

## **Amino Terminus Gen Polimerase Basik-2 Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Berbagai Spesies Hewan di Indonesia**

**(AMINO-TERMINUS OF POLYMERASE BASIC-2 OF AVIAN INFLUENZA VIRUS  
OF H5N1 SUBTYPE ISOLATED FROM VARIOUS ANIMAL SPECIES  
IN INDONESIA)**

**Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1,1a</sup>, Widya Asmara<sup>2</sup> Charles Rangga Tabbu<sup>2</sup>,  
I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,  
Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Telepon: (0361) 223791

<sup>1a</sup>Mahasiswa Program S3 Jurusan Sains Veteriner, Universitas Gadjah Mada  
E-mail: [yuniatikencana@yahoo.co.id](mailto:yuniatikencana@yahoo.co.id)

<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Olahraga Karang Malang, Yogyakarta

<sup>3</sup>Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan FKH Universitas Udayana,  
Jl. Raya Sesetan Gang Markisa No. 6 Denpasar, Bali

### **ABSTRACT**

The information on pathogenicity and adaptation factors of avian influenza virus (AIV) in mammals is very important in an effort to reduce the risk of avian influenza (AI) pandemic in the future. Polymerase gene complex appears to be the major factors for adaptation of AIV to certain animal species. A preliminary study on role of non-coding region (NCR) and amino-terminus of polymerase-basic 2 (PB2) is presented. Purified viral RNA of AIV isolated from chicken, duck, pig, and quail of Bali and Yogyakarta was reverse transcribed into cDNA and amplified using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using PB-2 universal forward primer and specifically designed backward primer. The result showed that all AIV's H5N1 isolated from chicken, duck, quail, and pig, posed PB2 amino-terminus typical for Indonesian AIV H5N1. However, polymorphic amino acids of the protein fragment did not show any species specific motive, with the exception of the pig isolate Sw/Tabanan/2006 which had specific substitution of D16E, H17Q, M40I, and H124Y.

Key word: PB2 gene, avian influenza, H5N1, Indonesia

### **PENDAHULUAN**

Virus avian influenza (VAI) yang sangat patogen (*highly pathogenic avian influenza virus/HPAI*) subtipe H5N1, telah menyebabkan sampar ayam (*fowl plague*) pada unggas di berbagai negara di Asia seperti Vietnam, Thailand, Cina, Jepang, Korea Selatan, Kamboja, Laos, dan Indonesia sejak akhir 2003 sampai sekarang (WHO, 2007). Ratusan juta ayam dan itik telah dimusnahkan untuk menghentikan laju penyebarannya. Di samping menyebabkan kerugian ekonomi yang besar dan ancaman pada ketahanan pangan, virus HPAI tersebut juga telah terbukti dapat melompati *barier* spesies unggas-manusia dan dapat

menjadi ancaman pandemi (Fouchier *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004, Hulse-Post *et al.*, 2005; De Jong dan Hien, 2006). Karena itu, penelitian untuk menemukan faktor patogenik dan adaptasi pada mamalia sangat penting dilakukan sebagai signal apakah suatu isolat berpotensi sebagai galur pandemi.

Secara umum dinyatakan bahwa rentang inang dan patogenesis VAI bersifat poligenik, yaitu faktor determinan untuk rentang inang dan patogenesis terdapat pada semua fragmen gen (Wright dan Webster, 2001). Virulensi VAI dipengaruhi oleh beberapa fragmen gen, antara lain gen hemaglutinin (HA), gen-gen polimerase, polimerase basik-1 (PB1), polimerase basik-2 (PB2), polimerase asidik (PA), gen neuraminidase (NA), dan gen non struktural (NS).

Kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi VAI pada spesies tertentu. Kompleks enzim polimerase dari VAI membentuk heterotrimer (PA, PB1, PB2) dan diketahui terlibat dalam banyak tahapan replikasi virus dan berinteraksi dengan berbagai protein sel, sehingga berperan dalam menentukan spesifisitas induk semang (Taubenberger *et al.*, 2005). Dalam kasus VAI subtipe H5N1, Salomon *et al.* (2006) telah membuktikan bahwa gen yang berperan sebagai *barrier* spesies VAI subtipe H5N1 berlokasi pada gen-gen polimerase.

