

IDENTIFIKASI MOLEKULAR DINAMIKA GENETIK VIRUS *AVIAN INFLUENZA*

SUBTIPE H5N1 *CLADE* 2.1.3 DAN 2.3.2

¹ERNES ANDESFA, ²RAMLAH, ²KETUT KARUNI NYANAKUMARI NATIH,
ENUH RAHARDJO DJUSA, HANY MUCHARINI¹Unit Uji Bakteriologi

²Unit Uji Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
Gunungsindur-Bogor, Indonesia, 16340

ABSTRAK

Avian Influenza (AI) subtipe H5N1 termasuk dalam kategori penyakit strategis di Indonesia yang menyebabkan kematian pada ayam, itik, puyuh, dan manusia. Identifikasi molekular ini bertujuan untuk mengetahui dinamika genetik virus AI H5N1 sebagai salah satu langkah strategis dalam pencegahan, pengendalian dan pemberantasan penyakit AI. Metode identifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *sequencing*. Isolat virus berasal dari Balai Besar Veteriner (BBV) Wates. Analisis filogenetik *tree* menunjukkan isolat virus dari ayam yang merupakan hasil *monitoring* tahun 2011 termasuk dalam *clade* 2.1.3. Adapun isolat itik, entok dan puyuh yang diambil dari *outbreak* kematian massal itik tahun 2012 termasuk dalam *clade* 2.3.2. Hasil analisis keragaman sekuen isolat *clade* 2.3.2 memiliki tingkat homologi yang tinggi yaitu 99,0%-99,5% terhadap virus *reference clade* 2.3.2 yang berasal dari Vietnam. Hasil keragaman sekuen antara isolat *clade* 2.1.3 dan isolat *clade* 2.3.2 memiliki tingkat keragaman yang rendah yaitu 90,4%-90,9%. Hal ini menunjukkan bahwa virus isolat dari itik ini termasuk virus H5N1 *clade* 2.3.2 yang merupakan varian baru di Indonesia. Hasil analisis asam amino pada daerah *cleavage site*, menunjukkan pola pengulangan asam amino arginin (R) dan lisin (K) yaitu PQRESRRKKR (isolat *clade* 2.1.3) dan PQRERRRKR (isolat *clade* 2.3.2) yang merupakan indikasi virus H5N1 strain *High Pathogenic Avian Influenza (HPAI)*. Dua belas isolat virus tersebut memiliki pola asam amino yang sama pada *receptor binding site* (RBS) yaitu glutamin (Q) pada asam amino ke-222 dan glisin (G) pada asam amino ke-224. Hal ini berarti virus yang dianalisa masih mengenali avian reseptor (α 2-3) dan tidak mengalami perubahan pada *pocket* RBS.

Kata kunci : AI H5N1, *sequencing*, *phylogenetic*, *clade* 2.3.2, keragaman.

ABSTRACT

Avian Influenza (AI) H5N1 subtype included in the category of strategic disease in Indonesia which led to the death of chicken, duck, quail, and human. Molecular identification aims to identify the genetic dynamics of H5N1AI virus as a strategic step in the prevention, control and eradication of AI. Identification method using Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing. Virus isolates from District of Investigation Center (DIC) Wates. Phylogenetic tree analysis showed the virus isolates from chickens that are the results of monitoring in 2011 are included in the clade 2.1.3 isolates whereas duck, wild duck and quail were taken from the outbreak of mass death of ducks in 2012 included in clade 2.3.2. The results of the analysis of the diversity of isolates of clade 2.3.2 sequences have a high degree of homology is 99,0%-99,5% of the reference clade 2.3.2 viruses originating from Vietnam. The results of sequence diversity among isolates of clade 2.1.3 and clade 2.3.2 isolates had a low level of diversity that is 90,4%-90,9%. This suggests that the virus isolates from ducks including H5N1 clade 2.3.2 which is a new variant in Indonesia. The results of analysis of amino acids in the cleavage site region, show a pattern of repeating amino acid arginine (R)

and lysine (K) is *PQRESRRKKR* (clade 2.1.3 isolates) and *PQREERRRKR* (clade 2.3.2 isolates) which is indicative of HPAI H5N1 virus strain. Twelve isolates of the virus has the same amino acid pattern in the Receptor Binding Site (RBS) is glutamine (Q) at amino acid to -222 and glycine (G) at amino acid to -224. It means the virus was analyzed to identify avian receptor (α 2-3) and no change in the RBS pocket.

Keywords : *H5N1 AI, sequencing, phylogenetic, clade 2.3.2, diversity.*

PENDAHULUAN

Strain virus HPAI H5N1 pertama kali dikenal di dunia pada tahun 1959 yang memusnahkan dua flock di satu peternakan ayam di wilayah Skotlandia, Inggris. Strain yang ditemukan pada tahun tersebut sangat jauh berbeda dengan virus HPAI H5N1 yang bersirkulasi saat ini. Strain dominan HPAI H5N1 yang menyebabkan pandemi pada unggas tahun 2003-2004 lalu merupakan hasil evolusi virus tahun 1999 sampai 2002 yang menciptakan genotype Z dan kemudian disebut sebagai “**Trah Asia HPAI A-H5N1**” (“*Asian lineage* HPAI A-H5N1”) ⁽²⁾. Virus AI merupakan suatu virus *Ribonucleic Acid* (RNA) berantai tunggal yang mempunyai amplop dengan delapan segmen, berpolaritas negatif dan berbentuk bulat atau filamen dengan diameter 50–120 x 200–300 nm. Virus ini termasuk ke dalam famili *Orthomyxoviridae*⁽¹⁴⁾.

Virus AI tetap infeksi dalam feses selama 30–35 hari pada 4°C dan selama 7 hari pada 20°C. Kemampuan bertahan di lingkungan dalam kurun waktu tertentu memungkinkan terjadinya penyebaran virus. Penularan dapat juga terjadi secara tidak langsung misalnya melalui udara yang tercemar material atau debu yang mengandung virus AI (aerosol), makanan atau minuman, alat atau perlengkapan peternakan, kandang, pakaian, kendaraan, peti telur, *egg tray*, burung, mamalia, dan insekta yang mengandung virus AI⁽¹⁶⁾.

Enam belas sub tipe virus influenza A hidup abadi pada populasi unggas liar, terutama pada unggas air (*waterfowl*) dan virus-virus ini berdampingan secara harmoni dengan hospesnya tanpa menimbulkan gejala penyakit^(1,21). Dalam hospes alaminya, virus-virus ini berada dalam evolusi yang statis, hanya memperlihatkan perubahan minimal di tingkat asam amino dan normalnya non patogen, akan tetapi setelah menyebar ke hospes lain virus-virus ini menampakkan evolusi yang cepat^(11, 20).

