telah berhasil diperbanyak atau tidak maka perlu dilanjutkan dengan deteksi dengan elektroforesis DNA. Proses ini dikenal dengan istilah *endpoint analysis*.

Sedangkan pada *Real Time PCR*, kita dapat mengetahui apakah DNA berhasil diperbanyak atau tidak selama proses masih berlangsung. Pendeteksian secara dini ini dapat dilakukan dengan menambahkan suatu molekul *fluorescence* sehingga dapat melaporkan sejauh mana reaksi telah berlangsung dengan satuan *Relative Fluorescence Unit (RFU)*. Molekul *fluorescence* yang digunakan ada 2 jenis, yaitu *DNA binding Dyes* dan *Hybridization Probes*. *DNA binding dyes* adalah suatu senyawa yang dapat menempel pada DNA 2 utas. Jadi ketika DNA sudah menjadi 2 utas maka *DNA binding dyes* ini akan menempel dan memberikan laporan berupa kuantitas dari pendaran yang berhasil ditangkap oleh kamera detektor pada mesin. Contoh dari senyawa *DNA binding dyes* adalah *ethidium bromide* dan *Sybr Green*. Sedangkan *Hybridization probes* merupakan sebuah oligonukleotida seperti primer dengan diberi label berupa senyawa yang dapat berpendar seperti FAM, TAMRA, dan lain-lain. Contoh probes yang biasa digunakan adalah Taqman, molecular beacon, FRET, dan amplifluor. Dengan adanya *DNA binding Dyes* maupun *Probes* maka dapat diketahui jumlah awal dari DNA sampel yang berhasil dideteksi melalui pendaran yang dihasilkan.

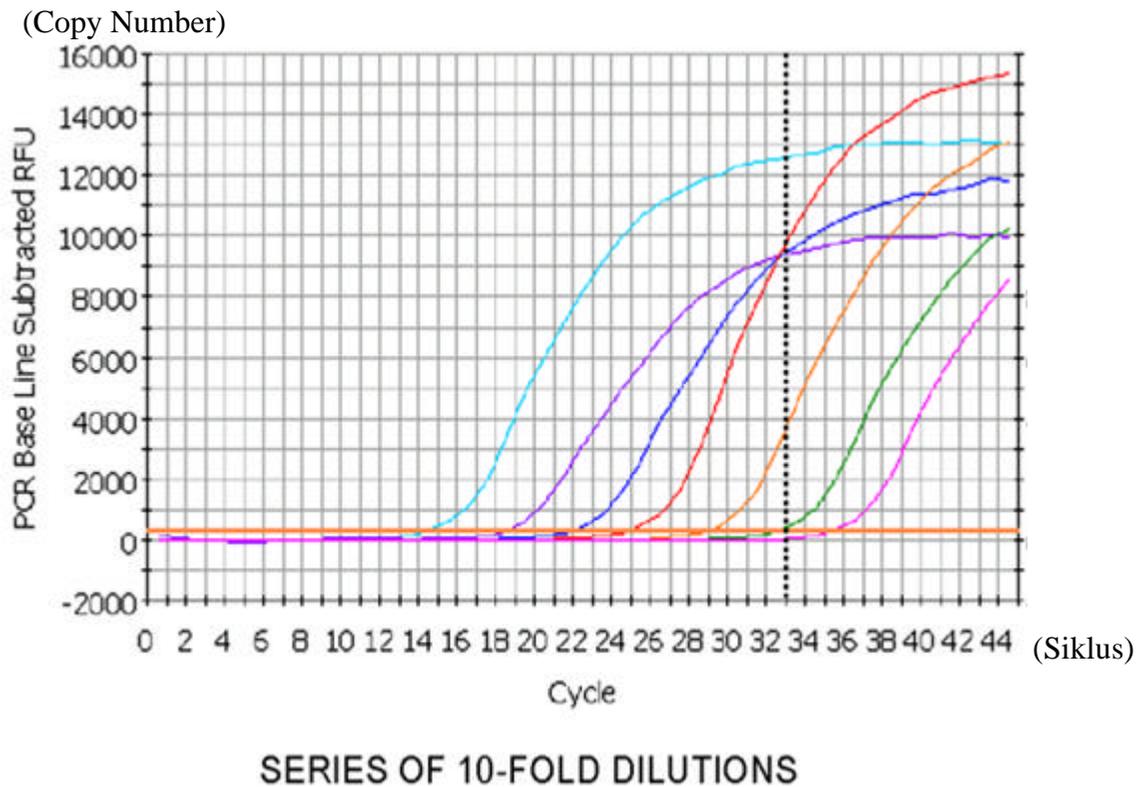
Jumlah awal dari DNA sampel dikenal dengan istilah *starting quantity*. Satuan *starting quantity* dapat bermacam-macam seperti *copy number*, nanogram, *fold dilution*, dan lain-lain. Untuk menentukan *starting quantity* dari suatu sample maka perlu diketahui terlebih dahulu nilai *threshold cycle (Ct)* dari sample. *Threshold cycle (Ct)* merupakan nilai yang menunjukkan *starting quantity* dari sampel. Nilai ini menunjukkan pada *cycle* ke berapa, sampel mulai menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan kenaikan jumlah pendaran (RFU). Sebelum menentukan Ct maka terlebih dahulu kita harus menentukan *baseline threshold*. *Baseline Threshold* merupakan suatu garis batas yang dibuat untuk menentukan *starting quantity* dari sampel. Titik pertemuan antara *baseline threshold* dengan data grafik amplifikasi disebut Ct (Gambar 6) (Roche, 2007)