Fokus penelitian yang dilakukan selama ini adalah pada daerah *coding region* (CR) dari segmen gen VAI. Perubahan asam amino pada gen polimerase PB2 daerah CR pada posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan VAI asal unggas ke VAI asal mamalia (Naffakh *et al.*, 2000). Namun, temuan tersebut tidak konklusif karena data yang tersedia di *GeneBank* menunjukkan banyak isolat AI H5N1 asal unggas yang mempunyai mutasi pada asam amino 627 PB2. Dengan pertimbangan tersebut, penelitian tentang *non-coding region* (NCR) dari gen-gen polimerase diharapkan memberikan indikasi adaptasi VAI subtipe H5N1 pada berbagai spesies. Bukti ilmiah bahwa daerah NCR berpengaruh pada efisiensi replikasi virus influenza telah pernah dilaporkan. Genom sebagian besar virus famili *Orthomyxoviridae* membentuk struktur seperti jepit rambut (*hairpin loop*) pada kedua ujung -5' dan -3' yang dibutuhkan untuk aktivitas endonuklease dari RNA polimerase virus influenza dalam proses *cap-snatching* (Leahy *et al.*, 2001). Fujii *et al.* (2005) juga membuktikan bahwa NCR gen NS ikut mempengaruhi transkripsi pada virus influenza A. Publikasi oleh Gultayev *et al.* (2007) mengungkapkan bahwa mutasi gen NS pada posisi 563 dari G menjadi C yang terjadi setelah tahun 2000 menyebabkan *hairpin loop* RNA menjadi kokoh, yang dihipotesiskan dapat meningkatkan kapasitas VAI subtipe H5N1 untuk menginfeksi manusia dan menyebar ke seluruh dunia.

Dalam penelitian ini NCR ujung-5' gen polimerase PB2 dipelajari bersama-sama dengan *amino-terminus* daerah CR gen yang bersangkutan. Seperti diungkap sebelumnya bahwa kompleks enzim polimerase berinteraksi dengan berbagai protein sel (Taubenberger *et al.*, 2005). Daerah NCR bersama-sama dengan bagian depan CR akan berinteraksi dengan

sistem sintesis RNA dan protein seluler maupun virus.

## METODE PENELITIAN

### Virus

Isolat yang digunakan adalah koleksi FKH Unud dan FKH UGM yang merupakan hasil isolasi virus dari kasus AI lapangan. Isolat ayam Ck/Denpasar/2004 adalah koleksi Lab. Biomedik FKH Unud (Mahardika *et al.*, 2004), sedangkan pengumpulan isolat yang lain dilakukan pada saat kejadian luar biasa kasus influenza pada unggas tahun 2005, 2006, dan 2007. Sampel yang digunakan berasal dari berbagai spesies hewan seperti ayam, itik, puyuh, dan babi. Isolat virus HPAI H5N1 yang digunakan antara lain: isolat ayam kampung dari Bali, Yogyakarta, dan Solo, yaitu A/Chicken/Denpasar/Unud-01/2004, A/Chicken/Klungkung/Unud-12/2006, A/Chicken/Denpasar/20/2007, A/Chicken/Denpasar/21/2007, A/Chicken/Klungkung/22/2007, isolat puyuh A/Quail/Yogyakarta/2005, A/Quail/Yogyakarta/2005, dan A/Quail/Solo/2006, isolat itik yaitu A/Duck/Badung/Unud-05/2005, isolat babi yaitu A/Swine/Tabanan/Unud-02/2006. Informasi sekunder gen PB2 VAI subtipe H5N1 asal berbagai unggas di Indonesia diperoleh dari *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi>).

