

Analisis Molekuler Gen Polymerase Basic 2 (PB 2) Virus Avian Influenza H5N1 yang Diisolasi dari Unggas Asal Purworejo, Jawa Tengah dan Bantul, Yogyakarta

Riandini Aisyah¹, Widya Asmara², Tri Wibawa³

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

³ Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Correspondence to : Riandini Aisyah, M.Sc

Bagian Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta

Email : adnisyaaqalba@yahoo.co.id

ABSTRACT

Avian Influenza Virus (AIV) is a RNA virus which can infect avian, mammalian, and human with genome consisting of 8 segments with Polymerase Basic 2 (PB2) as the longest segment. Polymerase Basic 2 has been known to play a role in cleavage and capping of RNA, related with replication and transcription into 8 segments of virus genome. A research with reverse genetic shows that Glutamate mutation into Lysine in position 627 PB2, determines the high pathogen and mutation in amino acid 667 into Lysine has been known as causing favorable virus to replicate at temperature of 36⁰C. The goal of this study was to find out nucleotide of PB2 gene AIV subtype H5N1 isolated from chicken Purworejo, Central Java and duck from Bantul, Yogyakarta. This study was also aimed to find out the existence of amino acid change in positions 627 and 667, homological level and its 3 dimension of protein structure. RNA virus isolated from the two test isolate was carried out RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) and the resulted cDNA which than sequencing to identify the possibility of the happening of change (mutation) in nucleotide sequence and its amino acid. The analysis was carried out by comparing a certain part of the sequence of nucleotide of PB2 protein of two test isolate with other H5N1 virus from avian and human coming from Asia, Europe, and Africa within 1996 – 2007 selected from genebank. Nucleotide sequence obtained was then analyzed filogenetic to find out its homological level, and subsequently carried out observation on its 3 dimension structure. The result of the study showed that amino acid in position of 627 and 667 in th two test isolate had not mutated into lysine. The mutation point was met in the residue of amino acid having fewer roles in replication, transcription, and transmission among species. Phylogenetic analysis had also been carried out by comparing the two test isolate of 62 isolates of avian influenza virus H5N1 from human and other avian. The two test isolate still showed high homological level with isolate from Indonesia, especially Yogyakarta. From the observation of 3 dimension structure, as a whole, the molecular characteristic of the two test isolate still showed the characteristic of amino acid residue generally found in avian from Indonesia and several avian isolates from other countries.

Key words: PB2, Avian Influenza Virus H5N1, Mutation

Pendahuluan

Jumlah kematian manusia yang berhubungan dengan kasus flu burung terus bertambah. Di Indonesia sampai bulan Januari 2008 tercatat 118 orang terkonfirmasi menderita flu burung dan 95 orang di antaranya meninggal dunia (Asmara, 2007). Makna penting virus influenza unggas (*Avian Influenza Virus/AIV*) yang sangat patogen secara nyata makin meningkat dalam sepuluh tahun terakhir ini, hal ini didasari oleh telah terjadinya perubahan patogenisitas virus dari *low pathogenic* menjadi *high pathogenic* (Honda *et.al.*, 1999)

Masalah penting yang dikhawatirkan oleh para ahli di dunia adalah kemungkinan

munculnya subtipe baru virus influenza yang mampu menular dari manusia ke manusia oleh karena saat ini H5N1 diduga telah mampu menular dari unggas ke manusia. Kemungkinan ini dapat terjadi apabila muncul adanya virus subtipe baru yang terbentuk akibat mutasi adaptif atau rearsori virus AI asal unggas dan virus *human influenza*. Di dalam perkembangannya subtipe virus AI mutan ini dimungkinkan akan terus mengalami mutasi yang dapat berakibat pada *shift* dan atau *drift* antigenik yang dapat meningkatkan kemampuan virus tersebut untuk menginfeksi sel-sel dalam tubuh manusia sehingga dapat terjadi penularan antar manusia

yang merupakan awal dari pandemik global flu burung (Mohamad, 2007).

Kompleks *heterotrimeric polymerase* virus AI yakni *Polymerase Basic 1* dan 2 (PB1 dan PB2) telah diketahui punya peran sentral dalam banyak aspek replikasi virus dan interaksinya dengan *host* sehingga PB1 dan PB2 disebut mempunyai peran dalam *host specificity*. Suatu penelitian dengan *reverse genetic* menunjukkan bahwa Lisin (Lys) pada posisi 627 PB2 (ditemukan pada semua isolat manusia) menentukan patogenisitas yang tinggi pada tikus sedangkan Glutamat (Glu) pada posisi tersebut (ditemukan pada semua isolat unggas) menentukan patogenisitas yang rendah. Asam amino PB2 pada posisi 627 mempengaruhi kemampuan replikasi virus pada tikus dan kemungkinan juga replikasi virus pada manusia. Penemuan ini menunjukkan bahwa mutasi asam amino pada posisi 627 protein PB2 dari Glutamat menjadi Lisin memungkinkan virus influenza unggas dapat tumbuh secara efisien pada manusia dan mengimplikasikan bahwa *lysine* pada posisi tersebut sebagai suatu *host range determinant* yang penting (Neumann & Kawaoka, 2006).

Sebanyak 75 persen isolat virus H5N1 asal manusia dari Vietnam mengalami mutasi pada residu 627 pada protein PB2 yang diyakini menyebabkan level virulensi yang tinggi. Dalam suatu penelitian dengan *reverse genetic* terhadap virus H5N1 isolat Hongkong pada tahun 1997 dapat diketahui bahwa mutasi PB2 pada kodon 667 menjadi *lysine* menyebabkan virus *favorable* untuk replikasi pada suhu sekitar 36°C. Kondisi ini sangat memungkinkan bagi virus avian influenza untuk dapat bereplikasi dalam tubuh manusia, atau dengan kata lain mempunyai kapabilitas untuk menginfeksi manusia (Mohamad, 2007).

Sehubungan dengan hal tersebut maka telah dilakukan penelitian untuk mengetahui sekuen PB2 virus avian influenza subtipe H5N1 isolat asal Purworejo, Jawa Tengah dan Bantul, Yogyakarta dengan melihat ada tidaknya mutasi dengan membandingkan sekuen PB2 virus avian influenza subtipe H5N1 isolat yang diteliti dengan sekuen PB2 virus avian influenza subtipe H5N1 dari *genebank*, melihat hubungan kekerabatan antara isolat yang diteliti dengan isolat lain dari *genebank* berdasarkan homologinya melalui analisis filogenetik, serta mengetahui struktur tiga dimensi protein PB2 virus avian influenza subtipe H5N1 isolat yang diteliti.

