

## OPTIMASI SUHU DAN MASA INKUBASI PADA UJI HEMAGLUTINASI AVIAN INFLUENZA H5N1 DENGAN SEL DARAH MERAH MANUSIA GOLONGAN O

*Optimization of Temperature and Incubation Period in Avian Influenza H5N1  
Hemagglutination Test with Type O Human Blood Cells*

Ridwan Ilhamsyah<sup>1\*</sup>, Iis Kurniati<sup>2</sup>, Asep Dermawan<sup>3</sup>, Eem Hayati<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup> Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Prodi Sarjana Terapan Teknologi  
Laboratorium Medik,

Email: [ridwanilhamsyah92@gmail.com](mailto:ridwanilhamsyah92@gmail.com)

<sup>2</sup> Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Prodi Sarjana Terapan Teknologi  
Laboratorium Medik,

Email: [kurniati20260@gmail.com](mailto:kurniati20260@gmail.com)

<sup>3</sup> Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Prodi Sarjana Terapan Teknologi  
Laboratorium Medik,

Email: [dermawanasep33@gmail.com](mailto:dermawanasep33@gmail.com)

<sup>4</sup> Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Prodi Sarjana Terapan Teknologi  
Laboratorium Medik,

Email: [eem.hayati@yahoo.com](mailto:eem.hayati@yahoo.com)

### ABSTRACT

*Avian Influenza H5N1 has a high pathogenicity (HPAI H5N1) that has been known to infect animals and humans. The main characteristic of Avian Influenza is the hemagglutinin protein. Hemagglutinin protein has the ability to agglutinate red blood cells. Based on the protein's ability, a hemagglutination test can be performed. The activity of hemagglutinin protein can be affected by temperature and incubation period. In the hemagglutination test, red blood cells are needed as receptors for hemagglutinin protein binding. In addition to chicken red blood cells as receptors, human red blood cells type O can also be used as receptors for hemagglutinin proteins. Avian influenza H5N1 recognizes  $\alpha$ -2,3-galactose sialic acid in poultry, while humans recognize  $\alpha$ -2,6-galactose sialic acid found on the surface of red blood cells. The purpose of this study was to determine the optimum temperature and incubation period for the hemagglutination test of Avian Influenza H5N1 with human red blood cells type O. The type of research used was quasi-experiment, while the research design used was Post-test Control Group Design. The sample used was inactive Avian Influenza H5N1 virus to be tested for hemagglutination with human red blood cells type O. The data were analyzed by two-way ANOVA test on SPSS. The results showed that the optimum temperature and incubation period with O type red blood cells were at a temperature of 25°C and an incubation period of 60 minutes.*

**Key words:** Avian Influenza H5N1, hemagglutination, incubation temperature, incubation period, type O blood

### ABSTRAK

*Avian Influenza H5N1 memiliki patogenisitas tinggi (HPAI H5N1) yang telah diketahui menginfeksi hewan dan manusia. Ciri utama Avian Influenza yaitu memiliki protein hemagglutinin. Protein hemagglutinin mempunyai kemampuan mengaglutinasi sel darah merah. Berdasarkan kemampuan protein tersebut, maka dapat dilakukan uji hemagglutinasi. Aktifitas protein hemagglutinin dapat dipengaruhi oleh suhu dan masa inkubasi. Pada uji hemagglutinasi dibutuhkan sel darah merah sebagai reseptor pengikatan protein hemagglutinin. Selain sel darah merah ayam sebagai reseptor, sel*

darah merah manusia golongan O juga dapat dijadikan sebagai reseptor bagi protein hemaglutinin. *Avian influenza H5N1* mengenali asam sialat  $\alpha$ -2,3-galaktosa pada unggas, sedangkan pada manusia mengenali asam sialat  $\alpha$ -2,6-galaktosa yang terdapat pada permukaan sel darah merah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan suhu dan masa inkubasi yang optimum untuk uji hemaglutinasi *Avian Influenza H5N1* dengan sel darah merah manusia golongan O. Jenis penelitian yang digunakan adalah quasi eksperimen, sedangkan desain penelitian yang digunakan adalah *Post-test Control Group Design*. Sampel yang digunakan berupa virus inaktif *Avian Influenza H5N1* untuk diuji hemaglutinasi dengan sel darah merah golongan O. Data hasil penelitian dianalisis dengan uji *two-way ANOVA* pada SPSS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu dan masa inkubasi yang optimum dengan sel darah merah golongan O adalah pada suhu 25°C dan masa inkubasi selama 60 menit. **Kata kunci:** *Avian Influenza H5N1*, uji hemaglutinasi, suhu inkubasi, masa inkubasi, golongan darah O

