

REASORSI GENETIK VIRUS *HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA* (HPAI) H5N1 YANG DIISOLASI DARI ITIK PADA PROGRAM SURVEILANS AVIAN INFLUENZA TAHUN 2017

Lestari¹, Ira Pramastuti², Hendra Wibawa¹, Zaza Famia¹, Vika Yuanita¹, Herdiyanto Mulyawan²

¹Medik Veteriner Balai Besar Veteriner Wates

²Paramedik Veteriner Balai Besar Veteriner Wates

Balai Besar Veteriner Wates, Jl Raya Yogya-Wates KM 27 Tromol Pos 18 Wates Yogyakarta

Email: lestari.dvm@gmail.com

ABSTRAK

Virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) subtype H5N1 berdampak serius pada sektor perunggasan di Indonesia sejak tahun 2003. Virus ini memiliki kemampuan berubah secara cepat melalui mekanisme mutasi (*mutation*) dan persilangan/reasorsi (*reassortment*) untuk kelangsungan hidup di dalam tubuh hospesnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter dan persilangan genetik virus HPAI subtype H5N1 yang diisolasi dari itik. Sampel dikoleksi dari hasil uji PCR positif terhadap virus influenza tipe A yang berasal dari program surveilans avian influenza (AI) pada itik di wilayah kerja Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates tahun 2017. Sampel-sampel yang terdeteksi positif subtype H5 dari uji realtime reverse transcription PCR (qRT-PCR), dilanjutkan *sequencing* keseluruhan genom virus dengan teknik *Next Generation Sequencing* (NGS). Hasil *sequencing* di'BLAST' ke dalam virus referensi yang ada di dalam database GenBank, kemudian disusun dan diekstrak secara *whole genome* didalam *software CLC Genomic Workbench*. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software Mega v7* untuk melihat ada tidaknya reasorsi genetik antar segmen virus (AI). Berdasarkan analisis molekuler pada gen hemagglutinin menunjukkan bahwa virus-virus dalam penelitian ini termasuk kategori HPAI dan memiliki kecenderungan untuk mengikat reseptor dari avian (*avian binding receptor*). Analisis filogenetik gen HA, NA dan hampir semua gen internal (PB2, PB1, PA, NP, dan NS) menunjukkan bahwa virus-virus yang diteliti termasuk dalam kelompok H5N1 *clade* 2.3.2.1c. Tetapi, terdapat salah satu virus dengan gen internal M (*matrix*) berasal dari virus H5N1 *clade* 2.1.3.2, sedangkan segmen gen yang lain masuk kelompok H5N1 *clade* 2.3.2.1c. Hal ini menunjukkan telah terjadi reasorsi genetik antara virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c dan *clade* 2.1.3.2. Surveilans dan karakterisasi avian influenza secara rutin sebaiknya terus dilakukan untuk memonitor dinamika dan keanekaragaman virus yang beredar guna mendukung pengendalian penyakit avian influenza di Indonesia.

Kata kunci: Avian influenza, H5N1, karakterisasi, reasorsi genetik, NGS

PENDAHULUAN

Virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) H5N1 pertama kali teridentifikasi pada tahun 1996 di Guangdong, China. Sejak kemunculannya kembali di tahun 2003, virus ini telah menyebar ke berbagai negara di Asia Timur dan Asia Tenggara, termasuk Indonesia (Sonnberg *et al.*, 2013). Kejadian outbreak HPAI H5N1 telah berdampak serius berupa kerugian ekonomi di sektor peternakan Indonesia akibat jutaan unggas mati maupun dimusnahkan. Pada awalnya, virus HPAI H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia termasuk ke dalam *clade* 2.1 dimana virus ini memiliki tingkat mortalitas yang tinggi terutama pada unggas ayam. Virus ini kemudian berkembang menjadi sub *clade* 2.1.1, 2.1.2 dan 2.1.3 dimana sub *clade* 2.1.3 ini kemudian berevolusi menjadi 2.1.3.1, 2.1.3.2 dan 2.1.3.3 (WHO, 2012). Namun demikian, sebuah *clade* baru dari HPAI H5N1 *clade* 2.3.2.1 telah teridentifikasi di Indonesia dari kejadian *outbreak* pada tahun 2012 dengan tingkat mortalitas yang tinggi pada itik (Wibawa *et al.*, 2012; Dharmayanti *et al.*, 2014).

