

Review : Karakteristik Molekuler Gen Hemaglutunin (HA), Polimerase Basik-2 (PB2) dan Virulensi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1

Muflihanah, St Nurul Muslinah Muhiddin, Sitti Hartati Said, Supri

Balai Besar Veteriner Maros

1. 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 *Influenza virus* 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 subtipe berdasarkan karakteristik antigenik pada glikoprotein permukaan hemaglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) (Lee *et al.*, 2001; Russel dan Webster, 2005, Capua dan Marangon 2006). Saat ini terdapat 18 subtipe hemaglutinin (H1- H18) dan 11 neuraminidase (N1-N11) yang telah diidentifikasi (Russel dan Webster 2005 ; Capua dan Marangon, 2006, CDC,2020). Semua subtipe Influenza A ditemukan pada jenis unggas air yang merupakan reservoar 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). 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 virus dari unggas (Jia-Hai *et. al.*, 2006) .

2. Epidemiologi

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 Februari 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. Dari data terakhir WHO 29 Juli 2010, Indonesia merupakan negara urutan pertama terjadinya infeksi pada manusia yaitu sebanyak 164 kasus dengan kematian sebanyak 138 orang. Khusus di Sulawesi Selatan terdapat satu kasus positif pada manusia (WHO 2010 ; Takano *et al.*, 2009). Masalah yang dikhawatirkan adalah ketika terjadi wabah pandemi di dunia, yang akan mengakibatkan penularan dari manusia ke manusia.

3. Karakteristik Molekular 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 (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). 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 hemaglutinasi 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).

4. 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 pandemik 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(α 2-3)Gal] atau [Neu5Ac(α 2-6)Gal]. Isolat dari ayam cenderung berikatan dengan [Neu5Ac(α 2-3)Gal], sedangkan isolat virus dari manusia memiliki spesifitas terhadap [Neu5Ac(α 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(α 2-3)Gal], sedangkan virus asal manusia dengan posisi asam amino 226 Leu dan 228 Ser akan lebih mengenal [Neu5Ac(α 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(α 2-6)Gal] terdapat pada sel-sel yang tidak bersilia

sementara reseptor [Neu5Ac(α 2-3)Gal], terdapat sel-sel yang bersilia. Secara umum α 2-3 dan α 2-6 terdapat pada saluran pernapasan manusia bagian atas dan bawah. Belum lama berselang menunjukkan bahwa α 2-3 terdapat pada saluran pernapasan 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 mengaktifasi prekursor hemagglutinin (HA 0) menjadi fragmen1 (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 keseluruhan tubuh (Asmara, 2007).

Dalam diagnosis AI peran protein hemagglutinin (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)

5. 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 (Yuniati 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 *barier* 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. Namun, temuan tersebut tidak konklusif karena data yang tersedia di *GeneBank* menunjukkan banyak isolat AI H5N1 asal unggas yang mempunyai mutasi pada asam amino 627 PB2 (Yuniati, 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 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 , 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.

6. 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 Kim *et al.*, (2010) 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. Sehingga perlu dilakukan kajian untuk mempelajari perubahan asam amino H5N1 pada isolat-isolat virus yang ada.

7. 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 glikoprotein 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 patogenesitas 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, tetapi Gao *et al.*, (2009) menemukan virus AI H5N1 DKGX/35 and 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 *reseptor 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 reservoar alami (Susuki dan Nei, 2002). Virus AI H5N1 sangat letal terhadap unggas domestik tetapi patogenisitasnya berbeda pada mamalia termasuk tikus dan *ferret* (Yen *et al.*, 2009)

8. 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 (Yuniati dkk, 2008 ; Gabriel *et al.*, 2008) . Menurut Salomon *et al.*, (2006), bahwa gen-gen polimerase berperan dalam *barrier* 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 patogenitas 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 patogenitas virus AI H5N1, H7N7 dan berperan dalam patogenitas 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)

