

**Ekspresi Sitokin Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) dan Interferon (IFN- $\gamma$ ) pada sel MDCK yang diinfeksi virus avian influenza subtipe H5N1 asal Indonesia**  
(Cytokines Expression of Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) dan Interferon (IFN- $\gamma$ ) in *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) that infected by Indonesia H5N1 avian influenza viruses)

NLP. Indi Dharmayanti<sup>1</sup>, Ukhti Dwi Rillah<sup>2</sup>, Farida Syamsiah<sup>2</sup>, & Risa Indriani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner, JL RE Martadinata 30, Bogor,

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta

Email: nlpdharmayanti@yahoo.com; nlpdharmayanti@gmail.com

Memasukkan: September 2013, Diterima: Desember 2013

**ABSTRACT**

Patients with H5N1 disease have a characteristic complications of pneumonia with acute respiratory syndrome distress and multi-organ failure associated with cytokine dysregulation, so it is suspected that the clinical forms of severe H5N1 disease in humans is caused by dysregulation of cytokine induction of H5N1 virus. Study on cytokines associated with H5N1 influenza virus infection is still limited, while animal studies using virus H5N1/97 give conflicting results. Recent studies, showing that in fact the high cytokine is not a common form of the H5N1 viruses, so Pathogenicity of H5N1 viruses were not only determined by whether or not the virus can induce hypercytokinemia. In this study we wanted to determine the phenotype of the Indonesia H5N1 virus in inducing cytokine expression. This study compared three Indonesian H5N1 viruses that have different genetic variations of the virus including the clade 2.1.1 and two other viruses included in clade 2.1.3 that were infected in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell. The MDCK cell that infected virus were observed for 72 hours. We observed the infection during 72 hours and the cytokines expression were examined using RT-PCR method. The results showed that the H5N1 influenza viruses used in this study showed the low expression of cytokines IFN- $\gamma$ , and did not show any expression of the TNF- $\alpha$  cytokines in MDCK cells infected with the H5N1 virus within 72 hours after infection.

**Keywords :** Expression, H5N1 virus, Cytokines, sel *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK)

**ABSTRAK**

Penderita dengan penyakit H5N1 mempunyai ciri khas berupa komplikasi pneumonia dengan *sindrom acute respiratory distress* dan kegagalan multi organ yang dikaitkan dengan disregulasi sitokin, sehingga diduga bahwa bentuk klinis penyakit H5N1 parah pada manusia adalah disregulasi sitokin akibat induksi virus. Penelitian tentang sitokin yang berhubungan dengan infeksi virus influenza H5N1 masih terbatas, sedangkan penelitian dengan hewan coba dengan menggunakan virus H5N1/97 memberikan hasil yang bertentangan. Penelitian terbaru, menunjukkan bahwa ternyata tingginya sitokin bukan merupakan bentuk umum dari semua virus H5N1, sehingga patogenesis virus H5N1 bukan hanya ditentukan oleh dapat atau tidaknya virus tersebut menginduksi hipersitokinemia. Pada penelitian ini kami ingin mengetahui fenotipe dari virus H5N1 asal Indonesia dalam menginduksi ekspresi sitokin. Studi ini menggunakan tiga virus H5N1 asal Indonesia yang mempunyai variasi genetik berbeda yaitu satu virus termasuk clade yaitu clade 2.1.1 dan dua virus lainnya termasuk dalam clade 2.1.3 yang diinfeksi dalam sel *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) yang diamati selama 72 jam. Sel MDCK yang diinfeksi virus H5N1 diamati selama 72 jam, dan ekspresi sitokin diketahui dengan menggunakan metode RT-PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus *avian influenza* yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan tidak adanya ekspresi sitokin tinggi dan adanya perbedaan ekspresi sitokin IFN- $\gamma$  diantara virus H5N1, serta ketiga virus H5N1 tidak menunjukkan adanya ekspresi terhadap sitokin TNF $\alpha$  pada sel MDCK yang diinfeksi virus H5N1 clade 2.1.1 dan clade 2.1.3 dalam kurun waktu 72 jam setelah infeksi.

