

REVIEW ARTIKEL

GEN HEMAGLUTININ (HA) DAN POLIMERASE BASIK-2 (PB-2)  
SEBAGAI PENANDA SPESIFIK DALAM DETEKSI VIRULENSI  
VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1

Muflihanah\*, Ratna, Supri, Rosmiaty\*\*

\*Medik Balai Besar Veteriner Maros

\*\*Paramedik Balai Besar Veteriner Maros

ABSTRAK

Penyakit *Avian Influenza* (AI) adalah penyakit hewan menular yang menyerang unggas, mamalia dan manusia yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* termasuk dalam family *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus*. Virus ini termasuk golongan virus RNA (*Negative Sense, Single Stranded RNA*) yang memiliki susunan genom yang terdiri dari 8 (delapan) gen yang mengkode 10 (sepuluh) protein yaitu polimerase protein (PB1, PB2, dan PA), hemagglutinin (HA), nukleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matriks protein (M1 dan M2) dan nonstruktural protein (NS1 dan NS2). Di antara ke delapan genom penyandi protein virus AI, gen protein permukaan HA dan NA, polimerase kompleks (PB1, PB2 dan PA) serta non struktural (NS) menentukan virulensi virus AI.

Gen HA menentukan variasi genetik, imunitas dan interaksi inang. Selain itu gen HA sangat penting dalam studi epidemiologi molekuler untuk menentukan kemungkinan asal asul virus dan analisis antigenik terhadap isolat khususnya dalam pemilihan antisera dan vaksin. Selain gen HA, kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi virus AI pada spesies tertentu. Kompleks enzim polimerase dari virus AI 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.

Gen HA dan PB2 digunakan sebagai penanda spesifik untuk menentukan virulensi virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1.

I. PENDAHULUAN

Penyakit *Avian Influenza* (AI) adalah penyakit hewan menular yang menyerang unggas yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* (AI) termasuk dalam family *Orthomyxoviridae*, yang terbagi dalam tiga tipe yaitu *Influenzavirus* tipe A, B dan C (Capua dan Marangon, 2006). Pembagian menjadi tiga tipe tersebut berdasarkan karakter protein NP dan M sehingga virus *Influenza* sangat berbeda secara antigenik (Wiyono dkk, 2004; Dharmayanti dkk, 2004 ; de Jong dan Hien , 2006). *Influenza* tipe A dibagi menjadi sub tipe berdasarkan karakteristik antigenik pada glikoprotein permukaan hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) (Lee *et al.*, 2001; Russel dan Webster, 2005, Capua dan Marangon 2006). Saat ini terdapat 16 sub tipe hemagglutinin (H1- H16) dan neuraminidase (N1-N9) yang telah diidentifikasi (Russel dan Webster 2005 ; Capua dan Marangon,

2006). Semua subtipe Influenza A ditemukan pada jenis unggas air yang merupakan reservoir alami virus AI (Steinhauer, 1999; Lee *et al.*, 2001; Capua dan Marangon 2006). Unggas air biasanya menunjukkan infeksi pencernaan asimtomatik, tetapi dapat mengeluarkan virus AI dalam jumlah yang besar melalui feses tanpa adanya penyakit (Steinhauer, 1999 ; Asmara, 2007).

Pada manusia ada 3 (tiga) subtipe HA yaitu H1, H2, H3 dan 2 (dua) subtipe NA yaitu N1 dan N2 yang pernah mengakibatkan pandemi influenza. Selanjutnya diketahui adanya influenza pada manusia disebabkan oleh H5, H7 dan H9 (Dharmayanti dkk, 2004 ; FKH Unair, 2006). Pada babi terdapat subtipe H1, H3 dan H9 sedangkan pada kuda H3 dan H7 (Steinhauer, 1999). Pandemi influenza pernah terjadi pada tahun 1918 (subtipe H1N1), 1957 (subtipe H2N2) dan 1968 (subtipe H3N2) akibat adanya *point mutation* (mutasi titik) dan *reassortment* virus dari manusia dan unggas (Jia-Hai *et al.*, 2006) .

Berdasarkan patogenitas virus AI dibagi menjadi *high pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI) (Capua dan Marangon, 2006). Pada tahun 1996 virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 pertama kali diisolasi dari angsa yang terinfeksi di Propinsi Guangdong Cina Selatan (Smith, *et al.*, 2006 ; Lam *et al.*, 2008 ; Takano *et al.*, 2009). Virus ini menyebar dengan cepat dan menyebabkan kematian pertama pada manusia di Hongkong tahun 1997. Tahun 2003 menyebar ke beberapa negara Asia yaitu Cina, Thailand, Vietnam, Indonesia dan Kamboja dan secara sporadis menular ke manusia dan merupakan ancaman besar bagi industri peternakan (Smith, *et al.*, 2006 ; Lam *et al.*, 2008 ; Takano *et al.*, 2009

Kasus AI pada unggas di Indonesia pertama kali muncul pada Bulan Desember 2003 di beberapa peternakan ayam komersil di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Kemudian menyebar ke beberapa propinsi di Indonesia termasuk Jawa Timur, DIY Yogyakarta, Lampung, Bali serta beberapa daerah di Sumatra dan Kalimantan (Asmara, 2007). Kasus AI di wilayah Sulawesi pertama kali dilaporkan pada bulan Pebruari 2005 di Sulawesi Selatan yaitu di Kabupaten Maros, Wajo dan Soppeng, kemudian menyebar di beberapa kabupaten di Sulawesi Selatan, Sulawesi Barat, Sulawesi Tenggara, Sulawesi Utara, Papua Barat, Papua dan Maluku. Dua propinsi yang masih dinyatakan bebas adalah Propinsi Maluku Utara dan Gorontalo (Muflihanah dkk, 2007).

Pada Bulan Juli 2005, kita dikejutkan dengan kejadian pertama flu burung pada manusia di Kabupaten Tangerang Jawa Barat. Kasus pada manusia per 29 Juli 2010 sudah dilaporkan sebanyak 167 kasus dengan kasus kematian sebanyak 138 orang. Khusus di



Sulawesi Selatan terdapat satu kasus positif pada manusia (WHO 2009 ; Takano *et al.*, 2009). Masalah yang dikhawatirkan adalah ketika terjadi wabah pandemi didunia, yang akan mengakibatkan penularan dari manusia ke manusia.

