

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI GENETIK VIRUS *LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA* (LPAI) SUBTIPE H7N1 DAN H10N2 PADA ITIK DENGAN TEKNIK *NEXT GENERATION SEQUENCING* (NGS)

Lestari¹, Hendra Wibawa¹, Elly Puspasari Lubis¹, Rina Astuti Rahayu², Ira Pramastuti², Zaza Famia¹, Vika Yunita¹, Herdiyanto Mulyawan², Bagoes Poernadjaja³

¹Medik Veteriner Balai Besar Veteriner Wates

²Paramedik Veteriner Balai Besar Veteriner Wates

³Kepala 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 *avian influenza* (AI) dikategorikan menjadi beberapa sub tipe berdasarkan determinan antigen yang terdapat pada protein permukaan *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA) yang dimilikinya. Itik termasuk salah satu unggas air yang merupakan reservoir alami virus AI. Semua sub tipe virus AI pernah diisolasi dari unggas air tersebut. Namun, penelitian tentang sub tipe selain H5N1 dan H9N2 pada itik di Indonesia belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengarakterisasi secara genetik sub tipe virus *avian influenza* yang diisolasi dari itik yang terdeteksi positif influenza tipe A namun negatif sub tipe H5N1 dan H9N2.

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel/isolat virus AI asal unggas itik yang telah terdeteksi positif virus influenza tipe A (positif gen matrik) dan negatif sub tipe H5 dan H9 dengan pengujian realtime RT-PCR. Multi-segmen konvensional RT-PCR digunakan untuk mengamplifikasi genom virus AI kemudian dilanjutkan *sequencing* genom utuh virus dengan teknik *Next Generation Sequencing* (NGS). Analisis hasil *sequencing* dilakukan dengan software *CLC Genomic Workbench*. Analisis genetik dan filogenetik menggunakan konstruksi *neighbor-joining tree* dengan nilai replikasi *bootstrap* sebanyak 1000 kali menggunakan software *Mega v7*.

Berdasarkan analisis molekuler menunjukkan bahwa gen HA dan NA virus-virus dalam penelitian ini termasuk dalam sub tipe H7N1 dan H10N2. Karakterisasi genetik menunjukkan bahwa semua virus memiliki residu asam amino *single basic* pada HA *cleavage site* yang mengindikasikan *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Analisis gen internal PB2 menunjukkan bahwa semua virus tidak memiliki substitusi asam amino E pada posisi 627 menjadi K (E237K) mengindikasikan tingkat virulensi yang rendah pada mamalia. Analisis terhadap resistensi obat-obatan antivirus pada gen NA menunjukkan asam-asam amino E119 dan H275 serta pada gen M2 menunjukkan asam-asam amino L26, V27 dan S31 mengindikasikan bahwa virus-virus tersebut sensitif terhadap obat-obatan antivirus. Desain primer-primer baru dalam pengujian PCR untuk mendeteksi virus AI sub tipe selain H5N1 dan H9N2 perlu dikembangkan dan karakterisasi genetik rutin sebaiknya terus dilakukan guna mendeteksi dini semua sub tipe virus-virus *avian influenza* yang bersirkulasi di lapangan.

Kata kunci: Itik, LPAI, H7N1, H10N2, *Next Generation Sequencing*

PENDAHULUAN

Virus influenza tipe A merupakan jenis virus *single stranded ribonucleic acid* (ssRNA) yang tergolong ke dalam famili *orthomyxoviridae*. Diantara member famili *orthomyxoviridae*, virus influenza tipe A merupakan virus paling virulen yang dapat menginfeksi berbagai spesies avian maupun mamalia. Virus ini memiliki 8 gen bersegmen yang terdiri dari *Polymerase basic 2* (PB2), *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase acid* (PA), *hemagglutinin* (HA), *nucleoprotein* (NP), *neuraminidase* (NA), *matrix* (M) dan *nonstructural* (NS) dimana gen-gen tersebut

mengkode 8 protein structural (PB2, PB1, PB1-F2, PA, HA, NA, NP, M1 and M2) dan 2 protein non-structural (NS1 dan NS2) (Lamb and Krug, 1996). Berdasarkan glikoprotein permukaan HA dan NA, virus influenza tipe A diklasifikasikan menjadi sub tipe H1-H18 dan N1-N11. Hampir semua sub tipe virus influenza ini telah diidentifikasi dari unggas air, termasuk itik, yang merupakan reservoir alami virus influenza tipe A. Unggas air yang terinfeksi virus influenza biasanya bersifat asimtomatik sehingga tidak menunjukkan gejala klinis (Webster *et al.*, 1992). Namun demikian, berbagai penelitian terkini melaporkan bahwa infeksi virus *avian influenza* menyebabkan gejala klinis berat hingga kematian pada unggas air (Ellis *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2006; Wibawa *et al.*, 2014).