**Kata Kunci :** Ekspresi, Virus H5N1, Sitokin, sel *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK)

## PENDAHULUAN

Infeksi virus Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 pada manusia masih terjadi dengan rata-rata mortalitas sekitar 60% (Abdel-Ghfar *et al.* 2008; Claas *et al.* 1998). Mekanisme patogenesis dari infeksi virus ini tidak sepenuhnya diketahui, meskipun hipersitokinemia dihubungkan dengan patogenesis yang tinggi (de Jong *et al.* 2005; Peiris *et al.* 2004; To *et al.* 2001; Uprasertkul *et al.* 2005). Makrofag alveolar berperan utama dalam respon imun innate dan adaptif pada infeksi saluran pernapasan. Pada studi *in vitro*, *human primary macrofag* yang diinfeksi dengan virus H5N1 menghasilkan produksi sitokin yang tinggi dibandingkan dengan yang diinfeksi dengan virus flu musiman (Cheung *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2004; Lee *et al.* 2009 Mok *et al.* 2009; Woo *et al.* 2010). Namun demikian virus-virus yang digunakan pada penelitian ini sangat terbatas dan diisolasi sebelum tahun 2005 serta studi tentang sitokin juga terbatas. Virus H1N1 pdm menginduksi produksi sitokin dan ekspresi gen pada sel *dendritic* dan *primary human macrophages* dengan level sama atau di bawah dari ekspresi yang diinduksi virus flu biasa (Osterlund *et al.* 2010; Woo *et al.* 2010).

Cheung *et al.* (2002) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa virus AI H5N1/97 yang digunakan dalam penelitiannya menginduksi transkripsi sitokin proinflamatori daripada virus H3N2 atau virus H1N1 terutama TNF- $\alpha$  dan IFN- $\beta$ . Determinan utama patogenesis virus influenza pada spesies unggas telah dengan jelas, namun pada mamalia masih belum jelas. Ekperimen infeksi H5N1/97 pada mencit, feret dan maqaqa memberikan hasil yang bertentangan. Eksperimen dengan menginfeksi mencit BALB/c, pada beberapa virus H5N1 asal manusia (contoh: virus 483/97) berperan dalam menyebarkan virus kepada yang lain, sedangkan virus yang lain (contoh: 486/97) tidak menunjukkan hal tersebut. Perbedaan ini diduga berkaitan dengan mutasi pada gen PB2 dan HA (Hatta *et al.* 2001).

Penderita dengan penyakit H5N1 mempunyai ciri khas berupa komplikasi pneumonia dengan sindrom *acute respiratory disterss* dan kegagalan multi organ yang dikaitkan dengan disregulasi sitokin (Fisman 2000; Headley *et al.* 1997), sehingga diduga bahwa bentuk klinis penyakit H5N1 parah pada manusia adalah disregulasi sitokin akibat induksi virus.

Variasi genetik virus influenza H5N1 yang beragam menyebabkan antar virus kemungkinan akan menyebabkan perbedaan fenotipe dari virus, diantaranya adalah dalam menginduksi sitokin pada sel yang diinfeksi virus H5N1, sehingga pada studi ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi sitokin TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  pada sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) terhadap infeksi virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 asal Indonesia.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Sebanyak tiga virus avian influenza subtipe H5N1 dipropagasi pada telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari. Virus yang digunakan pada penelitian ini adalah virus A/Chicken/West Java/1074/2003 (Clade 2.1.1) sebagai representasi virus yang diisolasi pada awal wabah AI pada tahun 2003, A/Chicken/East Java/Bwi12/2010 merupakan virus mengalami *genetic drift* dan A/Bird/Bali1/2011 yang telah diisolasi di sekitar kasus manusia. Kedua virus ini merupakan virus H5N1 clade 2.1.3. Semua virus diisolasi dan telah dikarakterisasi (Dharmayanti *et al.* 2008; Dharmayanti 2009).

Sel MDCK yang disimpan beku dalam *liquid nitrogen* diambil 1-2 ampul, dicairkan pada suhu 37°C lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 – 1500 rpm selama 5 menit sampai terlihat endapan di dasar ampul. Endapan sel kemudian dilarutkan dengan media DMEM penumbuh dan dimasukkan ke dalam wadah biakan jaringan (*plate*) untuk dibiakkan kembali dengan inkubasi pada suhu 37° C dalam inkubator yang memiliki kandungan CO<sub>2</sub> 5%. Perkembangan sel MDCK

diamati setiap hari sampai membentuk *monolayer* yang siap untuk dipasase kembali atau dipakai untuk inokulasi virus.