## II. PEMBAHASAN

### 1. Karakteristik Virus *Avian Influenza*

Ciri-ciri dari virus ini, virionnya memiliki amplop dengan diameter 80 -120 nm dan panjang 200 -300 nm serta ada yang berfilamen. Protein permukaan virus berbentuk *spike-shaped* sebagai bahan dengan derivat yang kaya lipid dari *host* dan protein Matriks yang mengelilingi segmen nukleokapsid berbentuk heliks sebanyak 6-8 segmen (FKH Unair, 2006 ; Asmara, 2007). Genom virus influenza A berupa *negative-sense single stranded RNA*, sepanjang kurang lebih 13.558 nukleotida yang memungkinkan untuk terjadinya *genetic reassortment* pada suatu sel yang mengalami infeksi campuran oleh lebih dari satu virus yang akan menghasilkan strain baru yang berbeda dari strain asalnya. *Negative -sense* atau polaritas negatif berarti bahwa RNA virus tidak dapat ditranslasi untuk menghasilkan protein sebelum diubah terlebih dahulu menjadi RNA +. Genom virus AI terdiri dari 10 gen pengkode protein yang berbeda yaitu delapan protein struktural dan dua protein non struktural. Kesepuluh genome pengkode tersebut terdiri dari tiga protein transkriptase yaitu PB1 (polymerase protein, 2342 bp), PB2 (polymerase protein, 2341 bp) dan PA (polimerase protein, 2234 bp), dua glikoprotein permukaan HA (hemagglutinin, 1778 bp) dan NA (neuraminidase, 1413 bp), protein M1 dan M2 (matriks protein M1 + M2, 1027 bp), protein NP (nukleoprotein 1565 bp) dan NS1 dan NS2 (nonstuktural protein, NS1+NS2 890 bp) (de Jong and Hien, 2006 ; Mahardika, 2006 ; Shaffer, 2006 ; Asmara, 2007 ; Wong *et.al.*, 2008). Fragmen gen virus influenza juga dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasarkan lokasinya yaitu gen eksternal dan gen internal. Gen eksternal terdiri dari gen HA dan NA dan gen internal yaitu PB1, PB2, PA, NP, M dan NS (Nidom, 2005)

Tiga protein besar PB1, PB2 dan PA terikat pada RNA virus dan merupakan penyebab dari transkripsi dan replikasi RNA. Nukleoprotein berikatan dengan RNA virus membentuk suatu struktur berdiameter 9 nm. Protein matriks yang membentuk suatu lapisan di bawah selubung lipid virus penting dalam morfogenesis partikel dan merupakan komponen utama dari virus (sekitar 40% dari protein virus). Virus AI mempunyai amplop

dengan *lipid bilayer* yang berasal dari hospes dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktivitas hemagglutinasinasi dan neuraminidase. Aktivitas ini diperankan oleh glikoprotein utama yang ada dipermukaan virus yaitu HA dan NA. Gen HA dan NA yang berbentuk seperti paku dengan panjang sekitar 10 nm yang berfungsi untuk perlekatan dengan sel inang dan bersifat antigenik serta menentukan variasi genetik dari virus influenza dan imunitas inang. Pembagian virus menjadi beberapa subtype berdasarkan antigen permukaan HA yang terdiri dari H1 – H16 dan NA yang terdiri dari N1-N9 (de Jong dan Hien, 2006 ; Thontiravong *et al.*,2007)

Diantara virus AI yang menyebabkan *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) pada unggas yang memiliki hemagglutinin H5, H7 dan H9 (de Jong dan Hien, 2006). Susunan asam amino protein HA, NA serta protein NS dan polimerase kompleks (PB1,PB2 dan PA) ikut berperan dalam sifat antigenik, virulensi dan spesifitas virus terhadap hospes (Russel and Webster,2005). Kemampuan virus AI untuk melakukan mutasi dan rearsori genetik memungkinkan virus berubah sifat antigeniknya, patogenitasnya serta spesifitas hospesnya (Asmara, 2007).

Struktur antigen virus influenza berubah secara bertahap oleh karena mutasi dan rekombinasi (hanyutan antigenik /*antigenic drift*) atau secara drastis karena *reassortment* (lompatan antigenik/*antigenic shift*). Kejadian mutasi berupa hanyutan antigenik pada virus AI dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal terjadi karena adanya peranan enzim polimerase pada proses replikasi tetapi tidak dilengkapi oleh dengan sistem *proofreading*. *Proofreading* merupakan kemampuan polimerase DNA untuk membaca rangkaian DNA dan memperbaiki kesalahan penyusunan bagian dari salinan (hasil duplikat) untai DNA. *Proofreading* sangat penting dalam proses multiplikasi virus terutama pada saat proses replikasi RNA. Hal ini disebabkan dengan *proofreading* kesalahan pembacaan susunan asam amino dalam rantai RNA akan terdeteksi dan dapat disusun ulang atau diperbaiki. Namun lain halnya dengan virus AI, kesalahan susunan asam amino pada saat replikasi tidak dapat terdeteksi. Hal ini akan mengakibatkan munculnya varian baru dari virus AI (Mahardika, 2006 ; Wibawan dan Mahardika, 2006 ; Medion, 2009 ; Radji, 2006)

Faktor eksternal yang menyebabkan hanyutan antigenik adalah cekaman imunologis pada inang disebabkan timbulnya tekanan respon imun akibat vaksinasi dan infeksi alam dan usaha virus untuk menghindar dari sistem imun tubuh inang. Hanyutan antigenik dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada antigen

permukaan H dan/atau N dan dapat ditemukan pada virus influenza A dan B. Perubahan yang terjadi karena adanya mutasi titik, sehingga perubahan secara gradual. Mutasi titik ini tidak akan menghasilkan subtipe baru. Waktu yang diperlukan untuk proses mutasi seperti ini relatif singkat, sekitar kurang lebih 1 (satu) tahun dan dapat memungkinkan terjadinya epidemi tahunan dengan wabah ulangan setiap 1-5 tahun kemudian. *Drift* antigenik berlangsung lambat tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas disuatu kawasan (Sarjito, 1993 ; Nidom, 2005 ; Suwarno dkk, 2006 ; Asmara, 2007 ; Medion, 2009). Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus, yaitu sekitar 2-3 kali substitusi asam amino per tahun (Asmara, 2007).

*Antigenic shift* dapat timbul akibat *gene reassortment* (pertukaran dan pencampuran gen) yang terjadi pada 2 (dua) atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang yang bermanifestasi sebagai subtipe virus AI baru. *Shift* antigenik terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada antigen H dan N. Pada kondisi ini terjadi melalui akibat penataan genetik dari beberapa subtipe (*genetic reassortment*) yang mengarah pada timbulnya evolusi virus. Proses mutasi ini membutuhkan waktu yang relatif lama, sekitar 8-10 tahun dengan efek yang ditimbulkan sangat berbahaya. Tipe mutasi ini biasanya terjadi saat dua atau lebih subtipe virus AI bercampur dalam satu inang membentuk subtipe baru. Inang yang bisa berperan dalam proses mutasi ini adalah babi (Sarjito, 1993 ; Mahardika, 2006; Wibawan dan Mahardika, 2006; Asmara, 2007 ; Medion 2009).