Metode

Penelitian dilaksanakan bulan Desember 2007 - Januari 2008. Pelaksanaan isolasi RNA dan amplifikasi gen PB2 dengan RT - PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) dilakukan di Laboratorium Avian Influenza, Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pelaksanaan proses purifikasi produk PCR dan sekuensing dilakukan di PT. Charoen Pokphand Indonesia, Tbk *Research & Development Centre*, Jakarta.

Sampel penelitian yang digunakan adalah isolat virus yang diisolasi dari swab (usapan) kloaka ayam kampung asal Purworejo, Jawa Tengah (Pw K R 311205) dan entog asal Bantul, Yogyakarta (13 B Gebel CE 150106) yang telah dipropagasi dalam telur berembrio steril oleh Tim Flu Burung Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Isolasi RNA isolat virus H5N1 menggunakan metode *Whole Blood* dengan prosedur *PureLink™ Micro-to-Midi Total Purification System* produk Invitrogen™.

Pengenceran primer spesifik untuk gen PB2. Pada Invitrogen Custom Primer tertera : konsentrasi primer *forward* gen PB2 adalah 49.7nmoles dan konsentrasi primer *reverse* gen PB2 adalah 43.2nmoles. Konsentrasi *working solution* yang digunakan adalah 40pmol/μl sehingga primer perlu diencerkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk amplifikasi gen dengan RT-PCR. Pembuatan konsentrasi primer menjadi 1nmol/μl ditambahkan 50μl *RNAse free water* (~ dengan 49.7nmoles) ke dalam *tube* primer *forward* PB2 dan ditambahkan 43μl *RNAse free water* (~ dengan 43.2nmoles) ke dalam *tube* primer *reverse* PB 2, dibiarkan selama 2 menit pada *room temperature* kemudian divortex sebentar dan disentrifugasi pada 5000-6000G sebentar saja (*spin down*). Dua buah *tube* yang masing-masing diberi label F (*forward*) dan R (*reverse*) disiapkan dan ke dalam *tube* masing-masing ditambahkan 240μl *RNAse free water*. Sebanyak 10μl dari *tube* primer *forward* (a) ditambahkan ke dalam *tube* F yang sudah berisi 240μl *RNAse free water* (b), dan sebanyak 10μl dari *tube* primer *reverse* (a) ditambahkan ke dalam *tube* R yang sudah berisi 240μl *RNAse free water* (b). Langkah ini dilakukan untuk membuat konsentrasi primer (F dan R) menjadi 40pmol/μl, kemudian divortex. Primer siap digunakan untuk amplifikasi gen.

Amplifikasi gen PB 2 virus H5N1 pada posisi 1734-2133bp melalui RT-PCR. Satu kali reaksi PCR dibuat 50µl PCR *reaction master mix*. PCR *tube* disiapkan dan diberi kode isolat atau *template*. Primer *forward* sebanyak 3µl dan primer *reverse* sebanyak 2µl, 2x *mix reaction* 25µl, 10µl *template* (hasil isolasi RNA), 8µl H₂O ditambahkan ke dalam PCR *tube*, lalu campuran ini divortex. Sebanyak 2µl enzim Platinum® DNA *Taq Polymerase* ditambahkan ke dalam PCR *tube*, pencampuran enzim ini dilakukan paling akhir dengan tujuan untuk menghindari *bubbling*. PCR *tube* yang sudah berisi PCR *reaction master mix* ini kemudian diletakkan pada *thermal cycler PCR machine* kemudian dilakukan pemrograman untuk amplifikasi: 50°C selama 30 menit (sintesis cDNA), 94°C selama 3 menit (denaturasi), 48.5°C selama 1 menit (*annealing*), 68°C selama 1 menit (*extend*), 94°C selama 15 detik (*denaturasi*), diulang lagi mulai tahap ketiga sebanyak 40 kali, 68°C selama 5 menit (*final extension/optional*), 72°C selama 8 menit, 4°C sampai pemakaian.

Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis pada agarose gel 1% TAE dengan pengecatan *Ethidium Bromide*. Hasil amplifikasi fragmen gen PB2 virus H5N1 isolat ayam kampung asal Purworejo entog asal Bantul dan yang diharapkan adalah terbentuknya pita (*band*) dengan fragmen gen PB2 sepanjang 400bp (posisi 1734-2133bp). Setelah dilakukan elektroforesis, gel dipaparkan di bawah sinar UV untuk melihat *band* yang terbentuk. *Band* yang terlihat didokumentasikan dengan kamera digital.

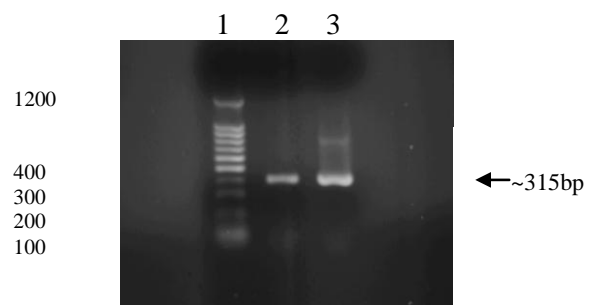
Hasil amplifikasi gen yang telah dielektroforesis pada gel agarose tersebut kemudian diisolasi dan dipurifikasi untuk selanjutnya dilakukan sekuensing untuk memperoleh visualisasi urutan nukleotida. Proses purifikasi dan sekuensing gen PB2 hasil PCR dilakukan di PT Charoen Pokphan Indonesia, Tbk *Research & Development Centre*, Jakarta dengan menggunakan sequencer *ABI Prism 3100 – Avant Genetic Analyzer (4 cappillaries)*, produk dari Applied Biosystem USA .