Virus HPAI sub tipe H5N1 telah bersirkulasi di Indonesia sejak tahun 2003. Virus HPAI H5N1 ini telah menyebabkan banyak kematian pada ayam (layer, broiler, domestik) maupun itik (OIE, 2004; Dharmayanti *et al.*, 2014). Belasan tahun kemudian pemerintah melaporkan adanya virus *avian influenza* sub tipe H9N2 yang bersirkulasi di Indonesia, dimana virus ini telah menyebabkan penurunan produksi telur dan peningkatan angka morbiditas pada peternakan ayam (Jonas *et al.*, 2018). Diagnosa virus *avian influenza* sub tipe H5N1 dan H9N2 dengan metode *real time* RT-PCR telah rutin dilakukan di laboratorium BBVet Wates Yogyakarta. Namun demikian, beberapa virus *avian influenza* tidak dapat dideteksi dengan primer-primer H5 maupun H9 sehingga diperlukan metode deteksi lebih lanjut untuk mengidentifikasi sub tipe dari virus-virus tersebut guna mendeteksi dini kemungkinan munculnya virus *avian influenza* sub tipe lain yang beredar di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengarakterisasi secara genetik sub tipe virus *avian influenza* yang diisolasi dari itik yang terdeteksi positif influenza tipe A namun negatif sub tipe H5N1 dan H9N2.

MATERI DAN METODE

Sebanyak 5 sampel yang berasal dari sampel surveilans aktif maupun surveilans pasif BBVet Wates Yogyakarta telah diseleksi dan digunakan dalam penelitian ini. Secara detail, 2 sampel berasal dari Kabupaten Trenggalek Jawa Timur dan 1 sampel berasal dari Kabupaten Batang Jawa Tengah pada program surveilans *avian influenza* pada itik. Dua sampel lainnya berasal dari Kabupaten Purbalingga Jawa Tengah pada program Kajian Endemisitas HPAI (Program Kerjasama Ditjen PKH dan FAO) di Indonesia. Dalam proses seleksi sampel didasarkan pada kriteria meliputi: 1) sampel berupa isolat virus yang telah terdeteksi influenza tipe A namun negatif sub tipe H5 dan H9 dengan pengujian Real time RT-PCR, 2) sampel belum pernah dilakukan *sequencing* dan karakterisasi, dan 3) volume sampel mencukupi untuk dilakukan pengujian lebih lanjut. Sampel-sampel isolat tersebut berupa cairan allantois dengan original sampel berasal dari swab oropharing dan kloaka yang diisolasi dari itik pada tahun 2015-2017. Detail keterangan sampel disajikan dalam table 1.

Table 1. Detail sampel yang digunakan dalam penelitian

Sampel	Jenis sampel	Original sampel	Asal Kabupaten	Tahun koleksi
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015	Cairan allantois	Swab oropharing&kloaka	Trenggalek	2015
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015	Cairan allantois	Swab oropharing&kloaka	Trenggalek	2015
A/duck/Batang/04170537-51/2017	Cairan allantois	Swab oropharing	Batang	2017
A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017	Cairan allantois	Swab oropharing	Purbalingga	2017
A/duck/Purbalingga/04170005-8/2017	Cairan allantois	Swab oropharing	Purbalingga	2017

Keseluruhan sampel yang berupa cairan allantois kemudian dilakukan ekstraksi RNA dengan menggunakan kit *QiaAmp viral RNA Minikit* (Qiagen, Germany). Metode *Multi segment reverse transcription polymerase chain reaction* (MRT-PCR) dipakai untuk mengamplifikasi keseluruhan genom virus *avian influenza* menggunakan reagen *Superscript III one step RT-PCR system with platinum taq polymerase kit* (Invitrogen, California USA) dengan primer spesifik MBTuni 13 dan 14 (Zhou et al., 2009). Visualisasi hasil PCR dilakukan dalam agarose gel 1.5% dibawah sinar ultraviolet (UV). Selanjutnya produk PCR dipurifikasi menggunakan *DNA Clean and ConcentratorTM-5* (Zimo Research Corp.) sesuai standar prosedur. DNA yang telah dipurifikasi selanjutnya *disequencing* dengan metode *whole genome sequencing*. Preparasi *DNA library* dilakukan dengan menggunakan *Kit nextera XT DNA* (Illumina Inc.) dan *sequencing* dilakukan dengan mesin *Next Generation Sequencer* (NGS) Illumina (MiSeq) menggunakan *MiSeq reagen Kit V2* sesuai dengan manual prosedur (Illumina). Validasi hasil *sequencing* dilakukan di dalam *CLC Genomic Workbench* (CLC Bio, Denmark).