Apabila dua atau lebih strain AI H5N1 menginfeksi suatu *host* secara bersama-sama, maka dimungkinkan terjadi pengacakan segmen genom virus (*genetic reassortment*), termasuk gen penyandi yang akan berakibat munculnya strain virus baru dengan kombinasi genom yang baru dan spesifitas *host* yang berbeda dengan virus asalnya (Nidom, 2005)

Dari segi patogenesis penyakit AI dibagi menjadi *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) dan *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Sementara dari aspek subtipe, virus Avian Influenza yang dikategorikan sebagai HPAI adalah subtipe H5 dan H7. Kedua subtipe ini mampu menyebabkan gangguan respirasi dan kematian hingga 100% pada unggas. Virus HPAI yang menginfeksi hewan dan manusia di Indonesia sampai saat ini mempunyai subtipe H5N1 (Nidom, 2005). Patogenesis virus Avian Influenza subtipe H5N1 adalah poligenik, bukan hanya ditentukan oleh protein hemagglutinin (HA) tetapi juga oleh protein neuraminidase (NA) dan protein internal yang lain. Mutasi genetik virus

avian influenza seringkali terjadi sesuai dengan kondisi dan lingkungan replikasinya. Mutasi gen ini tidak saja untuk mempertahankan diri akan tetapi juga dapat meningkatkan sifat patogenisitasnya (Radji, 2006).

Rekombinasi seperti mutasi titik (*point mutation*) dan *reassortment* akan menghasilkan varian-varian virus baru dan meningkatkan virulensi dan patogenisitas (Gibs *et al.*, 2001). Faktor penentu virulensi virus influenza A dapat digambarkan dengan menggunakan *reverse genetic* melalui keragaman tipe pandemik, epidemik dan zoonosis virus influenza. Mutasi dipengaruhi oleh virulensi virus dan hospes yang secara umum dihubungkan dengan gen HA dan NA yaitu adanya interaksi reseptor virus *sialic acid* pada permukaan sel hospes (Herfst *et al.*, 2010).

Tiga pandemik influenza terjadi pada abad 20 yaitu tahun 1918, 1957 dan tahun 1968. Pandemi tahun 1918 terjadi dari hasil adaptasi virus dari unggas dan manusia akibat *point mutation* (Jia-Hai *et al.*, 2006 ; de Jong and Hien, 2006). Pandemi influenza tahun 1957 di Asia yang disebabkan oleh H2N2 dari itik liar dengan tiga gene (H2,N2 dan PB1) yang bersikulasi dengan strain H1N1 pada manusia (de Jong and Hien, 2006) dan tahun 1968 di Hongkong pandemi influenza berasal dari strain virus itik dengan gen H3 dan PB1 yang bersikulasi dengan strain H2N2 pada manusia melalui proses *reassortment* (de Jong and Hien, 2006). Selain itu gen polimerase termasuk PB2 merupakan faktor yang penting dari virulensi virus HPAI H5N1, H7N7 dan pandemi virus H1N1 pada tahun 1918 (Herfst *et al.*, 2010). Kejadian pandemi H1N1 *swine-origin influenza virus* (S-OIV) tahun 2009, merupakan hasil *triple reassortment* dari virus avian, manusia dan babi. Selama terjadi *reassortment*, virus influenza baru terbentuk dari pencampuran delapan segmen gen dari dua hospes yang berbeda (Russel and Webster, 2005). Kekhawatiran terjadi pada virus AI ketika terjadi *reassortment* dan mengakibatkan penularan dari hewan ke manusia dan dari manusia ke manusia.

## 2. Gen Hemagglutinin (HA)

Virulensi virus influenza A ditentukan oleh faktor penting yaitu aktivitas gen hemagglutinin (HA). Mutasi pada gen HA akan menghasilkan strain *highly pathogenic* seperti ketika terjadi pandemi influenza tahun 1957 dan 1968 (Gibs *et al.*, 2001). Salah satu faktor yang berperan dalam infeksi virus AI adalah adanya kecocokan antara virus dengan reseptor yang ada dipermukaan sel hospes. Untuk terjadinya infeksi, virus AI akan berikatan dengan glikoprotein yang ada dipermukaan sel yang mengandung gugus *sialyl*

*galactosyl* [Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal] atau [Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal]. Isolat dari ayam cenderung berikatan dengan [Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal], sedangkan isolat virus dari manusia memiliki spesifitas terhadap [Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal] (Steinhauer, 1999 ; Asmara, 2007 ; Jackson *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009) Bagian protein HA yang berikatan dengan reseptor hospes (*Reseptor Binding Site/RBS*) mempunyai susunan amino yang khas. Pada virus influenza H3 isolat dari ayam dengan posisi 226 Gln dan posisi 228 Gly akan lebih mengenal [Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal], sedangkan virus asal manusia dengan posisi asam amino 226 Leu dan 228 Ser akan lebih mengenal [Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal] (Asmara, 2007). Namun demikian spesifitas reseptor tampaknya mengalami pergeseran yang signifikan. Menurut Matrosovich *et al.* (2004) dalam Wibawan dan Mahardika (2006), bahwa kedua reseptor tersebut terdapat pada sel-sel epitel pernafasan manusia dengan lokasi yang berbeda. Reseptor [Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal] terdapat pada sel-sel yang tidak bersilia sementara reseptor [Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal], terdapat sel-sel yang bersilia. Secara umum  $\alpha$ 2-3 dan  $\alpha$ 2-6 terdapat pada saluran pernafasan manusia bagian atas dan bawah. Belum lama berselang menunjukkan bahwa  $\alpha$ 2-3 terdapat pada saluran pernafasan manusia bagian dalam (Jackson *et al.*, 2009) . Peran gen HA dalam proses replikasi virus yaitu setelah berikatan dengan reseptor sel hospes, virus AI akan masuk melalui fusi amplop dengan membran endosomal sel hospes. Proses ini memerlukan protease sel hospes untuk mengaktivasi prekursor hemaglutinin (HA 0) menjadi fragmen 1 (HA 1) dan fragmen 2 (HA2) yang memungkinkan virus untuk melepaskan ribonukleoproteinnya, yang selanjutnya akan terjadi replikasi virus didalam sel hospes. Oleh karena itu aktivasi proteolitik protein HA sangat penting untuk infektifitas dan penyebaran virus AI keseluruh tubuh (Asmara, 2007).

