

Karakterisasi Molekuler Virus *Avian Influenza* Isolat Indonesia

N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16151

(Diterima dewan redaksi 28 Maret 2005)

ABSTRACT

DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO and R.M.A. ADJID. 2005. Molecular characterization of Indonesia avian influenza virus. *JITV* 10(2): 127-133.

Avian influenza outbreaks in poultry have been reported in Java island since August 2003. A total of 14 isolates of avian influenza virus has been isolated from October 2003 to October 2004. The viruses have been identified as HPAI H5N1 subtype. All of them were characterized further at genetic level and also for their pathogenicity. Phylogenetic analysis showed all of the avian influenza virus isolates were closely related to avian influenza virus from China (A/Duck/China/E319-2/03(H5N1). Molecular basis of pathogenicity in HA cleavage site indicated that the isolates of avian influenza virus have multiple basic amino acid (B-X-B-R) indicating that all of the isolates representing virulent avian influenza virus (highly pathogenic avian influenza virus).

Key Words: Avian Influenza Virus, Molecular Characterization, Poultry, Indonesia

ABSTRAK

DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID. 2005. Karakterisasi molekuler virus *avian influenza* isolat Indonesia. *JITV* 10(2): 127-133.

Wabah *avian influenza* di Indonesia telah terjadi sejak bulan Oktober 2003. Balitvet mempunyai beberapa isolat virus *avian influenza* yang dikoleksi mulai bulan Oktober 2003 sampai Oktober 2004. Sebanyak 14 isolat selanjutnya dikarakterisasi secara molekuler untuk mengetahui kedekatan genetik dengan isolat *avian influenza* lainnya dan untuk mengetahui dasar molekuler patogenitasnya. Hasil *phylogenetic tree* menunjukkan bahwa dari semua isolat Indonesia mempunyai kedekatan yang tinggi dengan isolat A/Duck/China/E319-2/03(H5N1) dan mempunyai kedekatan genetik satu sama lain. Patogenitas isolat Indonesia yang dikoleksi Balitvet dan diteliti berdasarkan sekuen di daerah *cleavage site* gen Hemagglutinin (HA) virus *avian influenza* mempunyai *multiple basic amino acid* di daerah *cleavage site* (B-X-B-R) yang menunjukkan bahwa semua isolat yang diisolasi sampai bulan Oktober 2004 merupakan virus *avian influenza* virulen atau virus *avian influenza highly pathogenic*.

Kata Kunci: Virus *Avian Influenza*, Karakterisasi Molekuler, Unggas, Indonesia

PENDAHULUAN

Virus *avian influenza* (AI) adalah virus RNA berpolaritas negatif, termasuk famili *Orthomyxoviridae* yang diklasifikasikan menjadi tipe A, B dan C berdasarkan pada perbedaan antigenik dalam protein nukleoprotein (NP) dan Matrix (M1). Influenza A selanjutnya diklasifikasikan ke dalam beberapa subtipe berdasarkan pada kemampuan antigenisitas dua protein permukaan yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sampai saat ini telah diidentifikasi sebanyak 15 subtipe HA (H1-H15) dan 9 subtipe NA (N1-N9) (MURPHY dan WEBSTER, 1996; ROHM *et al.*, 1996b). Sekuen asam amino pada daerah HA1 yang bertanggung jawab terhadap antigenisitas HA, berbeda dari subtipe-subtipe lainnya sekitar 30% atau lebih (ROHM *et al.*, 1996b). Virus dengan semua subtipe HA dan NA dapat ditemukan pada spesies unggas, sedangkan subtipe dari virus influenza mamalia sangat terbatas. Pada manusia hanya terbatas tiga subtipe HA dan dua subtipe NA yaitu H1, H2, H3, NA1 dan NA2.

Sebagian besar virus influenza A diklasifikasikan sebagai H1N1, H2N2 (yang bersirkulasi hanya dari tahun 1957 sampai 1968), dan H3N2; dimana H1N2 adalah virus *reassortant* yang telah bersirkulasi pada manusia di Cina (GUO *et al.*, 1992). Sejauh ini babi sangat peka terhadap semua subtipe virus avian influenza pada kondisi penelitian (KIDA *et al.*, 1994), tetapi hanya H1 dan H3 dan subtipe N1 dan N2 termasuk reassortant H1N2 yang telah diisolasi di alam dengan perkecualian isolat H1N7 (BROWN *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 1997). Dua subtipe yang berbeda dari virus influenza A (H7N7 dan H3N8) telah diisolasi dari kuda; dan dikenal sebagai *equine type 1* dan *equine type 2*. Kedua virus ini mempunyai gejala klinis yang sama, tetapi infeksi yang dihasilkan oleh virus *equine type 2* lebih berat (WEBSTER, 1993).