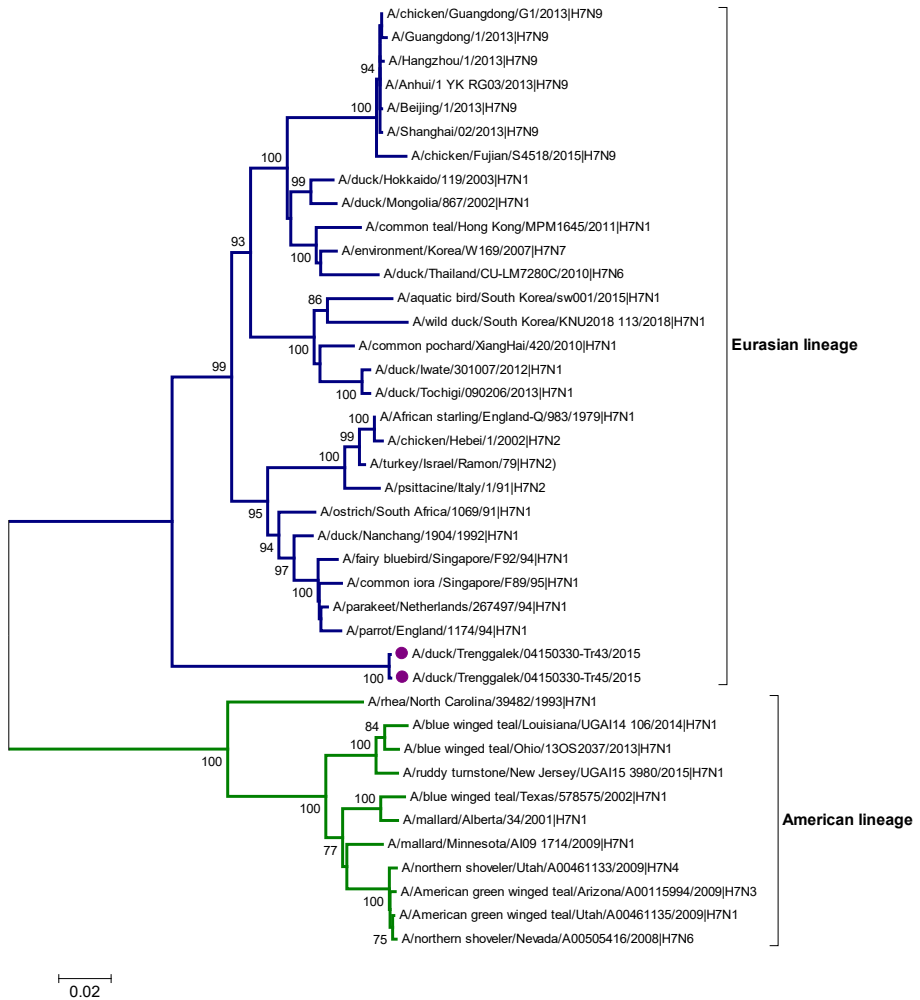
Analisis filogenetik dan genetik dilakukan dengan mengikutsertakan sekuens dari referensi virus *avian influenza* yang berasal dari GenBank dan didownload melalui NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dan Influenza Research Database (<https://www.fludb.org>). *Sequence alignment* dari tiap-tiap gen segmen virus dilakukan dengan program Muscle v3.6. Pohon Filogenetik dikonstruksi di dalam software MEGA 7 dengan metode *neighbor-joining algoritm with kimura-2 parameter* dan bootstrap analysis sebanyak 1000 replikasi (Kumar et al., 2016).