Dalam diagnosis AI peran protein hemaglutinin (HA) yang terdapat pada amplop virus menjadi tumpuan dasar pada uji HI. Protein HA merupakan target awal dalam pembentukan antibodi inang. Pada awal infeksi, protein ini akan berikatan dengan reseptor sel inang dan melepaskan ribonukleoprotein (RNP). Akibat aktivasi prekursor HA (HA0) oleh protease inang protein akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respons imun, sedangkan protein HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dengan membran endosomal inang (Suwarno dkk, 2002)

Adanya *multiple basic amino acids* antara diantara molekul HA1 dan HA2 dilaporkan merupakan faktor penting yang berkontribusi terhadap virulensi virus AI pada ayam dan unggas lainnya (Hiromoto *et al.*, 2000). Analisis molekuler menunjukkan

adanya perbedaan susunan asam amino pada hemagglutinin *cleavage site*. Pada HPAI akan ditemukan adanya *polybasic amino acid region*. Ciri tersebut mengandung 5 (lima) arginin dan 2 (dua) lisin. Susunan asam amino yang menyusun *regio* tersebut adalah Arg (arginin), Glu (glutamine), Arg (arginin), Arg (arginin), Lys (lisin), Lys (lisin) dan Arg (arginin) (PQRERRRKKRGLF). Asam amino tersebut dapat digunakan untuk membedakan virulensi virus AI. (Nidom, 2005; Asmara, 2007). Gen HA menentukan variasi genetik, imunitas dan interaksi inang. Disebutkan juga bahwa gen HA adalah sebagai pusat yang berperan dalam *antigenic drift* (Takano *et al.*, 2009). HA terdapat sekitar 25 % dari protein virus. Selain itu gen HA sangat penting dalam studi epidemiologi molekuler untuk menentukan kemungkinan asal asul virus dan analisis antigenik terhadap isolat khususnya dalam pemilihan antisera dan vaksin. Virus AI pada gen HA secara filogenetik memiliki keanekaragaman dan variasi antigenik serta genetik yang berbeda (Smith *et al.*, 2006 ; WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2009 ; Takano *et al.*, 2009)

Sejak dari awal terjadinya wabah HPAI H5N1 pada unggas tahun 1996, virus AI mengalami mutasi yang terus menerus. Menurut Asmara (2007), mulai tahun 2005 sudah terjadi perubahan asam amino pada *cleavage site* antigen HA yaitu substitusi asam amino lysine (K) oleh asam amino serin (S) yang diindikasikan virus AI dapat beradaptasi pada saluran pernafasan manusia. Beberapa isolat virus yang berasal dari Pulau Jawa sudah mengalami perubahan asam amino pada daerah tersebut (Smith *et al.*, 2006)

Berdasarkan analisis sequencing HA yang terdapat pada virus influenza A H5N1 diklasifikasikan kedalam beberapa *clade*. *Clade 1* menginfeksi secara terbatas di Kamboja, Thailand dan Vietnam. *Clade 2.1.* terdapat pada unggas dan manusia di Indonesia, sementara *clade 2.2* yaitu di Afrika, Asia dan Eropa serta pada manusia di Azerbaijan, Bangladesh, China, Mesir, Nigeria, Pakistan dan Turki. *Clade 2. 3.4* pada manusia di China, Laos, Myanmar dan Vietnam (Melidou, 2009)

### 3. Gen Polimerase Basik-2 (PB-2)

Ribonukleoprotein (RNP) terdiri dari empat protein yang disandi oleh satu segmen. Segmen 1 - 3 mengkode tiga subunit *heterotrimeric RNA- dependent* RNA polimerase (PB2, PB1 dan PA) dan segmen kelima mengkode nukleoprotein (NP) yang mengikat *single-stranded* RNA (Brower-Sinning *et al.*, 2009). Kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi virus AI pada spesies tertentu. Kompleks enzim

polimerase dari virus AI 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 (Kencana dkk, 2008). Protein PB2, PB1 dan PA membentuk kompleks polimerase. Adanya protein PB1 dan PA yang memiliki fungsi yang sama dengan protein PB2 menunjukkan bahwa protein-protein ini merupakan faktor penting dalam proses transkripsi (Manzoor *et al.*, 2009).

Menurut Salomon *et al.*, (2006), bahwa gen-gen polimerase berperan dalam *barrier* spesies virus AI, tetapi mekanisme ini belum jelas. Penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.*, 2010, untuk mengidentifikasi *host lineage-specific amino acids* yang membedakan antara virus unggas dan manusia mereka menemukan 72 asam amino sejati (*conserved*) pada virus AI unggas dan manusia dan disebut sebagai asam amino '*human-like*' atau '*avian-like*'. *Host lineage-specific amino acids* secara umum ditemukan pada komponen polimerase kompleks yaitu PB2, PA dan NP (Kim *et al.*, 2010)

Pada virus influenza yang menginfeksi manusia ditemukan (PB2-627Lys) sedangkan pada unggas umumnya ditemukan (PB2-627Glu) (Le *et al.*, 2009). Polimerase kompleks termasuk PB2 berperan dalam virulensi virus (Salomon *et al.*, 2006; Herfst *et al.*, 2010). Beberapa mutasi meningkatkan aktifitas polimerase dan virulensi penyakit pada hewan model rodensia. Mutasi ditemukan pada virus H5N1 yaitu substitusi asam amino Glu menjadi Lys pada residu 627 (Jia-Hai *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Herfst *et al.*, 2010).

Menurut Smith *et al.*, 2006, perbandingan urutan nukleotida virus AI dari unggas dan manusia di Vietnam hanya terjadi satu substitusi yaitu pada posisi Lys 627 gen PB2. Mutasi ini sangat erat hubungannya dengan peningkatan virulensi virus AI pada mamalia. Polimerase kompleks juga berperan dalam *cap binding* dan *elongation* (Asmara, 2007).

Selain itu perubahan asam amino pada gen polimerase PB2 daerah CR pada posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan virus AI asal unggas ke virus AI asal mamalia. (Kencana, 2008). Menurut Brower-Sinning (2009) kompleks polimerase merupakan faktor penting dalam evolusi dan spesifitas hospes terhadap virus influenza A

Disamping asam amino pada posisi 627, asam amino pada posisi 701 sangat penting dalam patogenisitas dan virulensi virus H5N1 pada mencit (Chen *et al.*, 2005). Secara umum asparagin tidak ditemukan pada residu 701. Sebagian besar virus AI terdapat asam amino aspartik pada posisi 701 Aasp, tetapi A/duck/Guangxi/35/2001 (H5N1) sangat virulen terhadap mencit memiliki posisi 701 Asn (asparagine). PB2-701Asn juga

ditemukan pada virus influenza pada kuda , babi dan beberapa isolat virus H5N1 pada manusia. Kedua asam amino ini merupakan *marker* terjadinya adaptasi virus H5N1 pada manusia (Chen *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2009). Mutasi dari Asp ke Asn pada posisi 701 gen PB2 dilaporkan juga terjadi pada virus AI H7N7 secara *in vitro* pada *mouse lung cell line* dan pada tikus percobaan yang diadaptasikan dengan virus influenza manusia (Chen *et al.*, 2005). Menurut Chen *et al.*, 2005, asam amino Asn pada posisi 701 gen PB2 adalah salah satu faktor yang sangat penting pada replikasi dan letalitas dari virus H5N1 dari isolat itik pada hewan percobaan tikus.