### Rancangan Primer

Untuk mengamplifikasi *amino-terminus* gen PB2 dari VAI subtipe H5N1, digunakan primer depan (*forward primer*) standar dari Hoffman *et al.* (2001). Sementara primer belakang (*backward primer*) dirancang sendiri berdasarkan atas susunan gen dari genom VAI yang diambil dari *GeneBank* isolat VAI Indonesia. Daerah konservatif (*conserved*) pada posisi 400-500 basa dari informasi sikuens yang telah tersedia dipilih dengan berpedoman pada panduan yang dikutip dari Mahardika (2003). Panjang produk yang diharapkan adalah sekitar 500-600 *base pair* (bp). Susunan primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: PB2F universal (5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC-3' (Hoffmann *et al.*, 2001) dan PB2R507 (5'-CGACTTCCATGATGACATCTTGTGC-3'). Isolat yang tidak dapat diperbanyak dengan pasangan primer tersebut, diamplifikasi dengan primer PB2F universal dan primer alternatif PB2200R (5'-GCCCTTGTTTCATTCCCTTTC-3').

### Perbanyak Virus

Masing-masing isolat virus dipropagasi menggunakan telur ayam bertunas (TAB) umur 9-10 hari melalui ruang alantois, selanjutnya TAB diinkubasikan pada mesin penetas telur selama 24 jam. TAB kemudian dikeluarkan dari mesin penetas telur, sebelum dipanen TAB dimasukkan ke dalam lemari es selama 1 jam untuk menghindari terjadinya perdarahan. Hasil panen cairan alantois selanjutnya diuji dengan uji HA/HI, kemudian dikonfirmasi dengan uji RT-PCR.

### Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan Trizol® (Invitrogen). Secara ringkas teknik tersebut adalah sebagai berikut. Sebanyak 0,25 ml sampel cairan alantois ditambahkan dengan 0,75 ml Trizol LS reagent dalam tabung *epENDORF*. Campuran tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 menit, ditambahkan kloroform sebanyak 0,2 ml, kemudian dikocok sampai homogen dan diinkubasikan pada suhu kamar (15-30°C) selama 15 menit. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 *revolution centrifugal force* (RCF) selama 15 menit. Bagian *aqueous* diambil dan dimasukkan ke dalam tabung steril. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan isopropil alkohol sebanyak 0,5 ml, dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 RCF selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan alkohol 70% sebanyak 1 ml dan divorteks, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.500 RCF selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet RNA dikeringkan, dan disuspensi kembali dengan *DEPC-treated water*.

### Reverse Transcriptase--Polymerase Chain Reaction

Uji *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dilakukan dengan *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). RT-PCR dilakukan dalam kondisi 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO<sub>4</sub>, dengan buffer yang disediakan oleh produsen. Ke dalam tabung PCR volume 10 µl dimasukkan 1 µl RNA dan ditambahkan primer depan dan belakang sebanyak 0,6 µl. Setelah penambahan enzim *super script* 0,25 µl, tabung PCR dimasukkan ke dalam *thermocycler epENDORF mastercycler personal* atau PTC-100™ *Programable Thermal*

*Controller MJ Research Inc.* Mesin penyiklus panas diprogram dengan kondisi 50°C selama 1 jam, 95°C selama 7 menit dan 45 siklus dengan kondisi 94°C selama 45 detik, 55°C selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Pada bagian akhir diinkubasikan pada suhu 72°C selama 5 menit untuk memperoleh fragmen yang sempurna. Tabung PCR dimasukkan setelah *thermocycler* mencapai suhu 50°C. Langkah selanjutnya adalah, 3 µl dari produk PCR tadi ditambah dengan 1 µl *loading dye* (Bromphenol-blue dan Cyline Cyanol), dan selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi *etidium bromide* dengan konsentrasi 25 µg/ml bersama dengan marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi produk RT-PCR diamati dengan ultraviolet, kemudian didokumentasikan dengan kamera dan film polaroid.