HASIL

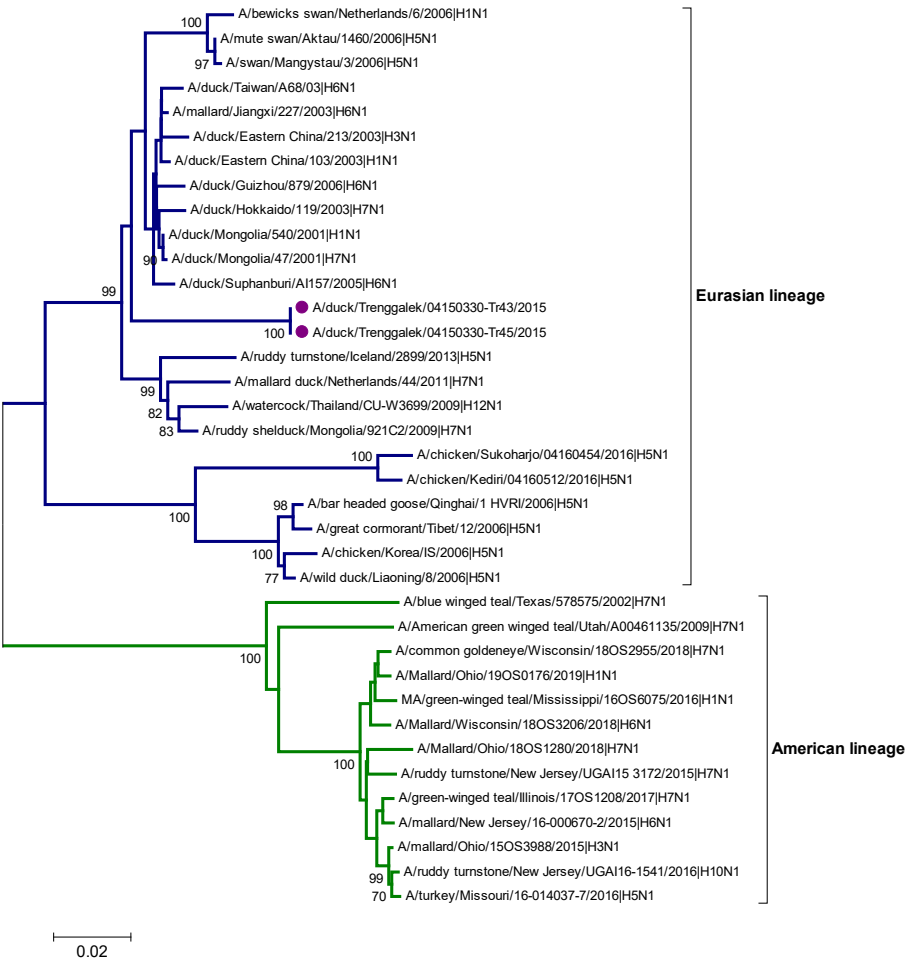
Analisis hasil *sequencing* menunjukkan bahwa keseluruhan gen segmen virus *avian influenza* dari total 5 sampel dalam penelitian ini telah berhasil *disequencing* secara utuh (*complete gene*). Analisis filogenetik gen HA menunjukkan bahwa 2 virus A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015 dan A/

duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015 termasuk dalam kluster virus *avian influenza* H7 group Eurasian lineage. Namun demikian, kedua gen HA7 dari virus H7N1 tersebut memiliki homologi yang rendah (<86%) terhadap gen HA7 dari virus subtype H7N9 yang berasal dari China, dimana virus tersebut telah menyebabkan infeksi pada manusia (Gambar 1). Di sisi lainnya, sampel A/duck/Batang/04170537-51/2017, A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017 dan A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017 tergolong ke dalam kluster virus *avian influenza* H10 lineage Eurasian (Gambar 2). Berdasarkan BLAST analysis, ketiga gen HA10 ini memiliki homologi tertinggi dengan virus AI subtype H10 yang berasal dari Indonesia (A/duck/Indonesia/Jakarta Utara 1631-29/2006).

Analysis terhadap gen NA1 menunjukkan bahwa dua virus A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015 dan A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015 tercluster ke dalam virus-virus subtype N1. Sama halnya seperti pada gen HA, virus-virus subtype N1 tersebut tercluster ke dalam *avian influenza* virus lineage Eurasian (Gambar 3). Walaupun begitu, kedua virus ini tidak tercluster menjadi satu dengan virus-virus H5N1 yang berasal dari Indonesia maupun negara Asia lainnya. Hasil analisis filogenetik pada gen NA dari ketiga virus A/duck/Batang/04170537-51/2017, A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017 dan A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017 menunjukkan bahwa virus-virus tersebut termasuk ke dalam cluster NA2 lineage Eurasian dan tidak tergabung menjadi satu cluster dengan virus-virus N2 dari subtype H9N2 yang berasal dari Indonesia dan negara-negara asia lainnya (gambar 4). Analysis filogenetik lebih lanjut terhadap semua gen internal PB2, PB1, PA, NP, M dan NS menunjukkan bahwa semua gen internal dari virus-virus subtype H7N1 dan H10N2 ini termasuk dalam group virus-virus *avian influenza lineage* Eurasian (data tidak ditampilkan).