#### 4. Virulensi virus AI

Faktor penentu virulensi virus influenza A dapat digambarkan dengan menggunakan *reverse genetic* melalui keragaman tipe pandemik, epidemik dan zoonosis virus influenza. Mutasi dipengaruhi oleh virulensi virus dan hospes yang secara umum dihubungkan dengan gen HA dan NA yaitu adanya interaksi reseptor virus *sialic acid* pada permukaan sel hospes (Herfst *et al.*, 2010).

Beberapa laporan kasus yang baru akibat dari mutasi virus AI H5N1 mengindikasikan terjadinya variasi genetik yang bisa meningkatkan kemungkinan pandemik baru. Virus influenza adalah virus yang tidak stabil disebabkan karena segmen genom RNA dan tidak mempunyai mekanisme "*proofreading*" Sejak kasus pertama pada manusia yang terinfeksi virus AI H5N1 pada tahun 1997, virus telah banyak mengalami perubahan-perubahan. Perubahan virus terjadi dengan pola transmisi dan penyebaran pada hewan domestik dan unggas liar. Infeksi pada manusia masih dipertanyakan karena secara teori virus tidak mudah melakukan transmisi dari unggas ke manusia atau dari manusia ke manusia (Melidou, 2009). Akan tetapi virus AI beresiko untuk menginfeksi manusia secara langsung dari unggas atau terjadinya *reassortment* antara virus dari mamalia dan unggas, dan hal tersebut merupakan dasar terjadinya pandemik baru pada manusia (Shahid *et al.*, 2009)

Tiga pandemik influenza terjadi pada abad 20 yaitu tahun 1918, 1957 dan tahun 1968. Pandemi tahun 1918 terjadi dari hasil adaptasi virus dari unggas dan manusia akibat *point mutation* (Jia-Hai *et al.*, 2006) Pandemi influenza tahun 1957 di Asia terdapat gen PB1, HA dan NA dari unggas dan tahun 1968 di Hongkong virus influenza di dapatkan dari gen HA dan PB1 unggas dari proses *reassortment*. Selain itu gen polimerase termasuk PB2 merupakan faktor yang penting dari virulensi virus HPAI H5N1, H7N7 dan

pandemik virus H1N1 pada tahun 1918 (Herfst *et al.*, 2010). Kejadian pandemik H1N1 *swine-origin influenza virus* (S-OIV) tahun 2009, merupakan hasil *triple reassortment* dari virus avian, manusia dan babi. Selama terjadi *reassortment*, virus influenza baru terbentuk dari pencampuran delapan segmen gen dari dua hospes yang berbeda (Russel and Webster, 2005 ; Hiromoto *et al.*, 2000). Kekhawatiran terjadi pada virus AI ketika terjadi *reassortment* dan mengakibatkan penularan dari hewan ke manusia dan dari manusia ke manusia.

Pandemik H5N1 pada manusia belum terjadi tetapi beberapa penelitian yang dilakukan secara *in vivo* pada hewan model *ferret* menunjukkan perubahan asam amino pada protein virus hospes yaitu HA, polimerase protein dan NP yang berfungsi sebagai pencetus terjadinya adaptasi virus H5N1 ke manusia dan mengakibatkan terjadinya pandemik H5N1 Kim *et al.*, (2010) Sehingga perlu dilakukan kajian untuk mempelajari perubahan asam amino H5N1 pada isolat-isolat virus yang ada.

##### 5. Gen Hemagglutinin (HA) - Virulensi Virus AI

Patogenisitas virus AI adalah pilogenik. Beberapa penelitian yang mengevaluasi *reassortant* virus mengindikasikan bahwa patogenitas tergantung dari fungsi setiap gen yang ada pada virus (Hulse 2 *et al.*, 2004), tetapi protein HA adalah faktor yang paling penting sebagai petanda dari virulensi virus. (Govorkova *et al.*, 2005). Glikoprotein HA adalah antigen permukaan mayor dari virus influenza (Tsuchiya *et al.*, 2001). Virulensi virus berhubungan dengan perubahan *glycosylation* pada gen HA ditambah dengan adanya *polibasic amino acid* pada *cleavage site* gen HA (Hulse 1, *et al.* 2004 ; Hatta *et al.*, 2007 ; Wasilenko *et al.*, 2008). *Reseptor binding* dan membran glykoprotein pada protein HA virus influenza adalah target untuk infeksi dan tempat terjadinya antibodi netralisasi (Nwe *et al.*, 2006 ; Pappas *et al.*, 2009 ; Plotkin *et al.*, 2002). Sejak dari awal terjadinya wabah HPAI H5N1 pada unggas tahun 1996, virus AI mengalami mutasi yang terus menerus. Menurut Asmara (2007), mulai tahun 2005 sudah terjadi perubahan asam amino pada *cleavage site* antigen HA yaitu substitusi asam amino lysine (K) oleh asam amino serin (S) yang diindikasikan virus AI dapat beradaptasi pada saluran pernafasan manusia. Asam amino pada regio *cleavage site* hemagglutinin yang terkait dengan patogenisitas virus AI H5N1 (Rahmiati, 2007).

Beberapa isolat virus yang berasal dari Pulau Jawa sudah mengalami perubahan asam amino pada daerah tersebut (Smith *et al.*, 2006). Gen HA merupakan hal yang harus dikaji karena dapat menyebabkan terjadinya pandemi (Ayora-Talavera *et al.* 2009).

Penularan virus influenza disebabkan oleh faktor agen (virus), lingkungan dan hospes. Peran protein HA terutama *sialic acid a-2,6 linked glycan (a-2,6 glycan)* merupakan faktor utama dalam pandemik H1N1 pada tahun 1918 (de Wit and Fouchier, 2008). Spesifitas reseptor protein HA berhubungan dengan penularan virus influenza (Yamada *et al.*, 2006 ; Ibricevic *et al.*, 2006). Tetapi kemampuan untuk menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada manusia tidak hanya disebabkan oleh reseptor a-2,6 glycan. Gao *et al.*, (2009) menemukan virus AI H5N1 DKGX/35 dan BHGQH/3 mengikat a-2,3 and a-2,6 glycans. Glikoprotein HA virus influenza adalah transmembran protein tipe I yang mengikat residu *sialic acid* pada sel target glikoprotein atau glikolipid. Pengikatan reseptor terletak pada membran HA distal yaitu pada 130-loop, 220-loop, 190 heliks dan terdapat daerah *conserved* lain dari daerah *receptor-binding site*. HA adalah faktor penting dalam menentukan spesifitas hospes karena virus influenza manusia dan unggas mengenali reseptor a-2,6 dan a-2,3 (Yen *et al.*, 2009). Menurut van Hoeven, *et al.*, (2009) penularan virus AI tidak hanya terjadi dengan reseptor spesifik a - 2,3, tetapi pada virus AI yang sudah mengalami mutasi pada gen HA juga memiliki reseptor a-2,6 sedangkan menurut Yen *et al.* (2009), reseptor a-2,3 *sialic acid* virus AI H5N1 dapat menginfeksi manusia dan menyebabkan penyakit yang akut.