## PENDAHULUAN

Menurut *World Organisation for Animal Health*, Virus *Avian Influenza* (AI) merupakan penyebab penyakit flu burung yang masuk ke dalam kelompok penyakit menular bersifat *zoonosis* berbahaya dan mematikan<sup>1</sup>. *Avian Influenza* dibedakan atas dasar patogenesitasnya yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) pemicu morbiditas dan mortalitas besar sehingga bisa memunculkan wabah serta *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yang diisyarati dengan indikasi ringan ataupun tidak mempunyai indikasi pada hewan unggas<sup>1,2</sup>.

*Avian Influenza* golongan A penyebab penyakit flu burung berasal dari famili *Orthomyxoviridae*. *Avian Influenza* golongan A ini dapat menginfeksi hewan seperti kuda, babi, mamalia laut, berbagai spesies burung serta manusia<sup>3</sup>. Virus AI menurut WHO 2016 dilaporkan pertama kali oleh Perrocinto di Italia pada tahun 1878<sup>4</sup>. Berdasarkan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI, dari *Avian Influenza* golongan A hanya tipe H1N1, H2N2, H3N3, H5N1, H9N2, H1N2 dan H7N7 yang menginfeksi manusia. Dari beberapa strain tersebut, strain H5N1 memiliki tingkat virulen yang tinggi sehingga menyebabkan flu burung. Di Negara Indonesia sendiri, mulai dari tahun 2003 *Avian Influenza H5N1* ini

telah menjadi virus yang endemik. Sejak pertama kali ditemukan, virus tersebut tercatat telah mengakibatkan jutaan hewan unggas di 34 provinsi mengalami kematian dengan jangka waktu tujuh tahun dan bersirkulasi hingga saat ini (Yusuf *et al.* 2013; Primadi 2017; Karo-karo *et al.* 2019; Idar *et al.*, 2019).

Ciri dari *Avian Influenza* salah satunya yaitu memiliki protein hemaglutinin (HA) dan protein neurominidase (NA) yang terdapat dibagian permukaan virus (De Jong dan Hien, 2006; Marson *et al.* 2020). Protein HA mempunyai aktifitas dalam pelekatan reseptor (Gurtler, 2006; Pattnaik, *et al.*, 2006; WHO, 2002; Muramoto, *et al.*, 2006; UGM, 2005; Widjadja *et al.*, 2019). Aktifitas protein HA dapat dipengaruhi oleh suhu dan masa inkubasi. Sifat protein HA *Avian Influenza* dapat menyebabkan peningkatan virulensi dengan termostabilitas suhu dari 33 - 40°C dan paling efektif berada di suhu yang lebih rendah sedangkan di suhu yang tinggi titer virus mengalami penurunan<sup>7</sup>. Perubahan suhu kemungkinan dapat berpengaruh pada stabilitas virus dengan kondisi suhu yang tinggi mengakibatkan stabilitas virus akan mengalami penurunan<sup>8</sup>. Suhu dan masa inkubasi dapat mempengaruhi proses elusi virus. Elusi virus membutuhkan waktu lebih lama jika diinkubasi pada suhu yang rendah,

akan tetapi virus akan dielus dengan cepat apabila meningkatnya suhu inkubasi<sup>9</sup>

Protein hemagglutinin memiliki kemampuan untuk mengaglutinasi sel darah merah. Berdasarkan kemampuan protein tersebut, maka dapat dilakukan uji hemagglutinas (HA) sebagai langkah pertama untuk mendeteksi *Avian Influenza*. Pada uji HA dibutuhkan sel darah merah sebagai reseptor pengikatan protein HA. Selain sel darah merah ayam sebagai reseptor, sel darah merah manusia golongan O juga dapat dijadikan sebagai alternatif reseptor bagi protein HA virus yang akan membentuk aglutinasi<sup>9</sup>. Permukaan sel darah merah Galaktosa dibandingkan dengan molekul asam sialat  $\alpha$ -2,3-Galaktosa<sup>10</sup>. Protein HA yang dimiliki oleh *Avian Influenza* manusia berikatan dengan glikan permukaan sel yang membawa gugus  $\alpha$ -2,6 yang manusia bergolongan darah O terdapat lebih banyak molekul asam sialat  $\alpha$ -2,6- disebut sebagai reseptor prototipik manusia<sup>11</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu dan masa inkubasi yang optimum untuk uji hemagglutinas *Avian Influenza H5N1* dengan sel darah merah manusia golongan O berdasarkan titer virus yang didapat dari uji hemagglutinas.