### Sikuensing dan Analisis Sikuens Nukleotida

Sikuensing dilakukan di First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia). Produk PCR dikirim bersama-sama dengan primernya. Data yang diperoleh dianalisis dengan program MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Data yang dianalisis adalah konfirmasi hasil sikuensing dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), analisis filogenetik dengan data nukleotida dan asam amino yang tersedia di *GeneBank*. Hubungan evolusi ditentukan berdasarkan metode *Neighbor-Joining* (Saitou dan Nei, 1987). Pohon yang optimum dengan total panjang cabang = 0.14 diperlihatkan. Nilai persentase replikasi pohon, dari taksa/isolat yang membentuk klaster yang sama pada *bootstrap test* dengan 1.000 ulangan, diperlihatkan dekat cabang (Felsenstein, 1985). Pohon digambar menurut skala, dengan panjang cabang unit yang sama seperti jarak evolusi yang digunakan untuk menentukan pohon filogenetik. Jarak evolusi dihitung menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood* (Tamura *et al.*, 2004) dan jarak tersebut merupakan jumlah unit-unit basa substitusi untuk setiap lokasi. Posisi kodon meliputi posisi 1, 2, dan 3. Seluruh posisi yang memiliki antara (*gap*) dan *missing* data dihilangkan dari *dataset* (*complete deletion option*). Pada data set akhir secara keseluruhan ada 383 posisi. Analisis filogenetik dilakukan dengan MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

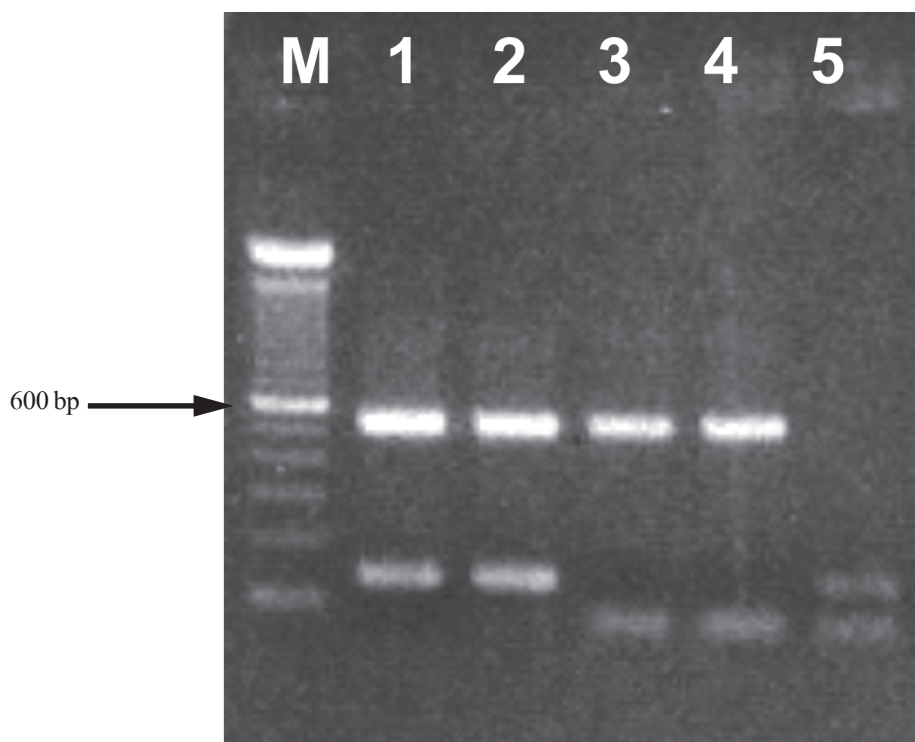
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi NCR ujung -5 dan *amino-terminus* gen PB2 VAI sub tipe H5N1 isolat lokal yang berasal dari ayam Ck/Denpasar/2004, itik Dk/Badung/2005, ayam Ck/Klungkung/2006, dan babi Sw/Tabanan/2006, ditampilkan pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan hasil PCR yang khas dari *amino-terminus* gen PB2 yang ditandai dengan panjang produk 600 bp. Panjang produk PCR tersebut sesuai dengan yang diharapkan, yaitu sekitar 100 bp untuk NCR dan sisanya merupakan gen ditambah dengan posisi primer belakang yang didesain khusus komplementer mulai dari posisi 507. Hal ini menandakan bahwa primer yang dirancang adalah spesifik untuk NCR ujung-5 dan *amino-terminus* gen PB2 VAI sub tipe H5N1 isolat lokal yang berasal dari ayam Ck/Denpasar/2004, itik Dk/Badung/2005, ayam Ck/Klungkung/2006, dan babi Sw/Tabanan/2006. Hasil pembacaan sikuens dan pengujian BLAST yang tersedia di *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) menunjukkan bahwa informasi

genetik yang dapat dibaca dan dikonfirmasi sebagai gen PB2 VAI sub tipe H5N1 mempunyai tingkat homologi sampai 97-99% dengan virus asal unggas dan manusia di Indonesia (data tidak ditampilkan).

