

**ANALISIS VARIASI GENETIK *HEMAGGLUTININ*, MATRIK 1,
DAN NON STRUKTURAL 1 DARI H5N1 DI INDONESIA YANG
MEMPENGARUHI TINGKAT PATOGENISITASNYA
TERHADAP MANUSIA SECARA *IN SILICO***

DANANG FEBRY WITANTO

0305030115



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2009**

**ANALISIS VARIASI GENETIK *HEMAGGLUTININ*, Matrik 1,
DAN NON STRUKTURAL 1 DARI H5N1 DI INDONESIA YANG
MEMPENGARUHI TINGKAT PATOGENISITASNYA
TERHADAP MANUSIA SECARA *IN SILICO***

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

DANANG FEBRY WITANTO

0305030115



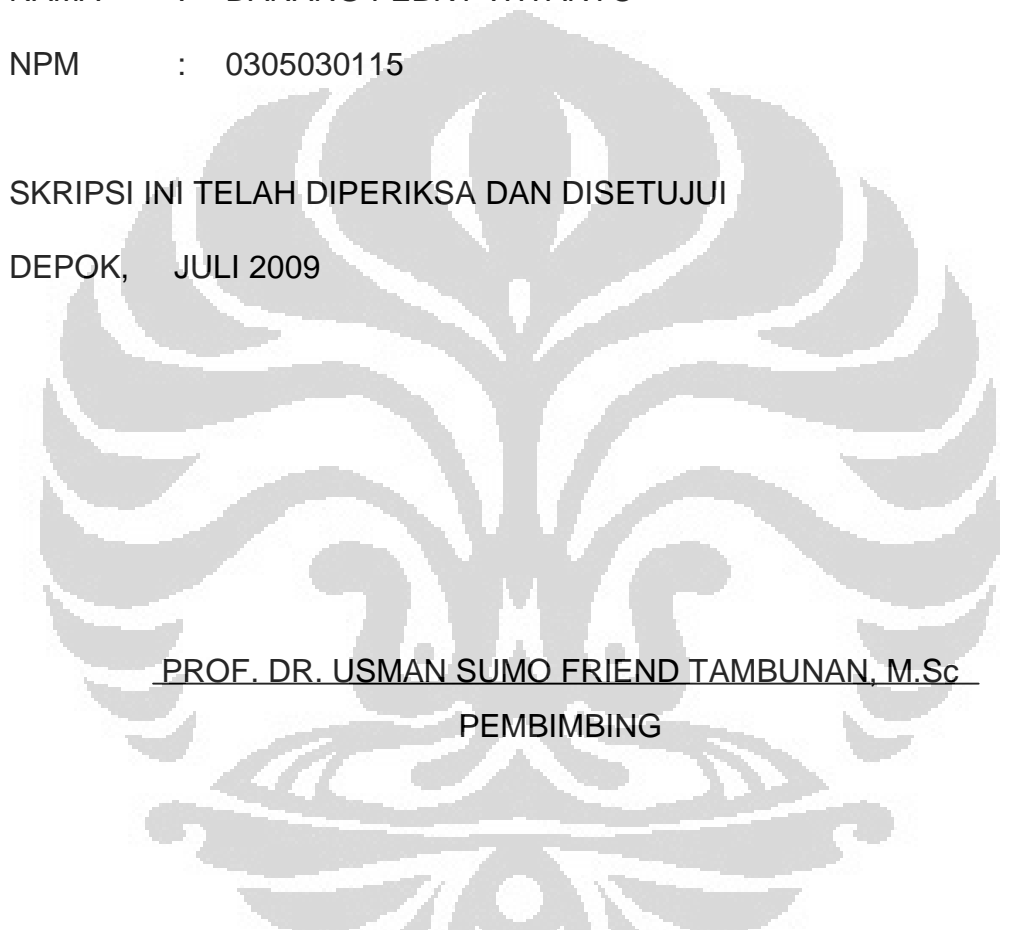
**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2009**

SKRIPSI : ANALISIS VARIASI GENETIK *HEMAGLUTININ*, Matrik 1,
DAN NON STRUKTURAL 1, DARI H5N1 DI INDONESIA
YANG MEMPENGARUHI TINGKAT PATOGENISITASNYA
TERHADAP MANUSIA SECARA *IN SILICO*

NAMA : DANANG FEBRY WITANTO

NPM : 0305030115

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI
DEPOK, JULI 2009



PROF. DR. USMAN SUMO FRIEND TAMBUNAN, M.Sc
PEMBIMBING

Tanggal lulus ujian sarjana : 10 Juli 2009

Penguji I : Dr. Endang Saepudin.....

Penguji II : Drs. Erzi Rizal Azwar

Penguji III : Prof. Dr. Djati Kerami



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini sebagai syarat menempuh ujian akhir sarjana di Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis haturkan ucapan terima kasih terutama kepada Prof. Dr. Usman Sumo Friend Tambunan yang telah bersedia dengan sabar memberikan bimbingan, motivasi, serta nasihat untuk penulis dalam penyusunan skripsi ini. Pelajaran hidup sangat berharga yang tidak akan pernah dapat penulis lupakan.

Ucapan terima kasih juga tidak lupa penulis sampaikan kepada Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing akademik penulis yang selama ini telah bersedia meluangkan waktu untuk memberikan saran dan nasehat dalam proses penyelesaian studi penulis. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada :

1. Dr. Ridla Bakri, Mphil selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
2. Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS, selaku Ketua Bidang Ilmu (KBI) Biokimia Departemen Kimia FMIPA UI.

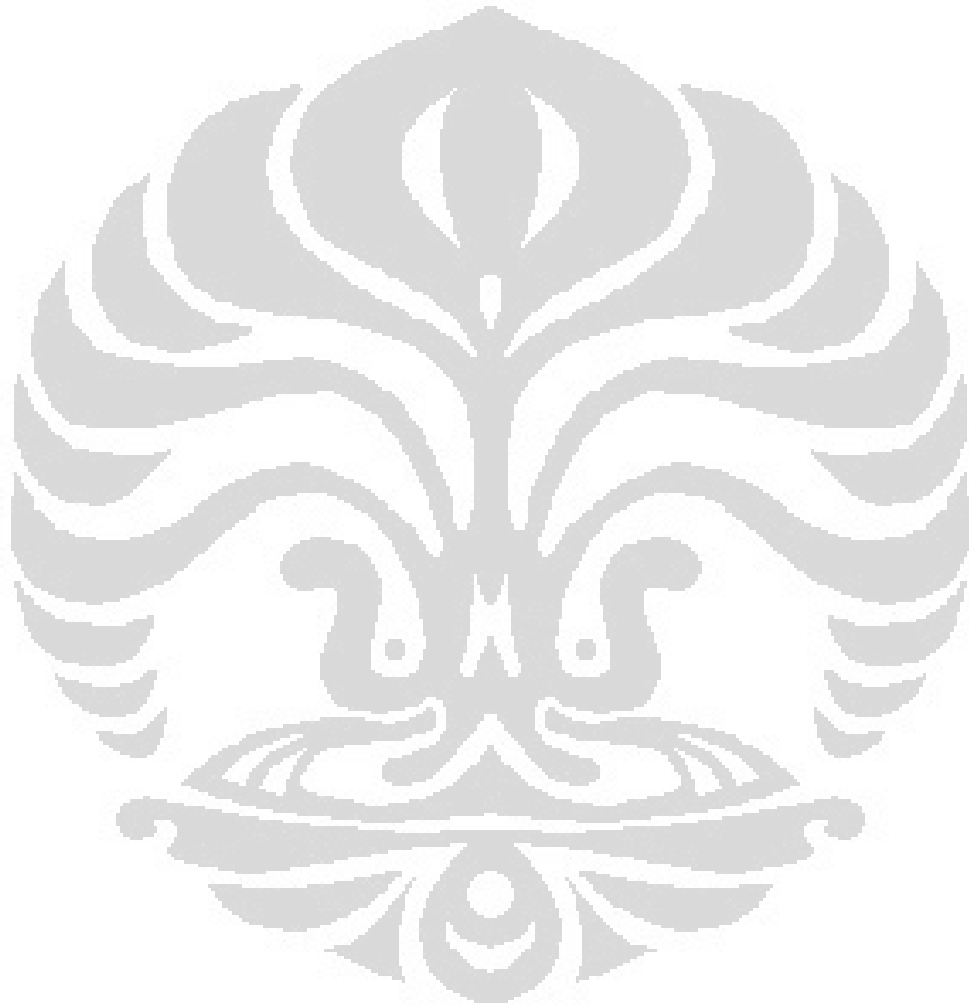
3. Seluruh Dosen dan Staf Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia yang telah memberikan perhatian dan bimbinganya selama penulis menempuh studi.
4. Keluarga tercinta, Ayah dan Ibu yang selalu memberikan nasihat dan motivasi di saat lelah menggelayuti rutinitas kuliah. Doa kalian selalu mengiringi langkah kaki ini berjalan.
5. Rekan-rekan seperjuangan yang selalu bersedia berbagi ruang dan waktu di ruangan bioinformatik tercinta kita; Ramdhan, Samira, dan Ronggo. Akhirnya kehampaan ini sirna sudah...
6. Teman-teman penelitian lantai 3 dan lantai 4 yang selalu memberikan canda tawa di tengah kesulitan yang kita hadapi.
7. Achmad Farouq Fazmar, Agung Kurniawan, Alex Lukmanto, Syarif, dan Yusni Nurdani yang telah memberikan warna dalam menempuh perjalanan panjang penuh liku selama 4 tahun ini. Semoga kita dapat menggapai impian yang selalu hadir pada hari-hari yang telah kita lalui.
8. Teman-teman Kimia 2005 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih untuk persahabatan selama ini. Mudah-mudahan persahabatan ini tidak akan pernah putus, kenangan yang tidak terlupakan. Semoga arti persahabatan ini akan selalu ada di hati kita masing-masing.
9. Teman-teman Kimia angkatan 2006, 2007, dan 2008.