Analisis hasil dilakukan secara deskriptif. Urutan nukleotida gen PB2 dari isolat ayam kampung asal Purworejo (Pw K R 311205) dan entog asal Bantul (13 B Gebel CE 150106) dari hasil sekuensing kemudian dibandingkan dengan 62 isolat yang telah dipilih dari sekuen virus H5N1 pada *genbank* yang dilaporkan dari Indonesia, Thailand, Vietnam, China dan Hongkong. Hasil urutan nukleotida gen PB2 kemudian diposisikan (*aligned*) menggunakan

Clustal X 1.81 dan *BioEdit 5.0.6. software*, selanjutnya dengan menggunakan *Genedoc 2.6.002 software* urutan nukleotida yang telah diposisikan diubah menjadi protein dan divisualisasikan dalam bentuk urutan asam amino. Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan program *Clustal X 1.81* kemudian divisualisasikan dengan program *NJPlot software*. Asam amino yang diperoleh melalui analisis tersebut kemudian divisualisasikan dalam struktur protein 3 dimensi menggunakan *Accelrys DS Vusualizer 1.7 software*.

Hasil dan Pembahasan

Gen PB2 virus avian influenza H5N1 pada penelitian ini diidentifikasi dengan menggunakan metode RT-PCR. Amplifikasi gen pada posisi nukleotida 1734-2133bp dilakukan dengan menggunakan primer *forward* 5'ACCGTTCCAATCCTTGGTACC3' dan primer *reverse* 5'ATTGATGCTCAATGCTGGTCC3' yang dielektroforesis pada gel agarose 1%. Hasil elektroforesis gen PB2 virus avian influenza (VAI) H5N1 yang diisolasi dari ayam kampung Purworejo, Jawa Tengah (Pw K R 311205) dan entog Bantul, Yogyakarta (13 B Gebel CE 150106) menunjukkan pita DNA spesifik dengan panjang pita ~400bp.



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen PB2 VAI H5N1 pada suhu *annealing* 48.5°C yang dielektroforesis pada gel agarose 1% dengan pewarnaan *Ethidium Bromide*. Lajur 1 : penanda (*marker*) DNA 100-1200bp; lajur 2 : sampel isolat virus asal ayam kampung Purworejo (Pw K R 311205); lajur 3 : sampel isolat virus asal entog Bantul (13 B Gebel CE 150106). Tanda panah menunjukkan hasil positif amplifikasi gen PB2 sepanjang ~315bp

Hasil Sekuensing Fragmen Gen PB2 VAI dengan Sequencer ABI Prism 3100 – Avant Genetic Analyzer (4 cappillaries). Gen

PB2 dari isolat uji yang berhasil diamplifikasi dengan RT-PCR kemudian dilakukan sekuensing untuk mengetahui susunan nukleotida (nt) penyusunnya. Adapun urutan nukleotida yang berhasil dideterminasi dari fragmen gen PB2 VAI H5N1 (1734-2133bp) yang diisolasi dari ayam kampung Purworejo (Pw K R 311205) dan terbaca pada posisi 1822-2136bp (315 nt) adalah sebagai berikut :

¹⁸²²GGG ACA TTT GAT ACT GTC CAG ATA ATA AAG CTG CTA CCA TTT GCA GCA GCC CCA CCG GAA CAG AGC AGA ATG CAG TTT TTT TCT CTA ACT GTG AAT GTG AGA GGC TCT GGA ATG AGA ATA CTC GTA AGG GGT AAT TCC CCT GTG TTC AAC TAC AAT AAG GCA ACC AAA AGG CTT ACC GTT CTT GGA AAG GAC GCA GGT GCA TTA AAA GAG GAC CCA GAT GAA GGG ACA GCC GGA GTG GAA TCT GCA GTA CTG AGG GGA TTC CTA ATT CTA GGC AAG GAG GAC AAA AGG TAT GGA CCA GCA TTG AGC ATC AAT GAA²¹³⁶

Gambar 2. Urutan nukleotida gen PB2 VAI H5N1 yang diisolasi dari ayam kampung asal Purworejo, Jawa Tengah pada tahun 2005 (Pw K R 311205)

Adapun fragmen gen PB2 VAI H5N1 yang berasal entog asal Bantul, Yogyakarta, urutan nukleotida yang berhasil terbaca adalah urutan yang terletak pada posisi 1873-2136bp (264nt) adalah sebagai berikut :

¹⁸⁷³CCA CCG GAA CAG AGC AGA ATG CAG TTT TTT TCT CTA ACT GTG AAT GTG AGA GGC TCT GGA ATG AGA ATA CTC GTA AGG GGT AAT TCC CCT GTG TTC AAC TAC AAT AAG GCA ACC AAA AGG CTT ACC GTT CTT GGA AAG GAC GCA GGT GCA TTA AAA GAG GAC CCA GAT GAA GGG ACA GCC GGA GTG GAA TCT GCA GTA CTG AGG GGA TTC CTA ATT CTA GGC AAG GAG GAC AAA AGG TAT GGA CCA GCT TTG AGC ATC ATT GAA²¹³⁶

Gambar 3. Urutan nukleotida dari fragmen gen PB 2 VAI H5N1 yang diisolasi dari entog asal Bantul, Yogyakarta pada tahun 2005 (13 B Gebel CE 150105)

Perbedaan panjang fragmen ini kemungkinan disebabkan primer yang digunakan dirancang untuk dapat menganalisis sebagian besar residu asam amino gen PB2 VAI H5N1. Perbedaan panjang fragmen ini tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap analisis urutan nukleotida maupun asam amino gen PB2 kedua isolat karena posisi target masih bisa terbaca walaupun terdapat beberapa *peak* pada *elektropherogram* yang lemah namun nukleotida masih bisa terbaca.

Primer *forward* dan *reverse* yang digunakan didesain untuk dapat membaca nukleotida kedua isolat sampel meskipun primer tersebut juga sesuai terhadap nukleotida beberapa isolat asal

unggas Indonesia dari *genebank* yang digunakan sebagai dasar pembuatan primer terutama isolat asal unggas beberapa daerah di Yogyakarta dan Jawa Tengah.

Hasil Pensejajaran (alignment) Sekuen Isolat Uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 dengan Isolat Unggas lain dan Manusia yang Terseleksi dari Genebank.