Virus influenza memiliki kemampuan berubah/berevolusi secara cepat untuk bertahan hidup. Untuk dapat bertahan di dalam tubuh hospes, virus influenza memiliki mekanisme agar tidak bisa dikenali kehadirannya oleh sistem imun hospes. Mekanisme ini meliputi mutasi (*antigenic drift*) dan reassortasi (*antigenic shift*). Mutasi merupakan perubahan sebagian kecil dari susunan RNA virus dan biasanya terjadi pada saat replikasi, sedangkan reassortasi merupakan persilangan antar gen segmen virus influenza yang biasanya terjadi pada saat dua atau lebih genotipe virus yang berbeda menginfeksi sel hospes secara bersamaan (Chen *et al.*, 2006). Surveilans dan genetik monitoring virus *avian influenza* penting dilakukan untuk mendeteksi, mengidentifikasi dan memonitor perubahan genetik virus yang bersirkulasi di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi dan mengetahui adanya reassortasi genetik virus-virus HPAI H5N1 yang diisolasi dari itik pada program surveilans *avian influenza* pada itik tahun 2017.

MATERI DAN METODE

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa virus-virus positif *avian influenza* sub tipe H5 yang diambil dari ternak itik pada program surveilans *avian influenza* pada itik di Jawa Tengah, Jawa Timur dan Yogyakarta tahun 2017. Sampel-sampel dikoleksi dari swab oropharing dan swab kloaka yang berasal dari itik hidup dan jaringan/organ yang berasal dari itik mati. Sampel-sampel tersebut sebelumnya telah terdeteksi influenza tipe A sub tipe H5 dengan menggunakan metode uji *qRT-PCR*. Sampel-sampel positif yang memiliki nilai interpretasi *cycle threshold* (Ct) value tinggi (<28) kemudian dilakukan amplifikasi dari seluruh 8 gen segmen virus dengan menggunakan metode *multi-segment PCR* (MRT-PCR) dengan primer spesifik MBTuni 12 dan MBTuni 13 (Zhou *et al.*, 2009). Sampel-sampel yang memiliki produk amplifikasi 8 gen segmen virus AI lengkap, meliputi gen *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), *hemagglutinin* (HA), *nucleoprotein* (NP), *neuraminidase* (NA), *matrix* (M), dan *non-structural* (NS), kemudian diseleksi dan selanjutnya digunakan dalam penelitian ini untuk dilakukan *sequencing*.

Sebanyak 2 sampel berupa swab oropharing dan jaringan/organ itik telah diseleksi dan digunakan dalam penelitian ini. Sampel swab terdiri dari pooling swab oropharing yang berasal dari 5 itik dipool menjadi satu tabung berisi VTM. Sedangkan sampel jaringan/organ terdiri dari pooling organ yang berupa otak, paru-paru, trachea, hati, dan ginjal yang berasal dari 1 itik. Kedua sampel tersebut diisolasi dari itik yang berasal dari peternakan di Kabupaten Malang Propinsi Jawa Timur (A/duck/Malang/04170342-MO46/2017) dan Kabupaten Purworejo Propinsi Jawa Tengah (A/duck/Purworejo/ 04171160-111/2017). Selanjutnya sampel-sampel tersebut dilakukan *sequencing* genom utuh (*whole genome sequencing*) dengan teknik *next generation sequencing* (NGS). Preparasi *DNA library* dilakukan dengan menggunakan Kit *nextera XT DNA* (Illumina Inc.). Proses *sequencing* dilakukan dengan mesin *Next Generation Sequencer*

(NGS) Illumina (MiSeq) dengan menggunakan *MiSeq reagen Kit V2* sesuai dengan manual prosedur (Illumina). Keseluruhan proses *sequencing* dilakukan di laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner (BBVET) Wates Yogyakarta. Hasil *sequencing* di'BLAST' ke dalam virus referensi AI yang ada di dalam database GenBank, kemudian disusun dan diekstrak secara *whole genome* didalam *software* CLC Genomic Work bench. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan di dalam *software* Mega v7 dengan metode *neighbor-joining algoritim with kimura-2 parameter*. Analisis genetik dan filogenetik dilakukan dengan membandingkan sekuens nukleotida dari tiap-tiap gen segmen virus dengan virus referensi influenza yang ada di GenBank database.

HASIL

Sebanyak 2 sampel (A/duck/Malang/04170342-MO46/2017 dan A/duck/Purworejo/ 04171160-111/2017) yang diisolasi dari itik pada program surveilans *avian influenza* pada itik di wilayah kerja BBVET Wates tahun 2017 telah berhasil *disequencing* dan dikarakterisasi. Seluruh 8 gen seqmen dari kedua sampel tersebut dibandingkan dengan sekuen virus referensi yang berasal dari Indonesia untuk melihat nilai persentase homologi virus, meliputi virus H5N1 *clade* 2.1.3.2 (A/chicken/West Java/Sbg-29/2007 dan A/quail/Deliserdang/01160025/2016) dan virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c (A/quail/Sukoharjo/04152003/2015 dan A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012). Didalam analisis ini disertakan pula virus H5N1 *clade* 0, yakni virus progeni H5N1 (A/goose/Guangdong/1/1996).