Hasil penyepadanan asam *amino-terminus* gen PB2 isolat yang dipelajari dalam penelitian ini dan yang diperoleh di *GeneBank* ditampilkan pada Tabel 1. Dari tabel tersebut tampak bahwa terdapat 20 titik asam amino yang polimorfik di antara semua virus yang dianalisis. Kecuali untuk isolat asal babi, residu yang khas isolat dari spesies tertentu tidak dapat diidentifikasi. Dengan lain perkataan, perubahan asam amino terjadi secara acak dan tidak berpola sesuai dengan spesies asal isolat. Hal yang sama berlaku untuk satu-satunya virus asal kucing yang informasi genetiknya tersedia di *GeneBank*. *Amino-terminus* protein PB2 dari virus Feline/Indonesia/CDC1/2006 bahkan 100% homolog dengan berbagai virus asal ayam, itik, dan puyuh.

Virus babi Sw/Tabanan/2006 tampaknya



Gambar 1. RT-PCR hasil amplifikasi NCR ujung -5 dan amino terminus gen PB2 dari virus AI H5N1 isolat lokal dalam gel agarose 1% dan divisualisasikan dengan ethidium bromide dan sinar ultraviolet. Isolat ayam Ck/Badung/2004 (jalur 1), isolat itik Dk/Badung/2005 (jalur 2), isolat ayam Ck/Kelungkung/2006 (jalur 3), isolat babi SW/Tabanan/2006 (jalur 4), kontrol negatif (jalur 5) dan M adalah 100 bp ladder (marker). Posisi 600 bp pada marker ditunjukkan dengan panah.

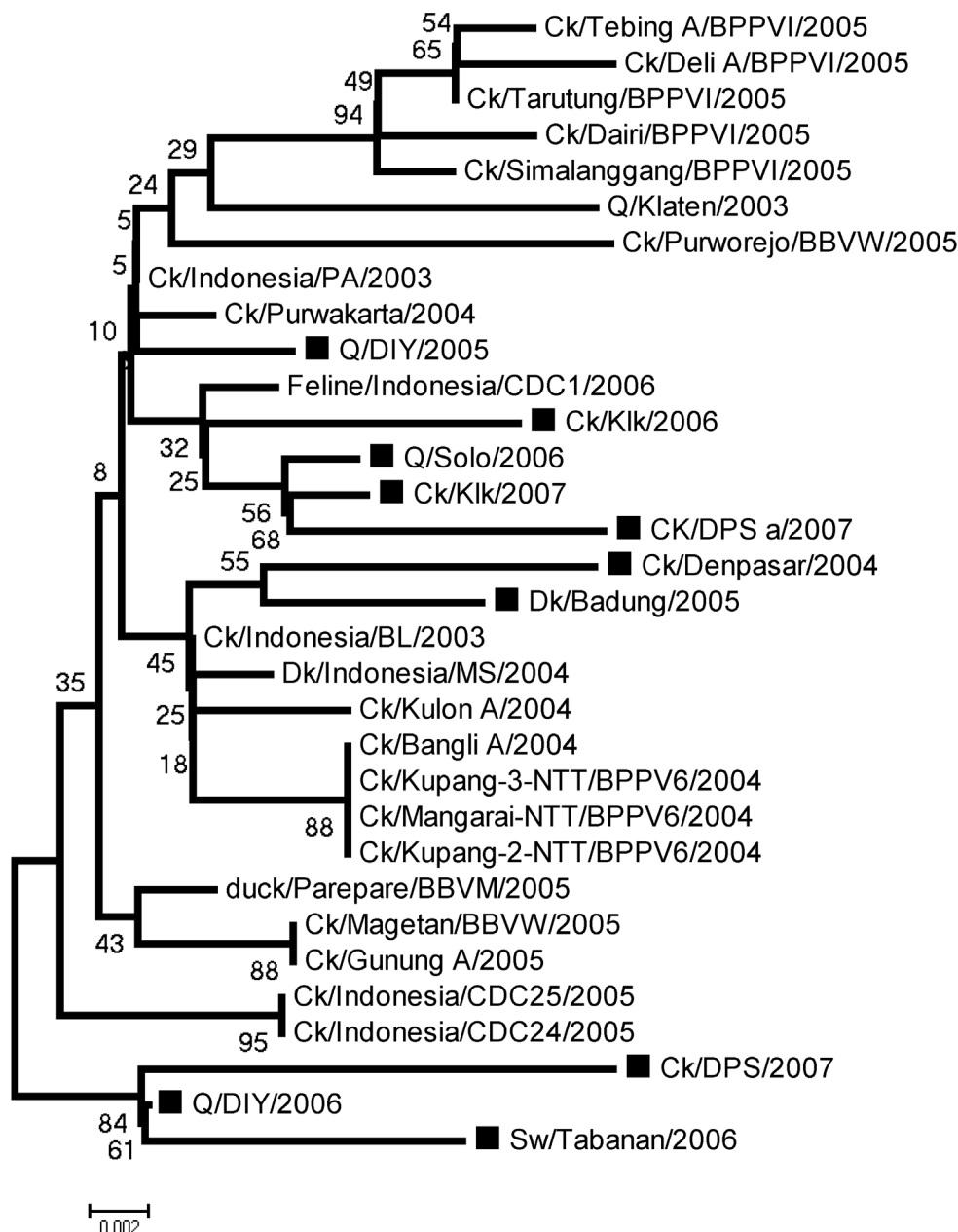
Tabel 1. Polimorfisme Asam Amino pada Amino Terminus Gen PB2 dari isolat Virus Avian Influenza H5N1 Asal Berbagai Spesies Hewan yang Diperoleh Langsung dari Penelitian ini dan Data yang Tersedia di GeneBank.