Antigenisitas virus influenza berubah secara bertahap dengan *point mutation (antigenic drift)* atau secara drastis dengan *genetic reassortment (antigenic shift)* (MURPHY dan WEBSTER, 1996). Tekanan imunologis pada HA dan NA adalah yang

mengendalikan *antigenic drift*. Seperti perubahan antigenisitas pada virus influenza manusia yang berguna untuk penggantian *strain* vaksin setiap beberapa tahun. *Antigenic drift* juga telah dideteksi diantara virus avian influenza, tetapi sedikit kurang ekstensif terjadi pada manusia (AUSTIN dan WEBSTER, 1986; KIDA *et al.*, 1987), kemungkinan karena pendeknya hidup pada jenis unggas. Penelitian pada gen HA virus H3 pada manusia menunjukkan bahwa hanya satu mutasi titik pada *antigenic site* dari struktur glikoprotein ini berperan pada variasi antigenik (WILSON *et al.*, 1981).

Antigenic shift disebabkan karena transmisi langsung dari virus influenza *non human* kepada manusia atau *reassortment* gen dari dua jenis virus influenza berbeda yang menginfeksi sebuah sel. (WEBSTER *et al.*, 1982). Secara teoritis, terdapat 256 kombinasi RNA yang dapat diproduksi dari *shuffling* delapan segmen virus yang berbeda. Karena sifat virus AI inilah karakter molekuler virus influenza harus diketahui sehingga dapat diketahui apakah virus AI yang ada di Indonesia sudah berubah atau mengalami mutasi atau belum. Informasi ini dapat digunakan untuk memperkirakan adanya kemungkinan penularan pada manusia atau perbaikan *seed* vaksin yang sesuai dengan kondisi lapang.

Sejak pertama kali dilaporkan pada bulan Agustus 2003, sampai akhir tahun 2004 wabah AI masih terus berlangsung. Gejala klinis yang ditimbulkannya masih konsisten seperti wabah pada tahun 2003 yaitu kematian mendadak dalam waktu singkat, petekchie pada subkutan dan perdarahan pada bagian tubuh yang tidak berbulu (DHARMAYANTI *et al.*, 2004). Kematian mendadak akibat penyakit avian influenza menimbulkan kepanikan pada sebagian penduduk. Hal tersebut disebabkan kematian ayam secara mendadak tanpa sebab seperti wabah yang terjadi di Propinsi DKI (WIYONO *et al.*, 2004) dan Kabupaten Pandeglang (DHARMAYANTI *et al.*, 2004b). Setelah bulan Februari 2004, adanya kasus AI tidak pernah dilaporkan hingga bulan September 2004 saat wabah terjadi di propinsi DKI dan Kabupaten Pandeglang pada bulan Oktober 2004, seperti memperingatkan kita bahwa *avian influenza* masih ada dan perlu tindakan pemberantasan. Apakah telah terjadi mutasi pada virus ini pada periode wabah bulan September 2003 sampai bulan Oktober 2004 atau masih virus yang sama dengan yang menyerang pada tahun 2003. Balitvet sebagai institusi penelitian telah melakukan penelitian tentang dinamika virus AI, untuk mengetahui apakah telah terjadi perubahan pada virus ini. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakter molekuler virus AI isolat Indonesia terutama hasil koleksi Balitvet dibandingkan dengan isolat AI lainnya.

MATERI DAN METODE

Virus AI

Empat belas isolat AI digunakan dalam penelitian ini. Semua isolat berasal dari wabah AI yang menimbulkan kematian pada sebagian besar populasi unggas. Virus *avian influenza* ini dikoleksi oleh Balitvet selama wabah pada bulan Oktober 2003 sampai dengan Oktober 2004. Virus *avian influenza* ditumbuhkan pada telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari (OIE, 2000). Virus-virus ini telah ditentukan subtipenya dengan teknik *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan *primer matrix avian influenza* dan primer subtype H1-H15 *avian influenza* (Tabel 1) pada penelitian terdahulu (DHARMAYANTI *et al.*, 2004a) sedangkan isolat yang berasal dari wabah di Propinsi DKI yang telah diisolasi oleh WIYONO *et al.* (2004) dan isolat yang berasal dari wabah di Pandeglang (DHARMAYANTI *et al.*, 2004b). Semua isolat ini sudah ditentukan subtipenya dengan menggunakan teknik RT-PCR yaitu disebabkan oleh virus *avian influenza* subtype H5 (DHARMAYANTI *et al.*, 2004b) (Tabel 1).

DNA sekuensing

RNA virus *avian influenza* diekstraksi dengan menggunakan Trizol Reagent dari cairan alantois terinfeksi dan kemudian dilakukan RT-PCR untuk mengamplifikasi fragmen gen sesuai metode pada penelitian terdahulu (DHARMAYANTI *et al.*, 2004a).