Berdasarkan hasil analisis gen HA menunjukkan bahwa semua virus dalam penelitian ini memiliki tingkat homologi yang tinggi terhadap H5N1 *clade* 2.3.2.1c dengan persentase *nucleotide identity* virus A/duck/Malang/04170342-MO46/2017 dan A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 terhadap virus A/quail/Sukoharjo/04152003/2015 secara berturut-turut adalah 99.02% dan 97.11%. Di sisi lain, analisis terhadap gen NA dan hampir semua gen internal (PB2, PB1, PA, NP dan NS) juga menunjukkan nilai persentase yang tinggi terhadap virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c (A/quail/Sukoharjo/04152003/2015) dengan nilai/range 98.54-98.77% (NA), 99.04% (PB2), 98.45-98.81% (PB1), 98.28-98.88% (PA), 99.06-99.90% (NP), dan 98.16-98.53% (NS). Hampir keseluruhan gen-gen dari kedua virus tersebut menunjukkan persentase kesamaan asam nukleat (*nucleotide identity*) yang rendah terhadap virus H5N1 *clade* 2.1.3.2. Namun demikian, terdapat salah satu segmen, yaitu gen M dari virus A/duck/Purworejo/ 04171160-111/2017 yang memiliki nilai persentase kesamaan asam nukleat yang lebih tinggi terhadap virus referensi H5N1 *clade* 2.1.3.2 (A/quail/Deliserdang/01160025/2016) sebesar 98.15% dibandingkan dengan virus referensi dari *clade* 2.3.2.1c (A/quail/Sukoharjo/04152003/2015) yang hanya sebesar 93.58% (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase *nucleotide identity* virus H5N1 terhadap virus-virus referensi H5N1

Virus Referensi	Subtype/clade	% nucleotide identity							
		A/duck/Malang/04170342-MO46/2017; A/duck/Purworejo/04171160-111/2017							
		PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
gs/Gd/1/96 ^a	H5N1 (clade 0)	91.18; 91.10	90.78; 90.78	90.03; 90.66	90.96; 89.94	90.02; 90.65	91.93; 92.15	95.21; 93.48	70.69; 71.17
ck/Sb/29/07 ^b	H5N1 (clade 2.1.3.2)	93.16; 92.98	93.90; 93.98	89.63; 89.21	89.62; 89.68	94.82; 94.92	91.78; 92.22	95.53; 95.62	94.69; 94.45
qa/Ds/01160025/16 ^c	H5N1 (clade 2.1.3.2)	90.23; 90.17	92.55; 93.03	88.24; 88.28	88.09; 88.09	93.80; 93.99	89.18; 90.08	94.35; 98.15	89.98; 89.98
qa/Sk/04152003/15 ^d	H5N1 (clade 2.3.2.1c)	99.04; 99.04	98.81 98.45	98.28; 98.88	99.02; 97.11	99.90; 99.06	98.54; 98.77	99.29; 93.58	98.53; 98.16
dk/Sk/1428-9/12 ^e	H5N1 (clade 2.3.2.1c)	98.03; 98.07	97.89; 97.99	98.05; 97.95	97.44; 97.57	98.13; 98.40	97.85; 98.37	98.68; 93.79	99.52; 99.16

^aA/goose/Guangdong/1/1996

^bA/chicken/West Java/Sbg-29/2007 (Strain tantang H5N1 clade 2.1.3.2)