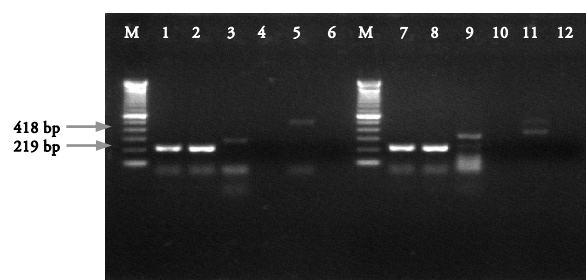
Sel MDCK yang sudah membentuk *monolayer* yang *confluence* disiapkan. Media sel MDCK dibuang dan disisakan sedikit. Virus *Avian Influenza* sebanyak 100  $\mu$ L dengan konsentrasi virus kurang lebih sekitar  $10^8$  EID<sub>50</sub>/ml diinokulasikan ke dalam sel MDCK. Sel MDCK yang telah diinfeksi diinkubasi pada 37° C dengan kandungan CO<sub>2</sub> 5 % selama 30 menit. Setelah diinkubasi, sebanyak 5 ml media penumbuh dimasukkan ke dalam *plate tissue culture*. Kemudian diinkubasi kembali pada 37° C dengan kandungan CO<sub>2</sub> 5 % selama 5 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam dan 72 jam. Pertumbuhan sel diamati pada setiap waktu yang telah ditentukan tersebut. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop lalu disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan pada proses selanjutnya.

Total RNA jaringan diekstraksi dari sel supernatan homogenat sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) yang diinfeksi virus *Avian Influenza* dengan menggunakan Rneasy mini kit (Qiagen). RNA selanjutnya diukur konsentrasinya dengan menggunakan Nanodrop dan digunakan sebanyak 10  $\mu$ l untuk diukur level ekspresinya dengan menggunakan uji kualitatif menggunakan *One Step RT-PCR system* menggunakan *Superscript III One step RT-PCR System* (Invitrogen) dengan menggunakan primer TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  dan  $\beta$ -actin sesuai Blaschke *et al.* (2000). Hasil dari PCR tersebut diamati secara elektroforesis pada agarose 2% dengan menggunakan *molecular weight ladder* 100bp (Invitrogen) untuk melihat ekspresi gen TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  yang terdapat pada sel MDCK terinfeksi virus uji dibandingkan terhadap sel MDCK terinfeksi virus pembanding dan sel MDCK normal. Dari hasil elektroforesis dapat diamati pita DNA yang menunjukkan ekspresi gen TNF  $\alpha$  terletak pada 409 bp dan IFN- $\gamma$  terletak pada 418 bp. Sel MDCK yang diinfeksi virus AI dibandingkan dengan sel MDCK normal.

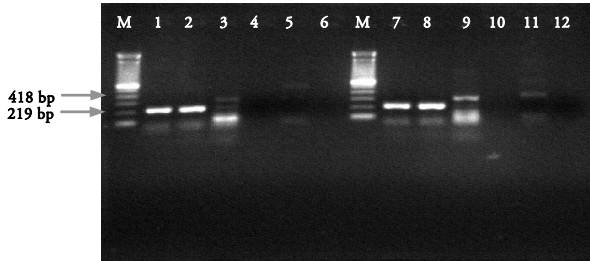
## HASIL

Gambar 1, 2 dan 3 merupakan gambaran hasil amplifikasi dari gen  $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$  dari sel yang diinfeksi virus avian influenza 1074/03 pada 5, 24, 36, 48 dan 72 setelah infeksi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat amplifikasi dengan primer  $\beta$ -actin merupakan *House Keeping Gen* pada posisi 219 bp (Yu *et al.*, 2008). Menurut Yu *et al.* (2008), ekspresi gen dengan menggunakan primer TNF- $\alpha$ , terletak pada posisi 409 bp sedangkan hasil amplifikasi dengan primer IFN- $\gamma$  terletak pada posisi 418 bp. Pada penelitian ini, ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada semua jam infeksi menunjukkan posisi amplicon tidak tepat di 400 bp, sedangkan IFN- $\gamma$  terdapat amplicon di posisi sekitar 400-500 bp pada sel MDCK yang diinfeksi virus A/Ck/West Java/1074/2003. Namun jika dibandingkan dengan  $\beta$ -actin tampak terdapat penurunan ekspresi (pita tampak lebih tipis, Gambar 1, Tabel 1). Sebagai kontrol, sel MDCK normal yang tidak diinfeksi virus hanya mengamplifikasi  $\beta$ -actin pada semua jam infeksi, yang ditandai dengan pita pada posisi 200 bp.