PCR Amplification vs Cycle: C:\My Documents\customer's opds\jkb1-26-01b.opd

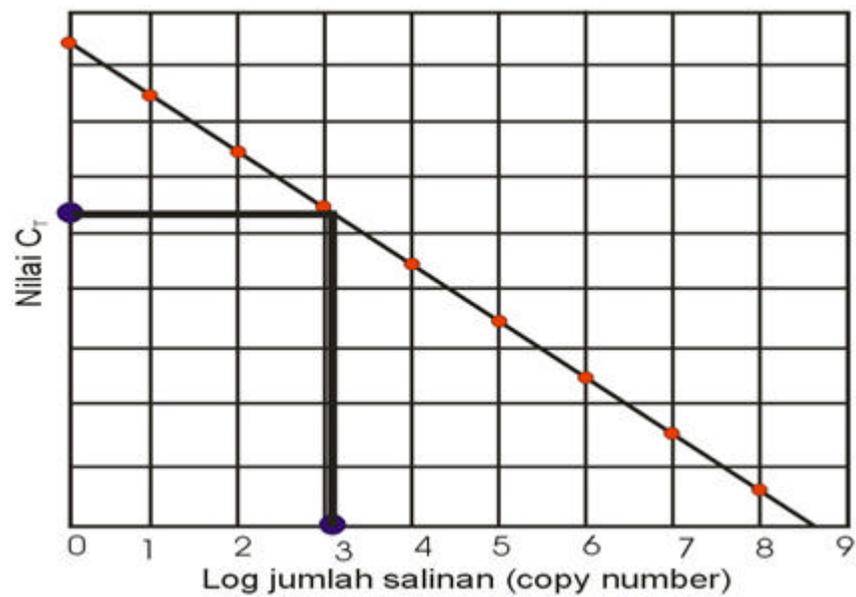
Gambar 6. Data Grafik Amplifikasi *Real Time* PCR (Roche, 2007).

Dengan cara mencatat jumlah fluorescen yang dipancarkan pada tiap siklus, maka dimungkinkan untuk memonitor fase eksponensial PCR terutama saat jumlah produk PCR berkorelasi dengan jumlah templat target DNA di awal (Gambar 7).



Gambar 7. Fluorescen (RFU) yang dipancarkan pada tiap siklus (Roche, 2007).