^cA/quail/Deliserdang/01160025/2016

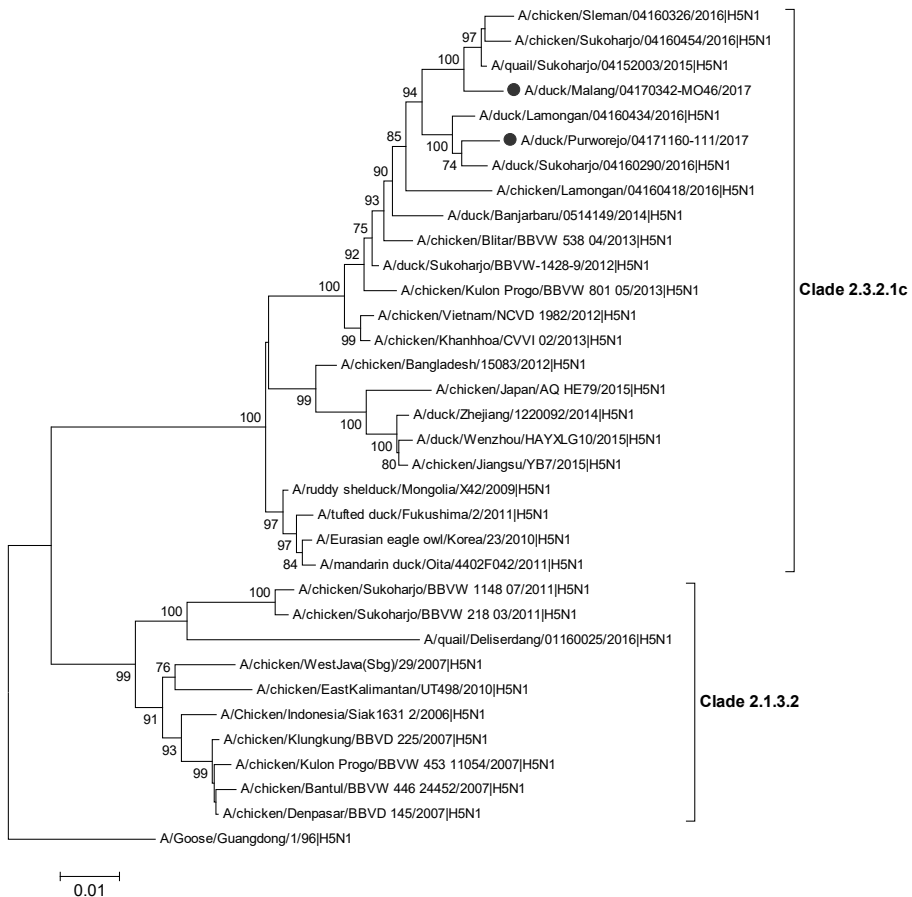
^dA/quail/Sukoharjo/04152003/2015

^eA/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 (Strain vaksin H5N1 clade 2.3.2.1c)

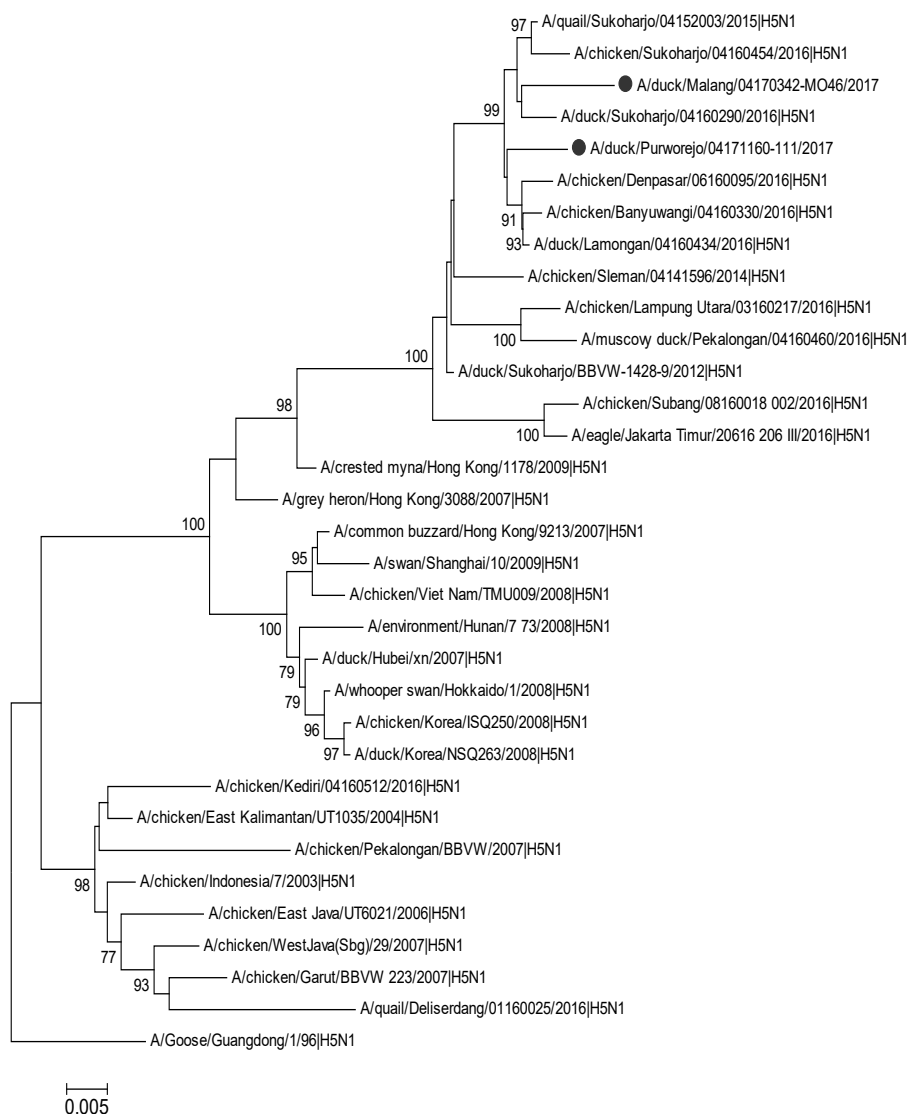
Analisis filogenetik dilakukan dengan mengikut sertakan virus-virus referensi *avian influenza* yang berasal dari Indonesia dan Negara-negara Asia lainnya. Berdasarkan analisis filogenetik terhadap gen HA menunjukkan bahwa kedua virus dalam penelitian ini termasuk dalam kluster virus-virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c (Gambar 1). Begitu pula dengan hasil analisis terhadap gen NA (Gambar 2) dan hampir seluruh gen internal (PB2, PB1, PA, NP dan NS) juga menunjukkan bahwa kedua virus tersebut tergolong dalam kluster virus-virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c (Data tidak ditampilkan). Sebaliknya, gen M dari virus A/duck/Purworejo/ 04171160-111/2017 berada di dalam kluster virus-virus H5N1 *clade* 2.1.3.2 (Gambar 3).