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan semua pihak dalam penulisan skripsi ini, hanya Allah SWT yang mampu membalas itu semua. Serta tidak lupa penulis haturkan maaf pada semua pihak atas ucapan ataupun kesalahan yang kurang berkenan selama penulis menyelesaikan studi di lingkungan Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.

Akhir kata semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita semua. Amiin.

Depok, Juli 2009

Penulis



ABSTRAK

Avian influenza (H5N1) merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus influenza tipe A yang dapat menyebabkan kematian cukup tinggi. Kasus virus influenza A yang mematikan bagi manusia antara lain H1N1 tahun 1918, H2N2 tahun 1957-1958, H3N2 pada tahun 1967-1968, dan kasus terbaru adalah H1N1 tahun 2009. Hal ini menjelaskan bahwa mutasi yang terjadi dapat mempengaruhi tingkat patogenisitas dari virus influenza. Analisis mutasi secara *in silico* dapat dilakukan dengan menggunakan metode *multiple alignment* disertai pembuatan *phylogenetic tree*. Mutasi yang diamati untuk *Hemagglutinin* (HA) dilakukan pada daerah *cleavage site*, sedangkan untuk Non Struktural (NS) 1 dan Matrik(M) 1 dilakukan pada seluruh daerah pada sekuen. Pola untuk H5N1 Indonesia dan Hongkong pada *cleavage site* HA adalah R-X-K/R-R, sedangkan sekuen subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 tidak memiliki pola ini. Pola ini menyebabkan HA H5N1 mudah terpotong oleh furin sesuai hasil prediksi pro-P (furin). Mutasi spesifik pada sekuen NS1 untuk kontrol (*A/Indonesia/5/2005 (H5N1)*, *A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)*, *A/Hong Kong/156/97 (H5N1)*, *A/Brevig Mission/1/18 (H1N1)*, *A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)*) terhadap subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 terdapat di posisi 53. Pada M1 tidak ditemukan posisi mutasi spesifik untuk kontrol yang identik untuk ketiga subtipe tersebut. Sekuen NS1 dan M1 kontrol maupun subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2

memiliki nilai IC50 dibawah 50nM sehingga masih dapat dikenali dengan baik oleh sistem imun *host*. Mutasi spesifik tidak terjadi pada daerah pengenalan *epitope*. Hasil mutasi spesifik yang terjadi ini baik untuk NS1 dan M1 tidak mempengaruhi perubahan struktur sekunder maupun struktur tersier protein secara signifikan dari kontrol dengan sekuen H1N1, H1N2, dan H3N2. Hal ini terlihat dari nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) setelah dilakukan *superimpose* terhadap struktur protein 3D hasil prediksi.

Kata Kunci: *cleavage site, hemagglutinin, influenza, in silico, mutasi, Matrik1, Non Struktural 1*

Xii + 113 hlm.; gbr.; lamp.; tab

Bibliografi: 33 (1980 – 2009)

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Virus Influenza.....	7
2.2 <i>Avian Influenza</i>	8
2.2.1 Hemagglutinin (HA).....	9
2.2.2 Neuraminidase (NA).....	12
2.2.3 <i>Polymerase basic 1 (PB 1), Polymerase basic 2</i> <i>(PB 2), Polymerase acidic (PA)</i>	13
2.2.4 <i>Non structural ptotein (NS)</i>	13

2.2.5	<i>Matrix</i> protein (M)	14
2.3	Siklus Hidup Flu Burung	14
2.4	Pathogenisitas <i>Avian Influenza</i> (H5N1)	17
2.5	Sistem Imunitas	21
2.5.1	Sistem Imun Humoral.....	22
2.5.2	Sistem Imun Selular	23
2.6	Bioinformatika	25
2.6.1	Format FASTA	25
2.6.2	Format GBFF	26
2.6.3	<i>Multiple Sequence Alignment</i>	26
2.6.4	<i>Phylogenetic Tree</i>	27
2.6.5	Blast (<i>Basic Local Alignment search Tool</i>).....	28
2.6.6	Prediksi Struktur Sekunder	28
2.6.7	<i>Epitope Prediction Server</i>	29
BAB III. METODE PENELITIAN		31
3.1	Pencarian Sekuens Database dari Protein H5N1	31
3.2	Melakukan <i>Multiple Alignment</i> Terhadap Sekuens yang Diperoleh	31
3.3	Pembuatan Pohon Filogenetik.....	32
3.4	Analisis Mutasi.....	32
3.5	Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein (Furin)	33

3.6	Prediksi Struktur Sekunder	33
3.7	Prediksi Lokasi <i>Burried/ Exposed</i> dari Sekuen Protein.....	33
3.8	Prediksi Epitope	34
3.9	Prediksi Struktur 3D.....	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		35
4.1	Pencarian Sekuen Protein	35
4.2	<i>Multiple Sequence Alignment</i>	37
4.3	<i>Phylogenetic Tree</i>	38
4.4	Analisis Mutasi.....	40
4.4.1	Mutasi <i>Hemagglutinin</i>	41
4.4.2	Mutasi Non Struktural 1	42
4.4.3	Mutasi Matrix 1	44
4.5	Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein Furin	46
4.6	Prediksi Struktur Sekunder	49
4.7	Prediksi Mutasi <i>Burried/Exposed</i>	50
4.8	Prediksi Epitope.....	51
4.9	Prediksi Struktur 3D.....	54
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN		59
DAFTAR PUSTAKA		61
LAMPIRAN		65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur virus influenza.....	8
Gambar 2. Siklus hidup virus influenza.....	15
Gambar 3. <i>Cleavage site Hemagglutinin (HA)</i>	20
Gambar 4. Sistem imun humoral dan selular.....	24
Gambar 5. <i>Superimpose RNA Binding Domain NS 1</i>	55
Gambar 6. <i>Superimpose Effector Domain NS 1</i>	55
Gambar 7. <i>Superimpose Matrik 1</i>	56

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hubungan sekuens asam amino terhadap patogenitas virus.....	21
Tabel 2. Jumlah sekuen protein influenza A yang diperoleh.....	36
Tabel 3. Sekuen virus influenza A H1N1, H1N2, dan H3N2 yang memiliki kekerabatan dekat dengan kontrol	39
Tabel 4. Mutasi yang terjadi pada daerah <i>Cleavage Site</i> HA.....	41
Tabel 5. Mutasi spesifik NS1.....	42
Tabel 6. Mutasi spesifik M1.....	45
Tabel 7. Hasil prediksi pro-P	47
Tabel 8. Data RMSD Non Struktural 1	56
Tabel 9. Data RMSD Matrik 1	57

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sekuen Format GBFF	65
Lampiran 2. Sekuen Format FASTA.....	68
Lampiran 3. <i>Multiple sequence Alignment</i>	70
Lampiran 4. Pohon Filogenetik	78
Lampiran 5. Hasil pro-P	87
Lampiran 6. Prediksi Struktur Sekunder.....	95
Lampiran 7. Mutasi Spesifik Struktur Sekunder Non Struktural 1	98
Lampiran 8. Mutasi Spesik Struktur Sekunder Matrik 1	99
Lampiran 9. Prediksi <i>Burried/ Exposed</i>	100
Lampiran 10. Hasil Prediksi Epitope Non Struktural 1 (NS1).....	102
Lampiran 11. Hasil Prediksi Epitope Matrik 1.....	104
Lampiran 12. <i>Template RNA Binding Domain</i> NS 1	107
Lampiran 13. <i>Template Effector Domain</i> NS 1.....	108
Lampiran 14. <i>Template</i> Matrik 1	109
Lampiran 15. Daftar RMSD.....	110
Lampiran 16. Daftar Singkatan	111
Lampiran 17. Daftar Kode Asam Amino.....	112
Lampiran18. Bagan Kerja Penelitian.....	113

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sejak tahun 1997 hingga sekarang kasus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 virus influenza A telah menyebabkan kematian pada unggas ternak dan manusia dalam jumlah yang cukup besar. Daerah penyebaran virus ini di Asia meliputi Jepang di Utara dan Indonesia di Selatan. HPAI H5N1 harus diwaspadai sebagai ancaman terjadinya wabah pandemik yang berakibat fatal bagi manusia. Ancaman pandemik dari virus influenza sangatlah dimungkinkan dan virus H5N1 yang diperkirakan penyebab pandemik ini masih perlu dikaji lebih lanjut. Akan tetapi bukti-bukti di lapangan menunjukkan bahwa virus H5N1 bertanggungjawab terhadap kematian unggas dan manusia yang begitu banyak di berbagai negara. Yang secara langsung maupun tidak, menimbulkan kerugian di bidang ekonomi maupun sosial (Guan, Yi *et al.* 2007).