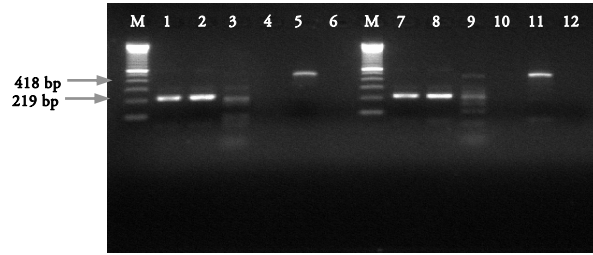
Pada sel MDCK yang diinfeksi virus A/Bird/Bali1/11 pada 5, 24, 36, 48 dan 72 jam setelah infeksi virus menunjukkan bahwa terdapat ekspresi gen IFN  $\gamma$  dengan amplicon pada posisi



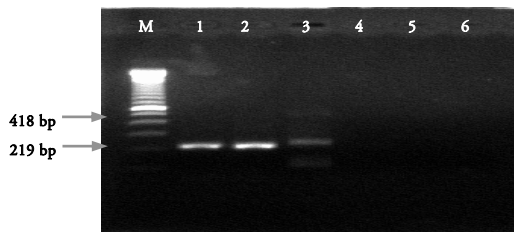
**Gambar 1.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 5 dan 24 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus 1074/03. M adalah Marker, 1) Beta actin, infeksi 5 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 5 jam, 3) TNF alfa, infeksi 5 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 5 jam, 5) IFN gamma, infeksi 5 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 5 jam, 7) Beta actin, infeksi 24 jam, 8) Beta actin, kontrol sel 24 jam, 9) TNF alfa, infeksi 24 jam, 10) TNF alfa, kontrol sel 24 jam, 11) IFN gamma, infeksi 24 jam, 12) IFN gamma, kontrol sel 24 jam.



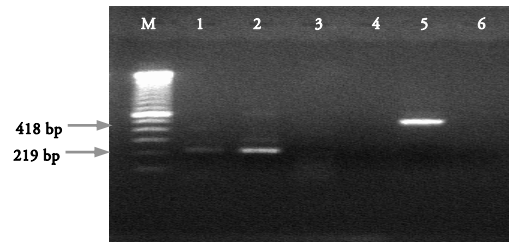
**Gambar 2.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 36 dan 48 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus 1074/03, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100bp) , 1) Beta actin, infeksi 36 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 36 jam, 3) TNF alfa, infeksi 36 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 36 jam, 5) IFN gamma, infeksi 36 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 36 jam, 7) Beta actin, infeksi 48 jam, 8) Beta actin, kontrol sel 48 jam, 9) TNF alfa, infeksi 48 jam, 10) TNF alfa, kontrol sel 48 jam, 11) IFN gamma, infeksi 48 jam, 12) IFN gamma, kontrol sel 48 jam.



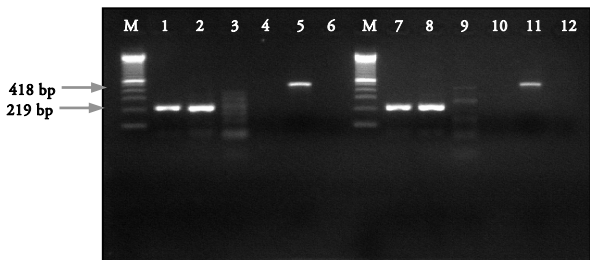
**Gambar 5.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 36 dan 48 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus Bali1/11, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 36 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 36 jam, 3) TNF alfa, infeksi 36 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 36 jam, 5) IFN gamma, infeksi 36 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 36 jam, 7) Beta actin, infeksi 48 jam, 8) Beta actin, kontrol sel 48 jam, 9) TNF alfa, infeksi 48 jam, 10) TNF alfa, kontrol sel 48 jam, 11) IFN gamma, infeksi 48 jam, 12) IFN gamma, kontrol sel 48 jam.



**Gambar 3.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 72 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus 1074/03, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 72 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 72 jam, 3) TNF alfa, infeksi 72 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 72 jam, 5) IFN gamma, infeksi 72 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 72 jam.



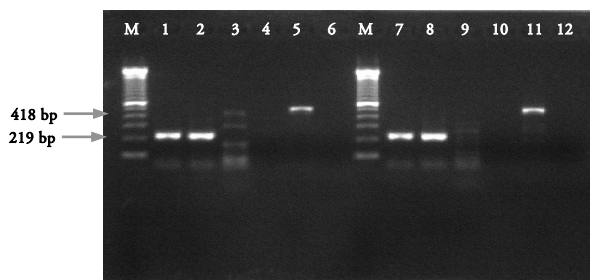
**Gambar 6.** Hasil amplifikasi setelah infeksi 72 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus Bali1/11, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 72 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 72 jam, 3) TNF alfa, infeksi 72 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 72 jam, 5) IFN gamma, infeksi 72 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 72 jam.