Sekuen fragmen isolat uji yang berhasil terbaca pada proses sekuensing dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* menghasilkan sekuen fragmen sepanjang 315nt untuk isolat uji asal ayam kampung Purworejo dan sekuen fragmen sepanjang 264nt untuk isolat uji asal entog Bantul. Hasil *alignment* dari masing-masing sekuen fragmen isolat uji tersebut kemudian disejajarkan dan dibandingkan dengan 62 fragmen gen PB2 VAI H5N1 dari *genebank* yang diisolasi dari unggas (31 fragmen) yang terdiri dari isolat asal ayam (*chicken*), itik (*duck*), angsa (*Wp swan*) dan burung elang (*P.falcon*), dan manusia (31 fragmen) sejak kejadian luar biasa avian influenza pada tahun 1996 sampai dengan tahun 2007 dengan menggunakan software *Clustal X* dan *Genedoc* untuk selanjutnya diterjemahkan (*translate*) ke asam amino untuk mengetahui adanya perubahan pada level nukleotida maupun asam amino.

Kompleks heterotrimerik polymerase virus influenza A yang terdiri dari PA, PB1, dan PB2 telah diketahui terkait dengan banyak aspek replikasi virus dan interaksinya dengan *host* namun belum diketahui dengan jelas bagaimana kompleks polymerase ini merubah adaptasinya ke *host* yang baru. Perubahan asam amino pada posisi 627 gen PB2 dari Glutamat menjadi Lisin (E627K) berperan pada adaptasi virus di host mammalia (HPAI pada tikus) dan ditemukan pada infeksi fatal virus ini pada manusia selama outbreak HPAI di Vietnam dan Thailand (Tarendeau *et.al.*, 2007).

Perbandingan urutan nukleotida dan asam amino antara isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105. Perbandingan urutan nukleotida dan asam amino hasil *alignment* dari isolat virus yang diuji yaitu Pw KR 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 menunjukkan adanya beberapa perbedaan. Perbedaan tersebut meliputi perbedaan susunan nukleotida baik yang menyebabkan perubahan asam amino (*non synonymous*) maupun yang tidak menyebabkan perubahan asam amino (*synonymous* atau *silent mutation*). Terjadinya perubahan *synonymous* dan *non synonymous* ini ditentukan oleh ketersediaan tRNA untuk asam

amino tersebut dalam *host* atau disebut sebagai kodon *preference* serta adanya adaptasi dalam *host*. Posisi target yakni asam amino posisi 627 gen PB2 pada kedua isolat uji masih terbaca sebagai Glutamat (E) dan belum mengalami perubahan menjadi Lisin (K) meskipun terjadi perubahan pada level nukleotida yaitu GAA sedangkan pada isolat lain adalah GAG, dengan kata lain terjadi perubahan *synonymous*. Substitusi asam amino dari Glutamat menjadi Lisin pada posisi 627 (E627K) berhubungan dengan peningkatan pathogenisitas virus dan terkait dengan adaptasi ke *host* manusia, perubahan asam amino pada posisi 627 gen PB2 ini diketahui mempunyai kemampuan untuk bereplikasi pada tikus dan dimungkinkan juga pada manusia (Neumann & Kawaoka, 2006). Posisi lain yang dicurigai adalah asam amino

pada posisi 667 yang diketahui berperan dalam menentukan suhu yang sesuai untuk replikasi virus (suhu replikasi virus yang efektif adalah 36-37°C). Pada kedua isolat uji dan isolat unggas lain dari *genbank* asam amino pada posisi ini adalah Valin sedangkan pada isolat manusia asal Hongkong tahun 1998 adalah Isoleusin (Neumann & Kawaoka, 2006). Asam amino pada posisi 711 berbeda antara isolat uji asal ayam kampung Purworejo dan isolat asal entog Bantul. Perbedaan basa Adenin dan Timin pada nukleotida posisi 2132 telah menyebabkan terjadinya perubahan asam amino pada posisi 711 tersebut (N711I). Pada level asam amino, hasil analisis homologi antara kedua isolat uji menunjukkan tingkat kesamaan mencapai 98,8 % oleh karena adanya perbedaan 1 asam amino.

a.	627		1881
	PPEQS	-----PwKR3PB2A_05-----	CCACCGGAACAGAGC.
	PPEQS	-----13GebelCEPB2E_05-----	CCACCGGAACAGAGC.
	PPEPS	-----Goose_Guangdong_96-----	CCACCGGAGCCGAGC.
	PPEQS:	-----Ck_Hongkong_97-----	CCACCGGAGCAGAGT.
	↑		↑
b.	667		2001
	TVLGKD.	-----PwKR3PB2A_05-----	ACCGTTCTTGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----13GebelCEPB2E_05-----	ACCGTTCTTGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Goose_Guangdong_96-----	ACAGTCCTCGAAAGGAC
	TVLGKD	-----Ck_Hongkong_97-----	ACAGTCCTCGGTAAGGAT
	↑		↑
c.	634		1901
	FSSLTVN	-----PwKR3PB2A_05-----	TTTTTTTCT
	FSSLTVN	-----13GebelCEPB2E_05-----	TTTTTTTCT
	FSSLTVN	-----Goose_Guangdong_96-----	TTTTCTTCT
	FSSLTVN	-----Ck_Hongkong_97-----	TTTTCTTCT
	↑		↑
d.	711		2132
	ALSINE	-----PwKR3PB2A_05-----	ATCAATGAA
	ALSIIE	-----13GebelCEPB2E_05-----	ATCATTGAA
	ALSINE	-----Goose_Guangdong_96-----	ATCAATGAA
	ALSINE:	-----Ck_Hongkong_97-----	ATCAACGAA:
	↑		↑

Gambar 4. Asam amino dan nukleotida penyusunnya pada posisi (a) 627 (b)667 (c)634 (d)711 pada kedua isolat uji. Isolat ayam asal Guangdong/96 dan Hongkong/97 yang merupakan isolat unggas yang pertama kali diisolasi sebagai pembandingan.

Pada perbandingan fragmen gen PB2 antara 2 isolat uji terhadap isolat asal angsa Guangdong tahun 1996 (A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)) yang merupakan isolat VAI H5N1 yang berhasil

diisolasi pertama kali di dunia pada tahun 1996 menunjukkan adanya perbedaan 4 asam amino terhadap isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 yakni pada posisi asam amino 628, 634, 676, 711.