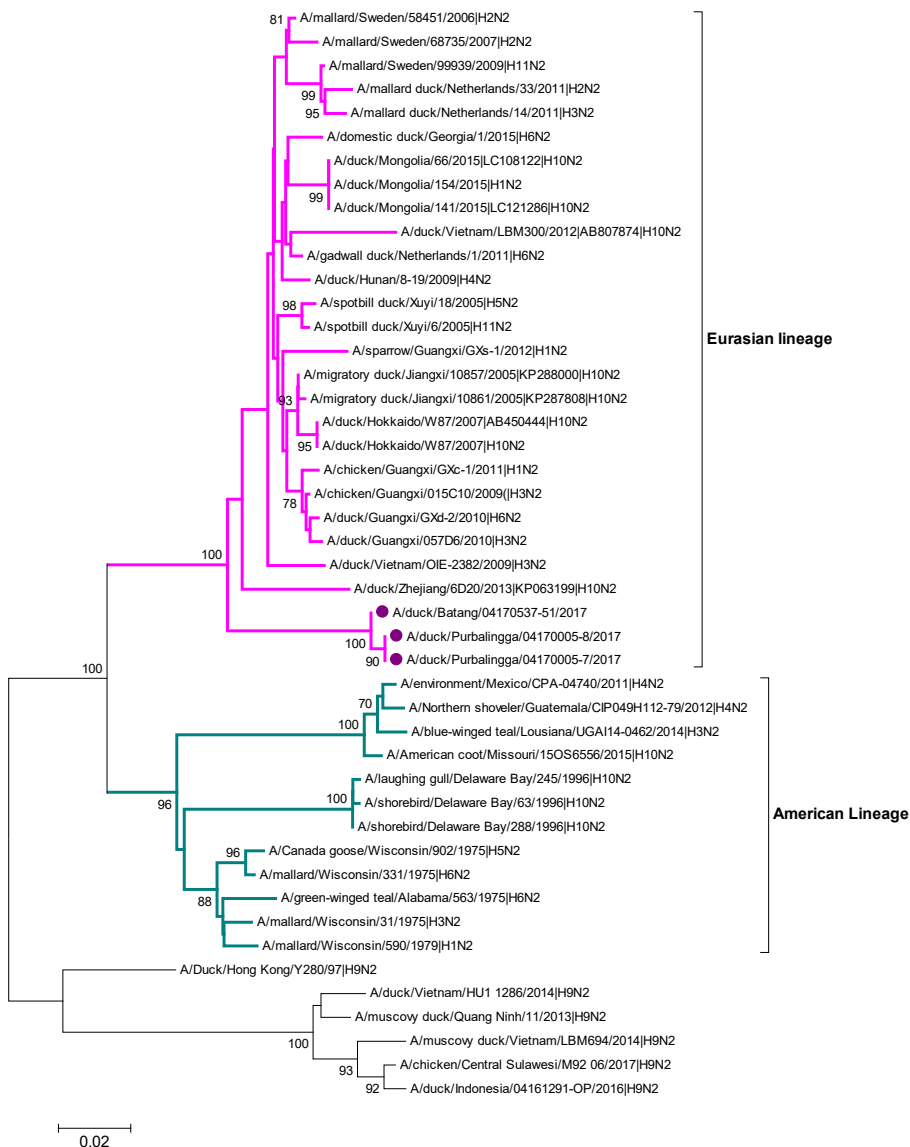
Gambar 1. Analisis filogenetik dengan metode *neighbor-joining algorithm with kimura-2 parameter* dan *bootstrap analysis* 1000 replikasi dari gen HA7. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H7N1 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan asam nukleat.



Gambar 2. Analisis filogenetik dengan metode *neighbor-joining algorithm with kimura-2 parameter* dan *bootstrap analysis* 1000 replikasi dari gen NA1. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H7N1 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan asam nukleat.



Gambar 3. Analisis filogenetik dengan metode *neighbor-joining algorithm with kimura-2 parameter* dan *bootstrap analysis* 1000 replikasi dari gen HA10. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H10N2 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan asam nukleat.



Gambar 4. Analisis filogenetik dengan metode *neighbor-joining algorithm with kimura-2 parameter* dan *bootstrap analysis* 1000 replikasi dari gen NA2. Simbol lingkaran menunjukkan virus-virus H10N2 dalam penelitian ini. Skala bar menunjukkan jarak matrix diantara pasangan asam nukleat.