Sekuen nukleotida ditentukan dengan *direct sequencing* dengan kit *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* dengan *Ampli Taq DNA Polymerase FS* (PE Applied Biosystem) diikuti dengan elektroforesis dan analisis menggunakan *DNA sequencer 377* (PE Applied Biosystem). Purifikasi produk PCR dan sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman-Jakarta. Primer yang digunakan untuk sekuensing fragmen gen HA1 adalah primer untuk mengamplifikasi dan sekuensing fragmen gen HA1 yaitu Primer H5-155f ACACATGCYCARGACA TACT dan Primer H5-699r CTYTGRTTYAGTGTTG ATGT (LEE *et al.*, 2001), sedangkan untuk amplifikasi daerah *cleavage site* gen HA digunakan primer H5-1 AGCAAAGCAGGGGT (AC)TAAT dan primer H5-1111r CCATACCA (AT)CC(GA)TCTACCATTCC, sedangkan untuk sekuensing menggunakan primer H5-968 ACCAT (TC)GG(AG)GA(AG)TG(CT)CCCAAATA dan primer H5-1111r (SENNE *et al.*, 1996). Konsentrasi primer yang dibutuhkan untuk *direct sequencing* adalah 200 ng/μl dengan total volume 100 μl.

Tabel 1. Nama isolat, induk semang dan hasil RT-PCR dari isolat avian influenza yang dikoleksi Balitvet (Oktober 2003-Oktober 2004)

Nama isolat	Daerah wabah	Induk semang	Bulan isolasi	RT-PCR matrix	RT-PCR H5
A/Chicken/East Java/B11-2/2003	Blitar	Ayam	Oktober 2003	Positif	H5
A/Chicken/East Java/B12-2/2003	Blitar	Ayam	Oktober 2003	Positif	H5
A/Chicken/West Java/67-2/2003	Bogor	Ayam	Nopember 2003	Positif	H5
A/Chicken/West Java/69-2/2003	Bogor	Ayam	Nopember 2003	Positif	H5
A/Chicken/West Java/74-2/2003	Bekasi	Ayam	Nopember 2003	Positif	H5
A/Quail/West Java/Smi2-2/04	Sukabumi	Puyuh	Februari 2004	Positif	H5
A/Ostrich/West Java/Bgr2-2/04	Bogor	Burung onta	Februari 2004	Positif	H5
A/Chicken/Banten/Pdgl1-2/2/04	Pandeglang	Ayam	Oktober 2004	Positif	H5
A/Chicken/Banten/Pdgl2-2/04	Pandeglang	Ayam	Oktober 2004	Positif	H5
A/Muscovy duck/Jakarta/DKI1-2/04	Jakarta	Entok	Oktober 2004	Positif	H5
A/Chicken/Jakarta/DKI2-2/04	Jakarta	Ayam	Oktober 2004	Positif	H5
A/Quail/Jakarta/DKI3-2/04	Jakarta	Puyuh	Oktober 2004	Positif	H5
A/Chicken/Jakarta/DKI4-2/04	Jakarta	Ayam	Oktober 2004	Positif	H5
A/Chicken/Jakarta/DKI5-2/04	Jakarta	Ayam	Oktober 2004	Positif	H5

Analisis genetik

Penyusunan sekuen, translasi sekuen nukleotida ke sekuen protein dan *initial multiple sequence alignment* dilakukan dengan program *Ds Gene 1.5 version*. Hasil sekuen nukleotida dimasukkan dalam *BLAST search* (Influenza *Sequence database*). *Phylogenetic tree* dihasilkan dengan *maximum parsimony method* dengan 100 *bootstrap replicates* pada CLUSTAL W.

