

Analisis Molekuler Gen Penyandi Hemagglutinin Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5N1 Isolat Unggas Air

R. SUSANTI¹, R.D. SOEJOEDONO², I.G.N.K. MAHARDIKA³, I-W.T. WIBAWAN² dan M.T. SUHARTONO⁴

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES)
Gedung D6 Lt 1. Kampus Sekaran Jl. Raya Sekaran, Gunungpati, Semarang

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet FKH IPB,
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor

³Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan FKH UNUD
Jl Sesetan Gang Markisa No. 6 Denpasar, Bali

⁴Fakultas Tekonologi Pertanian IPB,
Jl. Kamper Kampus IPB Darmaga, Bogor

(Diterima dewan redaksi 19 Mei 2008)

ABSTRACT

SUSANTI, R, R.D. SOEJOEDONO, I.G.N.K. MAHARDIKA, I.W.T. WIBAWAN and M.T. Suhartono. 2008. Molecular analysis of Hemagglutinin Gen of Highly Pathogenic *Avian Influenza* of H5N1 Subtype Isolated from Waterfowls. *JITV* 13(3): 229-239.

Avian influenza viruses (AIV) subtype H5N1 isolated from waterfowls in West Java pose the known characteristic of highly pathogenic strains, with polybasic amino acid sequence of cleavage site QRERRRKKR and QRESRRKKR. This research aimed to analyze the important domain of hemagglutinin (HA) gene of those isolates. Fragment of HA gene was amplified using RT-PCR method with specifically-designed primer pairs and sequenced using dideoxy termination method with ABI *automatic sequencer* (Applied Biosystems). Multiple alignment of nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed using ClustalW of MEGA-3.1 program. Some of biological domains of HA, i.e. antigenic sites, receptor binding pocket, and glycosylation sites of the isolates were polymorphic. The viruses also pose conserved glutamine (Q) and glysin (G) residues at the known receptor binding site, at the position 222 and 224 respectively. This findings clearly show that all AIV subtype H5N1 isolated from waterfowl preserves the α -2,3NeuAcGal avian receptor specificity.

Key Words: Antigenic Sites, Glycosylation Sites, Receptor Binding Pocket, AIV H5N1, Waterfowls

ABSTRAK

SUSANTI, R, R.D. SOEJOEDONO, I.G.N.K. MAHARDIKA, I.W.T. WIBAWAN dan M.T. Suhartono. 2008. Analisis Molekuler Gen Penyandi Hemagglutinin Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5N1 Isolat Unggas Air. *JITV* 13(3): 229-239.

Virus *avian influenza* (VAI) subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas air di Jawa Barat bersifat patogenik dengan pola asam amino daerah pemotongan HA QRERRRKKR dan QRESRRKKR. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis *domain-domain* penting gen penyandi hemagglutinin (HA) isolat-isolat tersebut. Fragmen gen HA diamplifikasi dengan metode RT-PCR menggunakan pasangan primer yang didisain khusus, dan disekuensing dengan metode dideoksi dengan ABI *automatic sequencer* (Applied Biosystems). Runutan nukleotida hasil sekuensing dan asam amino turunannya disepadankan dengan ClustalW dari program MEGA 3.1. Domain asam amino daerah antigenik, posisi glikosilasi dan kantong pengikat reseptor virus yang dianalisis menunjukkan adanya polimorfisme. Sedangkan domain residu pengikat reseptor, semua isolat mempunyai glutamin (Q) dan glisin (G) berturut-turut pada asam amino nomor 222 dan 224. Temuan ini menunjukkan bahwa semua VAI H5N1 dalam penelitian ini mempunyai spesifisitas reseptor avian α -2,3 NeuAcGal.

Kata Kunci: Daerah Antigenik, Posisi Glikosilasi, Kantong Pengikat Reseptor, Virus AI H5N1, Unggas Air

PENDAHULUAN

Unggas air berpotensi sebagai sumber penularan virus *avian influenza* (VAI) subtipe H5N1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 21 isolat VAI H5N1 berhasil diisolasi dari 460 sampel unggas air (itik, angsa, entok) yang sehat dan belum divaksinasi di peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat (SUSANTI *et al.*, 2008a; *in press*). Semua VAI subtipe H5N1 (21

isolat) tersebut termasuk *highly pathogenic* dengan 2 pola sekuen asam amino *cleavage site* yaitu QRERRRKKR (20 isolat) dan QRESRRKKR (1 isolat) (SUSANTI *et al.*, 2008b; *in press*). Meskipun secara molekuler virus AI subtipe H5N1 isolat unggas air menandakan *highly pathogenic* (HPAI), secara fenotipe bersifat *low pathogenic* pada unggas air karena VAI H5N1 ini diisolasi dari unggas air yang sehat dan tidak divaksinasi.

Patogenesitas virus avian influenza (VAI) secara molekuler ditentukan berdasarkan sekuen asam amino daerah pemotongan (*cleavage site*) hemagglutinin (HA). Daerah pemotongan HA bersifat spesifik dan spesifisitas jenis protease membatasi distribusi jaringan yang dapat diinfeksi virus ini (MUNCH *et al.*, 2001). Meskipun VAI H5N1 secara molekuler bersifat patogenik, patogenesitasnya berbeda-beda pada setiap spesies hospes bahkan pada spesies hospes yang sama (HULSE *et al.*, 2004).