Asam amino pada posisi 226 dan 228 adalah merupakan kunci terjadinya pengikatan reseptor virus influenza. Protein HA virus influenza manusia pada posisi 226 Leu dan 228 Seirin. Meskipun virus AI menyebabkan kematian pada manusia tetapi residu 226L dan 228S tidak dapat dideteksi pada isolat sehingga hanya berdasarkan informasi hasil sequencing yang tersedia (Gao *et al.*, 2009). Mutasi yang terjadi pada *receptor binding site* pada gen HA adalah faktor penting selama terjadinya evolusi setiap pandemik virus influenza (Ayora-Talavera *et al*, 2009) . Pada penelitian yang dilakukan Matrosovich *et al* (1999) terhadap isolat pada manusia A/Hk/156/97 menunjukkan adanya reseptor permukaan dari unggas (a-2,3). Penemuan ini mengindikasikan virus AI dapat bereplikasi dan menyebabkan penyakit yang fatal pada manusia tanpa perubahan spesifitas perlekatan terhadap reseptor sialioligosakarida. Gen HA akan mengalami substitusi asam amino per  $10^4$  pertahun pada reservoir alami (Suzuki dan Nei, 2002). Virus AI H5N1 sangat letal

terhadap unggas domestik tetapi patogenisitasnya berbeda pada mamalia termasuk tikus dan *ferret* (Yen *et al.*, 2009)

#### 6. Gen Polimerase Basik-2 (PB-2) – Virulensi Virus AI

Ribonukleoprotein (RNP) terdiri dari empat protein yang disandi oleh satu segmen. Segmen 1 - 3 mengkode tiga subunit *heterotrimeric RNA- dependent* RNA polimerase (PB2, PB1 dan PA) dan segmen kelima mengkode nukleoprotein (NP) yang mengikat *single-stranded* RNA. (Brower-Sinning *et al.*, 2009). Kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi virus AI pada spesies tertentu. Kompleks enzim polimerase dari virus AI 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 (Kencana dkk, 2008 ; Gabriel *et al.*, 2008). Menurut Salomon *et al.*, (2006), bahwa gen-gen polimerase berperan dalam *barier* spesies virus AI dan kompleks polimerase juga penting dalam *host-range*, replikasi dan patogenisitas serta berperan dalam transmisi virus. Kondisi lingkungan panas dan dingin mendukung transmisi virus influenza manusia ke hewan model marmut (Subbarao *et al.*, 1993 ; Massin *et al.*, 2001 ; Gao *et al.*, 2009) .

Pada virus influenza yang menginfeksi manusia ditemukan (PB2-627Lys) sedangkan pada unggas umumnya ditemukan (PB2-627Glu) (Le *et al.*, 2009) . Polimerase kompleks termasuk PB2 berperan dalam virulensi virus. Beberapa mutasi meningkatkan aktifitas polimerase dan virulensi penyakit pada hewan model rodensia. Mutasi ditemukan pada virus H5N1 yaitu substitusi asam amino Glu menjadi Lys pada residu 627 (Jia-Hai *et al.*, 2006 ; Kim, *et al.*, 2010). Amonsin *et al.* (2006) dan Le *et al.*, (2009) juga menyebutkan bahwa adanya substitusi *glutamic acid* (E) menjadi lisin (K) pada residu 627 pada protein PB2 sangat virulen terhadap tikus dan mamalia yang lain. Selain itu perubahan asam amino pada gen polimerase PB2 daerah CR pada posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan virus AI asal unggas ke virus AI asal mamalia. Menurut Brower-Sinning (2009) kompleks polimerase merupakan faktor penting dalam evolusi dan spesifitas hospes terhadap virus influenza A. Menurut Hatta *et al.*, (2001), faktor yang berhubungan dengan patogenitas virus AI H5N1 terhadap tikus yaitu residu 627 pada protein PB2 dan *basic amino acids* pada gen HA.

Selain residu 627, asam amino pada posisi 701 juga sangat penting dalam patogenisitas virus H5N1 pada mencit. Sebagian besar virus AI pada posisi 701 Asp

tetapi A/duck/Guangxi/35/2001 (H5N1) sangat virulen terhadap mencit memiliki posisi 701 Asn (asparagine). PB2-701Asn juga ditemukan pada virus influenza pada kuda dan babi dan beberapa isolat virus H5N1 pada manusia. Kedua asam amino ini merupakan *marker* terjadinya adaptasi virus H5N1 pada manusia (Le *et al.*, 2009). Residu ini menggambarkan patogenisitas virus AI H5N1, H7N7 dan berperan dalam patogenisitas pandemik virus influenza tahun 1918 (Hatta *et al.*, 2001).

*Ferret* dan marmut berhasil digunakan sebagai model untuk mengevaluasi penularan virus AI dan spesies dari virus AI pada mamalia. Virus AI H5N1 menunjukkan tingkat variasi pada replikasi dan virulensi pada hewan model mamalia tikus dan *ferret*. Dari hasil penelitian Ayora-Talavera *et al.*, (2009), PB2 dan HA berperan penting dalam transmisi virus AI H5N1 pada mamalia. Pada gen HA *glycosylation* pada asam amino dengan posisi 150-160 pada protein HA sangat penting dalam pengikatan virus AI H5N1 dengan reseptor pada manusia dan transmisi ke hospes mamalia. Dua asam amino pada gen PB2 yaitu 627 K dan 701N ditemukan pada virus AI H5N1 isolat manusia. Asam amino tersebut diketahui berperan dalam efisiensi replikasi virus AI H5N1 pada tikus. Asam amino 627K dilaporkan mendukung proses replikasi virus AI pada saluran pernapasan bagian dalam tikus dan penting terhadap penularan dari manusia ke manusia. Asam amino residu 701N dan 627K pada gen PB2 dapat meningkatkan transmisi virus AI manusia dan unggas pada hewan model marmut. *Host-barrier* pada virus AI H5N1 penyebaran pada manusia bersifat multigenik (Ayora-Talavera *et al.*, 2009)