Perbedaan asam amino yang tampak pada posisi 634 adalah adanya perubahan asam amino dari Serin yang disusun oleh kodon TCT pada isolat asal Guangdong/96 menjadi Fenilalanin yang disusun oleh kodon TTT pada kedua isolat uji (S634F) (Gambar 4). Perbedaan ini disebabkan oleh adanya substitusi nukleotida pada posisi 1901nt dari Sitosin pada isolat asal Guangdong/96 menjadi Timin pada kedua isolat uji. Hasil analisis homologi asam amino antara kedua isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 dengan isolat A/goose/Guangdong/1/96 berturut-turut adalah 95,4% dan 94,3% sedangkan analisis homologi pada level nukleotida antara isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 terhadap

isolat A/Goose/Guangdong/1/96 berturut-turut menunjukkan tingkat kesamaan mencapai 91,2% dan 90,5%.

Perbandingan sekuen isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 dengan isolat unggas lain yang terseleksi dari *genebank*. Analisis hasil *alignment* urutan nukleotida dan asam amino isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 yang telah disejajarkan dengan isolat unggas lain dari *genebank* menunjukkan adanya perbedaan baik pada level nukleotida maupun pada level asam amino.

(a) 627		1881
PPEQS	-----PwKR3PB2A_05-----	CCACCGGAACAGAGC.
PPEQS	-----13GebelCEPB2E_05-----	CCACCGGAACAGAGC.
PPEQS:	-----Ck_Guangdong_97-----	CCACCGGAGCAGAGC.
PPEQN:	-----Ck_Thai_05-----	CCACCGGAGCAGAAC.
PPEQS:	-----Ck_Vietnam_04-----	CCACCGGAGCAGAGC.
PPEQS:	-----Ck_Jepang_04-----	CCACCGGAGCAGAGC.
PPEQS	-----Ck_Purworejo_05-----	CCACCAGAGCAGAGC.
PPEQS:	-----Quail_Yogya_04-----	CCACCGGAGCAGAGC.
PPEQS:	-----Ck_G.Kidul_05-----	CCACCAGAGCAGAGC.
PPEQS:	-----Ck_K.Progo_04-----	CCACCGGAGCAGAGC.
PPEQS	-----Ck_Magetan_05-----	CCACCAGAGCAGAGC.
PPEQS	-----Duck_Pare-pare_05-----	CCACCAGAGCAGAGC.
↑		↑
(b) 667		2001
TVLGKD.	-----PwKR3PB2A_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----13GebelCEPB2E_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Ck_Guangdong_97-----	ACAGTCCTCGGAAAGGAC
TVLGKD/	-----Ck_Thai_05-----	ACTGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Ck_Vietnam_04-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Ck_Jepang_04-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TILGKD.	-----Ck_Purworejo_05-----	ACCATTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Quail_Yogya_04-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Ck_G.Kidul_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Ck_K.Progo_04-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Ck_Magetan_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
TVLGKD.	-----Duck_Pare-pare_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
↑		↑

Gambar 5. Perbandingan asam amino dan nukleotida penyusunnya pada posisi (a)627 dan (b)667 antara kedua isolat uji dengan isolat lain dari *genebank*

Hasil analisis homologi asam amino antara kedua isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 dengan isolat A/goose/Guangdong/1/97 berturut-turut adalah 96,5% dan 94,3%. Pada level asam amino,

tingkat homologi antara isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 terhadap A/chicken/Thailand/Kanchanaburi/CK-160/2005 berturut-turut menunjukkan tingkat kesamaan sebesar 96,5% dan 95,4%. Analisis homologi

pada level nukleotida antara kedua isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 terhadap isolat A / chicken / Thailand / Kanchanaburi/CK-160/2005 yang menunjukkan perbedaan nt pada posisi 1974nt, 1998nt, 2034nt, 2043nt, 2084nt, dan 2124nt adalah sebesar 94,3% dan 93,5%.

Perbandingan antara sekuen isolat uji dengan sekuen isolat asal A/quail/Yogyakarta/BBVet-IX/2004, A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XII-1/2004, A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/2005, dan A/chicken/Purworejo/BBVW/2005 juga menunjukkan adanya perbedaan baik perbedaan karena adanya perubahan transisional maupun adanya substitusi pada asam amino. Analisis homologi pada level asam amino dari isolat uji

Pw K R 311205 terhadap isolat *genebank* asal Purworejo adalah 96,5% dan Kulon Progo, Gunung Kidul, dan Yogyakarta sebesar 97,7% sedangkan homologi antara isolat uji 13 B Gebel CE 150105 terhadap isolat-isolat tersebut adalah 95,4% dan 96,5%.

Perbandingan dengan isolat manusia yang terseleksi dari *genebank*. Analisis hasil *sequence alignment* selanjutnya dilakukan dengan membandingkan isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 dengan isolat manusia yang terseleksi dari *genebank*. Dalam hal ini *sequence* kedua isolat uji disejajarkan dan dibandingkan dengan 32 fragmen gen PB 2 VAI H5N1 yang diisolasi dari manusia asal Indonesia, Hongkong, Thailand, Vietnam, Iraq dan China.

a.	627		1881
	PPEQS	-----PwKR3PB2A_05-----	CCACCGGAACAGAGC.
	PPEQS	-----13GebelCEPB2E_05-----	CCACCGGAACAGAGC.
	PPKQS	-----Hmn Hongkong_97-----	CCACCTAAACAGAGT
	PPEQS	-----Hmn Tangerang_06-----	CCACCGGAGCAGAGC.
	PPKQS	-----Hmn Indo CDC370_06-----	CCGCCAAAGCAGAGC.
	PPEQS	-----Hmn Thailand_04-----	CCACCGGAGCAGAGC.
	PPKQN	-----Hmn Thailand_05-----	CCACCGAAGCAGAAC.
	PPKQS	-----Hmn Vietnam_05-----	CCACCGAAGCAGAGC.
	PPKQS	-----Hmn Iraq_06-----	CCACCGAAGCAGAGC
	PPEQS	-----Hmn China_06-----	CCCCCGGAACAAAGC.
	↑		↑
b.	667		2001
	TVLGKD.	-----PwKR3PB2A_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----13GebelCEPB2E_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TILGKD.	-----Hmn Hongkong_97-----	ACAATACTTGGGAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn Tangerang_06-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn Indo CDC370_06-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn Thailand_04-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn Thailand_05-----	ACTGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn Vietnam_05-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn Iraq_06-----	ACCGTTCTTGGAAAGGAC
	TVLGKD.	-----Hmn China_06-----	ACAGTCCTCGGAAAGGAC
	↑		↑