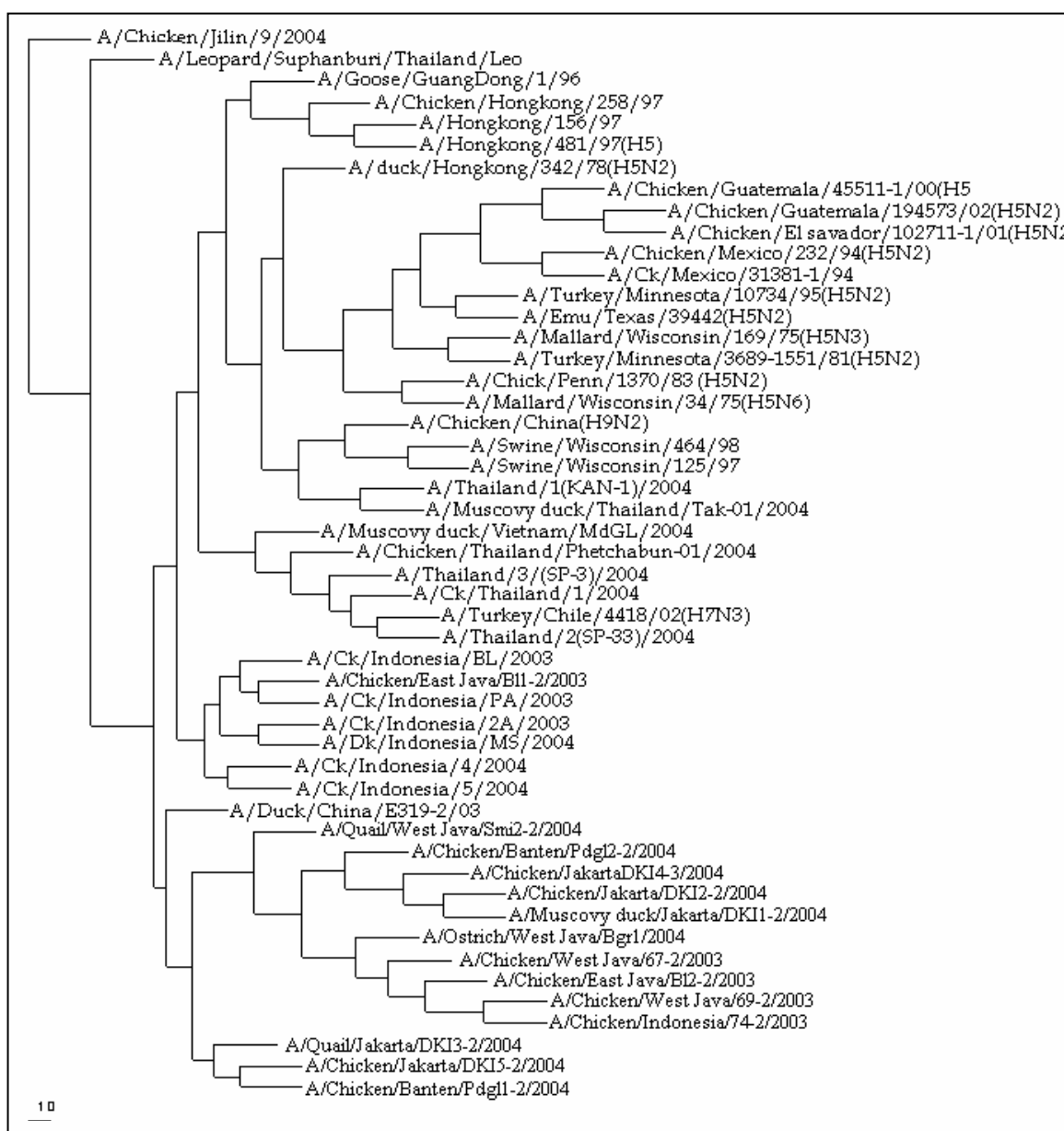
HASIL

Analisis sekuen fragmen gen HA1

Delapan isolat virus AI telah ditentukan subtipe pada penelitian terdahulu, yaitu termasuk dalam subtipe H5 (DHARMAYANTI *et al.*, 2004a). DHARMAYANTI *et al.* (2004b) juga telah menentukan subtipe isolat DKI 1-DKI5 dan Pdgl1-2 (Tabel 1). Pada penelitian ini semua isolat tersebut disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida pada fragmen gen HA1 yang kemudian dibandingkan dengan isolat-isolat AI yang ada di genbank termasuk isolat *avian influenza* Indonesia yang telah diisolasi oleh LI *et al.* (2004). Data sekuen nukleotida kemudian dikompilasi dan dianalisis dengan menggunakan *DS Gene version 1.5*. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa isolat *avian influenza* Indonesia

terdapat dalam satu kelompok dengan isolat Indonesia lainnya dan isolat *A/Duck/China/E319-2/03(H5N1)*.

Hasil analisis *phylogenetic tree* menunjukkan bahwa isolat *A/Duck/China/E319-2/03(H5N1)* berada dalam satu kelompok dengan isolat yang berasal dari Indonesia. Semua isolat yang diisolasi Balitvet memperlihatkan kedekatan genetik tertinggi dengan isolat *A/Duck/China/E319-2/03(H5N1)* untuk 13 isolat, kecuali isolat *A/Chicken/East Java/B11-2/2003(H5N1)* yang menunjukkan kedekatan tertinggi dengan isolat *A/Ck/Indonesia/BL/2003(H5N1)*. Namun demikian isolat-isolat *A/Chicken/East Java/B11-2/2003* masih menunjukkan kekerabatan yang tinggi dengan isolat *A/Duck/China/E319-2/03(H5N1)*. Semua isolat Indonesia yang dikoleksi Balitvet ataupun yang dikoleksi LI *et al.* (2004) mempunyai kekerabatan dekat satu dengan yang lain (Gambar 1). Dari hasil *phylogenetic tree* dapat dilihat bahwa isolat *A/Chicken/East Java/B11-2/2003(H5N1)* mempunyai kekerabatan dekat dengan enam isolat Indonesia yang dikoleksi oleh LI *et al.* (2004) yaitu *A/Chicken/Indonesia/PA/2003(H5N1)*, *A/Ck/Indonesia/BL/2003 (H5N1)*, *A/Dk/Indonesia/MS/2004(H5N1)*, *A/Chicken/2A/2003*, *A/Chicken/Indonesia/4/2004* dan *A/Chicken/Indonesia/5/2005* dibandingkan dengan isolat lainnya yang dikoleksi Balitvet termasuk isolat *A/Chicken/East Java/B12-2/2003* yang dikoleksi dari kabupaten yang sama tetapi berbeda lokasi dengan isolat *A/Chicken/East Java/B11-2/2003* (Gambar 1).