Selain ditentukan oleh sekuen asam amino daerah pemotongan HA, patogenesitas virus ditentukan oleh residu asam amino pada beberapa domain HA (PLOTKIN dan DUSHOFF, 2003; HULSE *et al.*, 2004). Domain-domain dimaksud antara lain adalah daerah antigenik, kantong pengikat reseptor, residu pengikat reseptor dan posisi glikosilasi. Daerah antigenik adalah asam amino sebagai target pengenalan dan netralisasi oleh antibodi (PLOTKIN dan DUSHOFF, 2003; SMITH *et al.*, 2004; CAMPITELLI *et al.*, 2006). Posisi glikosilasi adalah sekuen asam amino yang berpotensi sebagai tempat penempelan oligosakarida, dan penempelan oligosakarida ini sangat penting dalam orientasi pelipatan HA untuk berikatan dengan reseptor sel atau antibodi (RAJAKUMAR *et al.*, 1990; HOFFMANN *et al.*, 2005; MISHIN *et al.*, 2005; CAMPITELLI *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2006). Residu pengikat reseptor adalah asam amino yang berikatan secara langsung dengan reseptor sel hospes. Substitusi asam amino pada residu pengikat reseptor menyebabkan perubahan spesifisitas reseptor (VINES *et al.*, 1998; GLASSER *et al.*, 2005; GAMBARYAN *et al.*, 2006). Kantong pengikat reseptor adalah asam amino yang terlibat mempertahankan integritas struktur residu pengikat reseptor. Substitusi asam amino kantong pengikat reseptor menyebabkan perubahan pelipatan protein sehingga mengubah afinitas ikatan virus pada reseptor (HARVEY *et al.*, 2004; GAMBARYAN *et al.*, 2006; AUEWARAKUL *et al.*, 2007).

Disamping domain-domain di atas, terdapat suatu domain yang dikenal sebagai peptida fusi. Domain ini berperan pada fusi membran saat infeksi virus influenza ke dalam sel hospes, sehingga berperan dalam patogenesis virus. Domain ini diketahui bersifat stabil pada semua influenza A (CROSS *et al.*, 2001).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis domain-domain penting gen penyandi hemagglutinin virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) subtipe H5N1 isolat unggas air, seperti daerah antigenik, kantong pengikat reseptor, residu pengikat reseptor, posisi glikosilasi dan peptida fusi.

MATERI DAN METODE

Virus yang diuji dalam penelitian ini adalah 9 isolat VAI subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas air yang secara klinis sehat di peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat tahun 2006 (SUSANTI *et al.*, 2008a; *in press*). Berdasarkan sekuen asam amino bagian *cleavage site*-nya, ke-9 isolat VAI tersebut termasuk HPAI (SUSANTI *et al.*, 2008b; *in press*).

RNA dari 9 isolat VAI subtipe H5N1 asal unggas air di Jawa Barat diekstraksi dengan *Trizol[®] LSReagent* (Invitrogen) sesuai instruksi penggunaan. RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript[™] III One-step RT-PCR system* (Invitrogen). Reaksi PCR dibuat sebanyak 50 µl dengan komposisi 25 µl *2x reaction mix*, 2 µl primer *forward* (10 µM), 2 µl primer *reverse* (10 µM), 2 µl *Superscript III RT/Platinum Taq Mix*, 3 µl sampel RNA dan *ultrapure H₂O* sampai volume 50 µl. Primer yang digunakan adalah dua pasang primer yang didisain khusus untuk mengamplifikasi nukleotida nomor 1 sampai dengan nomor 1215 dari gen HA, yaitu primer HA01-HA645 yang mengamplifikasi nukleotida 1-645, dan primer HA548-HA1215 yang mengamplifikasi nukleotida 548-1215 (Tabel 1). PCR untuk primer HA01-HA645 adalah 45°C reaksi RT 60 menit, predenaturasi 95°C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 95°C 30 detik, *annealing* 55°C 30 detik, ekstensi 72°C 40 detik, dan *post* ekstensi 72°C 10 menit. Program PCR untuk primer HA548-HA1215 menggunakan suhu *annealing* 51°C. Isolat yang tidak dapat diamplifikasi dengan primer HA01-HA645, dilakukan amplifikasi menggunakan primer H5-155F-H5-699R dengan *annealing* 50°C. Adanya pita DNA spesifik hasil PCR diidentifikasi dengan elektroforesis pada gel agarose 2%.

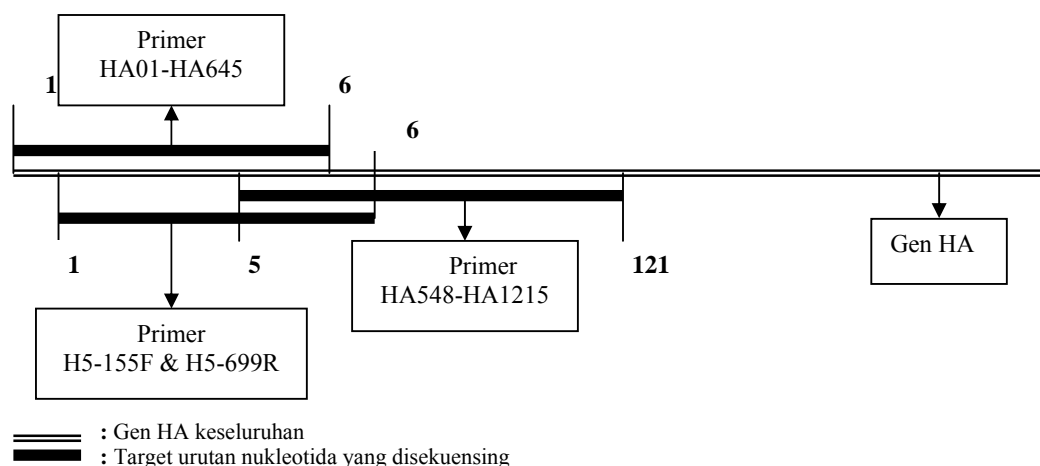
PCR dengan pasangan primer H5-155F dan H5-699R menghasilkan pita DNA target dan pita-pita nonspesifik, sehingga dilakukan purifikasi dengan *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) sesuai instruksi penggunaan.