Threshold cycle (Ct) jumlah siklus saat fluorescen yang dihasilkan memotong the threshold. Ini menandakan titik dalam reaksi saat akumulasi ampikon berada dalam jumlah cukup. Nilai Ct berbanding terbalik dengan logaritme jumlah salinan awal (Starting Quantity) (Gambar 8).



Gambar 8. Hubungan antara Ct dengan Starting Quantity (Roche, 2007).

### **Sistem Untuk Memonitor Amplifikasi DNA**

Sistem real-time PCR berlandaskan deteksi dan kuantitasi “fluorescent reporter”. Sinyal “reporter” meningkat sebanding dengan jumlah produk PCR dalam reaksi. Dengan cara mencatat jumlah pancaran fluorescen untuk tiap siklus, maka dimungkinkan untuk memonitor reaksi PCR selama fase eksponensial saat pertama kali terjadi peningkatan akumulasi produk PCR secara signifikan yang berkorelasi dengan jumlah awal templat target.

Ada tiga “fluorescence-monitoring systems” utama untuk amplifikasi DNA:

1. *Hydrolysis probes* (e.g. TaqMan probes)
2. *DNA-binding agents* (e.g. SYBR green)

### **Probe Taqman**

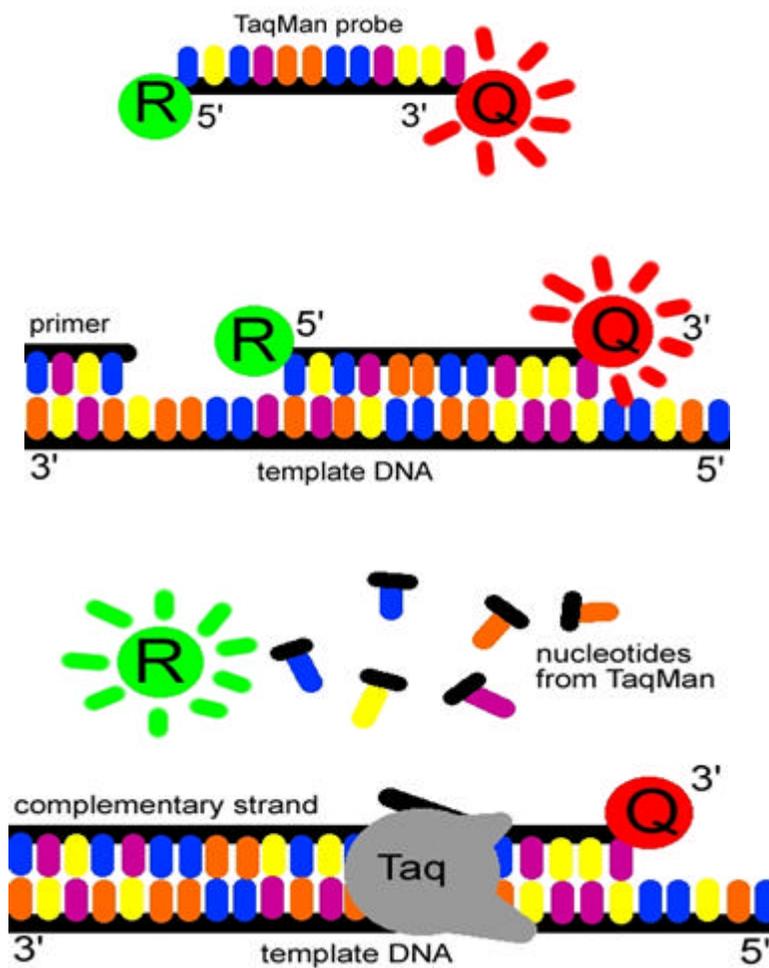
Probe TaqMan berupa oligonucleotida berukuran lebih panjang dari primer (20-30 basa dengan  $T_m$  sekitar  $10^\circ\text{C}$  lebih tinggi) dan dirancang untuk menempel pada daerah internal produk PCR. Probe TaqMan membawa pewarna (dye) fluorescen pada basa 5' yang berfungsi sebagai *reporter*, dan pewarna *quencher* pada basa 3'.