Hasil analisis genetik pada gen HA memperlihatkan bahwa virus-virus dalam penelitian ini memiliki asam amino dengan motif *multiple basic amino acid* ‘RERRRKR/G’ pada HA *cleavage site*. Analisis lebih lanjut terhadap gen HA pada area *reseptor binding site* (RBS) menunjukkan bahwa kedua virus tersebut memiliki asam amino *glutamine* pada posisi 222 (Q 222) dan *glycine* pada posisi 224 (G 224). Analisis gen NA pada penanda resistensi terhadap obat-obatan antiviral menunjukkan asam amino *glutamic acid* dan *histidine* pada posisi 119 dan 275 (E 119 dan H 275). Delesi 20 asam amino pada *NA stalk region* telah ditemukan pada kedua virus dalam penelitian ini. Sebaliknya, tidak dijumpai delesi asam amino tersebut pada virus progeni H5N1 A/Goose/Guangdong/1996. Karakteristik tingkat virulensi yang rendah pada mamalia terdeteksi pada gen PB2 dengan asam amino *glutamic acid* (E) pada posisi 627. Namun demikian, analisis gen PA pada posisi 383 menunjukkan asam amino *aspartid acid* (D) yang

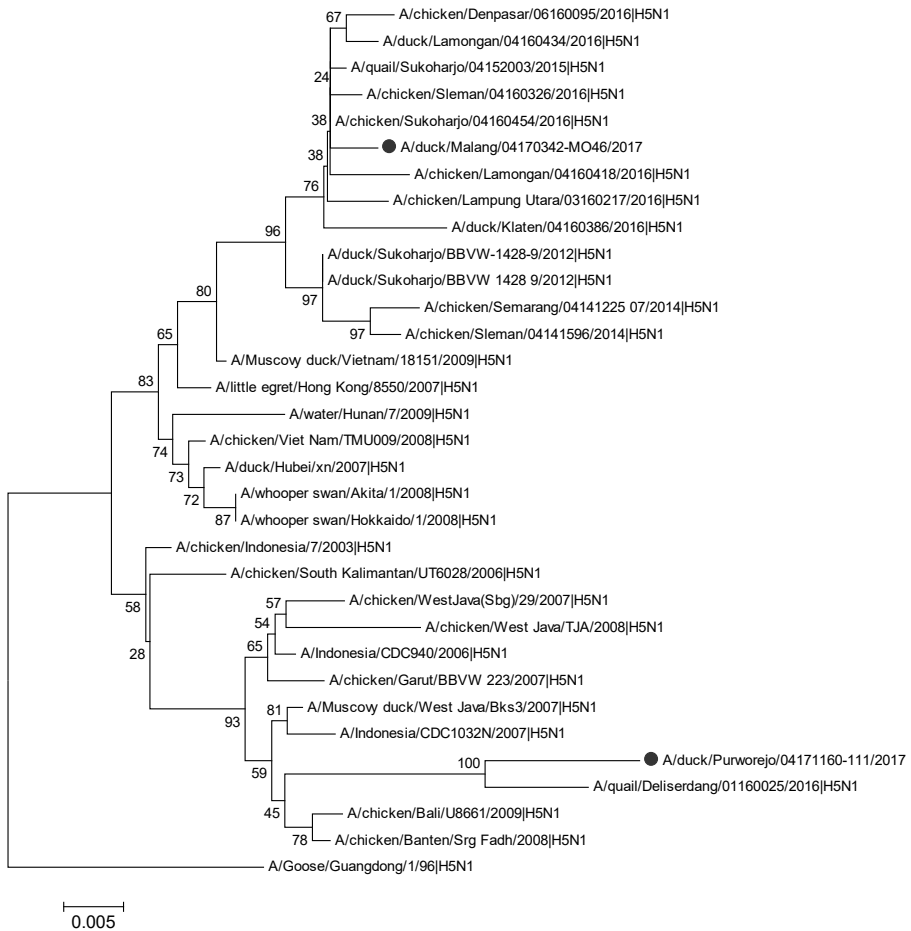
mengindikasikan tingkat virulensi tinggi pada mamalia. Ditambah lagi dengan ditemukannya delesi asam amino pada posisi 80-84 pada gen NS1 mengindikasikan peningkatan virulensi pada ayam dan tikus. PDZ *binding motif ligand* 'ESEV' pada rantai c-terminal telah ditemukan pada gen NS1 dari kedua virus tersebut. Analisis resistensi terhadap obat-obatan antiviral golongan amantadine pada gen M2 menunjukkan telah terjadi substitusi asam amino *serine* menjadi *asparagine* pada posisi 31 (S 31 N) pada virus A/duck/Purworejo/04171160-111/2017. Namun demikian, asam amino S 31 dapat ditemukan pada gen M2 virus A/duck/Malang/04170342-MO46/2017 dan asam amino *alanine* pada posisi 30 (A 30) telah ditemukan dari kedua virus dalam penelitian ini, mengindikasikan virus sensitif terhadap obat-obatan antiviral golongan *amantadine*.