Skema urutan nukleotida target dari gen HA virus AI subtipe H5N1 yang disekuensing dalam penelitian ini terlihat pada Gambar 1. Sekuensing dilakukan di laboratorium 1stBASE Selangor Malaysia dengan metode dideoksi menggunakan ABI *automatic sequencer* (Applied Biosystems). Setiap isolat disekuensing sebanyak 2 kali untuk setiap primer. Runutan nukleotida gen hemagglutinin hasil sekuensing dan turunan asam aminonya disepadankan dengan program ClustalW. Analisis *trace* data sekuen dan pengeditan data sekuen dilakukan dengan program software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 4,0 (TAMURA *et al.*, 2007). Data

Tabel 1. Sekuen nukleotida primer untuk mengamplifikasi gen HA

| Primer | Sekuen basa | Fragmen gen | Produk (bp) |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------|
| 1 ^a | HA01: 5' ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC'3 HA645: 5' GGAAATATAGGTGGTTGGGTTTTG'3 | H5 (basa 1-645) | 645 |
| 2 ^a | HA548F: 5'CCAACCRAGARGATCTTTTGG'3* HA1215R: 5'AYRGCCTCAAACCTGAGTGTC'3* | H5 (bada 548-1215) | 667 |
| 3 ^b | H5-155F: 5'ACACATGCYCARGACATACT'3* H5-699R: 5'CTYTGRTTYAGTGTGATGT'3* | H5 (basa 155-699) | 545 |

*Y=(CT), R=(AG) ³didisain oleh Dr. Drh. IGN MAHARDIKA & Dr. Drh. R. SUSANTI, MP ^bLEE *et al.* (2001)



Gambar 1. Skema urutan nukleotida target dari gen HA virus AI subtipe H5N1 isolat unggas air yang disekuensing dalam penelitian ini

sekuen nukleotida penyusun gen HA selanjutnya didokumentasikan di GenBank.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil PCR gen HA dari VAI subtipe H5N1 menggunakan primer HA01-HA645 yang mengamplifikasi nukleotida 1 sampai 645, dan primer HA548-HA1215 yang mengamplifikasi nukleotida 548 sampai 1215, berturut-turut terlihat pada Gambar 2 dan Gambar 3. Sebanyak 4 isolat VAI H5N1 (IPB6-RS, IPB7-RS, IPB8-RS, IPB9-RS) tidak dapat diamplifikasi dengan primer HA01-HA645, sehingga dilakukan amplifikasi dengan primer H5-155F-H5-699R (Gambar 4).

Sekuen nukleotida unggas air yang disepadankan dengan nukleotida gen HA dari VAI subtipe H5N1 isolat A/goose/Guangdong/1/96 (secara singkat disebut Gs/GD/1/96) menunjukkan bahwa jumlah kodon substitusi bervariasi dari 23 sampai 50, dan jumlah

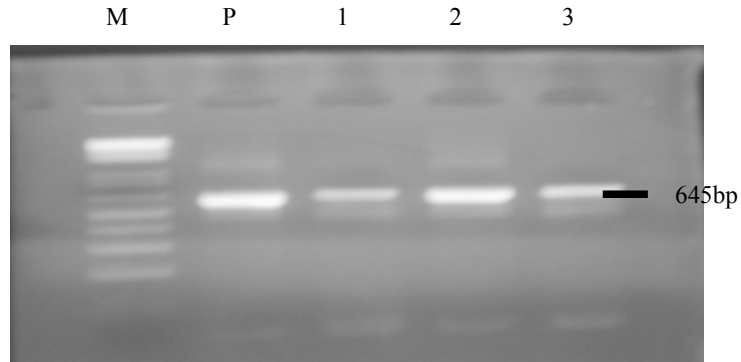
substitusi nonsinonim bervariasi dari 5-18 (Tabel 2). Replikasi genom RNA virus (vRNA) influenza dikatalisis oleh enzim *RNA dependent RNA polymerase* (RdRp) (HONDA *et al.*, 2002; CROW *et al.*, 2004; HARA *et al.*, 2006). Dan enzim RdRp ini tidak mempunyai mekanisme untuk memperbaiki kesalahan (*proofreading*) sehingga tingkat kesalahan mencapai 1 dari 10⁴ nukleotida per siklus replikasi (*review* oleh WEBSTER *et al.*, 1992). Tingkat mutasi yang tinggi akibat lemahnya mekanisme *proofreading* dari RdRp, menyebabkan perubahan nukleotida terjadi terus menerus. Kecepatan mutasi HA lebih tinggi dibandingkan dengan NA, karena NA bukan merupakan determinan antigenik utama dan jumlah NA pada permukaan virion hanya 1/5 jumlah HA (PLOTKIN dan DUSHOFF, 2003).

Sekuen nukleotida penyandi protein HA dari 9 virus AI subtipe H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini dapat diakses di GenBank dengan nomor akses EF646265-EF646273. Sekuen nukleotida gen

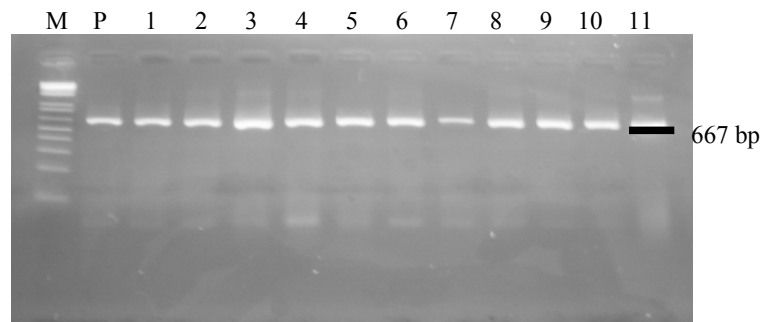
hemagglutinin dan turunan asam aminonya dari satu VAI subtipe H5N1 isolat unggas air terlihat pada Gambar 5.

Substitusi nonsinonim disebabkan oleh tekanan seleksi, dan semakin sering mengalami tekanan

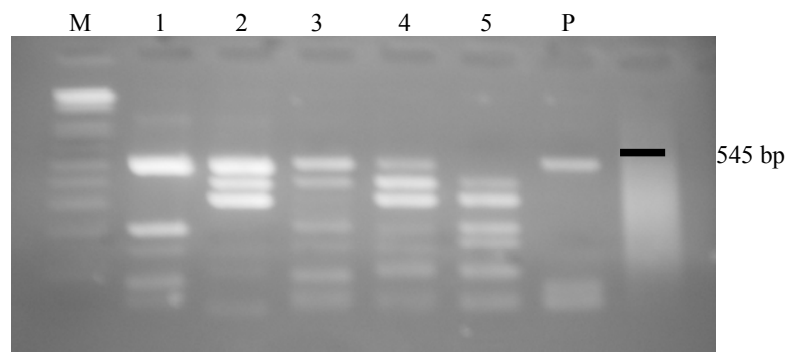
semakin tinggi kecepatan untuk substitusi nonsinonim (PLOTKIN dan DUSHOFF, 2003). Adanya tekanan seleksi akan menyebabkan munculnya varian dengan tingkat efektivitas replikasi yang tinggi (JONG *et al.*, 2000).