Evolusi maupun mutasi yang terjadi pada H5N1 sangat dipengaruhi oleh kemampuan virus tersebut untuk melakukan *drift / shift* antigenik. Dalam perkembangannya, H5N1 dapat menjadi lebih mudah menular dari manusia ke manusia akibat kedua proses tersebut, sehingga ancaman pandemik menjadi nyata (Guan, Yi *et al.* 2007).

Virus influenza yang pertama menyebabkan pandemik dan korban yang jatuh sangat banyak adalah subtipe H1N1 pada tahun 1918 (*Spanish Flu*). Virus ini telah menyebabkan kematian sekitar 50 juta orang di seluruh dunia . Selanjutnya subtipe H2N2 (*Asian flu*) pada tahun 1957-1958, H3N2 (*Hongkong Flu*) pada tahun 1967-1968 (Asmara, W. 2007). Kasus terbaru pada tahun 2009 ini subtipe H1N1 (*Swine Flu*) setidaknya menelan ratusan korban jiwa yang terjadi di Mexico. Sampai tanggal 12 Juni 2009, virus H1N1 ini telah menyebabkan 145 orang tewas di berbagai negara (http://www.who.int/csr/don/2009_06_12/en/index.html), diakses 14 Juni 2009 pukul 23.30 WIB).

Influenza disebabkan 3 tipe (*strains*) virus yaitu influenza A, B and C. Tipe A bertanggungjawab atas pandemik influenza mematikan (epidemik di seluruh dunia) yang menyerang setiap 10 sampai 40 tahun sekali. Tipe B dapat menyebabkan wabah yang lebih kecil atau terlokalisasi yang biasanya muncul setiap 3-15 tahun sekali. Tipe C kurang umum dan hanya menyebabkan gejala ringan. Tipe C merupakan virus yang stabil tetapi tipe A dan B berubah secara konstan dimana strain baru muncul rutin. Sekali terkena flu, tubuh akan mengembangkan antibodi terhadap virus yang menginfeksi tersebut, tetapi antibodi tersebut tidak melindungi tubuh dari *strain* virus influenza yang baru (Baigent, Susan J & John W, McCauley. 2003).

Virus influenza A termasuk ke dalam famili *orthomyxoviridae* yang terdiri dari 8 segmen *single stranded* RNA yaitu HA, NA, PB2, PB1, PA, NS,

NP, dan M. Pada permukaan virion terdapat tonjolan (*spikes*) yang digunakan untuk menempel pada reseptor yang spesifik pada sel inangnya pada saat menginfeksi sel. Terdapat 2 jenis *spikes* yaitu yang mengandung hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Keduanya dijadikan pembeda antara sub tipe virus influenza A. Saat ini diketahui terdapat 16 jenis HA dan 9 jenis NA (Cox *et al.* 2005).

Fasa penempelan virus pada reseptor yang mengandung *sialic acid* di permukaan sel host merupakan fasa paling menentukan dalam proses infeksi virus. Pada virus *avian influenza* protein HA hanya dapat mengenal reseptor yang ada pada unggas [Neu5Ac(α 2-3)Gal]. Dimana molekul ini berbeda dengan reseptor yang ada pada manusia [Neu5Ac(α 2-6)Gal]. Secara teoritis virus avian influenza tidak dapat menginfeksi manusia karena adanya perbedaan reseptor tersebut. Akan tetapi perkembangan berikutnya menunjukkan kemungkinan perubahan susunan asam amino pada HA akibat antigenik *drift / shift* yang mengakibatkan penularan antar manusia yang merupakan awal dari ancaman pandemi avian influenza secara global (Asmara, W. 2007).

Aspek utama dalam penentuan tingkat patogenitas virus influenza adalah (i) interaksi terhadap lapisan *mucus*, (ii) proses masuknya virus ke dalam sel inang, (iii) proses replikasi virus, (iv) pengaruh infeksi virus terhadap sistem imun, (v) penyebaran virus dari tempat bereplikasi, (vi) tingkat kerusakan sel oleh infeksi virus, dan (vii) spesifisitas dari sel inang (Sweet, C & H, Smith. 1980)

Avian influenza dapat ditemukan dalam 2 bentuk yaitu bentuk akut *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan bentuk ringan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Pada HPAI tingkat morbiditas dan mortalitas dapat mencapai 100% (Asmara, W. 2007).

H5N1 termasuk ke dalam HPAI yang menyebabkan tingkat kematian begitu besar pada *host*-nya. Tingkat patogenisitas dari virus H5N1 ini dipengaruhi antara lain oleh situs pemutusan HA (*cleavage site*) yang terdiri dari *polybasic amino region* yang memungkinkan HA menjadi sangat peka terhadap protease endogen/seluler hospes. Akibatnya virus ini dapat menyebar dalam jangkauan yang luas bukan hanya pada sel saluran pernapasan saja. Selain HA, mutasi gen-gen lain seperti NA, PB1, PB2, NS, dan M juga mempengaruhi tingkat patogenisitas dari virus (Asmara, W. 2007).

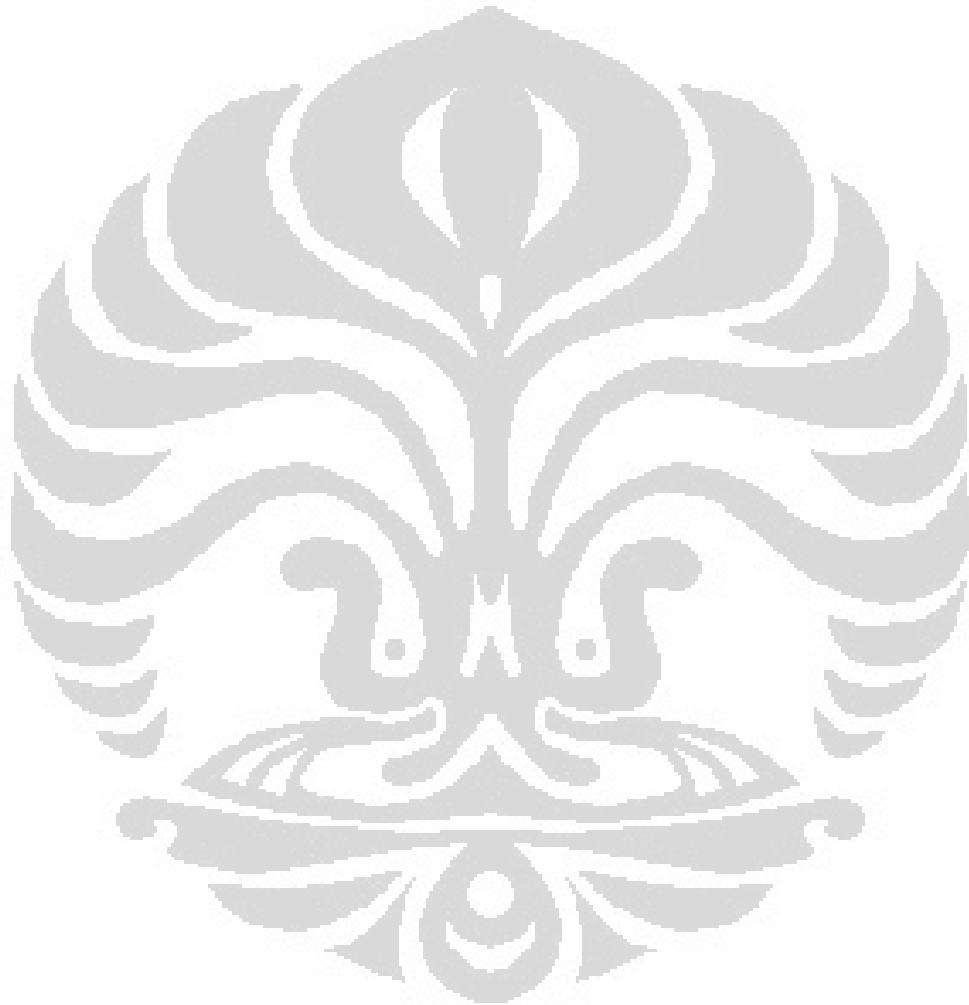
1.2 Perumusan Masalah

Pengetahuan akan tingkat patogenisitas dari virus avian influenza H5N1 sangat penting artinya dalam penanganan pasien flu burung di berbagai negara termasuk Indonesia. Berbagai kajian mengenai respon imun terhadap infeksi flu burung terus dilakukan untuk mendapatkan jawaban tentang patogenisitas virus ini bagi hostnya terutama manusia. Pertanyaan yang muncul adalah apakah ada kesamaan variasi genetik dari H5N1 Indonesia yang memiliki tingkat patogenitas tinggi dengan kasus influenza,

lain sehingga nantinya dapat dianalisa kesamaan maupun perbedaan genetik yang menentukan tingkat patogenisitas dari virus tersebut.