Nama Isolat	Posisi Asam Amino Polimorfik
	1111111
	1112444555 7991111224
	0670038237 9890236490
#Ck/Indonesia/PA/2003	LDHIMMTRII VAVEVEKHVG
#Ck/Magetan/BBVW/2005	.....
#Ck/Purworejo/BBVW/2005	.....T.....I.
#Ck/Kulon_A/2004	.....
#Ck/Gunung_A/2005	.....
#Ck/Purwakarta/2004	.....
#Ck/Bangli_A/2004	.....V.
#Ck/Mangarai-NTT/BPPV6/2004	.....V.
#Ck/Kupang-2-NTT/BPPV6/2004	.....V.
#Ck/Kupang-3-NTT/BPPV6/2004	.....V.
#Ck/Simalanggang/BPPVI/2005	.....
#Ck/Tebing_A/BPPVI/2005	.....
#Ck/Dairi/BPPVI/2005	.....
#Ck/Deli_A/BPPVI/2005	.....
#Ck/Tarutung/BPPVI/2005	.....
#Ck/Indonesia/BL/2003	.....
#Ck/Indonesia/CDC25/2005	.....I.....
#Ck/Indonesia/CDC24/2005	.....I.....
#Ck/Klk/2006	.....R.....
#Ck/Klk/2007	.....D.....
#CK/DPS_a/2007	.....V.....D.....D
#Ck/DPS/2007	.....K.....V
#Ck/Denpasar/2004	...L.P...I.....
#Dk/Badung/2005	I.....I.....
#Dk/Indonesia/MS/2004	.....
#duck/Parepare/BBVM/2005	.....A.....
#Q/DIY/2005	.....M.....
#Q/Klaten/2003	.....T...D.....
#Q/DIY/2006	.....
#Q/Solo/2006	.....D.....
#Feline/Indonesia/CDC1/2006	.....
#Sw/Tabanan/2006	EQI.....M

Keterangan: Posisi asam amino dibaca dari atas ke bawah. Titik Berarti sekuens di posisi tersebut sama dengan isolat yang ditulis paling atas. Residu asam amino pada posisi 16, 17, 40, dan 124 pada isolat Sw/Tabanan/2006 ditandai dengan kotak.; Ck=virus ayam; Dk=itik; Q=puyuh; Feline=kucing; Sw=babi.