Gambar 2. Elektroforegram RT-PCR dengan primer HA01 dan HA645 (produk 645bp). Sumur M: DNA ladder 100bp. Sumur P: Kontrol positif VAI subtipe H5. Sumur 1-3: VAI isolat unggas air subtipe H5N1



Gambar 3. Elektroforegram RT-PCR dengan primer HA548 dan HA1215 (produk 667bp). Sumur M: DNA ladder 100bp. Sumur P: Kontrol positif VAI subtipe H5. Sumur 1-11: VAI isolat unggas air subtipe H5N1



Gambar 4. Elektroforegram RT-PCR dengan primer H5-155F dan H5-699R (produk 545bp). Sumur M: DNA ladder 100bp. Sumur P: Kontrol positif VAI subtipe H5. Sumur 1-5: VAI isolat unggas air subtipe H5N1

Tabel 2. Jumlah substitusi sinonim dan nonsinonim gen hemagglutinin virus *avian influenza* subtype H5N1 isolat unggas air yang disepadankan dengan nukleotida virus AI subtype H5N1 isolat Gs/GD/1/96

| No | Isolat | Jumlah kodon yang dibaca | Jumlah substitusi | Jumlah substitusi sinonim | Jumlah substitusi nonsinonim |
|----|-----------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | IPB1-RS (Entok) | 358 | 19 | 16 | 3 |
| 2 | IPB2-RS (Angsa) | 358 | 22 | 18 | 4 |
| 3 | IPB3-RS (Itik) | 358 | 20 | 17 | 3 |
| 4 | IPB4-RS (Angsa) | 358 | 21 | 15 | 6 |
| 5 | IPB5-RS (Entok) | 358 | 24 | 17 | 7 |
| 6 | IPB6-RS (Itik) | 358 | 37 | 27 | 10 |
| 7 | IPB7-RS (Angsa) | 358 | 48 | 30 | 18 |
| 8 | IPB8-RS (Itik) | 358 | 46 | 30 | 16 |
| 9 | IPB9-RS (Itik) | 358 | 45 | 29 | 16 |

Lima virus AI subtype H5N1 isolat unggas air (IPB1-RS s/d IPB5-RS), mengalami substitusi nonsinonim 3 asam amino kantong pengikat reseptor. Sebanyak 11 substitusi nonsinonim pada isolat IPB6-RS, 10 diantaranya merupakan daerah antigenik, posisi glikosilasi dan kantong pengikat reseptor. Dari 17-18 substitusi nonsinonim pada 3 isolat virus (IPB7-RS, IPB8-RS dan IPB9-RS), 16 substitusi diantaranya merupakan daerah antigenik, posisi glikosilasi dan kantong pengikat reseptor. Virus AI subtype H5N1 garis Asia menunjukkan jumlah asam amino yang mengalami seleksi positif meningkat dari tahun ke tahun, terutama pada daerah antigenik, posisi glikosilasi dan kantong pengikat reseptor. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan peningkatan patogenesitas dan kemampuan virus untuk transmisi ke manusia (CAMPITELLI *et al.*, 2006).

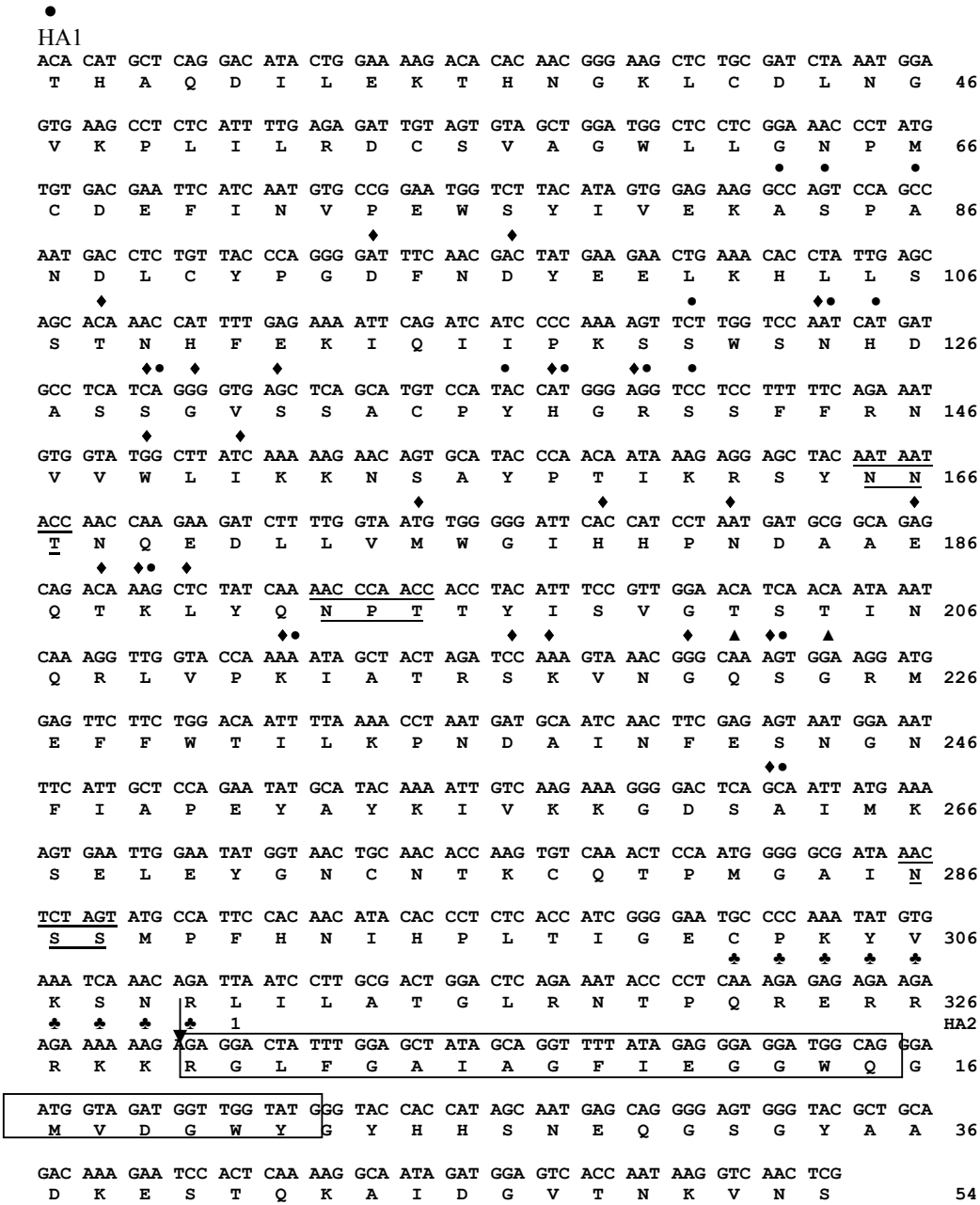
Daerah antigenik (*antigenic sites*)