Sejak kemunculan pandemi infeksi virus HPAI H5N1 tahun 2003-2004 pada unggas, virus ini telah menyebar pada spesies unggas di Asia, Eropa dan Afrika. Sirkulasi yang terus bertahan telah menghasilkan evolusi filogenetik dengan trah-trah (*lineages*) yang berbeda. Pendahulu dari semua virus-virus H5N1 yang bersirkulasi saat ini adalah

A/goose/Guangdong/1/1996, yang pertama kali diisolasi dari seekor angsa sakit di Guangdong, China pada tahun 1996. Derivat-derivat dari virus inilah yang kemudian menyebar ke Asia Tenggara, Eurasia dan Afrika. Sejalan dengan penyebarannya, virus-virus H5N1 yang telah berdiversifikasi menjadi berbagai trah tersebut, banyak diantaranya terus bersirkulasi secara bersamaan dan menyebabkan infeksi pada manusia sampai saat ini⁽⁶⁾.

Indikasi keberadaan virus HPAI H5N1 pada itik sehat sebenarnya sudah diketahui pada saat isolasi virus yang dilakukan di China antara tahun 1999 dan 2002. Virus-virus ini menunjukkan kesamaan secara antigenik dengan virus *A/goose/Guangdong/1/96*. Kemudian dari suatu studi yang dilakukan di pasar unggas hidup di Vietnam pada 2001 ditemukan virus HPAI H5N1 pada angsa sehat. Pada kasus di China maupun di Vietnam, virus-virus yang ditemukan bersifat sangat patogen bagi ayam. Meskipun demikian, virus yang ditemukan di Vietnam pada tahun 2001 berbeda secara genetik, antigenik, dan patologik dari yang kemudian diisolasi dari kejadian wabah pada tahun 2004^(4,13).

Satu kelompok yang mendapatkan perhatian cukup besar dari para ahli dunia yaitu suatu kelompok urutan keempat baru 2.3.2.1 yang diidentifikasi pada Februari 2011, sebagai hasil evolusi dari kelompok 2.3.2 yang semula bersirkulasi di antara unggas di wilayah Asia Timur sejak tahun 2005. Penemuan kelompok baru ini pada unggas semakin meningkat di sejumlah negara, dan bahkan di beberapa area menjadi lebih dominan daripada kelompok-kelompok yang bersirkulasi sebelumnya seperti di Vietnam⁽¹⁹⁾.

Konfirmasi pertama munculnya virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 pada burung liar di India dan peternakan unggas di Bhutan, selanjutnya virus ini terus menyebar dari Asia Tenggara dan daerah lainnya. Sejak awal tahun 2011 sejumlah negara di Asia telah terkena introduksi virus baru terutama *clade* 2.3.2.1 yang disebabkan implikasi oleh burung liar yaitu India, Republik Korea, Jepang dan Myanmar dan Nepal. Pada awal tahun 2012 tidak ada laporan *outbreak* yang disebabkan introduksi virus 2.3.2.1 di Jepang dan Republik Korea. Pada tahun 2009 virus *clade* 2.3.2 dianggap sebagai tipe dominan di Cina walaupun *clade* 2.3.4 sudah tidak muncul⁽⁸⁾. *Outbreak* H5N1 *clade* 2.3.2 di Eropa, terakhir dilaporkan terjadi pada tahun 2010 di Rumania dan Bulgaria⁽¹⁰⁾. Indonesia secara resmi melaporkan adanya kasus HPAI pada unggas pada Januari 2004. Sampai April 2012, penyakit AI sudah menjadi endemik di 32 provinsi di Indonesia dan hanya satu propinsi yang dinyatakan bebas AI yaitu Provinsi Maluku Utara⁽⁴⁾.

Sejak awal wabah pada tahun 2003 sampai dengan saat ini, virus HPAI H5N1 di Indonesia termasuk dalam *clade* 2.1 yang selanjutnya terbagi menjadi 3 *clade* dengan urutan sebagai berikut 2.1.1, 2.1.2 dan 2.1.3^(17, 23). Virus-virus *clade* 2.1.1 banyak diisolasi dari

unggas-unggas yang terinfeksi HPAI selama wabah berlangsung antara tahun 2004-2007. *Clade* 2.1.2 terdiri dari virus-virus yang menginfeksi unggas dan manusia, diisolasi terutama dari Sumatera pada tahun 2004-2007. *Clade* 2.1.3 terdiri dari suatu rangkaian virus-virus yang diisolasi dari unggas dan manusia sejak 2004⁽²³⁾. *Clade* 2.1.3 menjadi paling dominan di Indonesia, sedangkan *clade* 2.1.1 dan 2.1.2 semakin berkurang sejak 2005⁽¹⁷⁾. Virus-virus *clade* 2.1.3 telah menyebar dan menjadi endemik di banyak provinsi di Indonesia. Hasil evolusi dari *clade* 2.1.3 inilah yang membentuk beberapa sub-trah baru^(17, 23). *Outbreak* virus HPAI H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia terjadi pada bulan September 2012 sejak terjadi kematian massal itik di Kabupaten Brebes, Jawa Tengah. Virus varian baru ini sangat ganas menyerang itik. Sembilan provinsi dilaporkan sudah tertular dalam waktu enam bulan sejak kasus pertama kematian massal itik yaitu Jawa Tengah, Jawa Timur, Jawa Barat, DIY, Banten, Lampung, Riau, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Barat. Hingga 27 Desember 2012 tercatat 150.000 itik mati terjangkit *clade* 2.3.2. dan seluruh kasus kematian terjadi di peternakan itik rakyat⁽³⁾.

Pada itik yang terinfeksi virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 menunjukkan gejala klinis syaraf seperti tortikolis, tremor, kesulitan berdiri, kehilangan keseimbangan saat berjalan, dan pada kasus parah disertai kematian. Hasil pemeriksaan patologi anatomi tidak ditemukan perubahan yang spesifik kecuali adanya kornea mata yang keputihan baik unilateral maupun bilateral, garis-garis keputihan pada jantung dan kongesti pembuluh darah serta nekrosis pada otak dengan variasi dari ringan sampai berat. Pemeriksaan histopatologi menunjukkan adanya infiltrasi tinggi limfosit pada otot jantung, pada otak terjadi multifokal nekrosis hingga infiltrasi limfosit disertai *perivaskular cuffing* ringan sampai berat⁽²²⁾.