Sewaktu diradiasi, pewarna fluorescen yang tereksitasi mentransfer energi ke molekul *quencher* sehingga tidak timbul pancaran fluorescen (fenomena ini disebut *FRET = fluorescence resonance energy transfer*). Oleh karena itu, selama reporter dan quencher berada dalam posisi berdekatan, atau dengan kata lain selama probe masih utuh, maka emisi fluorescen tidak akan terjadi.

Sewaktu enzim polimerase mereplikasi daerah pada templat DNA dimana probe TaqMan menempel, maka enzim polimerase akan memotong probe TaqMan.

Ini mengakibatkan terpisahkan *reporter* dengan *quencher* dan mengakhiri peristiwa FRET. Dengan demikian perwarna *reporter* mulai memancarkan sinar fluorescen dan tingkat emisi fluorescen ini berbanding lurus dengan laju pemotongan probe.

Deteksi akumulasi produk PCR dilakukan dengan memonitor peningkatan fluorescen yang dipancarkan oleh pewarna reporter.



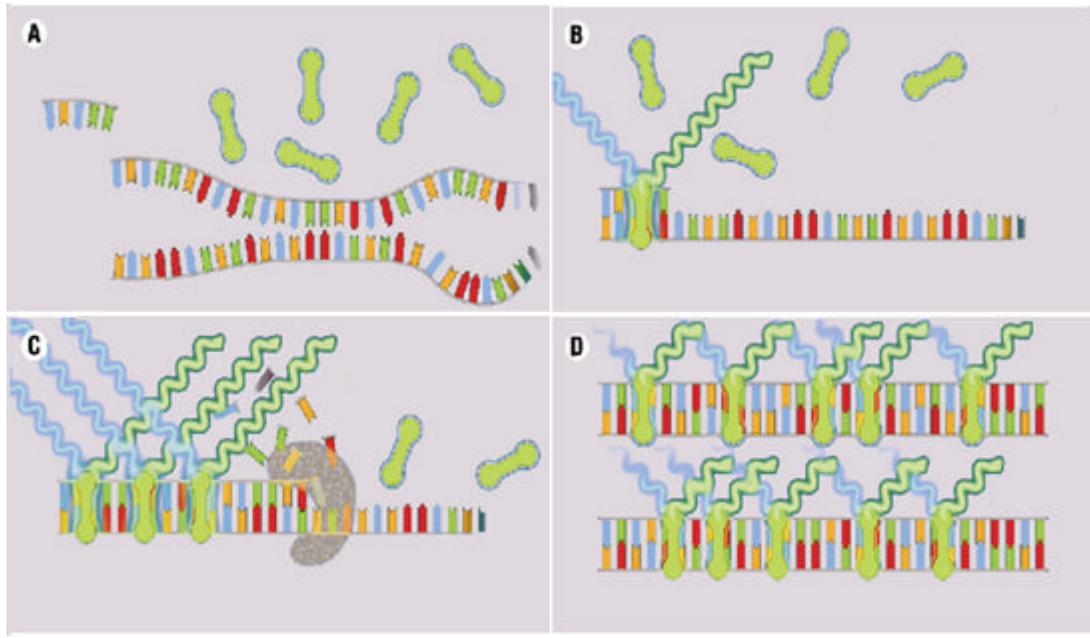
Gambar 9. Sintesis DNA Menggunakan *Probe Taqman* (Real Time PCR, 2007)

### **Probe SYBR Green**

SYBR green pewarna flourogenic pengikat yang tidak memancarkan cahaya sewaktu berada bebas dalam larutan tetapi memancarkan sinar flourescen secara kuat setelah terikat pada DNA utas ganda. Pewarna ini tidak terikat pada DNA utas tunggal.