Berdasarkan analisis genetik terhadap sekuens asam amino dari gen HA memperlihatkan motif asam amino *single basic* pada HA *cleavage site* 'PEGPKGR' dan PKGPKGR' dari virus-virus subtype H7N1 dan 'PEIIQGR' dari virus-virus subtype H10N2 mengindikasikan LPAI (Gambar 5). Analisis genetik lebih lanjut

terhadap gen HA pada *reseptor binding site* (RBS) posisi 226 menunjukkan bahwa semua virus dalam penelitian ini membawa asam amino glutamine (Q226) yang cenderung berikatan dengan reseptor dari avian spesies ($\alpha 2.3$ NeuAcGal lineages) (gambar 6). Analisis genetik terhadap resistensi obat-obatan oseltamivir dari gen NA1 dan NA2 pada posisi 119 menunjukkan asam amino glutamic acid (E119) dan gen NA1 pada posisi 275 menunjukkan asam amino histidine (H275). Hal ini mengindikasikan tidak terjadi substitusi asam-asam amino pada gen NA dihubungkan dengan resistensi terhadap NA inhibitor (Gambar 7). Analisis lebih lanjut terhadap resistensi obat antiviral amantadine pada gen M2 pada posisi 26, 27 dan 31 secara berturut-turut memperlihatkan asam amino leucine, valine dan serine (L26, V27 dan S31) menunjukkan bahwa virus-virus dalam penelitian ini sensitif terhadap obat-obatan antiviral golongan amantadine (Gambar 8). Substitusi asam amino glutamic acid menjadi lysine posisi 627 (E627K) pada gen PB2 memiliki peran dalam peningkatan patogenesitas pada mamalia (tikus). Mutasi ini tidak terjadi pada kelima virus dalam penelitian ini yang memiliki asam amino glutamic acid (E627) pada gen PB2 (Gambar 9).

H7N1		320	330	340	350	360
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015		CPRYVKQGSLLLATGMKNV	PEGPKGR	SLFGAIA	GIAGFIENGW	GLVDGWYGF
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015		CPRYVKQGSLLLATGMKNV	PEGPKGR	SLFGAIA	GIAGFIENGW	GLVDGWYGF

H10N2		330	340	350	360	370
A/duck/Batang/04170537-51/2017		LMLATGMRNV	PEIIQGR	SLFGAIA	GIAGFIENGW	GLVDGWYGF
A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017		LMLATGMRNV	PEIIQGR	SLFGAIA	GIAGFIENGW	GLVDGWYGF
A/duck/Purbalingga/04170005-8/2017		LMLATGMRNV	PEIIQGR	SLFGAIA	GIAGFIENGW	GLVDGWYGF

Gambar 5. Motif asam amino *single basic* pada HA *cleavage site* dari gen HA7 dan HA10 dari virus H7N1 dan H10N2

H7N1		210	220	230	240
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015		KLYGSGNKLITV	GSSNYQQSF	VNPGAR	PQVNC
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015		KLYGSGNKLITV	GSSNYQQSF	VNPGAR	PQVNC

H10N2		210	220	230	240	250
A/duck/Batang/04170537-51/2017		GTQSL	SISVGS	SSTYQNNF	VPVVGAR	PRVNG
A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017		GTQSL	SISVGS	SSTYQNNF	VPVVGAR	PRVNG
A/duck/Purbalingga/04170005-8/2017		GTQSL	SISVGS	SSTYQNNF	VPVVGAR	PRVNG

Gambar 6. *Reseptor binding site* (RBS) posisi 226 (H3 numbering) pada gen HA7 dan HA10 dari virus H7N1 dan H10N2

H7N1		110	120	130	140	150
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015		SRGDVFVIR	EPFISCSH	SECR	TSVELNAPN	HYECCSCYPDAGEIMC
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015		SRGDVFVIR	EPFISCSH	SECR	TSVELNAPN	HYECCSCYPDAGEIMC

H10N2		100	110	120	130	140	150
A/duck/Batang/04170537-51/2017		APFSKDNS	SIRLSAGG	DIWVTR	EPYVSCSP	PNKCYCFALG	GGTTLNNKHSNGTI
A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017		APFSKDNS	SIRLSAGG	DIWVTR	EPYVSCSP	PNKCYCFALG	GGTTLNNKHSNGTI
A/duck/Purbalingga/04170005-8/2017		APFSKDNS	SIRLSAGG	DIWVTR	EPYVSCSP	PNKCYCFALG	GGTTLNNKHSNGTI

Gambar 7. Oseltamivir resistance marker posisi 119 dan 275 pada gen NA1 dan posisi 119 pada gen NA2 dari virus H7N1 dan H10N2

H7N1, H10N2	10	20	30	40
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015/2017	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSDLVLAAS	IIIGILHLILWILDRIF		
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2017	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSDLVLAAS	IIIGILHLILWILDRIF		
A/duck/Batang/04170537-51/2017	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSDLVLAAS	IIIGILHLILWILDRIF		
A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSDLVLAAS	IIIGILHLILWILDRIF		
A/duck/Purbalingga/04170005-8/2017	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSDLVLAAS	IIIGILHLILWILDRIF		

Gambar 8. Amantadine resistance marker posisi 26, 27 dan 31 pada gen M2 dari virus H7N1 dan H10N2