MATERI DAN METODE

MATERI

Isolat

Isolat virus yang dikirim BBV Wates ke BBPMSOH berasal dari ayam, itik, entok, dan puyuh. Isolat berupa *complementary Deoxyribonucleic Acid* (cDNA) dan suspensi organ dalam larutan *buffer Viral Lysis/AVL* tanpa *carrier* RNA, berikut isolat-isolat virus yang diuji PCR dan *sequencing*:

1. *A/chicken/Sukoharjo/BBVW 218-03/2011*
2. *A/chicken/Kulon Progo/BBVW 1081-07-A/2011*
3. *A/chicken/Sukoharjo/BBVW 1148-07/2011*
4. *A/chicken/Gorontalo/BBVM 228-10/2011*

5. *A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012*
6. *A/duck/Wonogiri/BBVW-1730-11/2012*
7. *A/duck/Blitar/BBVW-1731-11/2012*
8. *A/duck/Tegal/BBVW-1727-11/2012*
9. *A/muscovy duck/Tegal/BBVW-1732-11/2012*
10. *A/quail/Pekalongan/BBVW 1769-11/2012*
11. *A/chicken/Pati/BBVW 1788-11/2012*
12. *A/chicken/Sleman/BBVW 1908-12/2012*

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan adalah *Kit Qiamp RNA Viral Mini Kit*, ethanol absolut 96%, Kit Qiagen *One Step RT-PCR*, Primer Reference dari *Australian Animal Health Laboratory (AAHL) Geelong*, *Forward* dan *Reverse HA 10–40*, Primer *Forward* dan *Reverse M13*, *RT-PCR Grade Water*, *agarose*, *SYBR Safe*, *Buffer Tris Acetate EDTA (TAE) 10X*, *DNA marker 100 bp*, *blue jus*, *blanko solution*, *tissue kim wipes*, *Illustra Exostar Enzymatic PCR & Sequencing*, *Big Dye Terminator Kit*, *Big Dye X Terminator Kit*, *buffer Anode Buffer Container (ABC)*, *Cathoda Buffer Container (CBC)*, dan *Polymer POP7*.

Alat yang digunakan adalah *thermocycler*, *Nano Drop 2000*, *single channel*, *tips filter* ukuran 0,5-10 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL , *mupid 2*, *vortex plate*, *plate 96 well*, *tube 0.2 mL*, *capillary array 50 cm*, *septa ABC*, *CBC*, *septa plate 96*, dan *retainer plate*.

METODE

Metode yang digunakan untuk menghasilkan urutan basa nukleotida yaitu metode *PCR* dan *sequencing*. Berikut adalah tahap–tahap reaksi yang dilakukan:

a. Ekstraksi.

Sampel suspensi organ dalam larutan *buffer Viral Lysis/AVL* dilakukan proses ekstraksi menggunakan *Qiamp Viral RNA Mini Kit*. Hasil ekstraksi RNA disimpan pada -20 C.

b. Master Mix PCR

Sequen primer yang digunakan berasal dari AAHL Geelong.

<i>Forward HA 10</i>	: AGCAAAAGCAGGGGT
<i>Reverse HA 10</i>	: CTTCTCCACTATGTAAGACCATTCTG
<i>Forward HA 20</i>	: GTTACACATGCCCAAGACATACTG
<i>Reverse HA 20</i>	: TGAGTCCCCTTTCTTGACAATTTTGT
<i>Forward HA 30</i>	: TTTCCGTTGGGACATTAACACTAA

Reverse HA 30 : CCATGAGAACATTAACACTAA
Forward HA 40 : GGATGGCAGGCAATGGTAGATG
Reverse HA 40 : AGTAGAAACAAGGGTGTT

Untuk sampel cDNA *reagent master mix* menggunakan Platinum Taq DNA *Polymerase High Fidelity* (Invitrogen 11304011) sehingga total volume akhir *reagent master mix* dan sampel yaitu 50 μ L.

Untuk sampel dalam bentuk suspensi organ dalam larutan Buffer AVL dan telah dilakukan ekstraksi maka *reagent master mix* menggunakan *Qiagen One Step RT-PCR Kit* sehingga total volume akhir *reagent master mix* dan sampel 25 μ L.

c. Amplifikasi

Tube yang berisi sampel dan *reagent master mix* dimasukkan ke dalam *thermal cycler* PCR dengan tahapan sebagai berikut:

- c.1. Untuk sampel cDNA : *Hot Start* 94 C, 70 detik, Siklus 25X yaitu Denaturasi 94 C, 30 detik, *Annealing* HA 10 s/d 40 yaitu 50 C, 55 C, 51 C, 51 C @ 1 menit, *Extension* 72 C, 1 menit, *End* 4 C.
- c.2. Untuk sampel yang diekstraksi : *Reverse Transcriptase* 50°C, 30 menit, *Hot start* 95°C, 15 menit, Siklus 35X yaitu Denaturasi 94 C, 30 detik, *Annealing* HA 10 s/d 40 : 50 C, 55 C, 51 C, 51 C, @ 1 menit, *Extension* 72 C, 1 menit, *Final extension* 72°C, 10 menit, *End* 4 C.

d. Elektroforesis

Proses elektroforesis menggunakan mesin Mupid 2, agarose 2%, SYBR *safe*, Buffer TAE 10x, *Loading dye*, dan DNA *Marker* 100 bp. Proses elektroforesis dimulai dengan *power supply* 100 volt selama 40 menit.

e. Pengukuran Konsentrasi Produk PCR Menggunakan Nano Drop

Konsentrasi produk PCR diukur menggunakan alat dan *software* Nano Drop 2000, pertama kali dilakukan pengukuran larutan blanko, selanjutnya diukur masing - masing sampel sebanyak 1 μ L sehingga diperoleh konsentrasi hasil produk amplifikasi dan kemurnian hasil ekstraksi.

f. Purifikasi Produk PCR

Purifikasi menggunakan illustra *ExoStar Enzymatic PCR & Sequencing* yaitu 10 μ L produk PCR ditambahkan dengan 4 μ L reagen *ExoStar* selanjutnya dinkubasikan pada 37°C selama 15 menit dan 80°C selama 15 menit menggunakan mesin *thermal cyclers (fast PCR)*.