Gambar 1. Hubungan filogenetik di antara virus *avian influenza* isolat Indonesia. Hubungan ini berdasarkan pada sekuen nukleotida fragmen gen hemaglutinin (HA). Pohon filogenetik diperoleh dengan menggunakan metode *neighbour-joining* dalam CLUSTAL W

Analisis daerah *cleavage site*

Hasil sekuensing dari daerah *cleavage site* gen HA, setelah dikompilasi kemudian dilakukan translasi protein. Hasil translasi protein dapat dilihat pada Tabel 2. R adalah asam amino Arginin, K adalah asam amino Lisin dan G adalah asam amino Glisin. Tanda // adalah daerah *cleavage* antara gen HA1 dan HA2. Hasil analisis daerah *cleavage site* menunjukkan bahwa semua isolat Indonesia yang diisolasi sampai bulan Oktober 2004 mempunyai *multiple basic* asam amino yang merupakan virus AI *highly pathogenic*.

PEMBAHASAN

Lebih dari 30 tahun, virus *highly virulent avian influenza* (HPAI) telah menyebabkan wabah yang antara lain terjadi di peternakan Australia, Inggris, Amerika, Irlandia, Jerman, Meksiko, Pakistan, Italia dan Hongkong (HARIMOTO dan KAWAOKA, 2001). Pada tahun 2003-2004 wabah HPAI telah terjadi di Thailand, Vietnam, Indonesia dan Malaysia. Semua kejadian ini secara nyata menunjukkan bahwa tanpa perkecualian semua virus AI yang patogen adalah subtipe H5 atau

H7, walaupun alasan untuk spesifisitas sub tipe ini belum seluruhnya jelas.

Tabel 2. Sekuen asam amino isolat Indonesia yang dikoleksi Balitvet di daerah *cleavage site* gen HA *avian influenza* yang menunjukkan *multiple basic amino acid*

Nama isolat	Sekuen asam amino di daerah <i>cleavage site</i>
A/Chicken/East Java/B11-2/03	RRRKKR//G
A/Chicken/East Java/B12-2/03	RRRKKR//G
A/Chicken/West Java/67-2/03	RRRKKR//G
A/Chicken/West Java/69-2/03	RRRKKR//G
A/Chicken/West Java/74-2/03	RRRKKR//G
A/Quail/West Java/Smi2-2/04	RRRKKR//G
A/Ostrich/West Java/Bgr2-2/04	RRRKKR//G
A/Chicken/Banten/Pdgl1-2/2/04	RRRKKR//G
A/Chicken/Banten/Pdgl2-2/04	RRRKKR//G
A/Muscovy duck/Jakarta/DKI1-2/04	RRRKKR//G
A/Chicken/Jakarta/DKI2-2/04	RRRKKR//G
A/Quail/Jakarta/DKI3-2/04	RRRKKR//G
A/Chicken/Jakarta/DKI4-2/04	RRRKKR//G
A/Chicken/Jakarta/DKI5-2/04	RRRKKR//G

Li *et al.* (2004) dalam tulisannya menyebutkan bahwa itik lokal dari Cina berperan penting dalam menghasilkan dan memelihara virus ini. Selain itu burung liar diduga mempunyai kontribusi dalam penyebaran virus AI di Asia. Mungkin hal inilah yang menyebabkan isolat yang dikoleksi Balitvet maupun yang dikoleksi Li *et al.* (2004) mempunyai homologi yang tinggi dengan isolat *A/Duck/China/E319-2/03*(H5N1).

Wabah *avian influenza* terjadi di Propinsi DKI pada bulan September 2004 (WYONO *et al.*, 2004) dan di Kabupaten Pandeglang pada bulan Oktober 2004 (DHARMAYANTI *et al.*, 2004b). Wabah ini telah menyerang ayam buras, puyuh dan entok milik penduduk. Pada Gambar 1 terlihat bahwa isolat *A/Chicken/Jakarta/DKI-1/2/04*, *A/Chicken/Jakarta/DKI-2/2/04*, *A/Chicken/Jakarta/DKI-4/2/04*, dan *A/Chicken/Indonesia/Pdgl2/2004* mempunyai kedekatan genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang berasal dari DKI lainnya ataupun dari Pandeglang. Sedangkan isolat *A/Quail/Jakarta/DKI3-2/2004* yang berasal dari burung puyuh, *A/Chicken/Jakarta/DKI5-2/2004*, *A/Chicken/Banten/Pdgl1-2/2004* juga memperlihatkan kedekatan genetik yang lebih tinggi

dibandingkan dengan isolat yang berasal dari DKI atau Pandeglang lainnya.