Gambar 6. Perbandingan asam amino posisi target (a)627 dan (b)667 dan nukleotida penyusunnya antara kedua isolat uji dan isolat manusia dari *genebank*

Hasil analisis antara isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 dengan fragmen gen PB2 VAI H5N1 yang pertama kali menginfeksi manusia asal Hongkong yaitu A/Human/Hongkong/483/1997 terdapat 4 perbedaan pada level asam amino. Adapun homologi asam amino antara isolat uji Pw K R 311205 dan 13 B Gebel CE 150105 terhadap

A/Human/Hongkong/483/1997 oleh karena adanya perbedaan tersebut berturut-turut sebesar 93,1% dan 92% sedangkan homologi nukleotida berturut-turut sebesar 85,2% dan 84,8%. Hal yang sangat menarik dari hasil perbandingan tersebut adalah terjadinya perbedaan asam amino pada posisi 627 dan 667 pada isolat manusia asal A/Human/Hongkong/483/1997 ini apabila

dibandingkan dengan kedua isolat uji, asam amino posisi 627 pada isolat A/Human/Hongkong/483/1997 adalah Lisin (K627) sedangkan pada kedua isolat uji asam amino pada posisi yang sama adalah Glutamat (E627). Perbedaan asam amino ini disebabkan oleh perbedaan nukleotida penyusunnya yaitu AAA pada isolat A/Human/Hongkong/483/1997 sedangkan pada kedua isolat uji adalah GAG. Asam amino pada posisi 667 juga berbeda pada perbandingan fragmen isolat ini, pada isolat A/Human/Hongkong/483/1997 asam amino pada posisi ini adalah Isoleusin yang disusun oleh kodon ATA sedangkan pada kedua isolat uji adalah Valin yang disusun oleh kodon GTT. Perbedaan lain yang terlihat pada perbandingan antara kedua isolat uji dengan isolat manusia asal A/Human/Hongkong/483/1997 adalah pada asam amino posisi 634, 655, 661, dan 675.

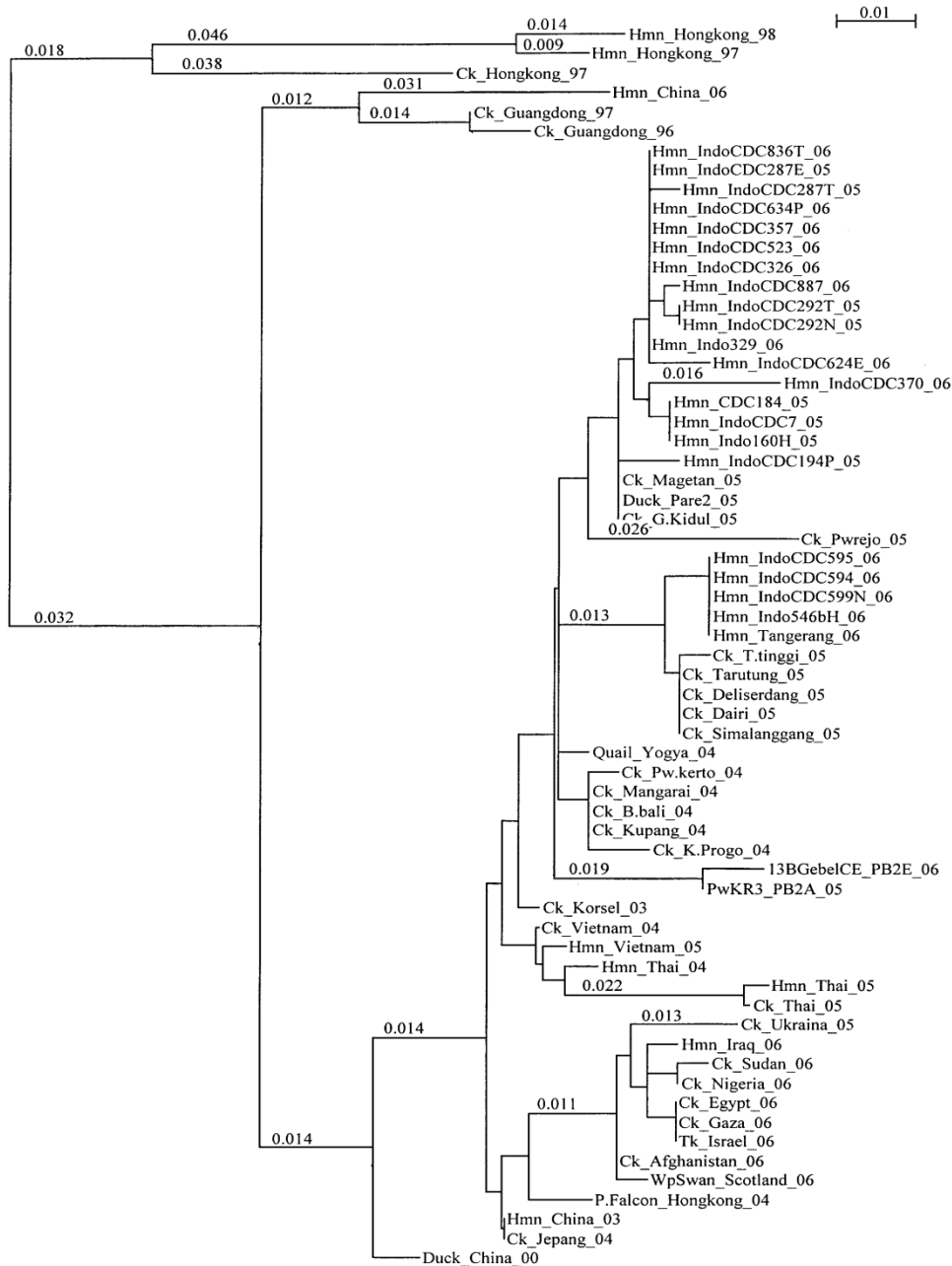
Pada analisis kedua isolat uji terhadap isolat Human/Tangerang/CDC625L/2006 enunjukkan perbedaan asam amino posisi 634, 660, 661, dan 676 dengan tingkat kesamaan asam aminonya sebesar 95,4% dan 94,3% dan tingkat kesamaan nukleotida sebesar 96,2% dan 95,4%. Perbedaan asam amino pada posisi 634, 661, dan 676 yang disebabkan oleh perbedaan nukleotida penyusunnya menunjukkan pola perubahan yang sama dengan perbandingan dengan isolat-isolat asal manusia sebelumnya.