g. Pengenceran Sampel

Pengenceran *template* dari produk purifikasi *Exo Star Enzymatic* menggunakan RT-PCR *Grade Water* dengan perhitungan pengenceran menggunakan hasil pengukuran menggunakan *Nano Drop 2000* dan standar Kuantitas *Template*. Jika produk PCR 200-500 bp maka konsentrasi yang dibutuhkan untuk *cycle sequencing* 3-10 ng (diambil 10 ng), jika 500-1000 bp maka konsentrasi yang dibutuhkan untuk *cycle sequencing* 5-20 ng (diambil 20 ng).

h. Master Mix Cycle Sequencing

Berikut *Reagent Master Mix Cycle Sequencing* masing–masing sampel *forward* dan *Reverse*: *Big Dye Terminator Mix* 4 μ L, *Buffer sequencing* 4 μ L, *template* (10 ng atau 20 ng) 1.5 μ L, *Primer M13 forward* atau *reverse* (3.2 pmol) 4 μ l, *RT-PCR grade water* 6.5 μ l sehingga total volume 20 μ L. *Sequen universal primer* yang digunakan untuk tahap *cycle sequencing* adalah *Primer M13 Forward* dengan *sequen* TGTAACGACGGCCAGT dan *Primer M13 Reverse* dengan *sequen* CAGGAAACAGCTATGACC.

i. Cycle Sequencing

Tube yang berisi *template* dan *reagent master mix cycle sequencing* dimasukkan ke dalam mesin *thermal cyclers* dengan tahapan sebagai berikut : Initial Denaturasi 96 C, 1 menit, siklus 25x terdiri dari denaturasi 96 C, 10 detik, *annealing* 50 C, 5 detik, *extension* 60 C, 4 menit dan final 4 C.

j. Purifikasi Big Dye X Terminator Kit

Proses mencampur produk hasil *cycle sequencing* dengan *reagent* purifikasi dilakukan di atas *ice tray*. X-Terminator 25 μ L ditambahkan menggunakan tips dengan ujung lebar (*wide bore tips*) pada produk hasil *cycle sequencing* (20 μ L). Selanjutnya ditambahkan 90 μ L *SAM Solution*. *Tube* ditutup dan divorteks selama 30 menit dengan kecepatan yang memungkinkan semua cairan tercampur merata secara *continue*. Setelah divorteks 30 menit selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 2 menit.

k. *Running Genetik Analyzer (Sequencing)*

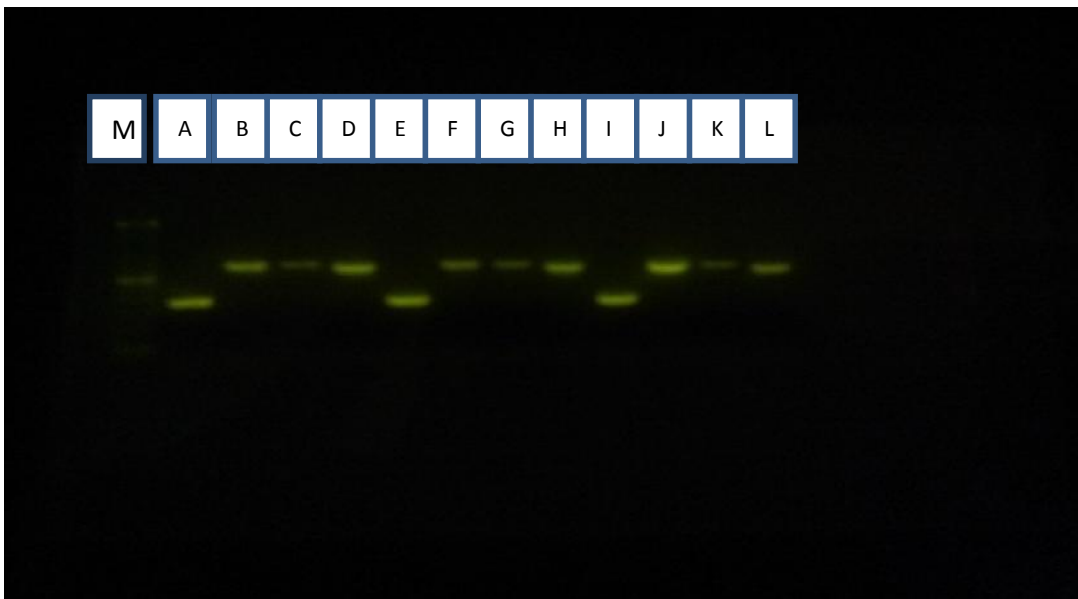
Running Sequencing menggunakan *plate* sampel 96 well, ABC, ABC, *Polymer POP 7, Cappillary Array 50 cm.*, Protokol Uji : *Std_Seq_Assay_POP7 (5760 sec)*, *Dye set : Z.* Hasil purifikasi menggunakan Big Dye X Terminator kit diambil bagian atas yang bening sebanyak 20 μ L dan dimasukkan ke dalam *plate 96 well sequencing* dan ditutup rapat dengan septa. Harus dipastikan tidak ada gelembung udara pada bagian dasar *plate 96 well*. *Plate 96 well* dimasukkan pada *plate base* dan ditutup dengan *plate retainer*.

l. *Software Analisa Bioinformatika Data Hasil Sequencing*

Hasil *sequencing* dianalisa dengan *software: Sequencing Analysis, Secscape, web National Center for Biotechnology Information (NCBI)* dan *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), software MEGA5.*

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Elektroforesis



Gambar 1*. Hasil elektroforesis PCR sampel No. 6, 7 dan 8 menggunakan 4 primer HA 10 - 40

Keterangan: M = Marker, A=isolat 6 HA 10, B=isolat 6 HA 20, C=isolat 6 HA 30, D=isolat 6 HA 40, E=isolat 7 HA 10, F=isolat 7 HA 20, G=isolat 7 HA 30, H=isolat 7 HA 40, I=isolat 8 HA 10, J=isolat 8 HA 20, K=isolat 8 HA 30, L=isolat 8 HA 40.

* = gambar hasil elektroforesis yang ditampilkan hanya sebagai perwakilan, sedangkan hasil elektroforesis sampel lainnya tidak bisa ditampilkan karena keterbatasan halaman.

Hasil elektroforesis dua belas isolat yang diuji PCR dengan menggunakan 4 pasang primer desain AAHL-Geelong menghasilkan panjang amplicon yang sama yaitu primer HA 10 menghasilkan amplicon pada posisi 358 bp, primer HA 20: 747 bp, primer HA 30: 713 bp, dan primer HA 40: 713 bp. Walaupun ada beberapa isolat di beberapa primer menghasilkan amplicon yang tipis namun semua isolat tetap dilanjutkan untuk disekuensing.