Beberapa isolat *avian influenza* yang berasal dari Vietnam dan Thailand yaitu *A/Muscovyduck/Vietnam/MdGL/2004*(H5N1), *A/Chicken/Thailand/Phetchabun-01/2004*(H5N1), *A/Chicken/Thailand/1/2004*(H5N1), *A/Thailand/2/(SP-33)/2004*(H5N1) mempunyai kedekatan yang cukup tinggi dengan isolat *A/Chicken/East Java/B11-2/2003* dan enam isolat Indonesia lainnya yang dikoleksi Li *et al.* (2004).

Hemaglutinin sebagai *determinant pathogenicity*

Walaupun virus *avian influenza* adalah *polygenic*, glikoprotein HA berperan sangat penting (GARTEN dan KLENK, 1999; STEINHAUER *et al.*, 1999). Infeksi diawali dengan virus *binding* pada reseptor sel dan menyebabkan lepasnya viral RNP melalui fusi membran (WHITE *et al.*, 1982). Aktivasi proteolitik post translasi dari precursor molekul HA (HA0) menjadi subunit HA1 dan HA2 oleh protease host menghasilkan domain fusogenic pada amino terminus dari HA2, yang memperantarai fusi diantara amplop viral dan membrane endosomal. Jadi aktivasi proteolitik dari molekul HA sangat penting untuk infektivitas (KLENK *et al.*, 1975; LAZAROWITZ dan CHOPIN, 1975) dan untuk penyebaran virus pada tubuh inang (GARTEN dan KLENK, 1999). HA dari virus avirulen biasanya terpisah terbatas hanya pada beberapa tipe sel, sehingga virus dapat menyebabkan infeksi lokal dalam saluran nafas dan saluran pencernaan, atau pada keduanya menghasilkan infeksi ringan atau *asymptomatic*. Sementara itu, HA pada virus avian virulen dapat terpisah pada berbagai macam jenis sel dan untuk itu dapat menyebabkan infeksi sistemik sehingga menyebabkan kematian pada ayam. Pada kultur jaringan, virus HA virulent dapat terbelah tanpa protease eksogen seperti tripsin, sedangkan pada virus avirulen hal ini tidak dapat dilakukan, menunjukkan perbedaan sensitivitas dari dua jenis HA terhadap protease selular endogen (BOSCH *et al.*, 1979). Penemuan ini berimplikasi bahwa *cleavability* HA adalah satu dari determinan utama pada jaringan dari *avian influenza* dan perbedaan pada distribusi protease jaringan dan kepekaan HA terhadap enzim ini menentukan datangnya infeksi virus.

Sekuen yang dibutuhkan untuk *cleavability* hemaglutinin dan virulensi

Dua bentuk struktural yang menunjukkan *cleavability* HA; sekuen asam amino pada *cleavage site* dan karbohidrat dalam *vicinity* dari *cleavage site*. Perbandingan sekuen asam amino di alam antara virus *avian influenza* avirulen dan virulen telah menunjukkan bahwa HA dengan *cleavability* yang terbatas (tipe

avirulen) biasanya mempunyai *single arginine* (R) sedangkan tipe virulen dengan *cleavability* yang tinggi mempunyai *multiple basic residu* pada *upstream* dari *cleavability site* (BOSCH *et al.*, 1981). Sebagian besar virus *avian influenza* mempunyai R pada karboksil terminus dari HA1 dan glisin (G) pada amino terminus dari HA2, meskipun beberapa mempunyai lisin (K) pada posisi tersebut (GUNTHER *et al.*, 1993; KAWAOKA *et al.*, 1990). Diantara virus H5, prolina (P) dan glutamina (Q), berlokasi di proksimal *upstream* dari karboksil terminus HA1, dan juga *conserved*. Di antara residu Q dan G terdapat daerah yang didesain sebagai *connecting peptide* (-P-Q-X-...-X-R//G-, dimana // menunjukkan *cleavage site* di antara HA1 dan HA2 dan X adalah asam amino *non basic*. Sekuen di daerah ini bervariasi dalam komposisi asam amino dan jumlah asam amino tergantung strain virus. Secara alami virus H5 avirulen mempunyai empat asam amino pada *connecting peptide*; sebagian besar mempunyai R-E-T-R (jarang yang mempunyai K-Q-T-R, R-E-T-K, I-G-E-R dan R-E-A-R (SENNE *et al.*, 1996). Sementara itu, HA tipe virulen mengandung B-X-B-R (dimana B adalah asam amino *basic*) dalam ketidakterdapatnya *carbohydrate side chain* didekatnya. Jika *carbohydrate moiety* ada, insersi dua asam amino, X-X-B-X-B-R, atau perubahan pada *conserved* prolina (P) atau glutamina (Q) ke *basic* residu, B(X)-X(B)-B-X-B-R, dibutuhkan. Dengan kata lain virus ini adalah *nonpathogenic* (KAWAOKA *et al.*, 1984).