Asam amino pada posisi 660 pada kedua isolat uji adalah *Arginine* yang disusun oleh kodon GGA menjadi *Lisin* pada isolat Human/Tangerang/CDC625L/2006 yang disusun oleh kodon AGG (R660K).

Analisis filogenetik dengan menggunakan *Clustal X 1.81 software* yang kemudian divisualisasikan menggunakan *NJPlot software* berdasarkan homologi sekuen dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar isolat. Kedua isolat uji dibandingkan dengan isolat VAI H5N1 lain yang telah diseleksi dari *genbank* yang meliputi isolat unggas dan manusia. Tingkat homologi isolat virus diketahui berdasarkan pada nukleotida sepanjang 264 nukleotida. Berdasarkan hasil analisis, tingkat homologi antara kedua isolat uji pada level nukleotida adalah sebesar 99,2% dengan perbedaan 2 nukleotida sedangkan pada level asam amino sebesar 98,8% dengan perbedaan 1 asam amino. Secara filogenetik kedua isolat uji menunjukkan kesamaan atau asosiasi yang dekat dengan isolat lain dari Indonesia baik isolat virus dari unggas maupun manusia apabila dibandingkan dengan isolat virus asal negara lain. Hal ini terlihat pula dari hasil *multiple alignment* yang menunjukkan tingkat homologi yang tinggi pada yaitu antara 95% sampai dengan 98,8% pada level asam amino dan sebesar 96,2% sampai dengan 99,2%.

Tabel 1. Tingkat homologi antara kedua isolat uji dengan beberapa isolat dari *genbank*

Isolat	Pw K R 311205		13 B Gebel CE 150105	
	Asam amino (%)	Nukleotida (%)	Asam amino (%)	Nukleotida (%)
Ck/Guangdong/96	95,4	91,2	94,3	90,5
Ck/Guangdong/97	96,5	92,0	94,3	91,2
Ck/Hongkong/97	97,7	85,9	96,5	85,2
Ck/Thailand/05	96,5	94,3	95,4	93,5
Ck/Yogya/05	97,7	97,7	96,5	96,2
Ck/K.Progo/05	97,7	96,9	96,5	96,2
Ck/G.Kidul/05	97,7	97,3	96,5	96,5
Ck/Purworejo/05	96,5	94,3	95,4	94,3
Hmn/Tangerang/06	95,4	96,2	94,3	95,4
Hmn/Hongkong/97	93,1	85,2	92,0	84,8
Hmn/China/06	97,7	90,5	96,3	89,7



Gambar 7. Hubungan filogenetik fragmen gen PB2 Virus Avian Influenza H5N1 yang terdiri atas 62 isolat unggas dan manusia dari berbagai negara di kawasan Asia dan Eropa. Analisis filogenetik ini dilakukan dengan menggunakan *Clustal X 1.81 software* yang kemudian divisualisasikan dengan *NJPlot software*.

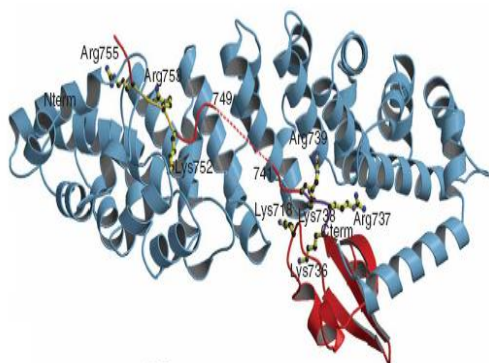
Menurut Taubenberger *et al.* (2005), pada protein PB2 H5N1 terdapat 5 perbedaan asam amino yang membedakan antara sekuen isolat unggas dan manusia yaitu asam amino pada posisi 199, 475, 567, 627, dan 702.

Tabel 2. Residu asam amino yang membedakan gen PB2 VAI antara unggas dan manusia

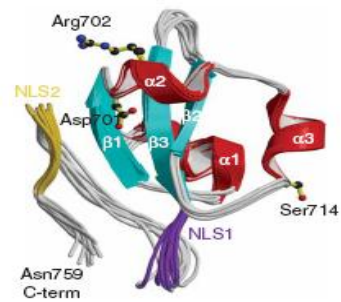
Residu gen PB2 no.	Avian	outbreak 1918	Human
199	A	S	S
475	L	M	M
567	D	N	N
627	E	K	K
702	K	R	R

Ket : A : Alanin L : Leucyne D: Aspartic acid
 E : Glutamat K ; Lysin S : Serine
 M : Metionin N : Asparagin R : Arginine
 Outbreak 1918 : pandemik influenza di Spanyol

Pada analisis selanjutnya yaitu analisis untuk mengetahui struktur 3 dimensi protein berdasarkan tingkat kesamaan sekuen asam amino isolat uji dengan fragmen PB2 dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan menggunakan software *Accelrys DS Visualizer*. Asam amino pada posisi 627 dan 667 yang merupakan posisi target untuk diamati karena berperan pada replikasi dan transkripsi genom virus pada *Protein Data Bank* tidak teramati akan tetapi diasumsikan sama dengan kedua isolat uji karena hasil pensejajaran dengan sebagian besar isolat dari *genebank* menunjukkan asam amino yang sama. Menurut Honda *et al.* (1999), terdapat dua sekuen yang terpisah pada subunit PB2 yang berperan pada transkripsi virus oleh karena kemampuannya dalam berikatan dengan *cap* RNA (RNA – *cap binding site*) yaitu N – site pada daerah N – terminal proximal, dan C – site sebagai *cap – binding motif* (terletak antara residu 538 – 577).