Primer yang digunakan adalah primer spesifik yang didesain oleh AAHL-Geelong untuk mengamplifikasi keseluruhan gen HA virus AI sub tipe H5 sehingga diperoleh gen HA secara lengkap (*full open reading frame*). Dari hasil elektroforesis dapat disimpulkan bahwa semua isolat yang teramplifikasi dengan empat pasang primer tersebut memang benar virus AI sub tipe H5 dan diharapkan hasil *sequencing* bisa mendapatkan keseluruhan gen HA.

2. Hasil Sequencing

Hasil *sequencing* berupa urutan nukleotida akan dianalisa menggunakan *software Sequencing Analysis* untuk melihat kualitas elektroferogram dan nilai *Query Value* (QV) yaitu tingkat kepercayaan sekuen yang didapat. Selanjutnya dianalisa dengan menggunakan *software secscape* yang berfungsi untuk menyambungkan empat pasang primer sehingga didapatkan gen HA secara penuh nukleotida 1707 bp dan mengedit sekuen yang bernilai QV rendah, *web* NCBI berfungsi untuk menemukan *references* sekuen yang terdekat dengan isolat yang diuji. *Software* MEGA5 berfungsi menganalisa sekuen isolat dan *reference* dengan program clustalW, mengubah sekuen nukleotida menjadi asam amino dan membuat pohon filogenetik.

Hasil *sequencing* dari dua belas isolat diperoleh panjang nukleotida mendekati 1700 bp kecuali isolat *A/chicken/Pati/BBVW 1788-11/2012* karena hasil *sequencing*nya kurang optimal, yaitu hanya diperoleh sekitar 1100 bp. Meskipun demikian analisa filogenetik isolat tersebut masih dapat diketahui klasifikasinya. Hasil *sequencing* berupa nukleotida dilakukan analisis sebagai berikut :

- a. analisis keragaman antara isolat itik dan *reference* H5N1 *clade* 2.3.2 dari *genbank*
- b. analisis keragaman antara isolat ayam (*clade* 2.1.3) dan isolat itik (*clade* 2.3.2)
- c. analisis *Cleavage Site* dan *Receptor Binding Site*
- d. analisis pohon Filogenetik.

a. Analisa Keragaman Antara Isolat Itik dan Reference NCBI H5N1 *clade* 2.3.2

Tabel 1. Hasil Analisa Keragaman Sekuen Antara Isolat Itik *clade* 2.3.2 dan Reference NCBI H5N1 *clade* 2.3.2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. A/quail/Pekalongan/BBVW 1769-11/2012										
2. A/Muscovyduck/Tegal/BBVW_1732_11/2012	0.002									
3. A/duck/wonogiri/BBVD 1730-11/2012	0.003	0.001								
4. A/duck/sukoharjo/BBVW 1428-9/2012	0.002	0.000	0.001							
5. A/duck/Blitar BBVW 1731-11/2012	0.004	0.002	0.003	0.002						
6. A/duck/tegal/BBVW 1731-11/2012	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003					
7. A/duck/Vietnam/QB1207/2012(H5N1)	0.006	0.005	0.006	0.005	0.007	0.005				
8. A/duck/Vietnam/DIE-2212/2012(H5N1)	0.008	0.007	0.008	0.007	0.009	0.007	0.002			
9. A/duck/Vietnam/DIE-2211/2012(H5N1)	0.008	0.008	0.009	0.008	0.010	0.008	0.003	0.002		
10. A/duck/Vietnam/DIE-2202/2012(H5N1)	0.007	0.006	0.008	0.006	0.008	0.006	0.001	0.001	0.001	

Tabel 1. merupakan hasil analisa keragaman sekuen antara isolat itik *clade* 2.3.2 dan *reference* sekuen H5N1 *clade* 2.3.2 dari NCBI yang merupakan hasil BLAST dengan nilai QC 100%. Hasil analisa keragaman dari isolat itik, entok dan puyuh *clade* 2.3.2 memiliki tingkat homologi yang tinggi yaitu 99,0% - 99,5% terhadap virus *reference clade* 2.3.2 yang berasal dari Vietnam.

b. Analisa Keragaman Antara Isolat Ayam (*clade* 2.1.3) dan Isolat Itik (*clade* 2.3.2)

Berdasarkan Tabel 2. diperoleh hasil analisa keragaman yang rendah yaitu 90,4% - 90,9%. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa virus isolat dari itik ini bukan termasuk *clade* 2.1.3 akan tetapi merupakan virus H5N1 *clade* 2.3.2 yang merupakan varian baru di Indonesia. Dalam *outbreak* kematian massal itik sejak September 2012 juga ditemukan kematian burung puyuh, entok dan ayam buras (isolat A/chicken/Pati/BBVW 1788-11/2012) yang disebabkan virus H5N1 *clade* 2.3.2, ditemukan juga kematian pada ayam buras yang disebabkan virus H5N1 *clade* 2.1.3 (isolat A/chicken/Sleman/BBVW 1908-12/2012).

Tabel 2. Hasil Analisa Keragaman Sekuen Antara Isolat Ayam *Clade* 2.1.3 dan Isolat Itik *Clade* 2.3.2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. A/quail/Pekalongan/BBVW 1769-11/2012										
2. A/Muscovyduck/Tegal/BBVW_1732_11/2012	0.000									
3. A/duck/wonogiri/BBVD 1730-11/2012	0.001	0.001								
4. A/duck/tegal/BBVW 1731-11/2012	0.000	0.000	0.001							
5. A/duck/sukoharjo/BBVW 1428-9/2012	0.000	0.000	0.001	0.000						
6. A/chicken/Sleman/BBVW 1908-12/2012	0.095	0.095	0.096	0.095	0.095					
7. A/chicken.sukoharjo.bbvw.218-03.2011	0.093	0.093	0.092	0.093	0.093	0.015				
8. A/chicken.sukoharjo.bbvw.1148-07.2011	0.092	0.092	0.091	0.092	0.092	0.013	0.004			
9. A/chicken.kulon progo.bbvw.1081-07-A.2011	0.092	0.092	0.091	0.092	0.092	0.015	0.006	0.002		
10. A/chicken.gorontalo.bbvm.228-10.2011	0.093	0.093	0.092	0.093	0.093	0.016	0.009	0.007	0.009	