Asam amino daerah antigenik pada 5 isolat VAI unggas air (IPB1-RS s/d IPB5-RS) sama dengan isolat Gs/GD/1/96. Isolat VAI IPB6-RS mengalami substitusi nonsinonim pada 4 asam amino daerah antigenik (N45D, S84N, H138Q dan R140S), sementara 3 isolat VAI unggas air lainnya (IPB7-RS, IPB8-RS dan IPB9-RS) mengalami substitusi nonsinonim pada 8 asam amino daerah antigenik (N45D, S84N, A86T, N124D, H138L, R140S, S141P dan K189R) (Tabel 3).

Substitusi asam amino pada daerah antigenik meningkatkan potensi terjadinya hanyutan antigenik,

karena berkaitan dengan mekanisme virus untuk menghindari dari respon imun hospes. Substitusi ini diduga akibat tekanan seleksi untuk menghindari dari respon antibodi hospes, termasuk penghindaran pengenalan antibodi yang terbentuk akibat vaksinasi atau infeksi sebelumnya (PLOTKIN dan DUSHOFF, 2003; SMITH *et al.*, 2004; CAMPITELLI *et al.*, 2006). Substitusi asam amino pada daerah antigenik merupakan salah satu pendorong evolusi gen hemagglutinin (SHIH *et al.*, 2007).

Substitusi asam amino 138 dan 140 juga berhubungan dengan patogenesitas virus, karena asam amino ini juga terlibat dalam ikatan dengan reseptor (HULSE *et al.*, 2004). Substitusi N124S, L138Q dan K189R pada genotipe Z kemungkinan berhubungan dengan adaptasi virus pada mamalia (GUAN *et al.*, 2004). Daerah antigenik pada asam amino 189 (R atau K) pada isolat unggas air dalam penelitian ini sama dengan isolat Hongkong, Vietnam dan Singapura (HOFFMAN *et al.*, 2005). Daerah antigenik pada asam amino 45, 84, 86, 124, 138, 140 dan 141 pada isolat unggas air dalam penelitian ini menunjukkan adanya polimorfisme. Daerah antigenik A-E pada asam amino 86, 138, 140 dan 141 isolat unggas dan manusia di Indonesia dan Vietnam mengalami seleksi positif (SMITH *et al.*, 2006). Analisis sekuen asam amino subunit HA1 pada virus influenza A tahun 1968-2005 berhasil mengidentifikasi 95 substitusi pada 63 asam amino, dan 57 substitusi diantaranya adalah asam amino daerah antigenik (SHIH *et al.*, 2007).



● : daerah antigenik ▲ : residu pengikat reseptor ◆ : kantong pengikat reseptor
 ♣ : daerah pemotongan → : batas subunit HA1 □ : peptida fusi
 Garis bawah: posisi glikosilasi

Gambar 5. Gen penyandi hemagglutinin dan turunan asam aminonya virus isolat A/muscovy duck/Cileungsi/IPB5-RS/2006(H5N1)

Tabel 3. Asam amino daerah antigenik pada hemagglutinin virus avian influenza sub tipe H5N1 isolat unggas air

| Isolat | Daerah antigenik * | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 45 | 83 | 84 | 86 | 121 | 124 | 125 | 129 | 137 | 138 | 140 | 141 | 155 | 189 | 212 | 223 | 263 |
| Gs/GD/1/96 | N | A | S | A | S | N | H | S | Y | H | R | S | S | K | K | S | A |
| IPB1-RS (entok) | N | A | S | A | S | N | H | S | Y | H | R | S | S | K | K | S | A |
| IPB2-RS (angsa) | N | A | S | A | S | N | H | S | Y | H | R | S | S | K | K | S | A |
| IPB3-RS (itik) | N | A | S | A | S | N | H | S | Y | H | R | S | S | K | K | S | A |
| IPB4-RS (angsa) | N | A | S | A | S | N | H | S | Y | H | R | S | S | K | K | S | A |
| IPB5-RS (entok) | N | A | S | A | S | N | H | S | Y | H | R | S | S | K | K | S | A |
| IPB6-RS (itik) | D | A | N | A | S | N | H | S | Y | Q | S | S | S | K | K | S | A |
| IPB7-RS (angsa) | D | A | N | T | S | D | H | S | Y | L | S | P | S | R | K | S | A |
| IPB8-RS (itik) | D | A | N | T | S | D | H | S | Y | L | S | P | S | R | K | S | A |
| IPB9-RS (itik) | D | A | N | T | S | D | H | S | Y | L | S | P | S | R | K | S | A |

* Penomoran menurut H5. (GUAN *et al.*, 2004; HOFFMAN *et al.*, 2005; WHO, 2005; CAMPITELLI *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006)

Posisi glikosilasi (glycosilation sites)

Posisi glikosilasi asam amino terkait asparagin (N) dengan pola sekuen NXS dan NXT (X: asam amino lain) yang berpotensi sebagai tempat penempelan oligosakarida (HOFFMAN *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2006). Posisi glikosilasi dari VAI H5N1 isolat unggas air menunjukkan bahwa asam amino nomor 84-86 dan 154-156 pada 5 isolat unggas air (IPB1-RS s/d IPB5-RS) tidak berpotensi sebagai tempat penempelan oligosakarida. Asam amino isolat unggas air IPB6-RS mengalami substitusi pada A156T, sehingga terbentuk sekuen N-S-T pada asam amino 154-156 yang berpotensi sebagai posisi glikosilasi. Akibat substitusi pada A86T dan A156T pada 3 VAI isolat unggas air (IPB7-RS, IPB8-RS, IPB9-RS) menginduksi munculnya posisi glikosilasi pada asam amino 84-86 dan 154-156 (Tabel 4).