SYBR green dapat digunakan untuk mengkuantitasi amplikon. Akan tetapi mengingat SYBR green terikat pada semua DNA utas ganda maka amplikon non-spesifik dan juga dimer primer ikut menyumbangkan sinyal. Ini mengakibatkan SYBR green kurang bersifat spesifik.

Untuk mendeteksi ada tidaknya amplifikasi non-spesifik perlu dilakukan uji lanjutan (analisis *melting point* juga disebut analisis *dissociation curve*) untuk mengidentifikasi amplikon. SYBR green bersifat kurang spesifik tetapi lebih murah.



Keterangan :

- A. SYBR green pewarna flourogenic, pengikat yang tidak memancarkan cahaya sewaktu berada bebas dalam larutan.
- B. Pewarna ini tidak terikat pada DNA utas tunggal, tetapi di ujung kiri dari DNA untai tunggal ini telah terjadi sintesis DNA, sehingga Pewarna SYBR mulai menempel dan terikat pada DNA utas ganda tersebut lalu memancarkan cahaya.
- C. SYBR green memancarkan cahaya seiring bagian yang mengalami sintesis DNA.
- D. SYBR green memancarkan sinar flourescen secara kuat.

Gambar 10. Pemantauan Sintesis DNA (Dengan *Probe Sybr Green*)

### **J. Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)**

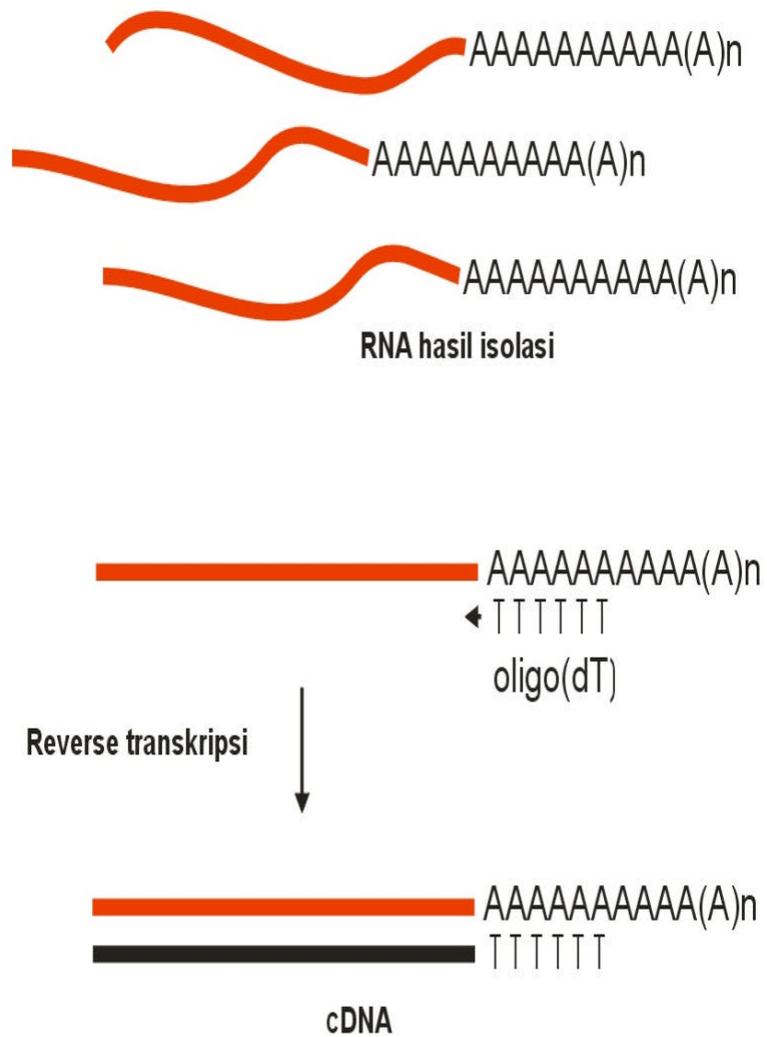
*RT-PCR* adalah metode yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi cDNA hasil proses penyalinan RNA.