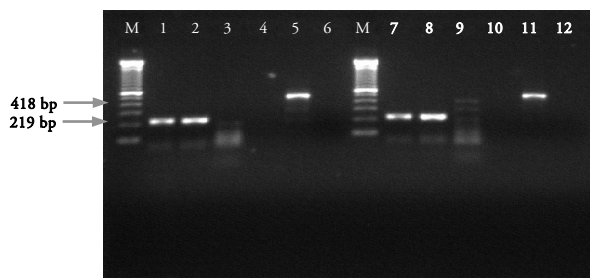
**Gambar 4.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 5 dan 24 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus Bali1/11, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 5 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 5 jam, 3) TNF alfa, infeksi 5 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 5 jam, 5) IFN gamma, infeksi 5 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 5 jam, 7) Beta actin, infeksi 24 jam, 8) Beta actin, kontrol sel 24 jam, 9) TNF alfa, infeksi 24 jam, 10) TNF alfa, kontrol sel 24 jam, 11) IFN gamma, infeksi 24 jam, 12) IFN gamma, kontrol sel 24 jam.

sekitar 400-500bp. Meskipun demikian, tidak tampak ekspresi yang berlebih dari gen IFN  $\gamma$  tersebut (Gambar 4 dan 5). Pada sel MDCK yang diinfeksi virus ini tidak menunjukkan adanya ekspresi TNF $\alpha$ . Pada 72 jam setelah infeksi tampak terdapat ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan pada gambar sebelumnya (5, 24, 36 dan 48) setelah infeksi (Gambar 6).

Pada sel MDCK yang diinfeksi virus A/East Java/BwiI2/10, menunjukkan hal yang serupa dengan sel MDCK yang diinfeksi dengan virus Bali1/11, yaitu ekspresi gen hanya terjadi pada gen IFN $\gamma$  dan tidak pada gen TNF $\alpha$  (Gambar 7, 8 dan 9).

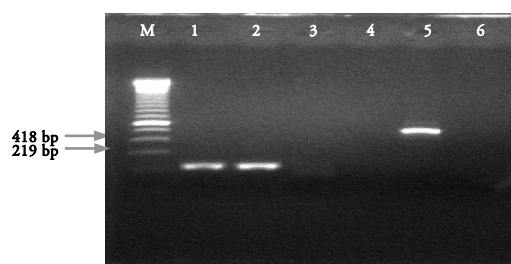


**Gambar 7.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 5 dan 24 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus BwiI2/10, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 5 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 5 jam, 3) TNF alfa, infeksi 5 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 5 jam, 5) IFN gamma, infeksi 5 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 5 jam, 7) Beta actin, infeksi 24 jam, 8) Beta actin, kontrol sel 24 jam, 9) TNF alfa, infeksi 24 jam, 10) TNF alfa, kontrol sel 24 jam, 11) IFN gamma, infeksi 24 jam, 12) IFN gamma, kontrol sel 24 jam.



**Gambar 8.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 36 dan 48 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus BwiI2/10, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 36 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 36 jam, 3) TNF alfa, infeksi 36 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 36 jam, 5) IFN gamma, infeksi 36 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 36 jam, 7) Beta actin, infeksi 48 jam, 8) Beta actin, kontrol sel 48 jam, 9) TNF alfa, infeksi 48 jam, 10) TNF alfa, kontrol sel 48 jam, 11) IFN gamma, infeksi 48 jam, 12) IFN gamma, kontrol sel 48 jam.

Pada Tabel 3 menunjukkan bahwa sel MDCK yang diinfeksi ketiga virus tersebut menunjukkan ekspresi IFN- $\gamma$  pada 5, 24, 36, 48 dan 72 jam setelah infeksi dan tidak ditemukan ekspresi gen TNF- $\alpha$ . Hal ini menunjukkan bahwa virus AI dapat menginduksi ekspresi sitokin terutama IFN- $\gamma$  pada 72 jam setelah infeksi. Pada penelitian ini, ekspresi IFN- $\gamma$  pada 5, 24, 36 dan 48 setelah infeksi virus tampak masih lebih kecil ekspresinya dibandingkan dengan ekspresi *house keeping gene*



**Gambar 9.** Hasil amplifikasi setelah infeksi selama 72 jam pada sel MDCK yang diinfeksi virus BwiI2/10, dengan keterangan sebagai berikut: M adalah Marker (*Molecular weight*, 100 bp), 1) Beta actin, infeksi 72 jam, 2) Beta actin, kontrol sel 72 jam, 3) TNF alfa, infeksi 72 jam, 4) TNF alfa, kontrol sel 72 jam, 5) IFN gamma, infeksi 72 jam, 6) IFN gamma, kontrol sel 72 jam.