Posisi glikosilasi pada asam amino posisi 154-156 dan 193-195 berdekatan dengan daerah antigenik dan residu pengikat reseptor, sehingga mempengaruhi afinitas ikatan pada reseptor dan mekanisme virus menghindari respon imun hospes (MATROSOVICH *et al.*, 1999; WHO, 2005; CAMPITELLI *et al.*, 2006; GAMBARYAN *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006). Substitusi pada A156T pada VAI H5N1 garis Asia dihubungkan dengan adaptasi virus pada hospes unggas darat dan meningkatkan virulensi pada unggas darat ini (WHO, 2005; SMITH *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2006). Posisi glikosilasi pada asam amino 84-86 merupakan mekanisme VAI untuk menghindari pengenalan daerah antigenik oleh antibodi (WHO, 2005; SMITH *et al.*, 2006).

Kantong pengikat reseptor (receptor binding pocket)

Kantong pengikat reseptor adalah asam amino yang terlibat mempertahankan integritas struktur residu pengikat reseptor. Secara struktural, terdapat 3 elemen dasar kantong pengikat reseptor VAI H5N1 yaitu α -helix (asam amino HA1 188-190), *loop*-130 (asam amino HA1 134-138) dan *loop*-220 (asam amino HA1 221-228) (STEVENS *et al.*, 2006). Substitusi asam amino kantong pengikat reseptor menyebabkan perubahan struktur sekunder protein sehingga mempengaruhi afinitas ikatan virus pada reseptor (HARVEY *et al.*, 2004; GAMBARYAN *et al.*, 2006; AUEWARAKUL *et al.*, 2007). Virus AI strain avian yang mengalami perubahan afinitas pada reseptor hospes berpeluang memunculkan strain virus yang berafinitas tinggi pada reseptor sel mamalia (CAMPITELLI *et al.*, 2006).

Virus AI sub tipe H5N1 isolat unggas air (IPB1-RS, IPB2-RS, IPB3-RS, IPB4-RS dan IPB5-RS), mengalami 3 substitusi nonsinonim pada asam amino kantong pengikat reseptor (L175M, E212K dan P217S). VAI H5N1 isolat IPB6-RS mengalami 7 substitusi nonsinonim asam amino kantong pengikat reseptor (D94N, T108I, D126E, H138Q, R140S, E212K dan P217S). Tiga VAI H5N1 isolat unggas air (IPB7-RS, IPB8-RS, IPB9-RS) mengalami substitusi nonsinonim pada 10 asam amino pembentuk kantong pengikat reseptor (D94S, T108I, N124D, D126E, H138L, R140S, D183N, K189R, E212K dan P217S) (Tabel 5).

Patogenesitas VAI H5N1 pada hospes sangat dipengaruhi oleh susunan asam amino kantong pengikat reseptor. VAI H5N1 dengan asam amino D97, I108, E126, L138, K212 dan S217 menunjukkan fenotipe *highly pathogenic*, sementara asam amino T108, D126,

H/Q138 menunjukkan fenotipe patogenik moderat (HULSE *et al.*, 2004). Tiga VAI H5N1 isolat unggas air (IPB7-RS, IPB8-RS dan IPB9-RS) kemungkinan mempunyai fenotipe patogenik tinggi, karena mempunyai asam amino kantong pengikat reseptor khas D97, I108, E126, L138, K212 dan S217 (Tabel 5). Sementara 5 VAI H5N1 isolat unggas air lainnya (IPB1-RS s/d IPB5-RS) mempunyai asam amino khas (T108, D126, H138) penanda fenotipe patogenik moderat. Fenotipe patogenesitas VAI H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini perlu dikaji lebih lanjut dengan uji biologis.

Residu pengikat reseptor (*receptor binding sites*)

Residu pengikat reseptor pada VAI H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini adalah glutamin (Q) dan glisin (G) berturut-turut pada asam amino nomor 222 dan 224 (Tabel 5). Residu pengikat reseptor seperti itu dianggap spesifik berikatan dengan reseptor avian α -2,3NeuAcGal (GAMBARYAN *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006; LEUNG, 2007).

Peptida fusi (*fusion peptide*)

Peptida fusi adalah peptida yang berperan pada fusi membran saat infeksi virus influenza ke dalam sel hospes. Sekuen asam amino peptida fusi yang terdapat pada ujung N subunit HA2 dari VAI H5N1 isolat

unggas air dalam penelitian ini terdiri dari 23 asam amino kaya glisin, yaitu GLFGAIAGFIEGGWQGMV DGWYG. Sekuen peptida fusi VAI H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini sama dengan isolat VAI H5N1 penyebab wabah di Asia. Jika dibandingkan dengan peptida fusi virus influenza penyebab pandemi flu di Hongkong tahun 1968 (GLFGAIAGFIENGWEG MIDGWYG), peptida fusi ini hanya mengalami substitusi 3 asam amino selama hampir 40 tahun (CROSS *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2006). Peptida ini bersifat stabil pada semua influenza A (CROSS *et al.*, 2001).