#### **Langkah-Langkah *RT-PCR***

a. Sintesis cDNA

Primer Untuk Pembentukan Utas Pertama cDNA, terdiri dari :

1. Oligo(dT), primer ini menempel pada ekor poli(A) mRNA
2. *Gene-specific primer*, primer ini dirancang untuk menempel pada daerah pada RNA target
3. *Random hexanucleotides*, primer ini menempel pada banyak situs pada RNA templat (berguna khususnya jika RNA target sangat panjang atau memiliki struktur sekunder)



Keterangan :

A = Adenin

T = Timin

Oligo(dT) = Primer yang menempel pada ekor poli(A) mRNA

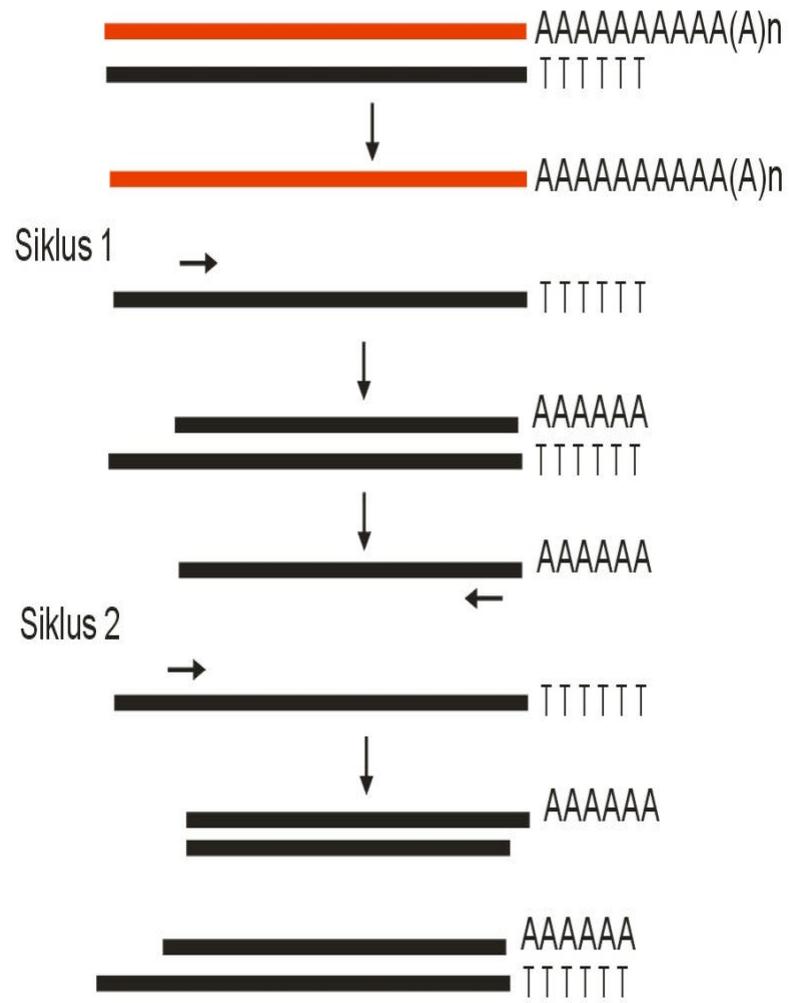
Gambar 11. Sintesis cDNA

Komponen Pereaksi Untuk Sintesis cDNA :

- Templat RNA
- Bufer RT
- Primer (oligo dT)
- dNTP
- $MgCl_2$
- DTT
- Inhibitor RNase
- Reverse transkriptase

b. Amplifikasi DNA

Menggunakan primer *sense* dan primer *antisense*



Gambar 12. Amplifikasi DNA

### **K. Kerangka Konsep**

Berdasarkan landasan teori yang mendukung penelitian ini maka kerangka konsep penelitian ini dapat digambarkan secara skematis sebagai berikut :