Gambar 1. Analisis filogenetik gen HA5. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H5N1 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan asam nukleat. Pohon filogenetik dirootkan dengan A/Goose/Guangdong/1996.



Gambar 2. Analisis filogenetik gen NA1. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H5N1 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan sekuens. Pohon filogenetik dirootkan dengan A/Goose/Guangdong/1996.



Gambar 3. Analisis filogenetik gen M. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H5N1 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan sekuens. Pohon filogenetik dirootkan dengan A/Goose/Guangdong/1996.

Tabel 2. Karakterisasi/analisis genetik virus-virus H5N1 yang diteliti dan beberapa virus referensi

Gen	Motif/posisi substitusi asam amino	Virus yang diteliti		Virus referensi		
		dk/MO46/17 ^a	dk/PW111/17 ^b	ck/Sb/29/07 ^c (<i>clade</i> 2.1.3.2)	dk/Sk/1428-9/12 ^d (<i>clade</i> 2.3.2.1)	gs/Gd/1/96 ^e (<i>clade</i> 0)
HA*	HA <i>cleavage site</i>	RERRRK/G	RERRRK/G	RESRRKKR/G	RERRRK/G	RERRKKR/G
	222 (RBS)	Q	Q	Q	Q	Q
	224 (RBS)	G	G	G	G	G
NA	119 (antiviral res. marker)	E	E	E	E	E
	275 (antiviral res. marker)	H	H	H	H	H
	<i>Stalk region</i> (20 AA <i>deletion</i>)	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak
PB2	627	E	E	E	E	E
PA	383	D	D	D	D	D
NS1	<i>C-terminal</i>	ESEV	ESEV	ESEV	ESEV	ESEV
	AA <i>deletion</i> (80-84)	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak
M2	30 (antiviral res. marker)	A	A	A	A	A
	31 (antiviral res. marker)	S	N	S	S	S

*H3 numbering

^aA/duck/Malang/04170342-MO46/2017

^bA/duck/Purworejo/04171160-111/2017

^cA/chicken/West Java/Sbg-29/2007 (Strain tantang H5N1 *clade* 2.1.3.2)

^dA/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 (Strain vaksin H5N1 *clade* 2.3.2.1c)

^eA/goose/Guangdong/1/1996

PEMBAHASAN

HPAI H5N1 telah menyebabkan dampak serius pada kesehatan hewan maupun kesehatan manusia sejak pertama kali masuk ke Indonesia pada tahun 2003. Dalam penelitian ini, sebanyak 2 virus (A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 dan A/duck/Malang/04170342-MO46/2017) yang diisolasi dari itik pada program surveilans *avian influenza* pada itik di wilayah kerja BBVET Wates tahun 2017 telah berhasil di *sequencing* dan dikarakterisasi. Berdasarkan analisis homologi gen HA menunjukkan bahwa kedua virus tersebut memiliki persentase *nucleotide identity* / homologi yang tinggi terhadap virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c yang berasal dari Indonesia. Homologi yang tinggi terhadap *clade* 2.3.2.1c juga dijumpai pada gen NA dan hampir seluruh gen internal (PB2, PB1, PA, NP, dan NS) dari kedua virus ini. Namun demikian, terdapat salah satu gen M dari virus A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 memiliki homologi yang lebih tinggi terhadap virus-virus H5N1 *clade* 2.1.3.2 daripada *clade* 2.3.2.1c. Hal serupa telah ditunjukkan dari hasil analisis filogenetik terhadap gen HA, NA dan hampir keseluruhan gen internal virus, dimana kedua virus tersebut masuk ke dalam kluster H5N1 *clade* 2.3.2.1c, kecuali gen M dari virus A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 termasuk ke dalam kluster *clade* 2.1.3.2. Hal ini mengindikasikan telah terjadi reassorsi genetik antara virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c dan *clade* 2.1.3.2 (*inter-lineage reassortment*) pada virus A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 dengan gen M yang berasal dari *clade* 2.1.3.2. Kejadian reassorsi genetik antara *clade* 2.3.2.1c dan *clade* 2.1.3.2 juga pernah dilaporkan dari virus-virus H5N1 yang diisolasi dari kejadian outbreak di Indonesia, dimana gen PB2, M dan NS berasal dari H5N1 *clade* 2.1.3.2 (Wibawa *et al.*, 2018). Penelitian lainnya menyatakan bahwa kejadian *multiple reassortment* antar internal gen virus *avian influenza* H5N1 diidentifikasi sebagai agen penyebab outbreak di peternakan puyuh di Vietnam pada tahun 2010 dan tahun 2014 (Nguyen *et al.*, 2016). Rith, *et al* (2014) telah melaporkan bahwa kejadian reassorsi genetik dari virus H5N1 *clade* 1.1.2 dengan gen internal dari *clade* 2.3.2.1c telah menyebabkan kematian pada manusia di Cambodia (Rith *et al.*, 2014). Reassorsi genetik menyebabkan perubahan susunan genetik virus yang dapat mengakibatkan peningkatan virulensi virus (de Silva *et al.*, 2012).