Domain asam amino daerah antigenik, posisi glikosilasi dan kantong pengikat reseptor virus avian influenza subtipe H5N1 isolat unggas air yang dianalisis menunjukkan adanya polimorfisme. LIU (2007) menyatakan bahwa virus influenza tidak selamanya bersifat stasis secara evolusioner pada hospes alami, dan biologi virus dapat berubah secara dramatis pada unggas air domestik. VAI subtipe H5N1 pada unggas air di Cina secara progresif menunjukkan peningkatan patogenesitas pada hewan model mencit (CHEN *et al.*, 2004). STRURM-RAMIREZ *et al.* (2005) juga melaporkan bahwa VAI H5N1 isolat itik di Asia tahun 2002-2004 tidak hanya bereplikasi pada saluran pencernaan tetapi juga pada saluran respirasi bagian atas. Analisis secara mendalam, baik secara molekuler maupun secara biologis dari VAI H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini perlu segera dilakukan untuk mengetahui kemungkinan adanya evolusi virus ini pada unggas air.

Tabel 4. Sekuen asam amino hemagglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 isolat unggas air yang berpotensi sebagai posisi glikosilasi

| Isolat | Posisi glikosilasi* | | | | |
|-----------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 84-86 | 154-156 | 165-167 | 193-195 | 286-288 |
| Gs/GD/1/96 | - | - | NNT | NPT | NSS |
| IPB1-RS (entok) | - | - | NNT | NPT | NSS |
| IPB2-RS (angsa) | - | - | NNT | NPT | NSS |
| IPB3-RS (itik) | - | - | NNT | NPT | NSS |
| IPB4-RS (angsa) | - | - | NNT | NPT | NSS |
| IPB5-RS (entok) | - | - | NNT | NPT | NSS |
| IPB6-RS (itik) | - | NST | NNT | NPT | NSS |
| IPB7-RS (angsa) | NPT | NST | NNT | NPT | NSS |
| IPB8-RS (itik) | NPT | NST | NNT | NPT | NSS |
| IPB9-RS (itik) | NPT | NST | NNT | NPT | NSS |

Penomeran menurut H5. (MATROSOVICH *et al.*, 1999; WHO, 2005; CAMPITELLI *et al.*, 2006; GAMBARYAN *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2006)

Tabel 5. Asam amino pembentuk kantong pengikat reseptor pada hemagglutinin virus avian influenza sub tipe H5N1 isolat unggas air

| Kantong pengikat reseptor | Isolat | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Gs/GD/I/96 | IPB1-RS (entok) | IPB2-RS (angsa) | IPB3-RS (itik) | IPB4-RS (angsa) | IPB5-RS (entok) | IPB6-RS (itik) | IPB7-RS (angsa) | IPB8-RS (itik) | IPB9-RS (itik) |
| 94 | D | D | D | D | D | D | N | S | S | S |
| 97 | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D |
| 108 | T | T | T | T | T | T | I | I | I | I |
| 124 | N | N | N | N | N | N | N | D | D | D |
| 126 | D | D | D | D | D | D | E | E | E | E |
| 129 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 130 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| 132 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 138 | H | H | H | H | H | H | Q | L | L | L |
| 140 | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S |
| 149 | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W |
| 151 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I |
| 175 | L | M | M | M | M | M | L | L | L | L |
| 179 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 183 | D | D | D | D | D | D | D | N | N | N |
| 186 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E |
| 188 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T |
| 189 | K | K | K | K | K | K | K | R | R | R |
| 190 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
| 212 | E | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| 217 | P | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 218 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| 221 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| 222 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| 223 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 224 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| 263 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |

Penomoran menurut H5. (HULSE *et al.*, 2004; WHO, 2005; CAMPITELLI *et al.*, 2006; GAMBARYAN *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2006)

KESIMPULAN

Domain asam amino daerah antigenik, posisi glikosilasi dan kantong pengikat reseptor VAI sub tipe H5N1 isolat unggas air yang dianalisis menunjukkan adanya polimorfisme. Sementara pada domain residu

pengikat reseptor, semua isolat mempunyai glutamin (Q) dan glisin (G) berturut-turut pada asam amino nomor 222 dan 224. Temuan ini menunjukkan bahwa semua VAI H5N1 dalam penelitian ini mempunyai spesifisitas reseptor avian α -2,3NeuAcGal.

SARAN

Perlu segera dilakukan analisis lebih lanjut VAI H5N1 isolat unggas air dalam penelitian ini baik secara molekuler maupun secara biologis.