## METODE

Jenis penelitian ini adalah quasi eksperimen. Dilakukan pengoptimasian suhu dan masa inkubasi pada uji hemagglutinas untuk deteksi *Avian*

*Influenza H5N1*. *Post-test Control Group Design* merupakan desain penelitian yang digunakan dengan membandingkan antara kelompok eksperimen yang mendapat variasi perlakuan dan kelompok kontrol yang tidak mendapatkan perlakuan.

Perolehan data dari eksperimen ini berupa nilai titer hasil deteksi *Influenza H5N1* dengan metode uji hemagglutinas. Pada penelitian ini diberi perlakuan pada kelompok eksperimen berupa variasi pada suhu inkubasi yaitu 25 °C, 37 °C dan 40°C serta variasi masa inkubasi adalah 40 menit, 50 menit dan 60 menit. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan.

Pada penelitian ini menggunakan virus inaktif *Avian Influenza H5N1* dan sel darah merah golongan O untuk dilakukan uji hemagglutinas. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi dan Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Bandung. Data yang didapat dari uji hemagglutinas akan dianalisis menggunakan uji *two-way ANOVA* pada SPSS

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung No. 57/KEPK/EC/V/2023.

## HASIL

Pada tabel 1 merupakan hasil titer dari uji hemagglutinas yang diberikan perlakuan variasi suhu dan masa inkubasi

**Tabel 1. Hasil Uji hemagglutinas**

Replikasi	Titer HA (HAU)								
	Suhu 25°C			Suhu 37°C			Suhu 40°C		
	40'	50'	60'	40'	50'	60'	40'	50'	60'
1	16	16	32	8	8	8	4	2	2
2	16	16	32	16	16	2	2	2	2
3	4	8	16	8	16	2	4	2	2
4	8	16	32	8	2	2	2	2	2

**Tabel 2. Hasil Nilai Mean Variasi Suhu Inkubasi**

1. Suhu Inkubasi				
Dependent Variable: Titer virus				
Suhu Inkubasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
25°C	17,667	1,322	14,955	20,379
37°C	8,000	1,322	5,288	10,712
40°C	2,333	1,322	-,379	5,045

**Tabel 3. Hasil Nilai Mean Variasi Masa Inkubasi**

2. Masa Inkubasi				
Dependent Variable: Titer virus				
Masa Inkubasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
40 menit	8,000	1,322	5,288	10,712
50 menit	8,833	1,322	6,121	11,545
60 menit	11,167	1,322	8,455	13,879

**Tabel 4. Hasil Nilai Mean Variasi Suhu dan Masa Inkubasi**

Descriptive Statistics				
Dependent Variable: Titer virus				
Suhu Inkubasi	Masa Inkubasi	Mean	Std. Deviation	N
25°C	40 menit	11,00	6,000	4
	50 menit	14,00	4,000	4
	60 menit	28,00	8,000	4
	Total	17,67	9,566	12
37°C	40 menit	10,00	4,000	4
	50 menit	10,50	6,807	4
	60 menit	3,50	3,000	4
	Total	8,00	5,527	12
40°C	40 menit	3,00	1,155	4
	50 menit	2,00	,000	4
	60 menit	2,00	,000	4
	Total	2,33	,778	12
Total	40 menit	8,00	5,326	12
	50 menit	8,83	6,686	12
	60 menit	11,17	13,224	12
	Total	9,33	8,931	36

Data yang didapat dari uji HA dianalisis menggunakan uji *two-way* ANOVA pada SPSS untuk mencari perbedaan antar perlakuan berdasarkan nilai rata-rata (mean) yang ditunjukkan oleh tabel 2, tabel 3, dan tabel 4.

Pada tabel 2 ditunjukkan bahwa variasi pada suhu 25°C memiliki nilai mean sebesar 17,667, sedangkan pada

suhu 37°C sebesar 8,000 dan untuk suhu 40°C sebesar 2,333. Hasil nilai mean tersebut berdasarkan titer virus yang didapat dari uji hemaglutinasi dengan nilai rata-rata titer yang terbesar terdapat pada suhu yaitu 25°C.