### III. KESIMPULAN

Protein HA adalah faktor yang paling penting sebagai petanda dari virulensi virus. Gen HA merupakan hal yang harus dikaji karena dapat menyebabkan terjadinya pandemi terutama perubahan *glycosylation* pada gen HA ditambah dengan adanya *polibasic amino acid* pada *cleavage site* gen HA. Selain itu kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi virus AI pada spesies tertentu terutama adanya perubahan pada asam amino PB2-627Glu dan PB2-701Asn.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amonsin, A., Payungporn, S., Theamboonlers A., Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., Pariyothorn, N., Tantilertcharoen, R., Damrongwantanapokin, S., Buranathai, C., Chaisingh, A., Songserm, T., Poovorawan, Y.. 2006. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* 344 (2006) 480 – 491
- Asmara, W. 2007. Peran Biologi Molekuler dalam Pengendalian Avian Influenza dan Flu Burung. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada. <http://www.komnasfbpi.go.id>.
- Ayora-Talavera, G., Shelton, H., Scull, M. A., Ren, J., Ian M., Pickles, R. J., Barclay, W. S .. 2009. Mutations in H5N1 Influenza Virus Hemagglutinin that Confer Binding to Human Tracheal Airway Epithelium. *PLoS ONE*, Volume 4 Issue 11 .
- Brower-Sinning, R, Carter, D.M, Crevar, CJ, Ghedin, E, Ross, T. M, Benos, P. V . The role of RNA folding free energy in the evolution of the polymerase genes of the influenza A virus. *Genome Biology* 2009, 10:R18
- Capua ,I., and Marangon, S.. 2006. Control of Avian Influenza in Poultry. *Emerging Infectious Diseases* • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 12, No. 9,
- Chen, H., Smith, G.J.D., Li, K.S. Wang, J., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., et.al.. 2005. Establishment of Multiple Sublineages of H5N1 Influenza Virus in Asia :Implications for Pandemic Control. *PNAS* vol 103 (8) p. 2845 – 2850
- Chen., L.M., Davis C. T., Zhou, H., Cox, N. J., Donis, R. O. 2008. Genetic Compatibility and Virulence of Reassortants Derived from Contemporary Avian H5N1 and Human H3N2 Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*, Volume 4 Issue 5
- Dahlan, S. 2004. *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Arkans. Jakarta
- Dahlan, S. 2005. *Besar Sampel dalam Penelitian Kedokteran Kesehatan*. Arkans. Jakarta
- De Jong, M.D., Hien, T.T. 2006. Review : Avian Influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 35 p. 2 -13.
- De Wit , E., Fouchier,R. A.M.. 2008. Emerging influenza. *J Clin Virol.*; 41(1): 1–6. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.017
- Dharmayanti, N.L.P.I.; Damayanti, R., Wiyono, A., Indriani, R., Darminto. 2004. Identifikasi Virus Avian Influenza Isolat Indonesia dengan Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Rection (RT-PCR). *JITV* 9(2): 136-143.
- Escorcia, M., Vazquez, L., Mendez, S.T., Ropon, A.R., Lucio, E., Nava, G.M.. 2008. Avian Influenza : Genetic Evolution Under Vaccination Pressure. *Virology Journal*, 5 : 15.
- FKH Unair. 2006. *Virus Avian Influenza dan Vaksin : Kajian Biologi Molekuler dan Respon Imun pada Babi, Burung Liar dan Unggas Air*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Gabriel, G. I., Herwig, A., Klenk, H. D.. 2008. Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin  $\alpha 1$  Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathogens* Volume 4 Issue 2

- Gao, Y., Zhang, Y., Shinya, K, Deng, G, Jiang, Y, Li, Z. , Guan, Y, Tian, G, Li, Y, Shi, J., , Liu, L., , Zeng, X, Bu, Z, Xia, X, Kawaoka, Y., Chen, H. 2009. Identification of Amino Acids in HA and PB2 Critical for the Transmission of H5N1 Avian Influenza Viruses in a Mammalian Host. *PLoS Pathogens*, Volume 5 Issue 12
- Gibs , M.J., Armstrong, J. S., Gibs, A.J.. 2001. Recombination in the Hemagglutinin Gene of the 1918 Spanish Flu. *Science* Vol 293 1842 [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P, Kawaoka, Y.. 2001. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science*, Vol 293 [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- Hatta, M., Hatta, Y., Kim, J. H., Watanabe, S., Shinya, K., Nguyen, T., Lien, P. S, Le, Q.M, Kawaoka, Y. 2007. Growth of H5N1 Influenza A Viruses in the Upper Respiratory Tracts of Mice. *PLoS Pathogens* Volume 3 Issue 10
- Hiroto, Y., Yamazaki, Y., Fukushima, T. , Saito, T., Lindstrom, S. E. Omoe, K., Nerome, R., Lim, W, Sugita, S, Nerome, K. 2000. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *Journal of General Virology* (2000), 81, 1293–1303
- Herfst, S., Chutinimitkul, S., Ye, J., de Wit, E., Munster, V.J., . Schrauwen E. J. A, Bestebroer, T. M., Jonges , M., Meijer, A., Koopmans, M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus A.D. M. E., Perez, D.R., Fouchier, R. A. M. 2010. Introduction of Virulence Markers in PB2 of Pandemic Swine-Origin Influenza Virus Does Not Result in Enhanced Virulence or Transmission. Vol. 84, No. 8p. 3752–3758
- Ibricevic, A., Pekosz, A., Walter, M. J., Newby, C. Battaile, J. T., Brown, E. G , Holtzman, I M. J., Brody, S. L.. 2006. Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology* , p. 7469–7480 Vol. 80, No. 15
- Jackson, R., Hoeven, N.V., Chen, L.M., Maines, T.R., Cox, N. C, Katz, J.M., Donis, R.O..2009. Reassortment between Avian H5N1 and Human H3N2
- Kencana, G.A, Asmara, W., Tabbu, C.H., Mahardika, IG.NK. 2008. Amino Terminus Gen Polimerase Basik-2 Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Berbagai Spesies Hewan di Indonesia. *Jurnal Veteriner* Vol. 9 No. 3 : 107-114
- Influenza Viruses in Ferrets: a Public Health Risk Assessment. *Journal of Virology* p. 8131–8140 Vol. 83, No. 16
- Lu Jia-hai, Zhang Ding-mei, Wang Guo-ling. 2006. Medical prog, ess Highlight the significance of genetic evolution of H5N1 avian flu. *Chin Med J* 119 (17):1458-1464
- Lam Y. T.T., , Hon, C.C., Pybus, O.G, Kosakovsky Pond, S.L, Wong, R.T.Y., Yip, C.W., Zenf, F., Leung, F.C.C. 2008 . Evolutionary and Transmission Dynamics of Reassortant H5N1 Influenza Virus in Indonesia *Plos Pathogens*, vol 4, Issue 8. Available at [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org)
- Le, Q.M, SQuykai Tagawa, Y., Ozawa, M., Ito, M., Kawaoka, Y. 2009. Selection of H5N1 Influenza Virus PB2 during Replication in Human. *Journal of Virology* Vol. 83, No. 10, p 5278–5281
- Mahardika, I.G.N.. 2006. Peran Berbagai Hewan dalam Genesis Pandemi Avian Influenza. *Hemera Zoa* ISSN 0437-2514 Vol 83 (1).

- Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, M., and Kida, H.. 2009. PB2 Protein of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) Determines Its Replication Potential in Pigs *Journal of Virology* Vol. 83, No. 4, p. 1572–1578
- Massin, P, Van Der Werf, S., Naffakh, N.. 2001 Residue 627 of PB2 Is a Determinant of Cold Sensitivity in RNA Replication of Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*. Vol. 75, No. 11, p. 5398–5404
- Medion Online. 2009. Penelitian Tentang AI dari Medion. <http://info.medion.co.id>
- Melidou, A Gioula, G , Exindari, M, Chatzidimitriou, D, Diza-Mataftsi, E. . 2009. Influenza A (H5N1) an overview of the current situation. *Eurosurveillance* Vol . 14 - Issue 20 · 21 May 2009 · [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)
- Muflihanah, Hardiman, Dini, WY, Ratna, Supri , Yudi, T, Benyamin K.S.. 2007. Evaluasi TaqMan Real Time Reverse Transcriptase PCR (RRT-PCR) dalam Diagnosa Avian Influenza Type A dan Subtype H5. *Diagnosa Veteriner*, vol 5 No 1. ISSN 0216-1486.
- Nidom, C.A. 2005. Analisis Molekuler Genome Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Ringkasan Desertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Radji, M.. 2006. Avian influenza A (H5N1) : Patogenesis, Pencegahan dan penyebaran pada manusia. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. III, No.2, Agustus 2006, 55 - 65
- Russell. C.J and Wabster, R.G. The Genesis of a Pandemic Influenza Virus. 2005 DOI 10.1016/j.cell..10.016
- Salomon R., Franks, J., Govorkova, E. A., Ilyushina, N. A ., Yen, H.L., Hulse-Post, D. J., Humberd, J., Trichet, M., Rehg, J.E., Webby, R. J., Webster, R. G., Hoffmann, E. 2006. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *JEM* , Vol. 203, No. 3, March 20, 2006 689–697 [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20051938](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20051938)
- Sardjito. 1993. *Orthomyxoviridae : Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Sastroasmoro, S., Ismael, S.. 2008. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Sagung Seto. Jakarta.
- Shaffer, C. 2006. Mapping Avian Flu Mutations. *G&P magazine: Vol. 6, No. 6, June 2006, pp. G4-G6*.
- Shahid, M. A., Abubakar, M, Hameed, S., Hassan, S.. 2009. Avian influenza virus (H5N1); effects of physico-chemical factors on its survival. *Virology Journal* 2009, 6:38 <http://www.virologyj.com/content/6/1/38>
- Smith, G.J.D., T.S.P Naipospos, T.D. Nguyen, M.D. de Jong, D. Vijaykrishna, T.B. Usman, S.S. Hassan, T.V. Nguyen, T.V.Dao, N.A. Bui, Y.H.C. Leung, V.C. Nguyen, T.T. Hien, J. Farrar, R.G. Webster, H. Chen, J.S.M Peiris, Y.Guan. 2006. Evolution and Adaptation of H5N1 Influenza Virus in Avian and Human Hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350 (2006) 258 – 268.

- Steinhauer, D. A. 1999. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology* 258, 1±20 (1999) . Article ID viro.1999.9716, available online at <http://www.idealibrary.com> on.
- Subbarao, E.K., London, W., Murphy, B. R. 1993. A Single Amino Acid in the PB2 Gene of Influenza A Virus Is a Determinant of Host Range. *Journal of Virology* Vol. 67, No. 4 p. 1761-1764
- Susanti, R, Soejoedono, R.D., Mahardika, I.G.N.K., Wibawan, I. W.T., Suhartono, M. G..2008. Filogenetik dan Struktur Antigenik Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Isolat Unggas Air. *Jurnal Veteriner*, vol 9. No 3 : 99 -106
- Suwarno, Raharjo, A.P., Faizah, Srihanto, E.A.. 2006. Karakterisasi Avian Influenza dengan Uji Serologik dan Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction. *Media Kedokteran Hewan*, Vol 22 No. 2.
- Suzuki, Y., Nei, M. 2002. Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes. *Molecular Biology and Evolution*. 19(4):501–509
- Swayne, D.E., Senne, D.A., Beard, C.W.. 1998. Avian Influenza. A Laboratory Manual for The Isolation and Identification of avian Pathogens. Fourth Edition. American Association of Avian Pathologist. Kennett Square. Pennsylvania
- Takano, R., Nidom, C.H., Kiso, M., Muramoto, Y., Yamada, S., Tagawa, Macken, C., Kawaoka, Y.. 2009. Phylogenetic Characterization of H5N1 Avian Influenza Viruses Isolated in Indonesia from 2003 -2007. *Virology* 390 (2009) p. 13-21
- Thontiravong A., Sunchai, P., Jutathip, K., Salin, C, Aumitra, W., Sudarat, D., Arunee C., Apiradee, T., Yong, P., dan Kanisak, O. 2007. The Single Step Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting H5 and H7 Avian Influenza A Viruses. *Tohoku Journal. Exp.Med* Vol 211 p.75-79
- Tim AI FKH Unair. 2006. Virus Avian Influenza dan Vaksin : Kajian Biologi Molekuler dan Respon Imun pada Babi, Burung Liar dan Unggas Air. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Van Hoven , N. , Pappas, C., Belsera, J. A., Mainesa, T. R., Zeng, H, Garcí'a-Sastreb, A., Sasisekharan, R., Katz, J. M., Tumpey, T. M.. 2009. Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *PNAS* vol. 106 no. 9 page 3366–3371 [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0813172106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0813172106)
- WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. 2008. Towards a Unified Nomenclature System for Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Viruses. *Emerge. Infect Dis*. 14.
- WHO. 2010. Cumulative Number of Confirmed Human cases of avian influenza A (H5N1) Reported to WHO. Available from [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2009\\_09\\_24/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_09_24/en/index.html)
- Wibawan, I.W.T., Mahardika. I.G.N.. 2006. Mekanisme Kekebalan terhadap Avian Influenza pada Unggas. *Hemera Zoa* ISSN 0437-2514 Vol 83 (1).

- Wiyono, A., Indriani, R, Dharmayanti, N.L.P.I, Damayanti, R., Parede, L., Syafriati, T., Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5 dari Ayam Asal Wabah di Indonesia. *JITV* Vol. 9 No. 1 Th. 2004
- Wong, F., Stevens, V., Davies, K.. 2008. Sequencing of Avian Influenza, *Laboratory Procedures*. CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory. Victoria Australia.
- Yamada, S., Suzuki, Y, Suzuki, T., . Le, M. Q, Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y, Muramoto, Y, Ito, M., Kiso, M, Horimoto, T, Shinya, K., Sawada, T, Kiso, M, Usui, T, Murata, T., Lin, Y, Hay, A., Haire, L.F., Stevens, D.J., Russell, R.J, Gamblin, S. J., Skehel, J. J., Kawaoka, Y. 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* Vol 444
- Yen, H.L., Aldridge, J. R., Boon, A C. M., Ilyushina, N A., Salomon, R, Hulse-Posta, D. J., Marjuki, H., Franks, J., Boltz, D. A., Bush, D, Lipatov, A. S., Webby, R. J., Rehg, J. E., Webster, R.G. 2009. Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin receptor binding domain affect systemic spread. *PNAS* vol. 106 no. 1 286291. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811052106](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811052106)