Hampir sama dengan virus H7 residu *conserved* ditemukan pada *upstream* dari *carboxyl terminus* HA1 : P-E-X-P-X-...-X-R//G- atau P-E-P-S-X-...-X-R//G. Residu di antara P atau S dan G terletak pada *connecting peptide*. Sebagian besar secara alami virus H7 avirulen mempunyai motif K-X-R. Sekuen *alignment* dari *connecting peptide* dari virus avirulen dan avirulen mutan menunjukkan bahwa R-X-B-R adalah sekuen minimal yang dibutuhkan untuk H7 tipe virulen (VEY *et al.*, 1992). Apakah K pada posisi ke empat *upstream* dari *cleavage site* adalah diterima untuk *cleavability* HA tergantung pada HA, Mutan avirulen dari A/Fowl/Victoria/75 mempunyai K-K-K-E-K-R pada *cleavage site* (VEY *et al.*, 1992) sedangkan isolat virulen *Chicken/Leipzig/79* (H7N7) dan *A/Goose/Leipzig/187-7/79* (H7N7) mempunyai sekuen HA *cleavage site* K-K-K-K-R atau K-K-K-K-K-R berturut-turut (ROHM *et al.*, 1996a).

Pada studi ini hasil penelitian (Tabel 2) menunjukkan bahwa 14 isolat Indonesia mempunyai *multiple basic amino acid* pada daerah *cleavage site* gen HA yaitu motif RRRKKR//G yang menunjukkan virus AI virulen (*highly pathogenic*). Gejala klinis di lapang juga menunjukkan hal yang sama yaitu kematian yang mendadak dalam beberapa hari tanpa adanya gejala klinis. Hal ini menunjukkan bahwa sampai bulan Oktober 2004, virus AI yang bersirkulasi di Indonesia

masih belum berubah banyak yaitu masih *avian influenza* HPAI H5N1. Untuk mengetahui apakah isolat-isolat virus AI tersebut tetap virulen atau berubah menjadi avirulen dan mengantisipasi kemungkinan terjadinya mutasi dan peluang kemungkinan penularan terhadap manusia tentunya memerlukan penelitian lebih lanjut.

KESIMPULAN

Hasil *phylogenetic tree* menunjukkan bahwa dari semua isolat Indonesia mempunyai kedekatan yang tinggi dengan isolat *A/Duck/China/E319-2/03(H5N1)* dan mempunyai kedekatan genetik satu sama yang lain. Patogenitas isolat Indonesia yang dikoleksi Balitvet dan diteliti berdasarkan sekuen di daerah *cleavage site* gen Hemagglutinin (HA) virus *avian influenza* mempunyai *multiple basic amino acid* di daerah *cleavage site* (B-X-B-R) yang menunjukkan bahwa semua isolat merupakan virus *avian influenza* virulen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih setulusnya kepada Bapak Nana Suryana, Heri Hoerudin dan Agus Winarsongko atas bantuan teknisnya dan kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AUSTIN, F.J. and R.G. WEBSTER. 1986. Antigenic mapping of an avian H1 influenza virus haemagglutinin and interrelationships of H1 viruses from human, pigs and birds. *J. Gen. Virol.* 67: 983-992.
- BOSCH, F.X., M. ORLICH, H.D. KLENK and R. ROTT. 1979. The structure of hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95: 197-207.
- BOSCH, F.X., GARTEN, H.D. KLENK and R. ROTT. 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus haemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology* 113: 725-735.
- BROWN, I.H., D.J. ALEXANDER, P. CHAKRAVERTY, P.A. HARRIS and R.J. MANVELL. 1994. Isolation of an influenza A virus unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Vet. Microbiol.* 39: 125-134.
- BROWN, I.H., M.I. HILL, P.A. HARRIS, D.J. ALEXANDER and J.W. MCCAULEY. 1997. Genetic characterization of an avian influenza A virus of usual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. *Arch. Virol.* 142: 1045-1050.