1.3 Tujuan

Melihat keganasan virus influenza H5N1 yang sangat tinggi terhadap manusia maka timbul dorongan untuk mencari faktor penyebab patogenitas yang begitu tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis secara *in silico* variasi genetik protein *Hemagglutinin*, Non struktural 1, dan Matrik 1 dari H5N1 di Indonesia yang mempengaruhi tingkat patogenitasnya terhadap manusia dibandingkan dengan kasus influenza dari subtipe lain. Serta melihat pengaruh mutasi ini terhadap perubahan struktur sekunder, daerah pengenalan epitope, dan perubahan dari struktur tersier protein.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Influenza

Virus influenza adalah partikel berselubung yang berbentuk bundar atau bulat panjang, merupakan genome RNA rangkaian tunggal dengan jumlah lipatan tersegmentasi sampai mencapai tujuh hingga delapan lipatan, dan berpolaritas negatif (*negative sense*) (Kamps, SB *et al.* 2006) .

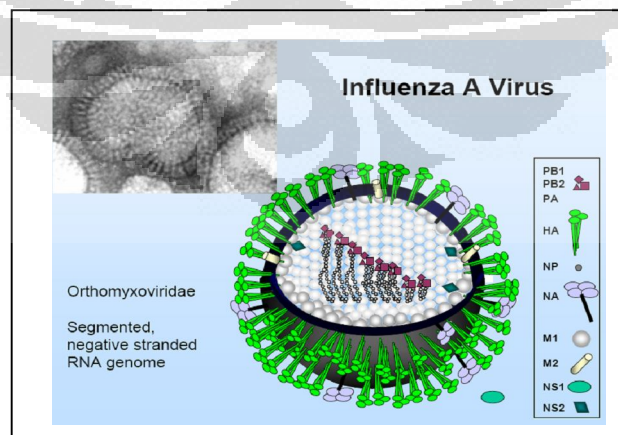
Virus influenza merupakan virus RNA termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*. Asam nukleat virus ini beruntai tunggal, terdiri dari 7 - 8 segmen gen yang mengkode sekitar 10 jenis protein. Virus influenza mempunyai selubung/simpai yang terdiri dari kompleks protein dan karbohidrat. Virus ini mempunyai sekitar 500 tonjolan (*spikes*) glikoprotein yang digunakan untuk menempel pada reseptor yang spesifik pada sel-sel hospesnya pada saat menginfeksi sel. Terdapat 2 jenis *spikes* yaitu yang mengandung hemagglutinin (HA) dan yang mengandung neuraminidase (NA), yang terletak di bagian terluar dari virion (Horimoto T, Kawaoka Y. 2001).

Virus influenza dibagi menjadi 3 tipe, yaitu A, B, dan C berdasarkan perbedaan sifat antigenik dari *nucleoprotein* (NP) dan matriks proteinnya (MP). Virus influenza A dan B terdiri dari delapan segmen RNA sedangkan virus influenza C hanya terdiri dari tujuh segmen. Virus influenza A dapat

menginfeksi unggas maupun mamalia (termasuk manusia) dan bersifat patogen terhadap hostnya, sedangkan virus influenza B dan C dapat diisolasi dari mamalia (termasuk manusia) dan umumnya kurang patogen dibandingkan dengan virus influenza tipe A.

2.2. Avian Influenza

Avian influenza adalah penyakit viral pada unggas, termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza tipe A dimana genom virus ini tersusun dalam 8 segmen. Kedelapan segmen tersebut adalah hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), *nucleocapsid* protein (NP), *polymerase basic1* (PB1), *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase acidic* (PA), protein matriks (M1 dan M2) serta *nonstructural* protein (NS1 dan NS2) (Horimoto, T., Kawaoka, Y. 2001; Swayne, D.E. 2003). Struktur dari virus influenza tipe A ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur virus influenza (Klenk, Hans Dieter. 2007)

Bagian dalam selubung dibatasi matrik protein (M) dan bagian luar oleh peplomer glikoprotein hemaglutinin (HA) berbentuk batang yang merupakan homotrimer dari membrane glikoprotein kelas I dan molekul neuroamidase berbentuk cendawan yang merupakan tetramer dari membrane protein kelas II (Syahdrajat, T. 2007)

Virus influenza tipe A dibagi menjadi beberapa tipe berdasarkan perbedaan antigen protein HA dan NA yang terdapat di permukaan virion. Sampai saat ini virus influenza A telah dikenal sebanyak 16 sub-tipe HA (H1 sampai H16) dan 9 sub-tipe NA (N1 sampai N9) (Guan, Yi *et al.* 2007) .

2.2.1 Hemaglutinin (HA)

Hemaglutinin (HA) merupakan suatu glikoprotein yang memiliki berat molekul kira-kira 76.000 dan mengandung 2 sampai 3 tempat terjadinya glikosilasi. Hemaglutinin ini mengelilingi membran lipid pada sisi luarnya dan setidaknya memiliki 5 daerah antigenik (*epitope*). HA berfungsi sebagai reseptor dalam pengikatan virus terhadap sel host. HA akan berikatan dengan *sialic acid* (N-acetyl-neuraminic acid) dan membantu dalam proses penetrasi materi genetik virus terhadap *nucleus* host dengan melakukan *membrane fusion* (Kamps, SB *et al.* 2006) .

Untuk terjadinya infeksi protein HA ini harus berikatan dengan lipoprotein atau glikolipid permukaan sel yang mengandung gugus terminal sialil-galaktosil [Neu5Ac(α 2-3)Gal] atau [Neu5Ac(α 2-6)Gal]. Virus avian

influenza isolat asal ayam cenderung berikatan dengan [Neu5Ac(α 2-3)Gal], sedangkan virus isolat asal manusia mempunyai spesifitas terhadap [Neu5Ac(α 2-6)Gal]. Kondisi ikatan ini ikut berperan dalam spesifitas virus dengan hospes (Matrosovich, 2004).

Bagian protein HA yang berikatan dengan reseptor hospes (*Receptor Binding Site / RBS*) mempunyai susunan amino yang khas. Pada RBS virus influenza subtype H3 isolat asal ayam dengan asam amino posisi 226 Gln dan posisi 228 Gly akan lebih mengenal [Neu5Ac(α 2-3)Gal], sedangkan virus isolat asal manusia dengan asam amino 226 Leu dan 228 Ser akan lebih mengenal [Neu5Ac(α 2-6)Gal] (Thompson *et al.* 2006).

Pada sel epitel permukaan saluran respirasi manusia terutama mengandung [Neu5Ac(α 2-6)Gal], sedangkan pada ayam mayoritas adalah [Neu5Ac(α 2-3)Gal]. Dengan kondisi seperti ini, maka virus avian influenza isolat asal ayam tidak dapat dengan mudah menginfeksi manusia. Perubahan spesifitas hospes dapat dimungkinkan akibat perubahan asam amino pada RBS melalui peristiwa mutasi genetik (Asmara, W. 2007).

Diketahui bahwa semua tipe dari virus influenza A secara antigenik labil dan dapat beradaptasi dengan baik untuk menghindari pertahanan tubuh hospesnya. Mutasi yang terjadi pada daerah antigenik akan mengurangi ikatan pengenalan dengan antibodi pada sistem imun hospes, dengan demikian dapat menimbulkan subtype baru pada virus ini sehingga akan timbul ancaman endemik maupun pandemik pada populasi hospes. Variasi antigenik pada virus avian influenza dapat ditemukan dengan frekuensi tinggi

dan terjadi melalui 2 cara, yaitu *shift* dan *drift*. *Shift* antigenik dapat timbul akibat *gene reassortment* (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang bermanifestasi sebagai subtipe virus avian influenza yang baru. *Shift* antigenik terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada antigen permukaan HA dan/atau NA. Sebagai contoh virus dengan tipe H1 digantikan dengan H5 menghasilkan strain baru dari virus ini. Hal ini dapat terjadi ketika suatu sel host terinfeksi oleh 2 tipe virus influenza yang berbeda secara bersamaan sehingga segmen gen dari kedua virus tersebut saling bertukar selama proses replikasi (Guan, Yi. 2007; Tumpey *et al.* 2002).

Pada proses *drift* antigenik terjadi perubahan susunan asam amino pada waktu gen melakukan *encoding* antigen permukaan setiap kali virus bereplikasi sehingga menghasilkan subtipe yang baru. *Drift* antigenik dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada antigen permukaan HA dan/atau NA dan dapat ditemukan pada virus influenza tipe A dan B. *Drift* antigenik berlangsung lambat, tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas pada suatu kawasan. Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus, yaitu sekitar 2-3 kali substitusi asam amino per tahun (Asmara, W. 2007; Soepadi PZ. 2005).