( $\beta$ -actin), namun setelah 72 jam infeksi, tampak peningkatan ekspresi IFN- $\gamma$  dari sebelumnya dan pita amplikon tampak setebal  $\beta$ -actin. Keadaan ini kemungkinan dapat merepresentasikan mulai terjadinya badai sitokin yang dapat diinduksi oleh virus avian influenza BwiI2/10 dan Bali1/11.

## PEMBAHASAN

Influenza adalah infeksi virus pernapasan akut yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan. Gejala klinis yang terjadi secara mendadak diantaranya malaise, demam, gejala pernapasan atas dan bawah, serta sakit kepala. Virus influenza bereplikasi di seluruh saluran pernapasan atas dan bawah manusia dan babi (Berg *et al.* 1980; Brocklebank *et al.* 1972; Haesebrouck & Pensaert 1986). Puncak replikasi virus adalah 48 jam setelah infeksi dan kemudian menurun; hanya sedikit virus dilepaskan setelah 6 sampai 8 hari. Virus influenza efisien menginduksi interferon dan sensitif terhadap efek antivirus dari sitokin (Hill *et al.* 1972; Murphy *et al.*, 1973; Richman *et al.*, 1976). Virus influenza ini dapat menginduksi keluarnya interferon dan sangat sensitif terhadap efek antiviral dari sitokin (Seo *et al.* 2002). TNF merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF- $\alpha$  dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. IFN- $\gamma$  yang diproduksi berbagai

**Tabel 3.** Hasil amplifikasi virus AI dengan primer  $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  sel MDCK

Waktu (jam)	Sel MDCK yang diinfeksi virus AI	Hasil amplifikasi dengan primer		
		$\beta$ -actin	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
5	Bali 1/11	++++	-	++
	Kontrol sel normal	++++	-	-
	BwiI2/10	++++	-	++
	Kontrol sel normal 1074 /03	++++	-	+
	Kontrol sel normal	++++	-	-
24	Bali 1/11	++++	-	++
	Kontrol sel normal	++++	-	-
	BwiI2/10	++++	-	++
	Kontrol sel normal 1074 /03	++++	-	+
	Kontrol sel normal	++++	-	-
36	Bali 1/11	++++	-	++
	Kontrol sel normal	++++	-	-
	BwiI2/10	++++	-	++
	Kontrol sel normal 1074 /03	++++	-	+
	Kontrol sel normal	++++	-	-
48	Bali 1/11	++++	-	++
	Kontrol sel normal	++++	-	-
	BwiI2/10	++++	-	++
	Kontrol sel normal 1074 /03	++++	-	+
	Kontrol sel normal	++++	-	-
72	Bali 1/11	+	-	+++
	Kontrol sel normal	++	-	-
	BwiI2/10	++++	-	+++
	Kontrol sel normal 1074 /03	++++	-	+
	Kontrol sel normal	++++	-	-

**Keterangan Gambar :**

- + : ada amplikon (tipis sekali)
- ++ : ada amplikon (tipis)
- +++ : ada amplikon (sedang)
- ++++ : ada amplikon (tebal)
- : tidak ada amplikon

sel sistem imun merupakan sitokin utama *Macrophage Activating Cytokines* dan berperan terutama dalam imunitas nonspesifik dan spesifik seluler. IFN- $\gamma$  adalah sitokin yang mengaktifkan makrofag untuk membunuh fagosit.

Hien *et al.* (2004) menyebutkan bahwa penderita *Avian Influenza* (H5N1) menunjukkan bahwa virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 dapat menginduksi sitokin dan menyebabkan terjadinya pneumonia hebat pada paru-paru penderita.