Suatu penelitian dilakukan di Jawa Tengah selama 12 bulan pada tahun 2007-2008 pada 96 peternakan itik yang tidak divaksin HPAI yang dimonitor setiap 2 bulan sekali. Dalam penelitian tersebut juga dilakukan pengamatan terhadap karakteristik molekuler dan antigenik virus-virus H5N1 yang diisolasi dari 96 peternakan itik diatas. Dari penelitian tersebut, 84 virus yang diisolasi dilakukan karakterisasi dan masuk ke dalam virus H5N1 kelompok (*clade*) 2.1, dan selanjutnya 3 turunan (*sublineage*) berhasil diidentifikasi yaitu subkelompok 2.1.1 (1 virus), subkelompok 2.1.3 (80 virus), dan subkelompok virus yang menyerupai IDN/6/05 atau IDN/6/05 *like* virus (3 virus). Ke-tiga subkelompok ditemukan pada itik, tapi hanya subkelompok 2.1.3 diisolasi dari ayam⁽²³⁾.

Berdasarkan hasil penelitian Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet) Badan Litbang Kementerian Pertanian, virus *clade* 2.3.2 ini merupakan introduksi dari luar negeri, kedelapan gen virus AI *clade* 2.3.2 berasal dari sumber luar negeri, sehingga kemungkinan besar virus ini bukan merupakan hasil mutasi virus AI *clade* 2.1 (2.1.1; 2.1.2; dan 2.1.3) yang telah menginfeksi unggas dan manusia di Indonesia selama ini. Dr. Indi Damayanti menjelaskan bahwa hasil uji pathogenesis virus *clade* 2.3.2 dibandingkan dengan virus *clade* 2.1.3 (2012) memperlihatkan patogenitas yang tinggi pada itik dan menimbulkan kematian pada rentang 2-7 hari pasca infeksi⁽⁵⁾.

c. **Analisis *Cleavage Site (SC)* dan *Receptor Binding Site (RBS)***

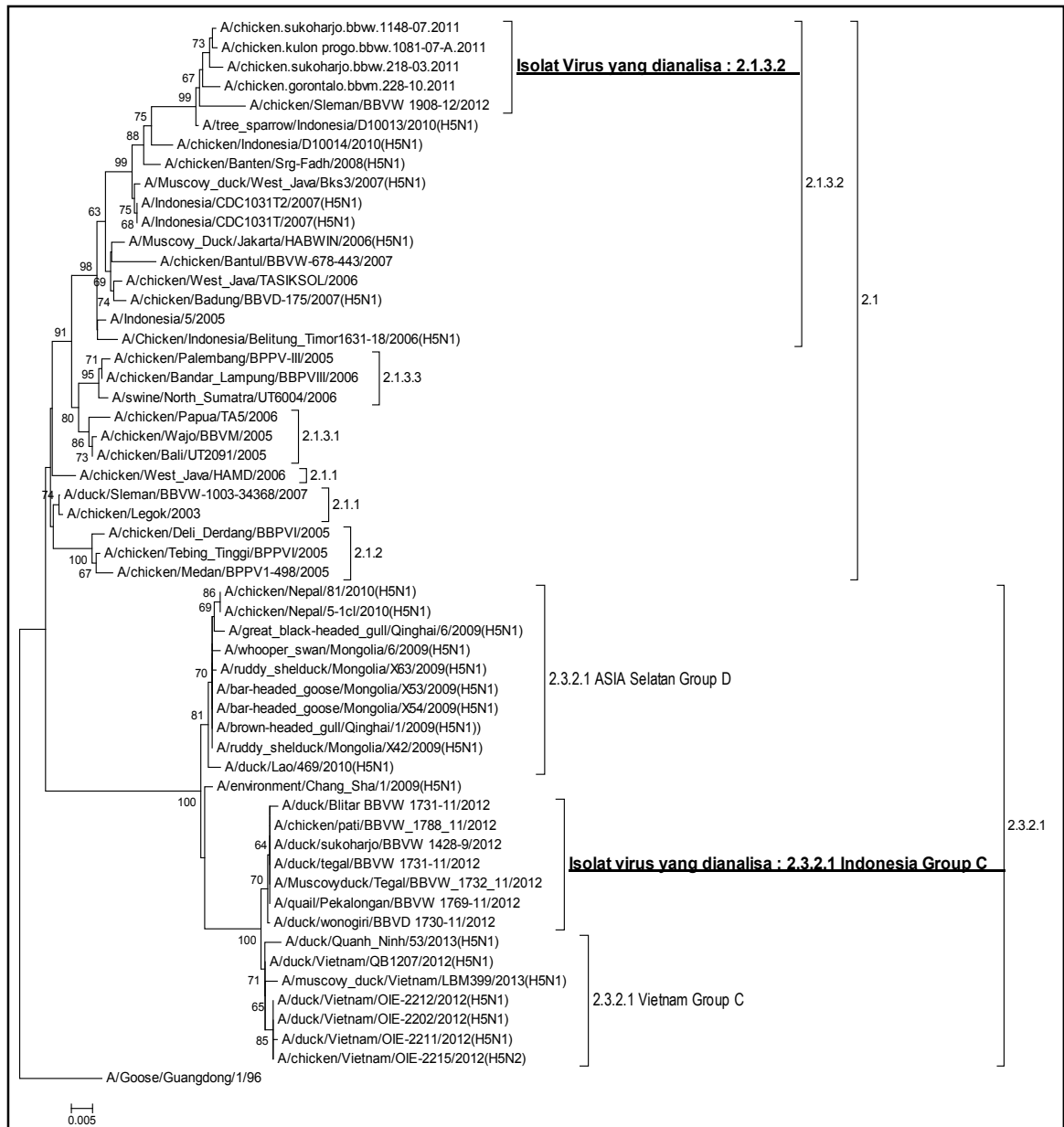
Analisis *sequen* asam amino pada *cleavage site (CS)* dari 12 isolat diperoleh 2 pola *polybasic* yaitu PQRESRRKKR (untuk isolat *clade* 2.1.3) dan PQRERRRKR (untuk isolat *clade* 2.3.2). Isolat yang termasuk dalam *clade* 2.1.3 yaitu *A/chicken/Sukoharjo/BBVW 218-03/2011*, *A/chicken/Kulon Progo/BBVW 1081-07-A/2011*, *A/chicken/Sukoharjo/BBVW1148-07/2011*, *A/chicken/Gorontalo/ BBVM-228-10/2011*, *A/chicken/Sleman/BBVW 1908-12/2012*.