2.2.2 Neuraminidase (NA)

Neuraminidase (NA) merupakan suatu glikoprotein layaknya HA, dan ditemukan di permukaan virion. NA membentuk struktur tetramer dengan rata-rata berat molekul 220.000. NA berfungsi sebagai suatu enzim yang dapat menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan *N-acetylneraminic* pada rantai ujung oligosakarida-glikoprotein. Dengan fungsi ini maka neuraminidase dianggap ikut berperan dalam spesifitas virus avian influenza terhadap hospes. Fungsi NA ini harus berada dalam keseimbangan dengan HA. Hal ini agar aktivitas enzimatik dalam melepaskan asam sialat dari sel yang terinfeksi tidak menyebabkan penurunan efisiensi infeksi sel berikutnya. Sialiloligosakarid yang terdapat pada mukus di saluran respirasi mempunyai peran pada pembatasan hospes terhadap avian influenza. Neuraminidase avian influenza isolat asal ayam tidak dapat memecah 4-O-asetyl SA, sehingga oligosakarida ini dapat berperan sebagai inhibitor analog reseptor dalam saluran respirasi manusia (Asmara, W. 2007; Kamps, SB *et al.* 2006).

Fungsi lain dari NA adalah untuk melepaskan partikel virus yang sudah selesai replikasi dalam sel host dan mencegah virion yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor asam sialat melalui tonjolan HA. Oleh karena itu efisiensi replikasi avian influenza sangat bergantung pada kerjasama protein HA dan NA dari virus (Zambon, Maria C. 2001).

Drift / shift antigenik juga dapat terjadi pada NA sehingga menyebabkan terjadinya mutasi pada sekuens NA. NA membawa beberapa residu asam

amino yang penting dalam pengembangan obat antiviral dan ketika terjadi mutasi dapat menyebabkan virus ini *resistance* terhadap inhibitor neuraminidase (Kamps, SB *et al.* 2006).

2.2.3 *Polymerase basic 1 (PB 1), Polymerase basic 2 (PB 2), Polymerase acidic (PA)*

Ketiga jenis polimerase ini berperan dalam proses replikasi dan transkripsi. Gen *polymerase basic* (PB) menyandi transkriptase yang berperan diantaranya dalam *capbinding* dan *elongation*. Ketiganya memiliki aktivitas endonuklease dan terikat dengan RNP (Asmara, W. 2007; Kamps, SB *et al.* 2006).

2.2.4 Protein Non Struktural (NS)

NS1 memiliki berat molekul sekitar 26.000 dan membentuk dimer yang dapat menghambat transfer mRNA sel host dari nukleus, sehingga memberikan kemudahan bagi viral RNA untuk bisa dibawa ke ribosom dan ditranslasikan. Selain itu NS1 juga dapat berperan dalam resistensi terhadap respon interferon pada sistem imun sel host (Kamps, SB *et al.* 2006).

NS2 merupakan molekul kecil dengan berat molekul 11.000. Protein ini kemungkinan terikat dengan M1 protein dan diyakini memiliki fungsi untuk

memfasilitasi transport RNPs yang baru terbentuk dari nukleus ke sitoplasma sehingga dapat mempercepat replikasi dari virus (Kamps, SB *et al.* 2006).

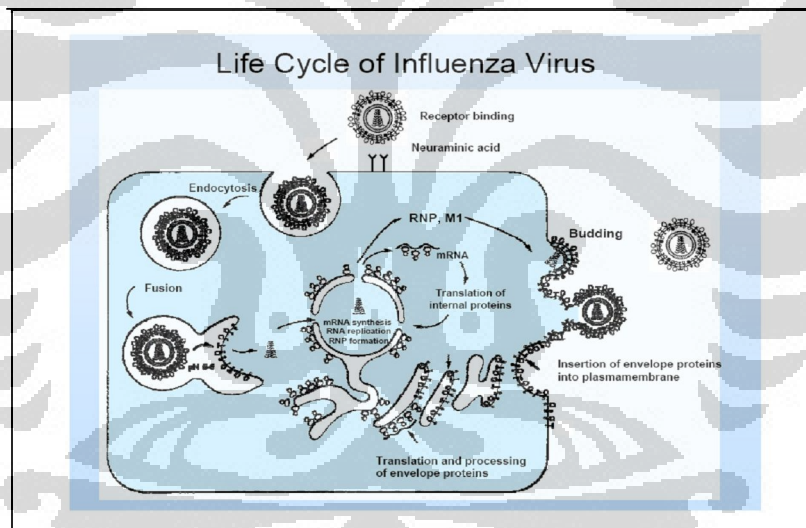
2.2.5 Matrix protein (M)

Gen matriks avian influenza menyandi 2 macam protein yaitu protein M1 dan protein M2. Protein matriks mempunyai peran dalam penyusunan virion avian influenza. Bersama dengan protein HA dan NA, protein M2 menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion. Protein M1 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan dalam proses awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dari RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma sel tropisma. Pemisahan ini dipicu pemindahan ion hidrogen melewati membran virus oleh protein M2. Aktivitas dari M2 menjadi target kerja amantadine dan rimantadine. Pada protein M1 ditemukan paling tidak, ada 2 domain yang *conserved* yaitu antara asam amino 148 sampai 162 yang membentuk struktur *zinc finger motif* dan residu palindromik pada posisi 101 sampai 105 (Kamps, SB *et al.* 2006; Reid *et al.* 2002).

2.3 Siklus Hidup Virus Flu Burung

Virus influenza akan terikat dengan permukaan sel host (reseptor sel hospes) dengan melekatkan HA pada *sialic acid* yang terdapat pada sel.

Ikatan *sialic acid* terhadap galaktosa baik α 2,3 (pada burung) atau α 2,6 (pada manusia) akan bergantung kepada spesifitas calon host. Setelah berikatan dengan reseptor sel hospes, maka virus akan masuk melalui fusi amplop virus dengan membran endosomal sel hospes. Langkah memasukan virus ini dilakukan dengan proses endositosis melalui mediasi penurunan pH pada *phagosom*. Ketika tahapan ini selesai, penurunan pH akan dihentikan oleh kerja protein M2 dimana selanjutnya akan terjadi serangkaian penataan ulang protein matrix-1 (M1) dan kompleks glikoprotein homotrimerik HA.



Gambar 2. Siklus hidup virus influenza (Klenk, Hans Dieter. 2007)

Sebagai hasilnya, terbuka (*exposed*) sebuah bidang (*domain*) yang sangat lipofilik dan fusogenik dari setiap monomer HA yang masuk ke dalam membran endolisomal, dan dengan demikian memulai terjadinya fusi antara membran virus dengan membran lisomal. Proses ini akan memerlukan

bantuan protease sel hospes untuk mengaktivasi prekursor hemagglutinin (HA0) menjadi fragmen 1 (HA1) dan fragmen 2 (HA2) yang akan memungkinkan virus melepaskan ribonukleoproteinnya (RNPs) (Asmara, W. 2007; Kamps, SB *et al.* 2006).

Langkah berikutnya adalah transport RNPs ke nukleus, dimana kompleks polimerase terikat pada viral RNA. Yang selanjutnya terjadi pemutusan viral RNA oleh aktivitas endonuklease dan secara simultan terjadilah proses *elongation*. Pembentukan dari viral RNA akan dibatasi oleh NP yang akan membentuk mRNA. Viral RNA (vRNA) dikopi dari (-) sense menjadi (+) cRNA dan mRNA. cRNA akan tetap berada inti yang berfungsi sebagai template pada produksi (-) sense vRNA baru, sedangkan mRNA akan berpindah ke sitoplasma untuk memproduksi protein. Tahap berikutnya viral protein yang baru terbentuk kembali lagi ke inti sel untuk membentuk vRNA lagi dan membentuk RNPs atau viral protein yang baru terbentuk dikeluarkan menuju badan golgi dimana terjadi proses glikosilasi. Protein yang dibentuk ini kemudian dibawa ke membran sel dimana mereka akan terikat dengan *lipid bilayer*. Tahap terakhir adalah vRNA dan inti viral meninggalkan inti sel menuju membran. Dan melakukan pemisahan dengan sel host melalui aktivitas NA, proses ini dikenal dengan *budding* (Kamps, SB *et al.* 2006).

2.4 Patogenisitas Avian Influenza (H5N1)

Telah diketahui bahwa virus influenza tipe A memiliki sifat kelabilan pada sisi antigenik sehingga dapat beradaptasi dengan baik untuk menghindari pertahanan tubuh sel host. Mutasi genetik virus avian influenza seringkali terjadi sesuai dengan kondisi dan lingkungan replikasinya. Mutasi gen ini tidak saja untuk mempertahankan diri akan tetapi juga dapat meningkatkan sifat patogenisitasnya (Radji, M. 2006).