Namun pada penelitian Sakabe *et al.* (2011)

menyebutkan bahwa, ekstensi induksi sitokin bervariasi diantara strain H5N1 dan tidak berkorelasi dengan kemampuan bereplikasi dalam makrofag. Virus pandemi H1N1 menginduksi beberapa jenis sitokin pada level lebih tinggi dibandingkan virus seasonal flu dan beberapa strain H5N1. Hasil penelitian Sakabe *et al.* (2011) menunjukkan bahwa induksi sitokin yang tinggi bukan merupakan sifat universal dari semua virus H5N1. Hasil pada penelitian ini hampir serupa dengan penelitian Sakabe *et al.* (2011) yang menunjukkan bahwa diantara virus H5N1 asal Indonesia tampak perbedaan fenotipe dalam menginduksi sitokin, karena virus H5N1 1074/03 yang merupakan clade 2.1.1 tidak menunjukkan adanya upregulasi dari sitokin, cenderung hanya sedikit memproduksi sitokin. Hal berbeda ditunjukkan oleh virus Bali1/11 dan BwiI2/10 yang merupakan clade 2.1.3, pada penelitian ini dapat menginduksi produksi sitokin IFN- $\gamma$  pada jam ke 72 setelah infeksi meskipun pada penelitian ini belum dapat menunjukkan adanya ekspresi sitokin yang berlebih. Namun demikian, pada penelitian ini menunjukkan bahwa virus avian influenza yang digunakan dalam penelitian tidak menginduksi terjadinya ekspresi sitokin TNF- $\alpha$ . Meskipun sebagian besar hasil penelitian memperlihatkan adanya beberapa sitokin yang diproduksi dalam jumlah yang tinggi akibat infeksi virus H5N1 namun tingkat ekspresinya bervariasi diantara strain. Le *et al.* (2010) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa hipersitokinaemia biasanya diamati pada pasien yang terinfeksi virus H5N1, pasien yang terinfeksi HK483/97; VN3028Icl2/03 dan IDN3006/05 meninggal sedangkan pasien yang terinfeksi dengan VN31203/07 dapat sembuh (Le *et al.*, 2010). Virus IDN3006/05 yang membunuh pasien, menginduksi sitokin pada level yang rendah, sehingga jika tidak terjadi hipersitokinemia, tentunya tidak dapat berspekulasi bahwa mortalitas pasien karena patogenesis yang tergantung pada sitokin. Sehingga mortalitas tidak hanya tergantung pada hipersitokinemia, tetapi juga karena yang

lain, yang faktor tersebut belum diketahui sampai sekarang (Sakabe *et al.*, 2011). Dari hasil penelitian pada studi kami dan beberapa penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti-peneliti lainnya, dapat dikatakan bahwa tingginya sitokin bukan merupakan bentuk umum dari semua virus H5N1.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus *avian influenza* yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan tidak adanya ekspresi sitokin tinggi dan adanya perbedaan ekspresi sitokin IFN- $\gamma$  diantara virus H5N1, serta ketiga virus H5N1 tidak menunjukkan adanya ekspresi terhadap sitokin TNF $\alpha$  pada sel MDCK yang diinfeksi virus H5N1 clade 2.1.1 dan clade 2.1.3 dalam kurun waktu 72 jam setelah infeksi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis tujukan kepada Nana Suryana, SE., Teguh Suyatno, Hanipah Ariyani dan Masithoh atas bantuan teknisnya selama penelitian ini berlangsung. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Bangli dan Propinsi Bali atas kontribusinya selama di lapang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Ghafar, AN., T. Chotpitayasunondh, Z. Gao, FG. Hayden, DH. Nguyen, MD. de Jong, A. Naghdaliyev, JS. Peiris, N. Shindo & other authors. 2008. Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J.* 358 : 261–273.
- Berg, RA., RH. Yolken, SI. Rennard, R. Dolin, BR. Murphy & SE. Strauss. 1980. New enzyme immunoassays for measurement of influenza A/Victoria/3/75 virus in nasal washes: a preliminary report. *Lancet.* i:851–853.
- Blaschke, V., K Reich, S. Blaschke, S. Zipprich, C. Neumann. 2000. Rapis quantification of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells : validation of new relative RT-PCR technology. *J. Virol. Method.* 246 : 76-90.
- Brocklebank, JT., SDM. Court, J. McQuillin & PS. Gardner. 1972. Influenza A infection in children. *Lancet* ii: 497–500.
- Cheung, CY., LL. Poon, AS. Lau, W. Luk, YL. Lau, KF. Shortridge, S. Gordon, Y. Guan, & JS. Peiris. 2002. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet.* 360 : 1831–1837.
- Claas, EC., AD. Osterhaus, R. van Beek, JC. De Jong, GF. Rimmelzwaan, DA. Senne, S. Krauss, KF. Shortridge, & RG. Webster, R. G. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 351: 472–477.
- de Jong, MD., VC. Bach, TQ. Phan, MH. Vo, T.T. Tran, BH. Nguyen, M. Beld, TP. Le, HK. Truong & other authors. 2005. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med.* 352 : 686–691.
- Dharmayanti, NLPI., R. Indriani, R.Hartawan, D.A. Hewajuli, A. Ratnawati & Darminto. 2008. Genetic mapping of Indonesian avian influenza viruses in 2007. *J Biol Indones.* 5. 2 : 155-171
- Dharmayanti, NLPI. 2009. Perubahan Genom Dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Pada Unggas di Indonesia. *Disertasi Program Doktor Ilmu Biomedik.* Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta
- Fisman, DN. 2000. Hemophagocytic syndromes and infection. *Emerg infect Dis.* 6:601-108.
- Guan, Y., LL. Poon, CY. Cheung, TM. Ellis, W. Lim, AS. Lipatov, KH. Chan, Sturm-KM.