Analisis genetik pada gen HA menunjukkan bahwa virus-virus dalam penelitian ini memiliki motif 'RERRRKR/G' pada HA *cleavage site*. Kehadiran *multiple basic amino acid* pada HA *cleavage site* virus *avian influenza* mengindikasikan HPAI (Senne *et al.*, 1996; Claas *et al.*, 1998) Eric CJ</author><author>Osterhaus, Albert DME</author><author>Van Beek, Ruud</author><author>De Jong, Jan C</author><author>Rimmelzwaan, Guus F</author><author>Senne, Dennis A</author><author>Krauss, Scott</author><author>Shortridge, Kennedy F</author><author>Webster, Robert G </author></authors></contributors><titl es><title>Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus</title><secondary-title>J The Lancet</secondary-title></titles><pages>472-477</pages><volume>351</volume><number>9101</

number><dates><year>1998</year></dates><isbn>0140-6736</isbn><urls></urls></record></Cite></EndNote>. Sekuen asam amino pada daerah *receptor binding site* posisi 222 dan 224 mengandung Q dan G (Q222 dan G224) menunjukkan bahwa virus memiliki kecenderungan untuk mengikat reseptor dari avian (*sialic acid α2.3 galactose*) (Matrosovich *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 2006). Analisis genetik terhadap gen NA ditemukan delesi 20 asam amino pada NA *stalk region* megindikasikan adanya adaptasi virus dari burung-burung liar ke unggas domestik (Matrosovich *et al.*, 1999). Tidak ditemukannya substitusi asam amino *glutamic acid* menjadi *lysine* pada posisi 627 (Q 627 K) dari gen PB2 menunjukkan bahwa virus-virus H5N1 ini memiliki tingkat virulensi yang rendah pada mamalia (Hatta *et al.*, 2001). Namun demikian, analisis gen PA pada posisi 383 menunjukkan adanya perubahan asam amino *asparagine* menjadi *aspartic acid* (N 383 D), dimana substitusi pada posisi ini memiliki korelasi terhadap tingkat virulensi yang tinggi pada mamalia (Song *et al.*, 2011). Indikasi peningkatan virulensi virus pada unggas (ayam) dan mamalia (tikus) juga ditunjukkan dengan adanya delesi asam amino pada posisi 80-84 dan sekuen PDZ *binding motif ligand* 'ESEV' pada rantai c-terminal dari gen NS1 (Jackson *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2008). Analisis genetik terhadap resistensi obat-obatan antiviral mengindikasikan bahwa kedua virus dalam penelitian ini sensitif terhadap oseltamivir dan amantadine yang ditunjukkan dengan asam-asam amino *glutamic acid* dan *histidine* dari gen NA secara berturut-turut pada posisi 119 dan 275 (E 119 dan H 275) dan asam amino *serine* dari gen M2 pada posisi 31 (S 31). Selain itu, indikasi virus sensitif terhadap obat-obatan antiviral golongan amantadine juga ditemukan pada virus A/duck/Malang/04170342-MO46/2017 dengan asam amino *serine* pada posisi 31 (S 31) yang dimilikinya. Meskipun demikian, substitusi asam amino *serine* menjadi *asparagine* pada posisi 31 (S 31 N) pada gen M2 telah ditemukan pada virus *reassortant* A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 sehingga dimungkinkan virus tersebut lebih resisten terhadap obat-obatan antiviral golongan *amantadine*. Penggunaan kombinasi obat antiviral *amantadine* dan *neuraminidase inhibitor* dapat mengurangi resiko resistensi terhadap virus avian influenza (Hewajuli and Dharmayanti, 2019)

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan data hasil analisis homologi dan filogenetik dapat disimpulkan bahwa kedua virus dalam penelitian ini termasuk dalam kluster virus H5N1 *clade* 2.3.2.1c. Namun demikian, terdapat salah satu virus A/duck/Purworejo/04171160-111/2017 yang menunjukkan kejadian reassortasi genetik (*inter-lineage reassortment*) pada gen M yang berasal dari virus H5N1 *clade* 2.1.3.2. Analisis genetik terhadap gen HA menunjukkan bahwa virus-virus tersebut dikategorikan sebagai *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan memiliki kecenderungan untuk mengikat reseptor dari avian. Analisis lebih lanjut terhadap obat-obatan antiviral menunjukkan bahwa virus *reassortant* dalam penelitian ini memiliki kecenderungan lebih resisten terhadap obat-obatan antiviral golongan *amantadine*.