Sedangkan berdasarkan tabel 3, variasi masa inkubasi pada waktu 40 menit memiliki nilai mean sebesar 8,000, sedangkan pada waktu 50 menit

sebesar 8,833 dan untuk waktu 60 menit sebesar 11,167. Hasil nilai mean tersebut berdasarkan titer virus yang didapat dari uji hemaglutinasi dengan nilai rata-rata titer yang terbesar terdapat pada masa inkubasi selama 60 menit.

Pada tabel 4, menunjukkan nilai mean titer virus pada variasi suhu dan masa inkubasi. Nilai mean tertinggi sebesar 28,00 dengan variasi suhu sebesar 25°C dan waktu masa inkubasi selama 60 menit. Berdasarkan besar nilai mean tersebut, maka uji hemaglutinasi *Avian Influenza H5N1* dengan sel darah manusia golongan O memiliki suhu dan lama masa inkubasi yang optimal yaitu pada suhu 25°C selama 60 menit.

## PEMBAHASAN

Uji HA dapat dilakukan berdasarkan sifat *Avian Influenza H5N1* yang memiliki kemampuan untuk mengaglutinasi sel darah merah (RBC). Asam sialat pada sel darah merah dapat bertindak sebagai ligan untuk protein pengikat lektin virus seperti hemaglutinin (HA) yang memediasi terjadinya infeksi virus. *Avian influenza H5N1* dapat mengenali asam sialat pada unggas yaitu  $\alpha$ -2,3-galaktosa, sedangkan pada manusia mengenali asam sialat  $\alpha$ -2,6-galaktosa. Kasus *Avian Influenza H5N1* yang diisolasi dari manusia menunjukkan adanya perubahan preferensi pengikatan reseptor HA dari asam sialat  $\alpha$ -2,3-galaktosa menjadi asam sialat  $\alpha$ -2,3-galaktosa dan  $\alpha$ -2,6-galaktosa. Meskipun demikian, pengikatan protein HA dengan reseptor asam sialat  $\alpha$ -2,6-galaktosa tidak berafinitas tinggi.

Pada bagian permukaan sel darah merah manusia bergolongan darah O terdapat lebih banyak molekul asam sialat  $\alpha$ -2,6-galaktosa dibandingkan dengan molekul asam sialat  $\alpha$ -2,3-galaktosa. Selain itu, pada sel darah merah golongan O tidak memiliki aglutinogen. Perbedaan ekspresi

aglutinogen golongan darah tersebut dapat meningkatkan atau menurunkan kerentanan inang terhadap infeksi. Golongan darah dapat memainkan peran langsung dalam infeksi sebagai reseptor untuk mikroorganisme salah satunya yaitu virus<sup>12</sup>. Maka dari itu, hasil aglutinasi dengan sel darah merah manusia dapat juga dipengaruhi oleh adanya aglutinogen pada sel darah merah tersebut<sup>13</sup>.

Protein NA sebagai sialidase dapat menghilangkan kemampuan hemaglutinasi dengan target reseptor berupa asam sialat  $\alpha$ -2,3-galaktosa. Ikatan  $\alpha$ -glikosidik yang menghubungkan asam sialat dengan glikan dihidrolisis oleh hidrolase glikosida bernama sialidase atau neuraminidase<sup>14</sup>. Sedangkan pada protein HA yang berikatan dengan reseptor asam sialat  $\alpha$ -2,6-galaktosa harus mempertahankan aktivitas hemaglutinasi dengan sel darah merah yang diberi perlakuan<sup>15</sup>.

Protein HA *Avian Influenza* dapat menyebabkan peningkatan virulensi dengan termostabilitas suhu dari 33 - 40°C dan paling efektif berada pada suhu yang lebih rendah sedangkan pada suhu tinggi titer virus akan menurun<sup>7</sup>. Sedangkan berdasarkan temuan Hirst, McClelland dan Hare<sup>16</sup> pada suhu 37°C Virus Influenza yang melakukan hemaglutinasi dapat teradsorpsi dan dielusi dari sel darah merah karena adanya kerusakan enzimatik dari substansi reseptor pada sel.