- Ramirez, CL. Cheung, & other authors. 2004. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 : 8156–8161.
- Haesebrouck, F. & MB. Pensaert. 1986. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunized with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet. Microbiol.* 11:239–249.
- Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann & Y. Kawaoka. 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza in mammals. *Science.* 293 : 1773-75.
- Headley, AS., E. Tolley & GU. Meduri. 1997. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. *Chest.* 111: 1306-1321.
- Hien, TT., TL. Nguyen, TD. Nguyen, TS. Luong, PM. Pham, VC. Nguyen VC, *et al.*, 2004. Avian Influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350:1178-1188.
- Hill, DA., S. Baron, JC. Perkins, M. Worthington, JE. Van Kirk, J. Mills, AZ. Kapikian, & RM. Chanock. 1972. Evaluation of an interferon inducer in viral respiratory disease. *JAMA.* 219:1179–1184.
- Lee, SM., JL. Gardy, CY. Cheung, TK. Cheung, KP. Hui, NY. Ip, Y. Guan, RE. Hancock, & JS. Peiris. 2009. Systems-level comparison of host-responses elicited by avian H5N1 and seasonal H1N1 influenza viruses in primary human macrophages. *PLoS ONE* : e8072.
- Mok, KP., CH. Wong, CY. Cheung, MC. Chan, SM. Lee, JM. Nicholls, Y. Guan, & JS. Peiris. 2009. Viral genetic determinants of H5N1 influenza viruses that contribute to cytokine dysregulation. *J. Infect. Dis.* 200: 1104–1112.
- Murphy, BR., S. Baron, EG. Chalhub, CP. Uhlenhof & RM. Chanock. 1973. Temperature-sensitive mutants of influenza virus. IV. Induction of interferon in the nasopharynx by wild-type and a temperature-sensitive re-combinant virus. *J. Infect. Dis.* 128:488–493.
- Osterlund, P., J. Pirhonen, N. Ikonen, E. Ronkko, M. Strengell, SM. Makela, M. Broman, OJ. Hamming, R. Hartmann & other authors. 2010. Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons. *J. Virol.* 84 : 1414–1422.
- Peiris, JS, WC. Yu, CW. Leung, CY. Cheung, W.F. Ng, J.M. Nicholls, TK. Ng, K. Chan, ST. Lai, & other authors. 2004. Reemergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet.* 363, 617–619.
- Richman, DD., BR. Murphy, S. Baron & C. Uhlenhof. 1976. Three strains of influenza A virus (H3N2): interferon sensitivity in vitro and interferon production in volunteers. *J. Clin. Microbiol.* 3:223–226.
- Seo, SH. & R. Webster. 2002. Tumor necrosis factor alpha Exerts powerful anti influenza virus effects in lung epithelial cells. *J Virol.* 76. 3 : 1072-1076
- To, KF., PK. Chan, KF. Chan, WK. Lee, WY. Lam, KF. Wong, NL. Tang, DN. Tsang, RY. Sung, & other authors. 2001. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol.* 63, 242–246.
- Uprasertkul, M., P. Puthavathana, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K. Srisook, M. Peiris, JM. Nicholls, K. Chokeyhaibulkit, N. Vanprapar & P. Auwarakul. 2005. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis.* 11 :1036–1041.
- Woo, PC., ET. Tung, KH. Chan, CC. Lau, SK. Lau, & KY. Yuen. 2010. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. *J. Infect. Dis.* 201: 346–353.



- Woo, PC., ET. Tung, KH. Chan, CC. Lau, SK. Lau & KY. Yuen. 2010. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. *J. Infect. Dis.* 201: 346–353.
- Yu, H., Z. Gao, Z. Feng *et al.* 2008. Clinical characteristics of 26 human cases of highly pathogenic avian influenzaa(H5N1)virus infection in China. *PLoS ONE.* 3 : 1-9.