Isolat yang termasuk *clade* 2.3.2 yaitu *A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012*, *A/duck/Wonogiri/BBVW-1730-11/2012*, *A/duck/Blitar/BBVW-1731-11/2012*, *A/duck/Tegal/BBVW-1727-11/2012*, *A/muscovyduck/Tegal/BBVW-1732-11/2012*, *A/quail/Pekalongan/BBVW 1769-11/2012*, *A/chicken/Pati/BBVW 1788-11/2012*. Untuk isolat *A/chicken/Pati/BBVW 1788-11/2012* karena panjang nukleotida hasil *sequencing* kurang panjang sehingga tidak diperoleh pola asam amino pada bagian *cleavage site* juga *receptor binding site (RBS)*, namun jika dianalisa menggunakan pohon filogenetik isolat ini termasuk dalam *clade* 2.3.2.

Dari hasil analisis *multiple alignmen* program ClustalW dari *software* MEGA5, asam amino pada daerah *cleavage site*, menunjukkan pola pengulangan asam amino arginin (R) dan lisin (K) yaitu PQRESRRKKR (*clade* 2.1.3) dan PQRERRRKR (*clade* 2.3.2) yang merupakan indikasi virus H5N1 strain HPAI. Hasil analisis sekuen asam amino pada *RBS* dari dua belas isolat yang *disequencing* diperoleh hasil yang sama untuk pola asam amino pada *RBS* yaitu glutamin (Q) pada asam amino ke-222 dan glisin (G) pada asam amino ke-224 ini artinya ini artinya tidak ditemukan mutasi yang mengarah ke perubahan reseptor virus dari unggas ke manusia, isolate virus yang dianalisa masih mengenali *avian receptor* (α 2-3) yang hanya spesifik pada virus – virus H5N1 yang menyerang unggas.

Asam amino *cleavage site clade* 2.3.2 PQRERRRKR di Indonesia memiliki pola yang sama dengan *clade* 2.3.2 pada kasus kematian massal burung liar di Danau Gengahai Provinsi Qinghai China pada bulan Mei–Juni 2009. Pola *polybasic* ini menunjukkan *clade* 2.3.2 di Indonesia dan China merupakan H5N1 strain HPAI ⁽¹²⁾.

d. Analisa Pohon Filogenetik



Gambar 2. Pohon filogenetik dari 12 isolat ayam, itik, entok dan puyuh menggunakan NJ tree, model substitusi nukleotida Kimura 2 – parameter model, 1000 bootstrap replikasi, root A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1)

Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan *Neighbor-Joining* (NJ) *Tree* dengan model substitusi nucleotida Kimura 2 – parameter model dan 1000 *bootstrap* replikasi yang bertujuan untuk mengetahui penggolongan atau klasifikasi virus H5N1 dari isolat ayam dan itik. Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan isolat dari ayam yang merupakan hasil *monitoring* selama tahun 2011 termasuk dalam *clade* 2.1.3 (*clade* 2.1.3.2), sedangkan isolat itik, entok, puyuh yang merupakan isolat yang diambil sejak terjadinya kematian massal itik termasuk dalam *clade* 2.3.2 dan

berada dalam cabang filogenetik *clade* 2.3.2.1. Namun saat terjadi kematian massal pada itik juga terdapat kematian pada ayam buras yang disebabkan AI H5N1 *clade* 2.1.3 sehingga dapat disimpulkan bahwa *clade* lama Indonesia yaitu 2.1.3 tetap ada dan masih patogen pada ayam.

Meskipun virus-virus H5N1 terus berevolusi, *Food and Agriculture Organization* (FAO) menyatakan tidak ada bukti saat ini bahwa virus H5N1 tertentu lebih virulen atau lebih mampu menulari unggas atau lebih patogenik bagi manusia. Hanya satu kelompok yang mendapatkan perhatian cukup besar dari para ahli dunia yaitu suatu kelompok urutan keempat baru 2.3.2.1 yang diidentifikasi pada Februari 2011, sebagai hasil evolusi dari kelompok 2.3.2 yang semula bersirkulasi di antara unggas di wilayah Asia timur sejak tahun 2005. Penemuan kelompok baru ini pada unggas semakin meningkat di sejumlah negara, dan bahkan di beberapa area menjadi lebih dominan daripada kelompok-kelompok yang bersirkulasi sebelumnya seperti di Vietnam⁽⁹⁾.

Meskipun tiga kasus manusia terinfeksi virus H5N1 di Vietnam tahun 2009 dan 2010 dihubungkan dengan virus-virus kelompok 2.3.2.1, namun tidak ada indikasi bahwa kelompok 2.3.2.1 menimbulkan ancaman besar terhadap kesehatan manusia dibandingkan dengan virus-virus H5N1 lainnya⁽⁹⁾. *World Health Organization* (WHO) menyatakan hal yang sama dalam menyikapi penemuan virus-virus H5N1 kelompok 2.3.2.1 baru-baru ini. Sirkulasi kelompok ini pada unggas di beberapa wilayah Asia sampai saat ini tidak meningkatkan resiko terhadap kesehatan manusia⁽¹⁸⁾.