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa suhu inkubasi yang optimum untuk uji hemaglutinasi *Avian Influenza H5N1* dengan sel darah merah manusia golongan O adalah 25°C, sedangkan masa inkubasi yang optimum pada uji hemaglutinasi *Avian Influenza H5N1* dengan sel darah merah manusia golongan O adalah 60 menit.

**DAFTAR RUJUKAN**

1. Marson FGS, Suardana IBK, Nindhia TS. Titer Antibodi Pascavaksinasi Flu Burung Subtipe H5N1 pada Ternak Itik di Baha, Mengwi, Badung, Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*. 2020;9(5):797–806. doi:10.19087/imv.2020.9.5.797
2. Isnawati R, Wuryastuti H, Wasito R. Peneguhan diagnosis Avian Influenza pada Ayam Petelur yang Mengalami Gejala Penurunan Produksi. *Jurnal Sain Veteriner*. 2019;37(1):1. doi:10.22146/jsv.40602
3. Webster R, Cox N, Stohr K. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance: World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and. *WHO/CDS/CDR/20025 Rev 1*. Published online 2002. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:WHO+Manual+on+Animal+Influenza+Diagnosis+and+Surveillance+World+Health+Organization+Department+of+Communicable+Disease+Surveillance+and#1>
4. Martinez NWI, Kencana GAY, Dibia IN. Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Itik di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Galiran, Bali. *Jurnal Veteriner*. 2021;22(3):442–449. doi:10.19087/jveteriner.2021.22.3.442
5. Idar I, Muhsinin S, Baroroh U, Yusuf M. Pola Perubahan Urutan Asam Amino pada Hemagglutinin Virus H5N1 Indonesia. *Chimica et Natura Acta*. 2019;7(3):150. doi:10.24198/cna.v7.n3.26314
6. Widjadja MJ, Rachmawati K, Rizal MF, Samjaya DF. Peran gen hemagglutinin virus avian influenza H5N1. *Prosiding Seminar Nasional Pakar ke 2 Tahun 2019*. Published online 2019:1.63.1-1.63.7.
7. Timofeeva TA, Sadykova GK, Lomakina NF, et al. The Effect of I155T, K156Q, K156E and N186K Mutations in Hemagglutinin on the Virulence and Reproduction of Influenza A/H5N1 Viruses. *Molecular Biology*. 2020;54(6):861–869. doi:10.1134/S0026893320060126
8. Bandou R, Hirose R, Nakaya T, et al. Higher Viral Stability and Ethanol Resistance of Avian Influenza A(H5N1) Virus on Human Skin. *Emerging Infectious Diseases*. 2022;28(3):639–649. doi:10.3201/eid2803.211752
9. Sciences A. Factors affecting Hemagglutination Activity of Avian Influenza Virus Subtype H5 1 M. Hussain \* , M. D. Mehmood ‡ , A. Ahmad † , M. Z. Shabbir † and T. Yaqub †. 2008;1(May 2019):31–36.
10. Makkoch J, Prachayangprecha S, Payungporn S, et al. Erythrocyte binding preference of human pandemic influenza virus A and its effect on antibody response detection. *Annals of Laboratory Medicine*. 2012;32(4):276–282. doi:10.3343/alm.2012.32.4.276
11. Broszeit F, van Beek RJ, Unione L, et al. Glycan remodeled erythrocytes facilitate antigenic characterization of recent A/H3N2 influenza viruses. *Nature Communications*. 2021;12(1):1–12. doi:10.1038/s41467-021-25713-1
12. Cooling L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):801–870. doi:10.1128/CMR.00109-14
13. Nuraningsih, Darmawati S, Santosa B. Aktivitas Hemagglutinas Protein Pili Salmonella typhi terhadap Eritrosit Manusia dan Domba. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*. 2018;1:86–90.
14. Burzyńska P, Sobala ŁF, Mikołajczyk K, Jodłowska M, Jaśkiewicz E. Sialic acids as



- receptors for pathogens. *Biomolecules*. 2021;11(6). doi:10.3390/biom11060831
15. Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, et al. An Avian Influenza H5N1 Virus That Binds to a Human-Type Receptor. *Journal of Virology*. 2007;81(18):9950–9955. doi:10.1128/jvi.00468-07
16. Mikhail Matrosovich, Georg Herrler and HDK. Sialic Acid Receptors of Viruses. *Springer*. 2013;367:1–28. doi:10.1007/128\_2013\_466