9. Peranan Gen Lainnya

9.1. Gen Non Struktural 1 (NS1)

Virus influenza memiliki segmen gen berupa non struktural protein (NS). Protein ini berperan dalam virulensi virus yang mengatur *splicing* dan translasi

dari virus influenza (Marion *et al.*, 1997; Falcon *et al.*, 1999 ; Anwar dan Khan, 2007, Zhang *et al.*, 2010). NS1 berperan dalam interaksi protein RNA – binding yang memiliki beberapa fungsi selama terjadinya infeksi virus influenza (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Beberapa penelitian menunjukkan gen NS memiliki kemampuan dalam mengatur respon sitokin (Chen *et al.*, 2005). Segmen NS memiliki dua gen pengkode protein yaitu NS1 dan NS2 (de Jong and Hien, 2006). NS1 memiliki multifungsi dalam hubungannya dengan virulensi virus influenza (Dundon and Capua, 2009). Fungsi NS1 yang sebenarnya belum diketahui dengan pasti, tetapi sangat berperan dalam memediasi pertahanan sel seperti interferon (IFN) (Shaffer, 2006 ; Bornholdt and Prasad, 2008) Pada dasarnya ada dua macam sistem pertahanan tubuh dalam mencegah infeksi virus yaitu *innate immune response* dan *adaptive immune response*. Diantara komponen *innate immune response* akibat infeksi virus adalah IFN (Kiukun *et al.*, 2006 ; Asmara, 2007 ; Jackson *et al.*, 2008). Secara *in vitro*, NS1 merupakan inhibitor dalam *pathway* IFN pada kejadian pandemik influenza tahun 1918. Hal tersebut berkontribusi terhadap virulensi virus influenza 1918 pada manusia. NS1 merupakan faktor penting pada patogenesis yang mampu melawan *innate immune response*. (de Wit and Fouchier, 2009 ; Herfst *et al.* , 2010). Menurut Salomon *et al.* (2006) NS1 virus H5N1 tahun 1997 dilaporkan sangat virulen terhadap hewan model tikus dan babi. Gen NS virus H5N1/97 berkontribusi terhadap peningkatan TNF- α yang diinduksi oleh virus. Menurut Lee *et al.*, 2005 ; Shaffer (2006), Li *et al.* (2006) , Lycett *et al.* (2009), adanya substitusi pada *nonstructural protein* (Asp92Glu), menyebabkan H5N1 resisten terhadap interferon dan *tumor necrosis factor* (TNF) secara *in vitro* dan pada babi. NS1 memiliki 230-237 asam amino. Dua *regio* yang memiliki peranan penting adalah yaitu N-terminal (amino acids 1-73) yang berfungsi sebagai *RNA-binding* dan C-terminal (amino acids 74-230/237) *effector* (Manasatienkij *et al.*, 2008 ;Zhao *et al.*, 2010). Menurut Zhu *et al.* (2008), gen NS1 berperan dalam virulensi virus pada tikus dan babi. Asam amino virus angsa H5N1 pada posisi 149 berhubungan dengan replikasi virus AI pada ayam.

9.2. Gen Neuraminidase (NA)

Salah satu glikoprotein permukaan virus influenza A adalah neuraminidase (NA) (Webster *et al.*, 1992 ; Capua and Marangon, 2006). NA dianggap ikut berperan dalam spesifitas virus terhadap hospes. NA berperan untuk menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan *N-acetylmeraminic* pada rantai ujung oligoshakarida- glikoprotein. Fungsi NA ini harus ada dalam keseimbangan dengan HA (Pappaioanou, 2009). Hal ini agar aktivitas enzimatis dalam melepaskan asam sialat dari sel yang terinfeksi tidak menyebabkan penurunan efisiensi infeksi sel berikutnya (Asmara, 2007). Fungsi lain dari NA adalah untuk melepaskan partikel virus yang sudah replikasi dalam sel, mencegah virion yang sudah terbentuk tersebut menempel kembali pada reseptor asam sialat melalui tonjolan HA. Oleh karena itu proses replikasi sangat tergantung dari kerajama dari protein HA dan NA (Asmara, 2007). Virulensi dan patogenisitas virus AI H5N1 dan pandemik H1N1 pada tahun 1918 disebabkan oleh perubahan dari struktur glikoprotein permukaan HA dan NA serta protein internal yaitu PB1 dan NS1 (Jackson *et al.*, 2008). Menurut Tumpey *et al.*, (2004) dan Russel and Webster (2005), protein NA memiliki beberapa peranan dalam virulensi dan patogenisitas virus pada mencit dan unggas. Protein NA memfasilitasi mobilitas virion setelah dihancurkan oleh residu *sialic acid* dari HA selama masuknya dan pelepasan virus dari sel (Hulse *et al.*, 2004 ; Zambon, 1999). Sama dengan HA, pada gen NA juga sering terjadi mutasi sehingga terjadi novel NA melalui hanyutan antigenik dan lompatan antigenik (Lal and Chow, 2009)