berbeda dengan virus yang lain. Isolat itu berbeda pada 4 residu dengan semua virus asal hewan, baik yang dipelajari dalam penelitian ini maupun yang tersedia di *GeneBank*. Substitusi D16E, H17Q, M40I, dan H124Y hanya ditemukan pada virus babi Sw/Tabanan/2006. Arti penting residu-residu tersebut perlu dikaji

lebih lanjut dengan menggunakan jumlah sampel virus mamalia yang lebih banyak. Menurut Naffakh *et al.* (2000) perubahan asam amino pada gen polimerase PB2 daerah CR pada posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan VAI asal unggas ke VAI asal mamalia. Lebih lanjut Hatta *et al.* (2007)



Gambar 2. Hubungan evolusioner fragmen amino-terminus gen PB2 dari VAI H5N1 yang dipelajari dalam penelitian ini (tanda kotak hitam) dengan berbagai virus yang diperoleh dari GeneBank. Prosedur analisis seperti dijelaskan dalam materi dan metode.

menyebutkan bahwa PB2 residu 627 adalah glutamat pada isolat virus asal unggas, tetapi lysin pada isolat virus asal mamalia dan merupakan reseptor spesifik pada manusia (asam sialat  $\alpha$ -2,6).

Pada penelitian ini, dari hasil polimorfisme ternyata tidak ada kesamaan asam amino yang spesifik untuk semua isolat, kecuali isolat babi. Antara isolat satu dan lainnya tidak ada satu pun asam amino spesifik sebagai pertanda bahwa

isolat berasal dari satu daerah (Bali). Belum diketahui apakah perbedaan titik-titik polimorfik pada tingkat asam amino ini mempengaruhi virulensi virus atau adaptasi pada hewan. Tujuan utama penelitian yang ingin mengungkap daerah NCR belum tercapai, karena sikuens yang terbaca tidak meliputi NCR. Penelitian lanjutan sedang dikerjakan dan diharapkan wilayah NCR juga terbaca dengan baik. Penelitian lanjutan tentang motif

sikuens dan struktur sekunder gen PB2 barangkali akan dapat lebih mengarahkan hipotesis untuk memprediksi terjadinya perubahan virulensi VAI ke arah virus mamalia.

Hasil analisis filogenetik *amino-terminus* gen PB2 yang berasal dari isolat ayam, itik, puyuh, dan babi yang diperoleh dari turunan sikuens cDNA dalam penelitian ini dan informasi genetik fragmen gen yang sama yang diperoleh dari *GeneBank* ditampilkan pada Gambar 2. Pohon filogenetik pada Gambar 2 menunjukkan bahwa semua isolat berada pada kelompok yang berbeda, dan terpisah dalam tiga kelompok. Isolat ayam Ck/Klungkung/2006, Ck/Klungkung/2007, Ck/Dps\_a/2007, Q/DIY/2005, dan Q/Solo/2006 berada pada kelompok 1, satu *cluster* dengan isolat ayam Ck/Indonesia/PA/2003, Ck/Simalangang/2006, dan Feline/Indonesia/CDC1/2006. Isolat ayam Ck/Denpasar/2004 dan itik Dk/Badung/2005 berada dalam satu kelompok dengan isolat ayam Ck/Bangli-Bali/2005 dan isolat-isolat ayam Indonesia yang sudah pernah dianalisis sebelumnya. Isolat babi Sw/Tabanan/2006, Q/DIY/2006, dan Ck/Dps/2007 berada pada kelompok 3, dan terpisah dengan isolat-isolat yang lain.

Analisis filogenetik tersebut menunjukkan bahwa semua virus H5N1 merupakan *strain* virus Indonesia yang telah pernah diisolasi sebelumnya. Hasil penelitian ini juga dengan jelas menunjukkan bahwa semua virus yang dianalisis merupakan virus yang berasal dari kelompok genetik yang berbeda satu dengan lainnya.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Semua VAI sub tipe H5N1 isolat ayam, itik, puyuh, dan babi merupakan isolat virus dengan fragmen *amino-terminus* PB2 yang khas virus Indonesia. Polimorfisme asam amino pada fragmen *amino-terminus* PB2 semua isolat tidak menunjukkan pola yang khas spesies, kecuali isolat asal babi Sw/Tabanan/2006 yang mempunyai substitusi khas D16E, H17Q, M40I, dan H124Y. Semua isolat berada pada tiga kelompok yang berbeda.