Fasa penempelan virus pada reseptor yang mengandung *sialic acid* di permukaan sel host merupakan fasa paling menentukan dalam proses infeksi virus. Pada virus avian influenza protein HA hanya dapat mengenal reseptor yang ada pada unggas [Neu5Ac(α 2-3)Gal]. Dimana molekul ini berbeda dengan reseptor yang ada pada manusia [Neu5Ac(α 2-6)Gal]. Secara teoritis virus avian influenza tidak dapat menginfeksi manusia karena adanya perbedaan reseptor tersebut. Akan tetapi perkembangan berikutnya menunjukkan kemungkinan perubahan susunan asam amino pada HA akibat *drift/shift* antigenik yang mengakibatkan penularan antar manusia yang merupakan awal dari ancaman pandemi avian influenza secara global. Seperti yang terjadi pada tahun 1918-1919 H1N1 (*Spanish flu*), tahun 1957-1958 H2N2 (*Asian flu*), serta tahun 1967-1968 H3N2 (*Hongkong flu*). Ketiga pandemi tersebut telah merenggut jutaan orang di berbagai belahan bumi .

Pada tahun 1997 dilaporkan terjadi infeksi jenis virus avian influenza tipe H5N1 di Hongkong yang menyebabkan kematian pada unggas. Yang

lebih mengkhawatirkan adalah ditemukannya kasus infeksi pada manusia, 18 orang penduduk dan enam diantaranya meninggal. Sejak akhir 2003 virus avian influenza subtipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk Indonesia. Bahkan akhir-akhir ini virus tersebut telah menginfeksi unggas di beberapa negara Eropa dan Afrika (Steven *et al.* 2006). Selain pada unggas avian influenza dapat pula menyerang mamalia, termasuk manusia. Tidak kurang dari 191 orang telah dilaporkan terinfeksi avian influenza H5N1 dan 108 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia sampai 2008 tercatat 80 orang terinfeksi dan 65 orang diantaranya meninggal dunia (Asmara, W. 2007).

Dari data tersebut pertanyaan yang muncul adalah bagaimana virus H5N1 dapat menginfeksi manusia dan menimbulkan kematian? Virus H5N1 Hk 150-97 isolat manusia memiliki sekuens RBS (*Receptor Binding Site*) yang sama dengan virus H5N1 asal unggas (Webster, RG. 1999). Hal ini juga ditemukan pada kasus H5N1 lain di berbagai negara termasuk Indonesia. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa selain reseptor [Neu5Ac(α 2-6)Gal] yang merupakan mayoritas, pada jaringan trakheobronkhal manusia juga terdapat sel bersilia yang mengandung reseptor dengan gugus [Neu5Ac(α 2-6)Gal] dan [Neu5Ac(α 2-3)Gal] dalam proporsi yang rendah. Reseptor [Neu5Ac(α 2-3)Gal] juga ditemukan pada pneumosit di saluran respirasi manusia bagian bawah (Thompson *et al.* 2006; van riel *et al.* 2006). Keberadaan reseptor ini besar kemungkinan yang berperan utama pada proses masuknya virus avian ke manusia.

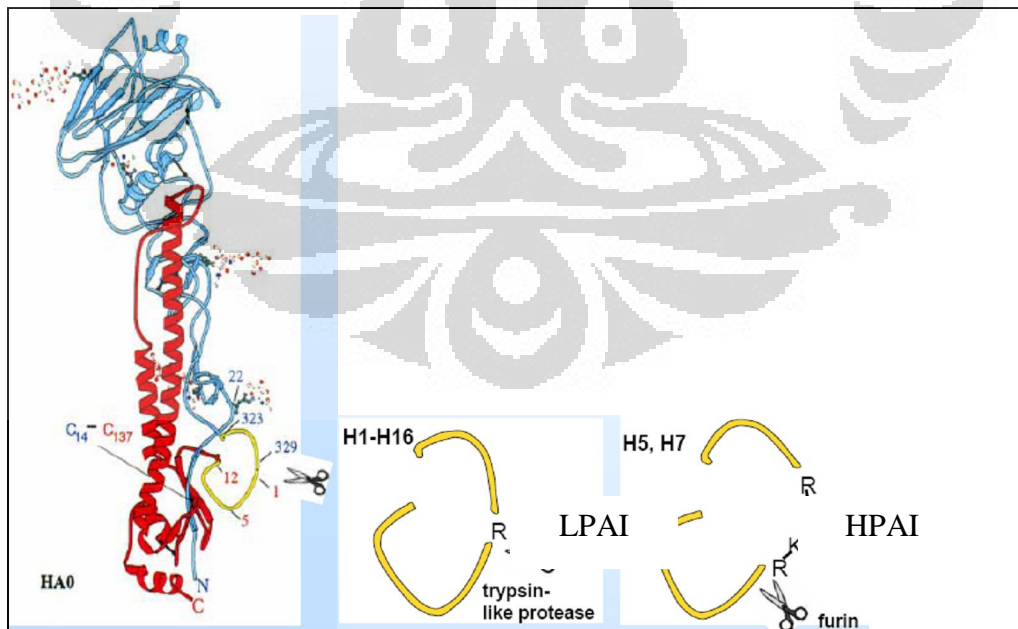
Avian influenza dapat ditemukan dalam 2 bentuk yaitu bentuk akut *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan bentuk ringan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Pada HPAI tingkat morbiditas dan mortalitas dapat mencapai 100% (Asmara, W. 2007).

Virus yang termasuk dalam kelompok HPAI mempunyai hemagglutinin yang sangat peka terhadap protease endogen/seluler hospes, sedangkan pemotongan hemagglutinin pada LPAI membutuhkan protease ekstra seluler aktif seperti tripsin. HA pada HPAI terdiri dari banyak asam amino dasar pada lokasi pemecahan, sedangkan HA LPAI kehilangan residu asam amino dasar karenanya tidak menjadi sasaran pemecahan protease. Akibatnya virus HPAI termasuk H5N1 dapat menyebar dalam jangkauan yang luas bukan hanya pada sel saluran pernapasan saja dan tentu saja hal ini akan meningkatkan patogenisitas dari avian influenza tersebut (Alexander. 2000;; Swayne. 2000). Pada daerah pemecahan (*cleavage site*) dari HA HPAI terdapat residu *polybasic amino acid region* R-X-K/R-R. Gambar lokasi pemecahan dari HA terlihat pada Gambar 3.

Patogenisitas infeksi virus influenza A H5N1 mungkin berbeda dengan influenza biasa (H1N1 dan H3N2) yaitu adanya hiperinduksi sitokin proinflamasi sehingga menimbulkan hipersitokinemia (*cytokine storm*). Pada infeksi H5N1, sitokin yang diperlukan untuk menekan replikasi virus terbentuk secara berlebihan yang justru menyebabkan kerusakan jaringan paru yang luas dan berat. Sifat patogenisitas ini diperankan oleh asam amino NS pada posisi 92 yang dapat menyebabkan avian influenza tersebut resisten

terhadap *innate immune respon* seperti IFN dan TNF sehingga berakibat pada efek tersebut. Apabila asam amino NS pada posisi 92 adalah glutamat maka akan menyebabkan virus resisten terhadap IFN dan TNF. Sedangkan apabila posisi 92 berupa asam aspartat, virus ini akan sensitif terhadap IFN dan TNF (Seo *et al.* 2002).

Substitusi asam amino dari asam glutamat (E) menjadi lisin (K) pada posisi 627 PB2 menjadi penentu spesifitas host mamalia (Katz *et al.* 2000). Mutasi D701N dan S714R pada PB 2 mempengaruhi tingkat viruensi dengan meningkatkan aktivitas polimerase (Gabriel, G *et al.* 2005). Asparagin pada posisi 66 pada PB1-F2 juga berperan dalam patogenesis H5N1 (Conenello, G M *et al.* 2007). Residu asam amino NP 10 Y juga berpengaruh pada patogenesis avian influenza (Gabriel, G *et al.* 2005).



Gambar 3. Cleavage site Hemagglutinin (HA) (Klenk, Hans Dieter. 2007)

Berikut ini ditampilkan tabel mengenai hubungan sekuens residu asam amino terhadap tingkat patogenisitas virus pada manusia.

Tabel 1. Hubungan sekuens asam amino terhadap patogenitas virus

Gen	Posisi asam amino	Patogenitas		Sumber
		HPAI	LPAI	
PB2	355	K	Q	Katz et al. (2000)
	627	K/E	E	Gao et al. (1999)
PB1	198	K	R	Katz et al. (2000)
	317	I	M	Katz et al. (2000)
HA	<i>Cleavage site</i>	RXK/RR	-	Subbarao & Shaw (2000)
NA	223	I	T	Katz et al. (2000)
M1	15	I	V	Katz et al. (2000)
NS1	92	E	D	Seo et al. (2002)

2.5 Sistem Imunitas

Virus Influenza H5N1 HPAI menyebabkan infeksi yang akut terhadap host dan mendorong respon dari sistem imun host. Hampir seluruh respon *innate* dari imunitas termasuk pelepasan sitokin (IFN) dan meningkatnya neutrofil *granulocytes* / *natural killer cell* ditemukan dalam menangkal infeksi virus ini. Respon *innate* merupakan langkah awal dalam menghambat

replikasi dari virus, respon ini akan mendorong aktivasi dari *adaptive immune response* yang lebih bersifat spesifik (Kamps, SB *et al.* 2006).