H7N1, H10N2	610	620	630	640
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015	TFDDTVQIIKLLPFAAAPHE	CSRMCFSSLTNNVRGSGMRIL		
A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015	TFDDTVQIIKLLPFAAAPHE	CSRMCFSSLTNNVRGSGMRIL		
A/duck/Batang/04170537-51/2017	TFDDTVQIIKLLPFAAAPHE	CSRMCFSSLTNNVRGSGMRIL		
A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017	TFDDTVQIIKLLPFAAAPHE	CSRMCFSSLTNNVRGSGMRIL		
A/duck/Purbalingga/04170005-8/2017	TFDDTVQIIKLLPFAAAPHE	CSRMCFSSLTNNVRGSGMRIL		

Gambar 9. Analisis gen PB2 terhadap patogenesitas pada posisi 627 dari virus H7N1 dan H10N2

PEMBAHASAN

Berdasarkan analisis filogenetik gen HA menunjukkan bahwa 2 virus A/duck/Trenggalek/04150330-Tr43/2015 dan A/duck/Trenggalek/04150330-Tr45/2015 terkluster kedalam virus-virus subtype H7 lineage Eurasian, sedangkan 3 virus lainnya (A/duck/Batang/ 04170537-51/2017, A/duck/Purbalingga/04170005-7/2017 dan A/duck/Purbalingga/04170005-7/ 2017) termasuk dalam kluster virus-virus subtype H10 lineage Eurasian. Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa virus-virus subtype H7 dalam penelitian ini memiliki angka homologi yang rendah (<86%) bila dikomparasikan dengan virus subtype H7N9 (A/Shanghai/1/2013, A/Shanghai/2/2013, A/Anhui/1/2013) yang menyebabkan infeksi pada manusia di China (Gao *et al.*, 2013). Hal ini menandakan bahwa susunan genetik dari gen HA7 pada *human isolate* H7N9 dari China berbeda jauh dengan genetik gen HA7 dari Indonesia. Analisis filogenetik gen NA memperlihatkan kedua sub tipe H7 dalam penelitian ini terkluster dengan virus-virus N1 lineage Eurasian, sedangkan ketiga subtype H10 tergabung dalam cluster virus-virus N2 lineage Eurasian. Analisis filogenetik gen NA juga menunjukkan bahwa dua virus H7N1 ini tidak memiliki subkluster yang sama dengan virus-virus H5N1 dari Indonesia maupun negara Asia lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa ancestor yang dimiliki oleh gen N1 pada virus H7N1 Indonesia berbeda dengan ancestor yang dimiliki oleh gen N1 pada virus H5N1 dari Indonesia dan Asia. Selain itu, gen NA2 dari ketiga virus H10N2 juga tidak tergabung menjadi satu cluster dengan virus-virus N2 dari subtype H9N2 yang berasal dari Indonesia dan negara Asia lainnya, mengindikasikan bahwa gen NA dari kedua sub tipe virus H10N2 Indonesia dengan virus H9N2 tersebut memiliki ancestor yang berbeda. Semua gen internal PB2, PB1, PA, NP, M dan NS dari semua virus dalam penelitian ini termasuk dalam group virus-virus *avian influenza* lineage Eurasian. Bersirkulasinya beberapa sub tipe virus *avian influenza* di Indonesia dapat menyebabkan kemungkinan terjadinya infeksi lebih dari

satu subtype di dalam hospes yang sama sehingga dapat memicu kemungkinan terjadinya virus *reassortment* (Lai *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013).