### Saran

Diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan sampel yang lebih banyak, terutama isolat dari mamalia, sehingga hasil

yang diperoleh lebih akurat. Analisis lebih lanjut diperlukan untuk mengungkap motif sikuens dan struktur sekunder NCR ujung-5 *amino-terminus* gen PB2 untuk memprediksi terjadinya perubahan virulensi VAI ke arah virus mamalia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dirjen Dikti yang telah memberikan beasiswa BPPS untuk mengikuti program Pascasarjana di UGM (2006), serta semua staf Lab. Biomedik FKH UNUD, dan staf Lab. Mikrobiologi FKH UGM yang telah membantu penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- DeJong MM, Hien TT. 2006. Avian Influenza A (H5N1). *J Clin Virol* 35: 2-13
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Doornum GJJV, Koch GBA, Koopmans\_M, Osterhaus ADME. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *PNAS* 101:1356-1361
- Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Harimoto T, Kawaoka Y. 2005. Importance of both the Coding and the Segment-Specific Noncoding region of the Influenza A Virus NS Segment for Its Efficient Incorporation into Virions. *J Virol* 79: 3766-3774
- Gulyaev AP, Heus HA, Olsthoorn RCL. 2007. An RNA Conformational Shift in Recent H5N1 Influenza A Viruses. *Bioinformatics* 23: 272-276
- Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Nguyen T, Lien PS, Le QM, Kawaoka Y. 2007. Growth of H5N1 influenza A viruses in the Upper respiratory Tract of Mice. *Pol Pathogens* 3
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for full-length amplification of all influenza A Virus. *Arch Virol* 146:2275-2289

- Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seller P, Govorkova EA, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranatha IC, Nguyen TD, Long HT, Naipospos TSP, Chen H, Ells TM, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG. 2005. Role of Domestic duck in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia. *PNAS* 102:10682-10687
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163
- Leahy MB, David C, Pritlove, Leo L, Poon M, Brownlee GG. 2001. Mutagenic Analysis of the 5' Arm of the Influenza A Virus virion RNA Promotor Defines the Sequence Requirements for Endonuclease Activity. *J Virol* 75: 134-142
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthawathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430: 209-213
- Mahardika IGNK. 2003. Polymerase Chain Reaction, *J Vet* 4: 21-36
- Mahardika IGNK, Sibang M, Suamba M, Adnyana KA, Dewi NMS, Meidiyanti KA, Paulus YA. 2004. Isolasi Virus Influenza pada Ayam Kampung di Bali. *J Vet* 1: 35-45
- Naffakh N, Massin P, Escriou N, Bernadette CC, Sylvic van der Werf. 2000. Genetic Analysis of The Compatibility Between Polimerase Protein from Human and Avian Strain of Influenza A Viruses. *J Gen Virol* 81: 1283-1291
- Saitou N, Nei .1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425
- Salomon R, Franks J, Govorkova EA, Ilyushina NA, Yen HL, Post DJH, Humberd, Jennifer, Trichet M, Rehg JE, Webby RJ, Webster RG, Hoffmann E. 2006. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *JEM* 203: 689-697
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hasan SS, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 Influenza virus in avian and human host in Indonesia and Vietnam. *J Virol* 350: 258-268
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101:11030-11035
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437: 889-893
- Tiley LS, Hagen M, Mathews JT, Krystal M. 1994. Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polimerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* 68:5108-5116
- Webster RG, Hulse DJ. 2004. Microbial Adaptation and Change Avian Influenza *Rev Sci Tech Int Epiz* 23: 453-465
- Webster RG, Guan Y, Poon L, Krauss S, Webby R, Govorkovai E, Peiris M. 2005. The Spread of The H5N1 Bird Flu Epidemic in Asia in 2004. *Arch Virol suppl* 2005: 117-129
- (WHO) Wold Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. 2005. Evolution of H5N1 Avian Influenza in Asia. *Emer Infect Dis* 11:1515-1521
- Wright PE, Webster RG. 2001. Orthomyxoviridae. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE (Ed). *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins. Pp.1533-1568.