Virus influenza HPAI memiliki protein non struktural 1 (NS1) yang berperan dalam menghindari respon sistem imun IFN. Sehingga produksi sitokin oleh hospes berlangsung secara berlebihan yang menyebabkan efek hiper-sitokinemia pada penderita (Asmara, W. 2007).

Respon imun *adaptive* membutuhkan beberapa hari untuk menjadi efektif dalam menghambat replikasi dari virus, kelebihan dari sistem imun ini adalah dalam kemampuannya untuk membuat suatu memori respon yang akan digunakan untuk menangkal infeksi virus yang sama di kemudian hari. Infeksi dari virus influenza mendorong terbentuknya antibodi secara sistemik maupun terlokalisasi (*humoral immunity*) dan juga sel T sitotoksik (*cellular immunity*). Kedua respon tersebut sangat penting dalam proses pemulihan setelah infeksi akut dan dapat mencegah infeksi kembali oleh tipe virus yang sama di kemudian hari (Kamps, SB *et al.* 2006).

2.5.1 Sistem Imun Humoral

Infeksi dari virus influenza menghasilkan produksi antibodi secara sistemik terhadap glikoprotein HA dan NA. Sebagai contoh produksi immunoglobulin spesifik terhadap HA seperti IgM, IgA dan IgG terlihat setelah infeksi virus selama 2 minggu. Pembentukan antibodi spesifik terhadap NA juga dilakukan bersamaan dengan antibodi untuk HA. Puncak pembentukan

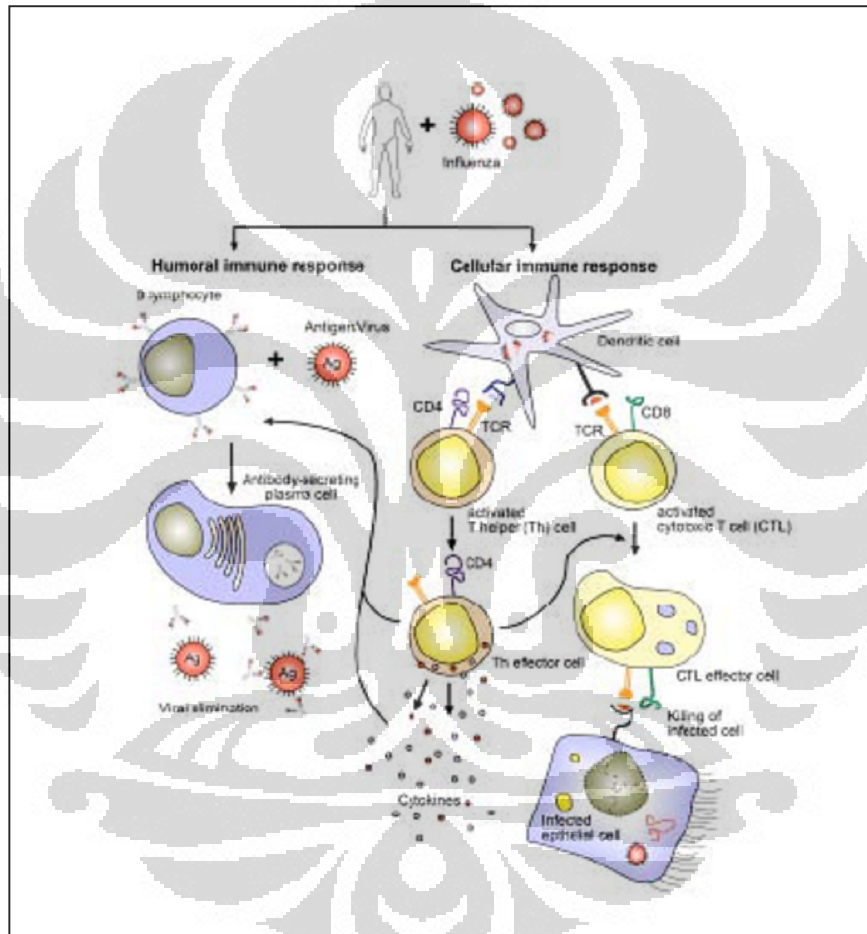
antibodi diketahui setelah 4-7 minggu setelah infeksi virus. Antibodi spesifik terhadap HA berguna dalam mencegah terjadinya infeksi oleh tipe virus yang sama. Berbeda dengan antibodi NA yang tidak dapat menetralisasi infeksi virus, tetapi hanya mengurangi efisiensi pelepasan virus baru dari sel yang terinfeksi (Johanson.1989).

2.5.2 Sistem Imun Selular

Sistem ini diperankan oleh sel T dengan dibantu oleh peran *Major Histocompatibility Complex* (MHC) yang berperan dalam mempresentasikan antigen ke permukaan sel terinfeksi sehingga dapat dikenali oleh sel T (Th atau Tc). Sel T penolong/ *helper* (sel Th), mengkoordinasikan respon imunitas dengan cara berkomunikasi dengan sel-sel lain. Ada yang bertugas menstimulasi sel B untuk memproduksi antibodi, mengaktifasi fagosit, serta ada yang mengaktifasi sel T lainnya. Sel T sitotoksik (sel Tc), akan membunuh sel yang memiliki molekul asing atau abnormal pada permukaan selnya. Sel T ini sangat berguna untuk menyerang virus karena ia mampu mengenali fragmen kecil dari virus yang ada pada membran sel tempat virus bersembunyi, dan kemudian menyerang dan membunuh sel tersebut (Kamps, SB *et al.* 2006).

Sebagai contoh, infeksi virus influenza, Th (CD4) akan membantu sel B untuk membentuk anti HA dan anti NA. Epitope yang dikenali oleh CD4 Th berbeda dari yang dikenali oleh antibodi, kerja dari Th dibantu oleh MHC

kelas II. Sedangkan Tc (CD8) akan mengenali epitope dari HA maupun protein internal seperti M, NP, dan PB2 yang di bawa ke permukaan sel terinfeksi oleh MHC kelas I (Kamps, SB *et al.* 2006). Pada Gambar 4 diperlihatkan perbedaan antara sistem imun humoral dan selular.



Gambar 4. Sistem imun humoral dan selular (Kamps, SB *et al.* 2006)

2.6 Bioinformatika

Bioinformatika adalah gabungan antara ilmu biologi dan ilmu teknik informasi (TI). Bioinformatika adalah aplikasi dari alat komputasi dan analisis untuk menangkap dan menginterpretasikan data-data biologi. Ilmu ini merupakan ilmu baru yang merangkul berbagai disiplin ilmu termasuk ilmu komputer, matematika, fisika, biologi, dan ilmu kedokteran yang kesemuanya saling menunjang dan saling bermanfaat satu sama lainnya (Utama, 2003).

Bioinformatika menjadi penting karena perkembangan teknologi informasi dan peningkatan ilmu komputer, khususnya pada bidang biologi molekuler, membuka sudut pandang baru dalam menyelesaikan persoalan biologi molekuler (Baxevanis dan Oullette, 2005).

2.6.1 Format FASTA

Format FASTA terdiri atas *definition line* dan *sequence* asam amino atau nukleotida. Format ini merupakan format input (*query sequence*) untuk berbagai program analisis bioinformatika. Format FASTA tergolong kurang informatif dibandingkan format lainnya, namun format ini lebih praktis jika digunakan untuk data-data primer pada manusia (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

2.6.2 Format GBFF (*Gen Bank Flatfile Format*)

Format penyimpanan data yang paling umum digunakan adalah format GBFF (*Gen Bank Flatfile Format*), yang merupakan format elementer penyimpanan informasi dalam genbank. Gen Bank merupakan suatu institusi yang menyimpan dan mengelola database urutan DNA suatu gen dan ekspresi asam aminonya. Urutan DNA diperoleh dari berbagai penelitian yang dengan sukarela mempublikasikan hasil penelitiannya untuk masyarakat umum. Gen Bank didirikan oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bersama dengan *DNA Data Bank of Japan* dan *European Bioinformatics Institute* (EBI) (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

2.6.3 *Multiple Sequence Allignment*

Alignment merupakan metoda penjajaran dua atau lebih sekuens DNA atau asam amino menggunakan algoritma tertentu dengan bantuan komputer, sehingga di dapatkan area yang memiliki urutan relatif identik satu sama lain. Kegunaan dari metoda ini adalah untuk mencari kesamaan (konservatifitas) dan homologi antar sekuens nukleotida ataupun asam amino. Konservatifitas menunjukkan adanya hubungan evolusi antara dua atau lebih sekuens nukleotida yang mengalami perubahan, seperti substitusi, insersi, dan delesi (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

Berdasarkan jumlah sekuens yang digunakan, sequence alignment dibagi menjadi dua jenis, yaitu pairwise alignment jika melibatkan dua sekuens dan *multiple sequens alignment* jika melibatkan lebih dari dua sekuens. multiple sequens alignment memberikan hasil yang lebih akurat dan representatif dibandingkan pairwise alignment karena peningkatan jumlah input sekuens meningkatkan kepercayaan dan akurasi output. Peningkatan jumlah sekuens yang dimasukan berarti meningkatkan kompleksitas proses sequence alignment. (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