Pedoman untuk pencegahan, pengendalian dan pemberantasan AI secara lengkap telah ditetapkan oleh *Office International des Epizooties* (OIE) dan WHO dan telah digunakan sebagai acuan program pencegahan, pengendalian dan pemberantasan AI di seluruh dunia⁽⁷⁾. Pemerintah Indonesia melalui Dirjen Bina Produksi Peternakan No. 17/Kpts/PD.640/F/02.04 juga telah menetapkan langkah-langkah strategis untuk pencegahan, pengendalian dan pemberantasan AI di Indonesia. Langkah-langkah strategis itu meliputi peningkatan biosekuriti, depopulasi, vaksinasi, pengendalian lalu lintas, surveilan, restocking, peningkatan kesadaran masyarakat, *monitoring* dan evaluasi⁽¹⁵⁾.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis pohon *phylogenetic* dan analisis keragaman sequen menunjukkan isolat dari ayam termasuk dalam *clade* 2.1.3 dengan pola *cleavage site* PQRESRRKKR. Isolat itik, entok dan puyuh termasuk dalam *clade* 2.3.2 dan pola *cleavage site* PQRERRRKR, memiliki tingkat homologi yang tinggi terhadap virus *reference clade* 2.3.2 yang berasal dari Vietnam, namun memiliki tingkat homologi rendah terhadap *clade* 2.1.3 (*clade* lama di Indonesia) hal ini menunjukkan bahwa virus *clade* 2.3.2 bukan termasuk *clade* 2.1.3 tapi merupakan varian baru di Indonesia. Semua isolat memiliki reseptor yang sama yaitu glutamin (Q) pada asam amino ke-222 dan glisin (G) pada asam amino ke-224 ini artinya tidak ditemukan mutasi yang mengarah ke perubahan reseptor virus dari unggas ke manusia, isolate virus yang dianalisa masih mengenali *avian receptor* (α 2-3) yang hanya spesifik pada virus – virus H5N1 yang menyerang unggas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alexander D.J. 2000. *A Review of Avian Influenza in Different Bird Species*. Vet. Microbiol. 74: 3-13.
2. Anonimus. 2013. Bird Flu (H5N1) Genetics. [http://www.news-medical.net/health/Bird-Flu-\(H5N1\)-Genetics.aspx](http://www.news-medical.net/health/Bird-Flu-(H5N1)-Genetics.aspx) (diunduh pada tanggal 16 Januari 2013)
3. Anonimus. 2013. Jateng Jadi Daerah Rawan Penyebaran AI Clade 2.3.2. <http://www.solopos.com/2013/01/02/jateng-jadi-daerah-rawan-penyebaran-ai-clade-2-3-2-364005>. (diunduh pada tanggal 16 Januari 2013)
4. Anonimus. 2013. Peranan Unggas Air (Itik) dalam Penyebaran Virus AI. <http://bbalitvet.litbang.deptan.go.id/ind/index.php/component/content/article/37-berita-utama/360-peranan-unggas-air-itik-dalam-penyebaran-virus-ai>. (diunduh pada tanggal 21 Oktober 2013)
5. Anonimus. 2013. Tingkatkan Riset dan Strategi Pengendalian AI. <http://www.litbang.deptan.go.id/berita/one/1332> (diunduh pada tanggal 16 Januari 2013)
6. Ducatez M.F., Bahl J., Griffin Y., Stigger-Rosser E., Franks J., Barman S., Vijaykrishna D., Webb A., Guan Y., Webster R.G., Smith G.J.D., and Webby R.J. 2011. *Feasibility of Reconstructed Ancestral H5N1 Influenza Viruses for Cross-clade Protective Vaccine Development*. PNAS, 108(1): 349-354. www.pnas.org/cgi/doi/pnas.1012457108. (diunduh pada tanggal 16 Januari 2013)
7. EMERGING INFECTION DISEASES (EID). 2006. *Control of Avian Influenza in Poultry*. <http://www.vetcite.org/publish/items/003162/index.html>. (diunduh pada tanggal 12 September 2006).

8. EMPRES/FAO-GLEWS. 2012. *H5N1 HPAI Global Overview January–March 2012*. Summary Issue No. 31 : 1 – 11.
9. FAO. 2011. *FAO-OIE-WHO Technical Update: Current Evolution of Avian Influenza H5N1 Viruses*. <http://www.fao.org/docrep/014/al874e/al874e00.pdf> (diunduh pada tanggal 7 September 2011)
10. FAO. 2011b. *Approaches to Controlling, Preventing and Eliminating H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in Endemic Countries*. <http://www.fao.org/docrep/014/i2150e.pdf> (diunduh pada tanggal 31 Agustus 2011)
11. Li Y., Liu L., Zhang Z., Tian G., Zeng X., Shi J., Zhang L., Chen H. 2011. *New Avian Influenza Virus (H5N1) in Wild Bird, Qinghai China, Emerging Infectious Disease*. www.cdc.gov/eid. Vol.17.No.2. (diunduh pada tanggal 5 Februari 2011)
12. Nguyen D.C., Uyeki T.M., Jadhao S., Maines T., Shaw M., Matsuoka Y., Smith C., Rowe T., Lu X., Hall H., Xu X., Balish A., Klimov A., Tumpey T.M., Swayne D.E., Huynh L.P., Nghiem H.K., Nguyen H.H., Hoang L.T., Cox N.I., and Katz J.M. 2005. *Isolation and Characterization of Avian Influenza Viruses, Including Highly Pathogenic H5N1, From Poultry in Live Bird Markets in Hanoi, Vietnam, in 2001*. *J. Virol.* 79: 4201-4212.
13. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). 2004. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal*. World Organisation for Animal Health 4: 258 – 269.
14. Syukur, D.A. 2006. *Situasi Penyakit Flu Burung*. http://www.disnakeswan-lampung.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=143&Itemid=9. (diunduh pada tanggal 30 Desember 2006).
15. Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta 1: 232 – 244.
16. Takano R., Nidom C.A., Kiso M., Muramoto Y., Yamada S., Sakai-Tagawa Y., Macken C., and Kawaoka Y. 2009. *Phylogenetic Characterization of H5N1 Avian Influenza Viruses Isolated in Indonesia from 2003-2007*. *Virology* 390: 13-21. doi:10.1016/j.virol.2009.04.024.
17. WHO (2011). *Avian Influenza Situation Update in Indonesia*. <http://www.who.int>. (diunduh pada tanggal 16 Januari 2013)
18. WHO (2011). *Evolution of H5N1 Avian Influenza Virus Does Not Increase Risk To Public Health*. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/h5n1-2011_08_30/en/index.html. (diunduh pada tanggal 30 August 2011)
19. Webster R.G., Hulse-Post D.J., Sturm-Ramirez K.M., Guan Y., Peiris M., Smith G., and Chen H. 2007. *Changing Epidemiology and Ecology of Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza Viruses*. *Avian Diseases* 51: 269-272.

20. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., and Kawaoka Y. 1992. *Evolution and Ecology of Influenza a Viruses*. Microbiol. Rev. 56: 152-159.
21. Wibawa H., Prijono W.B., Irianingsih S.H., Miswati Y., Rohmah A., Andesfha E., Dharmayati N.L.P.I., Rasa F.S.T. 2012. Investigasi Outbreak penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Timur: Identifikasi sebuah clade baru virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia. Buletin Laboratorium Veteriner BBWates. Vol 12(4).2012
22. Wibawa H., Henning J., Wong F., Selleck P., Junaidi A., Bingham J., Daniels P., and Meers J. 2011. *A Molecular and Antigenic Survey of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolates from Smallholder Duck Farms in Central Java, Indonesia During 2007-2008*. Virology Journal 8(425): 1-17. doi:10.1186/1743-422X-8-425.