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 pandemik influenza tahun 1957 dan 1968 (Gibbs *et al.*, 2001). Selain itu kompleks gen polimerase diduga merupakan faktor utama bagi adaptasi virus AI pada spesies tertentu (Yuniati dkk, 2008). Selain gen HA, gen PB2 adalah gen yang berperan dalam virulensi virus AI. (Salomon *et al.*, 2006 ; Herfst *et al.*, 2010), Adanya mutasi pada PB2-627Lys dan posisi 701 Asp menunjukkan bahwa virus AI dapat beradaptasi pada saluran pernafasan manusia (Le *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2005). Pada penelitian terdapat hubungan

antara mutasi gen HA dan PB2 dengan virulensi virus AI sub tipe H5N1 isolat unggas lokal.

DAFTAR PUSTAKA

- 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>.
- Budiantono. 2008. Deteksi Antigen Avian Influenza Kasus Lapangan Dengan Teknik Immunohistokimia. Jurnal Patologi Veteriner Indonesia. Vol 1 Nomor 1
- 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
- Dahlan, S. 2004. Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan. Arkans. Jakarta
- Dahlan, S. 2005. Besar Sampel dalam Penelitian Kedokteran Kesehatan. Arkans. Jakarta
- Darminto. 2007. Perkembangan Dinamika Virus Avian Influenza di Indonesia. Makalah. Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.
- De Jong, M.D., Hien, T.T. 2006. Review : Avian Influenza A (H5N1). Journal of Clinical Virology 35 p. 2 -13.
- Harimoto, T, Kawaoka, Y., 1995. Direct Reverse Transcriptase PCR to Determine Virulence Potential of Avian Influenza A Viruses Bird. Journal of Clinical Microbiology halaman 748 – 751.
- 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
- Mahardika, I.G.N.. 2006. Peran Berbagai Hewan dalam Genesis Pandemi Avian Influenza. Hemera Zoa ISSN 0437-2514 Vol 83 (1).
- Medion Online. 2009. Penelitian Tentang AI dari Medion. <http://info.medion.co.id>
- Muflihanah. 2006. Hasil Surveilans AI di Sulawesi, Maluku dan Irian. Jakarta. Majalah Trobos No. 84.
- 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.
- Muflihanah, Hendrawaty, F., Ratna, Supri. 2009. Karakterisasi Isolat Balai Besar Veteriner Maros dengan Uji HA /HI. *In press*.

- Nidom, C.A. 2005. Analisis Molekuler Genome Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Ringkasan Desertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Sardjito. 1993. Orthomyxoviridae : Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Sastroasmoro, S., Ismael, S.. 2008. Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis. Sagung Seto. Jakarta.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. 2009. 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

Wibawan, I.W.T., Mahardika. I.G.N.. 2006. Mekanisme Kekebalan terhadap Avian Influenza pada Unggas. Hemera Zoa ISSN 0437-2514 Vol 83 (1).

Wong, F., Stevens, V., Davies, K.. 2008. Sequencing of Avian Influenza, Laboratory Procedures. CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory. Victoria Australia.