DAFTAR PUSTAKA

- AUEWARAKUL, P., O. SUPTAWIWAT, A. KONGCHANAGUL, C. SANGMA, Y. SUZUKI, K. UNGCHUSAK, S. LOUISIROTCHANAKUL, H. LERDSAMRAN, P. POORUK, A. THITITHANYANONT, C. PITTAYAWONGANON, C.T. GUO, H. HIRAMATSU, W. JAMPANGERN, S. CHUNSTUTHIWAT and P. PUTHAVATHANA. 2007. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol.* 81: 9950-9955.
- CAMPITELLI, L., M. CICCOTZI, M. SALEMI, F. TAGLIA, S. BOROS, I. DONATELLI and G. REZZA. 2006. H5N1 influenza virus evolution: a comparison of different epidemics in birds and humans (1997-2004). *J. Gen. Virol.* 87: 955-960.
- CHEN, H., G. DENG, Z. LI, G. TIAN, Y. LI, P. JIAO, L. ZHANG, Z. LIU, R.G. WEBSTER and K. YU. 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10452-10457.
- CROSS, K.J., S.A. WHARTON, J.J. SHEKEL, D.C. WILEY and D.A. STEINHAUER. 2001. Studies on influenza hemagglutinin fusion peptide mutants generated by reverse genetics. *EMBO J.* 20: 4432-4442 .
- CROW, M., T. DENG, M. ADDLEY and G.G. BROWNLEE. 2004. Mutation analysis of the influenza virus cRNA promoter and identification of nucleotides critical for replication. *J. Virol.* 78: 6263-6270.
- GAMBARYAN, A., A. TUZIKOV, G. PAZYNINA, N. BOVIN, A. BALISH and A. KLIMOV. 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 344: 432-438.
- GARMORY, H.S., K.A. BROWN and R.W. TITBALL. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Gen. Vacc. Therapy.* 1: 1479-86.
- GLASER, L., J. STEVENS, D. ZAMARIN, I.A. WILSON, A. GARCIA-SASTRE, T.M. TUMPEY, C.F. BASLER, J.K. TAUBENBERGER and P. PALESE. 2005. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J.Virol.* 79: 11533-11536.
- GUAN, Y., L.L.M. POON, C.Y. CHEUNG, T.M. ELLIS, W. LIM, A.S. LIPATOV, K.H. CHAN, K.M. STURM-RAMIREZ, C.L. CHEUNG, Y.H.C. LEUNG, K.Y. YUEN, R.G. WEBSTER and J.S.M. PEIRIS. 2004. H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8156-8161.
- HARA, K., F.I. SCHMIDT, M. CROW and G.G. BROWNLEE. 2006. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding and virion RNA promoter binding. *J. Virol.* 80: 7789-7798.
- HARVEY, R., A.C.R. MARTIN, M. ZAMBON and W.S. BARCLAY. 2004. Restriction to the adaptation of influenza A virus H5 hemagglutinin to the human host. *J. Virol.* 78: 502-507.
- HOFFMANN, E., A.S. LIPATOV, R.J. WEBBY, A.E. GOVORKOVA and R.G. WEBSTER. 2005. Role of Specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 Influenza virus vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12915-12920.
- HONDA, A., MIZUMOTO and A. ISHIHAMA. 2002. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13166-13171.
- HULSE, D.J., R.G. WEBSTER, R.J. RUSSELL and D.R. PEREZ. 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J. Virol.* 78: 9954-9964.
- JONG, D.J.C., W.E. BEYER, A.M. PALACHE, G.F. RIMMELZWAAN and A.D. OSTERHAUS. 2000. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A (H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J. Med. Virol.* 61: 94-99.
- LAVNER, Y. and D. KOTLAR. 2005. Codon bias is a factor in regulating expression via translation efficiency in the human genome. Tel-Hai Academic College. <http://www.iscb.org/ismb/> [27 Mei 2006].
- LEE, M.S., P.C. CHANG, J.H. SHIEN, M.C. CHENG and H.K. SHIEH. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse trascription-PCR. *J. Virol. Methods* 97: 13-27.
- LEUNG, F.C. 2007. Avian H5N1 is still an animal virus. Di dalam: Zhou J & Yan H, editor. The 15th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book. Beijing 11-14 September 2007: 42-52.
- LIU, X. 2007. Infection and clinical disease caused by influenza and Newcastle disease viruses in domestic waterfowl. Di dalam: Zhou J & Yan H, editor. The 15th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book. Beijing 11-14 September 2007: 42-52.
- MATROSOVICH, M., N. ZHOU, Y. KAWAOKA and R.G. WEBSTER. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73: 1146-1155.
- MISHIN, V.P., D. NOVIKOV, F.G. HAYDEN and L.V. GUBAREVA. 2005. Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.* 79: 12416-12424.
- MUNCH, M., L.P. NIELSEN, K.J. HANDBERG and P.H. JORGENSEN. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.* 146: 87-97.

- PLOTKIN, J.B. and J. DUSHOFF. 2003. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 7152-7157.
- RAJAKUMAR, A., E.M. SWIERKOSZ and I.T. SCHULZE. 1990. Sequence of an influenza virus hemagglutinin determined directly from a clinical sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4154-4158.
- SHIH, A.C.C., T.C. HSIAU, M.S. HO and W.H. LI. 2007. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic site drive influenza A hemagglutinin evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6283-6288.
- SMITH, G.D.J., T.S.P. NAIPOSPOS, T.D. NGUYEN, M.D. JE-JONG, D. VIJAKRISHNA, T.B. USMAN, S.S. HASSAN, T.V. NGUYEN, T.V. DAO, N.A. BUI, Y.I.L.C. LEUNG, C.L. CHEUNG, J.M. RAYNER, J.X. ZHANG, L.J. ZHANG, L.L.M. POON, K.S. LI, V.C. NGUYEN, T.T. HIEN, J. FARRAR, R.G. WEBSTER, H. CHEN, J.S.M. PEIRIS and Y. GUAN. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350: 258-268.
- SMITH, G.D.J., A.S. LAPEDES, J.C. DE-JONG, T.M. BASTEBROER, G.F. RIMMELZWAAN, A.D.M.E. OSTERHAUS and R.A.M. FOUCHIER. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305: 371-375.
- STEVENS, J., O.BLIXT, T.M. TUMPEY, J.K. TAUBENBERGER, J.C. PAULSON and I.A. WILSON. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312: 404-410.
- STURM-RAMIREZ, K.M., D.J. HULSE-POST, E.A. GOVORKOVA, J. HUMBERD, P. SEILER, P. PUTHUVANTHANA, C. BURUNATHAI, T.D. NGUYEN, A. CHAISINGH, H.T. LONG, T.S.P. NAIPOSPOS, H. CHEN, T.M. ELLIS, Y. GUAN, J.S.M. PEIRIS and R.G. WEBSTER. 2005. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J. Virol.* 79: 11269-11279.
- SUSANTI, R., R.D. SOEJOEDONO, I.G.N.K. MAHARDIKA, I.W.T. WIBAWAN and M.T. SUHARTONO. 2008a. Isolasi dan identifikasi virus avian Influenza subtype H5N1 pada unggas air sehat di peternakan skala rumah tangga di Jawa Barat. *Media Kedokteran Hewan. In press.*
- SUSANTI, R., R.D. SOEJOEDONO, I.G.N.K. MAHARDIKA, I.W.T. WIBAWAN and M.T. SUHARTONO. 2008b. Identifikasi patogenitas virus avian influenza subtype H5N1 isolat unggas air berdasarkan sekuen asam amino bagian cleavage site hemagglutinin. *Biotechnology. In press.*
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- VINES, A., K. WELLS, M. MATROSOVICH, M.R. CASTRUCCI, T. ITO and Y. KAWAOKA. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J. Virol.* 72: 7626-7631.
- WHO (World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network). 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1515-1521.
- WEBSTER, R.G., W.J. BEAN, O.T. GORMAN, T.M. CHAMBERS and Y. KAWAOKA. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 56: 152-179.
- WU, G. and S. FREELAND. 2005. Quantifying unequal patterns of synonymous codon usage. The CAI calculator. <http://www.evotingcode.net/codon/faq/CAI/> (10 Februari 2007).