Analisis genetik terhadap gen HA menunjukkan bahwa virus-virus dalam penelitian ini memiliki motif asam amino *single basic* PEGPKGR', PKGPKGR' dan 'PEIIQGR' pada *HA cleavage site* menandakan bahwa virus-virus tersebut tergolong LPAI. Adanya perubahan asam amino *single basic* ke *multi basic amino acid* pada *HA cleavage site* virus AI H5 maupun H7 memungkinkan virus tersebut berubah menjadi HPAI (Horimoto *et al.*, 1995). Asam amino Q 226 pada *reseptor binding site* dari gen HA yang dimiliki oleh kelima virus ini mengindikasikan kecenderungan virus untuk berikatan dengan reseptor $\alpha 2.3$ NeuAcGal lincages spesifik pada avian spesies (Matrosovich *et al.*, 1999). Analisis terhadap resistensi obat-obatan oseltamivir dan amantadine mengindikasikan bahwa virus-virus ini sensitif terhadap antiviral drugs tersebut, ditandai dengan tidak adanya substitusi asam-asam amino pada 2 posisi di gen NA dan 3 posisi di gen M2 secara berturut turut E119V, H275Y dan L26F, V27A/T dan S31N/G (Suzuki *et al.*, 2003; Oh and Hurt, 2014). Selain itu, semua virus ini memiliki asam amino E267 pada gen PB2 mengindikasikan tingkat patogenesitas virus yang rendah pada mamalia. Substitusi asam amino glutamic acid menjadi lysine posisi 627 (E627K) pada gen PB2 memiliki peran dalam peningkatan patogenesitas pada mamalia (tikus) (Hatta *et al.*, 2001). Meskipun tidak ditemukan adanya karakter tingkat patogenesitas yang tinggi pada kedua subtype virus dalam penelitian ini, surveilans dan karakterisasi genetik rutin sebaiknya terus dilakukan sebagai early warning system guna mendeteksi dini adanya potensi virus tersebut bermutasi dan bereasosiasi menjadi lebih patogen yang memungkinkan terjadinya ancaman bagi kesehatan hewan maupun manusia.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil studi dapat disimpulkan bahwa virus *avian influenza* subtype H7N1 telah teridentifikasi dari 2 sampel dan virus *avian influenza* subtype H10N2 telah teridentifikasi dari 3 sampel dalam penelitian ini, dimana keseluruhan sampel tersebut diisolasi dari itik. Berdasarkan analisis filogenetik menunjukkan bahwa semua virus tersebut berada dalam lineage Eurasian. Berdasarkan hasil karakterisasi memperlihatkan bahwa virus subtype H7N1 dan H10N2 dikategorikan kedalam *low pathogenic avian influenza* (LPAI), memiliki kecenderungan berikatan dengan reseptor dari avian spesies dan sensitif terhadap obat-obatan antiviral golongan amantadine. Desain primer-primer baru dalam pengujian PCR untuk mendeteksi virus AI subtype selain H5N1 dan H9N2 perlu dikembangkan dan karakterisasi genetik rutin sebaiknya terus dilakukan guna mendeteksi dini semua subtype virus-virus *avian influenza* yang bersirkulasi di lapangan serta mendeteksi kemungkinan terjadinya *virus reassortment*.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL and Swayne DE 2006. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *J Emerg Infect Dis.* 12(11): 1663.
- 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.
- Ellis TM, Barry Bousfield R, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim S, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y and Peiris JM 2004. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *J Avian Pathol.* 33(5): 492-505.
- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H and Xu K 2013. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 368(20): 1888-1897.
- 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.
- Horimoto T, Ito T, Alexander DJ and Kawaoka Y 1995. Cleavability of hemagglutinin from an extremely virulent strain of avian influenza virus containing a unique cleavage site sequence. *J. Vet Med Sci.* 57(5): 927-930.
- Jonas M, Sahesti A, Murwijati T, Lestariningsih CL, Irine I, Ayesda CS, Prihartini W and Mahardika GN 2018. Identification of avian influenza virus subtype H9N2 in chicken farms in Indonesia. *J Prev Vet Med.* 159: 99-105.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *J Mol Biol.* 33(7): 1870-1874.
- Lai KY, Ng GWY, Wong KF, Hung IFN, Hong JKF, Cheng FF, Chan JKC and infections 2013. Human H7N9 avian influenza virus infection: a review and pandemic risk assessment. *J Emerg Microbes.* 2(8): e48.
- Lamb RA and Krug RM 1996. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Momath TP, Roizman S, editors. *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA. p. 1353-1395.
- 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.
- Oh DY and Hurt AC 2014. A review of the antiviral susceptibility of human and avian influenza viruses over the last decade. *J Scientifica.* 2014.
- OIE 2004. Disease information: Highly pathogenic avian influenza in Indonesia. [Online] Available; ftp://ftp.oie.int/infos_san_archives/eng/2004/en_040206v17n06.pdf. Vol. 17 — No. 6.

- Sun Y, Tan Y, Wei K, Sun H, Shi Y, Pu J, Yang H, Gao GF, Yin Y and Feng W 2013. Amino acid 316 of hemagglutinin and the neuraminidase stalk length influence virulence of H9N2 influenza virus in chickens and mice. *J Virol.* 87(5): 2963-2968.
- Suzuki H, Saito R, Masuda H, Oshitani H, Sato M and Sato I 2003. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J Infect Chemother.* 9(3): 195-200.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *J Microbiol Rev.* 56(1): 152-179.
- Wibawa H, Bingham J, Nuradji H, Lowther S, Payne J, Harper J, Junaidi A, Middleton D and Meers J 2014. Experimentally infected domestic ducks show efficient transmission of Indonesian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus, but lack persistent viral shedding. *J PloS one.* 9(1): e83417.
- 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.