Dari hasil penelitian ini maka beberapa saran yang perlu dilakukan antara lain dengan meningkatkan pelaksanaan biosecurity pada peternakan itik dan peternakan unggas lainnya untuk menekan resiko infeksi dan penularan virus *avian influenza*. Surveilans dan karakterisasi *avian influenza* secara rutin sebaiknya terus dilakukan untuk memonitor dinamika dan keanekaragaman virus yang beredar guna mendukung pengendalian penyakit *avian influenza* di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen R, Holmes EC and evolution 2006. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *J Mol Biol Evol.* 23(12): 2336-2341.
- Claas EC, Osterhaus AD, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF and Webster RG 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *J The Lancet.* 351(9101): 472-477.
- de Silva UC, Tanaka H, Nakamura S, Goto N and Yasunaga T 2012. A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus. *Open Microbiol J.* 1(4): 385-390.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Pudjiatmoko HW, Hardiman AB, Donis R, Davis CT and Samaan G 2014. Genetic characterization of clade 2.3. 2.1 avian influenza A (H5N1) viruses, Indonesia, 2012. *J Emerg Infect Dis.* 20(4): 671.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P and Kawaoka Y 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *J Sci.* 293(5536): 1840-1842.
- Hewajuli DA and Dharmayanti NI 2019. Efikasi, Mekanisme dan Resistensi Antiviral Neuraminidase Inhibitor dan Adamantane pada Avian Influenza. *Wartazoa Vol. 29 No. 2 Th. 2019 Hlm. 061-074 DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/wartazoa.v29i2.1951>.*
- Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR and Lamb RA 2008. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *J Proc Natl Acad Sci.* 105(11): 4381-4386.
- Long J-X, Peng D-X, Liu Y-L, Wu Y-T and Liu X-F 2008. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *J Virus Genes.* 36(3): 471-478.
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y and Webster R 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.* 73(2): 1146-1155.
- Nguyen TH, Thanh HD, Hung V-K, Nguyen DT and Kim W 2016. Intersubtype reassortments of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from Quail. *J PloS One.* 11(2): e0149608.

- Rith S, Davis CT, Duong V, Sar B, Horm SV, Chin S, Ly S, Laurent D, Richner B and Oboho I 2014. Identification of molecular markers associated with alteration of receptor-binding specificity in a novel genotype of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses detected in Cambodia in 2013. *J Virol.* JVI. 01887-01814.
- Senne D, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson J, Süß J, Lipkind M, Kida H and Webster R 1996. Survey of the hemagglutinin (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. *J Avian Dis.* 425-437.
- Song J, Feng H, Xu J, Zhao D, Shi J, Li Y, Deng G, Jiang Y, Li X and Zhu P 2011. The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks. *J Virol.* 85(5): 2180-2188.
- Sonnberg S, Webby RJ and Webster RG 2013. Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *J Virus Res.* 178(1): 63-77.
- Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC and Wilson IA 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *J Sci.* 312(5772): 404-410.
- WHO 2012. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. *Influenza Other Respi Viruses* 6(1): 1-5.
- Wibawa H, Dharmawan R, Mulyawan H, Mahawan T, Srihanto. E.A, Miswati. Y, Hutagaol. N.M, Riyadi. A, H.W. D, Hartawan, Hendrawati. F, Deswarni, Zenal. F.C, Hartaningsih. N and Poermadjaja B 2018. Deteksi dan identifikasi virus-virus reassortant highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.2.1c dengan teknik next generation sequencing (Detection and identification of highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.2.1c virus reassortant by using next generation sequencing technique). *Bul. Lab. Vet.* 18, 2018; 1(1).
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, Rohmah A, Andesyha E, Romlah, Daulay RSD and Safitria K 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Timur: identifikasi sebuah clade baru virus avian influenza subtype H5N1 di Indonesia (Disease outbreak investigation in ducks in Central Java, Yogyakarta, and East Java: identification of a new clade of avian influenza subtype H5N1 virus in Indonesia). *Bul. Lab. Vet.* 12, 2-9.
- Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, George KS, Hatta M, Kawaoka Y and Wentworth DE 2009. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. *J Virol.* 83(19): 10309-10313.