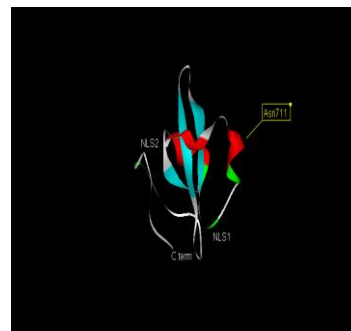


Gambar 8. Struktur N dan C – terminal domain protein PB2 yang terletak pada daerah yang terpisah dan berperan dalam inisiasi terjadinya transkripsi virus (Tarendeau *et al.*, 2007)

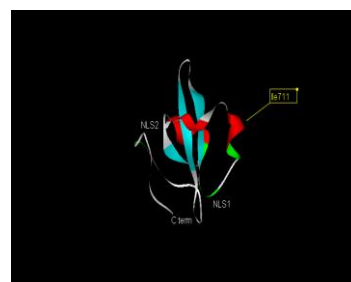


Gambar 9. Ekspresi protein gen PB2 dengan suatu label C – terminal *biotin acceptor peptide*. Deteksi dengan *fluorescent streptavidin* dan *fluorimaging* (Tarendeau *et al.*, 2007)

Terdapat 3 residu pada protein PB2 H5N1 yang berimplikasi pada transmisi antar spesies (*cross – species transmission*) yaitu Asp701, Arg702, dan Ser714. Apabila dilihat ada sekuen kedua isolat uji, diketahui bahwa asam amino pada posisi 701 dan 702 menunjukkan asam amino yang sama seperti yang telah disebutkan namun asam amino pada posisi 714 tidak teramati (Taubenberger *et al.*, 2005).



(a)



(b)

Gambar 10. Perbandingan struktur protein 3 dimensi PB2 antara (a) isolat uji asal ayam Purworejo dan (b) isoat uji asal entog Bantul, menunjukkan terjadinya perubahan asam amino posisi 711 yaitu Asparagin pada isolat asal ayam Purworejo dan Isoleusin pada isolat asal entog Bantul

Berdasar penelitian yang dilakukan oleh Tarendeau *et.al* (2007), substitusi D701N diketahui berperan dalam pathogenesis strain H5N1 dan H7N1 ke tikus dan ditemukan pada kasus fatal dan non fatal infeksi H5N1 ke manusia di Vietnam. Mutasi D701N merusak jembatan garam – Arg753 pada *nuclear localization signal* dan hal ini meningkatkan efisiensi assembling trimeric polymerase. Residu 702 juga berperan penting dalam determinasi spesifisitas *host*, fakta bahwa ketiga residu ini berperan dalam transmisi antar spesies menunjukkan kemungkinan peran domain ini pada interaksi intermolekuler dengan virus lain atau protein *host*.

Simpulan

Hasil sekuensing gen PB2 virus avian influenza subtipe H5N1 isolat ayam kampung asal Purworejo, Jawa Tengah menunjukkan urutan nukleotida sepanjang 315bp (1822-2136) dan isolat entog asal Bantul, Yogyakarta sepanjang 264bp (1873-2136). Perbedaan asam amino antara kedua isolat uji terletak pada posisi 711, dan perbedaan nukleotida terletak pada posisi 2121nt dan 2132nt. Hasil analisis molekuler terhadap urutan nukleotida maupun asam amino pada fragmen protein internal polymerase PB2 virus avian influenza H5N1 yang diisolasi dari ayam kampung asal Purworejo, Jawa Tengah dan entog asal Bantul, Yogyakarta apabila dibandingkan dengan sekuen pada isolat virus asal unggas maupun manusia dari *genebank* menunjukkan bahwa tidak ditemukan mutasi spesifik pada asam amino posisi 627 dari Glutamat menjadi Lisin dan Valin menjadi Lisin pada posisi 667 fragmen PB2 yang mempunyai peran terhadap replikasi dan transkripsi virus. Terdapat perubahan asam amino pada posisi 634 dan 711 fragmen PB2 pada kedua isolat uji apabila dibandingkan dengan isolat lain dari *genebank*. Berdasarkan analisis filogenetik menunjukkan bahwa kedua isolat uji masih menunjukkan tingkat homologi yang tinggi terhadap isolat unggas lain dari Indonesia bila dibandingkan dengan isolat unggas dari negara lain. Tingkat homologi kedua isolat cukup tinggi yaitu mencapai 98.8% untuk homologi asam amino dengan perbedaan 1 asam amino dan 99.2% untuk homologi nukleotida dengan perbedaan 2 nukleotida. Berdasarkan analisis struktur protein 3 dimensi menunjukkan bahwa secara umum terdapat kesamaan gambar struktur 3 dimensi protein PB2 antara kedua isolat uji

apabila dibandingkan dengan fragmen protein PB2 dari *Protein Data Bank*.

Saran

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut terhadap asam amino di luar posisi yang telah dicurigai berperan dalam replikasi, transkripsi, dan transmisi antar spesies yang dapat menyebabkan infeksi virus avian influenza ke manusia menjadi lebih mudah. Hal ini dilakukan untuk memantau perubahan genomik VAI yang meliputi antigenik drift dan shift sebagai antisipasi terjadinya awal pandemik global flu burung yang ditandai dengan munculnya subtipe baru VAI.

Persantunan

Penelitian ini didukung oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

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 Gadjah Mada*. Yogyakarta.
- Honda A, Mizumoto K & Ishihama A. 1999. Two Separate Sequences of PB Subunit Constitute The RNA cap – binding site of Influenza Virus RNA Polymerase. *J Genes to Cells*; 4: 475-485.
- Mohamad, K. 2007. Flu Burung, Adapted from www.InfluenzaReport.com.
- Neumann G & Kawaoka Y. 2006. Host Range Restriction And Pathogenicity In The Context Of Influenza Pandemic. *Emerging Infectious Diseases* 12; 881-886.
- Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas P.J, Bougault C.M, Boulo S, Baudin F, Ruigrog RWH, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre J.P & Hart D.J. 2007. Structure and Nuclear Import Function of The C – terminal Domain of Influenza Virus Polymerase PB2 Subunit. *Nat Structl & Mol Biol*; Vol.14 No.3 : 229-232.
- Taubenberger JK., Reid AH., Lourens RM., Wang R., Jin G & Fanning TG. 2005. Characteristic of the 1918 Influenza Virus Polymerase Gene. *Letters*; Vol. 437: 889-890. Nature Publishing Group.

World Health Organization. 2008. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian I (H5N1) Reported to WHO. *Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR)*.