- DAMAYANTI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004. Gambaran klinis dan patologis pada ayam terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV* 9: 128-135.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004a. Identifikasi virus avian influenza Indonesia dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *JITV* 9: 136-142.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. INDRIANI, R. DAMAYANTI dan A. WIYONO. 2004b. Identifikasi wabah penyakit unggas yang terjadi pada bulan September dan Oktober 2004. *Laporan intern penelitian*. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- GARTEN, W and H.D. KLENK. 1999. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 7: 99-100.
- GUNTHER, I., B. GLATTHAAR, G. DULLER and W. GARTEN. 1993. A H1 haemagglutinin of a human influenza A virus with a carbohydrate-modulated receptor binding site and an unusual cleavage site. *Virus Res.* 27: 147-160.
- GUO, Y., X. XU and N.J. COX. 1992. Human influenza A (H1N2) viruses isolated from China. *J. Gen. Virol.* 73: 383-388.
- HARIMOTO, T. and Y. KAWAOKA. 2001. Pandemic treat posed by avian influenza a viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14.1. 129-149.
- KAWAOKA, Y., C.W. NAEVE and R.G. WEBSTER. 1984. Is virulence of H5N2 influenza virus in chicken associated with loss of carbohydrate from the haemagglutinin ? *Virology* 158: 218-227.
- KAWAOKA, Y., S. YAMNIKOVA, T.M., T.M. CHAMBERS, D.K. LVOV and R.G. WEBSTER. 1990. Molecular characterization of a new haemagglutinin subtype H14 of influenza a virus. *Virology* 179: 759-767.
- KIDA, H., T. ITO, J. YASUDA, Y. SHIMIZU, C. ITAKURA, K.F. SHORTRIDGE, Y. KAWAOKA and R.G. WEBSTER. 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* 75: 183-2188.
- KIDA, H., Y. KAWAOKA, C.W. NAEVE and R.G. WEBSTER. 1987. Antigenic and genetic conservation of H3 influenza in wild duck. *Virology* 159: 109-119.
- KLENK, H.D., R. ROTT, M. ORLICH and J. BLODORN. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68: 426-429.
- LAZAROWITZ, S.G. and P.W. CHOPPIN. 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the haemagglutinin polypeptide. *Virology* 68: 440-454.
- LEE, M.S., P.C. CHANG, J.H. SHIEN, M.C. CHENG and H.P. SHIEH. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97: 13-22.
- LI, K.S., Y. GUAN, J. WANG, G.D.J. SMITH, K.M. XU, L. DUAN, A.P. RAHARDJO, P. PUTHAVATHANA, C. BURUNATHAI, T.D. NGUYEN, A.T. ESTOEPANGESTIE, A. CHAISINGH, P. AUWARAKUL, H.T. LONG, N.T.H. HANH, R.J. WEBBY, L.L.M. POON, H. CHIEN, K.F. SHORTRIDGE, K.Y. YUEN, R.G. WEBSTER and J.S.M. PEIRIS. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 virus in eastern Asia. *Nature* 430: 209-213.
- MURPHY, B.R and R.G. WEBSTER. 1996. Orthomyxoviruses. In: *Fields Virology*. B.N. FIELDS, D.M. KNIPE and P.M. HOWLEY (Eds.). 3rd Ed, Ippincott-Raven. Philadelphia. pp. 1397-1445.
- OIE. 2000. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. Highy pathogenic avian influenza. pp. 212-232.
- ROHM, C., J.C. SUSS, V. POHLE and R.G. WEBSTER. 1996a. Different haemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chicken in Leipzig, Germany. *Virology* 218: 253-257.
- ROHM, C., N.A. ZHOU, J.C. SUSS, J. MACKENZIE and R.G. WEBSTER. 1996b. Characterization of novel influenza haemagglutinin, H15: Criteria for determination of influenza A subtype. *Virology* 217: 508-516.
- SENNE, D.A., B. PANIGRAHY, Y. KAWAOKA, J.E. PEARSON, J. SUSS, M. LIPKIND, H. KIDA and R.G. WEBSTER. 1996. Survey of the haemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: Amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.* 40: 425-437.
- STEINHAEUER, D.A. 1999. Role of haemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258: 1-20.
- VEY, M., M. ORLICH, S. ADLER, H.D. KLENK, R. ROTT and W. GARTEN. 1992. Haemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-R/R-R. *Virology* 188: 408-413.
- WEBSTER, R.G. 1993. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet. J.* 25: 537-538.
- WEBSTER, R.G., W.G. LAVER, G.M. AIR and G.C. SCHILD. 1982. Molecular mechanism of variation in influenza viruses. *Nature* (London) 296: 115-121.
- WHITE, J., J. KARTENBACK and A. HELENIUS. 1982. Membrane fusion activity of influenza virus. *EMBO J.* 1: 217-222.
- WILSON, I.A., J.J. SKEHEL and D.V. WILEY. 1981. Structure at haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A resolution. *Nature* (London) 289: 366-373.
- WIYONO, A., R. INDRIANI, R. DAMAYANTI dan N.L.P.I. DHARMAYANTI. 2004. Identifikasi agen penyebab kematian pada populasi unggas di DKI Jakarta pada bulan September 2004. *Laporan intern hasil penelitian*. Balitvet. Bogor.