2.6.4 *Phylogenetic Tree*

Phylogenetic tree adalah proses untuk mengklasifikasikan makhluk hidup berdasarkan tingkat similaritasnya. Dalam konteks ini, diasumsikan bahwa semakin similiar kedua spesies maka semakin dekat pula *common ancestor* mereka. Filogenetik adalah filogeni khusus yang bergantung pada perbandingan gen-gen ekivalen dari beberapa spesies untuk merekonstruksi pohon genealogi dan mengetahui kekerabatan diantara mereka. Filogeni bermanfaat untuk merekonstruksi sejarah kehidupan dan menjelaskan diversifitas dari makhluk hidup (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

2.6.5 Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Blast adalah proses alignment antara suatu sekuens yang belum diketahui pembanding yang akan digunakan. Dengan metoda ini kita dapat mencari kecocokan antara sekuens yang kita miliki dengan sekuens yang ada di dalam database. Dengan begitu kita dapat melihat hasil/list sekuens dari database dengan berbagai tingkat nilai kemiripan. Dalam prosesnya Blast mencari kemiripan berdasarkan *word matching* secara cepat karena langsung mencari kemiripan untuk tiap 3 huruf. Akibatnya metoda ini kurang sensitif terhadap pencarian similarity dikarenakan tidak akan menemui kecocokan untuk sekuens yang sangat pendek (Baxevanis dan Ouellette, 2001).

2.6.6 Prediksi Struktur Sekunder

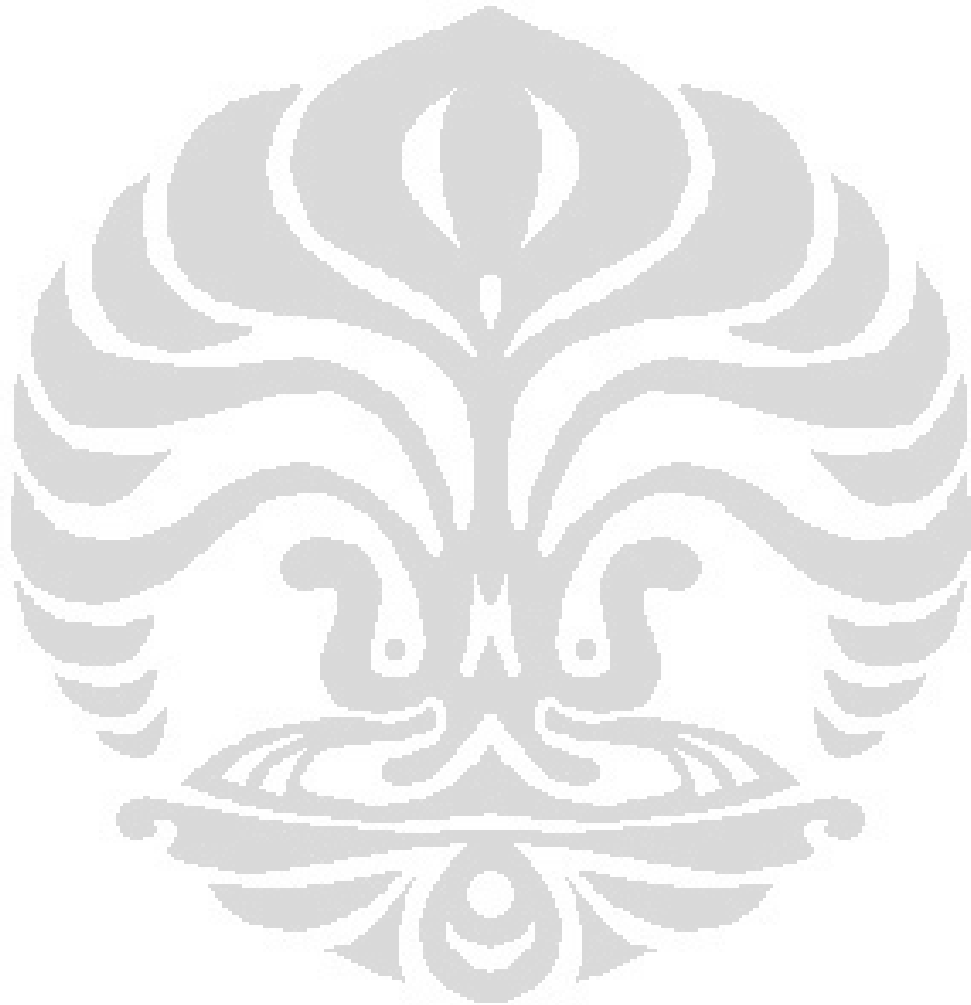
Struktur protein dapat dibedakan dalam empat tingkatan yaitu, struktur primer yang menyatakan susunan linear asam-asam amino sepanjang rantai polipeptida, struktur sekunder yaitu menggambarkan pola pelipatan (*folding*) bagian – bagian polipeptida ke dalam struktur yang teratur, struktur tersier yaitu menunjukkan kecenderungan polipeptida membentuk lipatan atau gulungan dan struktur kwartener yang menunjukkan interaksi non-kovalen yang mengikat beberapa rantai polipeptida ke dalam satu molekul tunggal protein.

Struktur sekunder protein berupa bentuk ruang dari rantai peptida dan antar residu asam amino yang berdekatan akan saling tertarik akibat terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus amino ikatan peptida pertama dengan gugus karboksil ikatan peptida pada jarak tertentu.

Bentuk dari struktur sekunder yang umum adalah *alpha helix* yaitu berbentuk berpilin, *beta sheet* yaitu berbentuk berlipat dan *Random Coil*. Prediksi struktur sekunder dari suatu sekuen protein dapat dilakukan dengan metoda komputasi.

2.6.7 Epitope Prediction Server

Epitope prediction server adalah server yang mampu memprediksi epitope yang terdapat pada suatu antigen, dengan bantuan dari penggunaan metode algoritma. Saat ini, telah tersedia berbagai macam *epitope prediction server*, baik untuk *sequential* maupun *conformational epitope*, yang dapat diakses melalui jaringan internet (Kulkarni-Kale *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).



BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan komputer yang terhubung ke jaringan internet dengan menggunakan program *Internet Browser* atau *Mozilla Firefox* dan terintegrasi pada sistem operasi *Microsoft Windows XP*.

Data sekuen protein influenza A diperoleh dari *database GenBank* yang dikeluarkan oleh *National Center for Biotechnology Information* melalui *Influenza Virus Resource*.

3.1 Pencarian Sekuens Database dari Protein H5N1

Sekuen protein H5N1 diambil dari website <http://ncbi.nlm.nih.gov/> yang dikeluarkan oleh *National Center for Biotechnology*. Data protein yang akan diambil meliputi HA, NS, dan M1 dari virus H5N1 Indonesia isolat manusia, H5N1 dari Hongkong, H1N1 tahun 1918, serta H1N1 Meksiko 2009 yang telah terbukti memiliki karakteristik tingkat keganasan tinggi. Data ini juga akan didukung oleh tipe *influenza* lain yang memiliki tingkat keganasan relatif rendah seperti H1N1, H1N2, dan H3N2

3.2 Melakukan *Multiple Alignment* Terhadap Sekuens yang Diperoleh

Setelah didapat sekuen protein yang diinginkan, kemudian dilakukan *multiple alignment* untuk mengetahui kemiripan dari sekuen protein pada tiap strain H5N1 dengan sub tipe influenza lain yang memiliki tingkat keganasan relatif rendah s. Program yang digunakan dalam langkah ini adalah menggunakan *CLC Main Workbench 5.0*, hasil dari *alignment* ini akan berguna untuk analisa mutasi dari virus H5N1.

3.3 Pembuatan Pohon Filogenetik

Pembuatan pohon filogenetik dimaksudkan untuk mencari sekuen yang memiliki kekerabatan yang dekat dengan virus influenza bertipe *High Pathogenicity*. Proses pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan software *CLC Main Workbench 5.0* dengan *input* hasil *alignment* sekuen-sekuen yang diperoleh.

3.4 Analisis Mutasi

Langkah ini dilakukan untuk mencari daerah mana saja yang terdapat perbedaan maupun persamaan sekuen protein dari H5N1 Indonesia dengan sub tipe virus influenza yang lain. Dan diharapkan dapat menemukan daerah-daerah yang menjadi penentu sifat patogenitas virus dengan

membandingkan dengan kasus *Low Pathogenicity*. Studi literatur sangat diperlukan untuk mencari daerah yang dimungkinkan menjadi penentu sifat patogenitas virus influenza A terutama H5N1.

Program yang dapat digunakan untuk analisa mutasi ini adalah server Amino Track yang dapat diakses melalui <http://apps.sbri.org/AminoTrack/> . Dengan menggunakan server ini akan memudahkan dalam melihat perubahan – perubahan asam amino yang terjadi. Input data berupa sekuen hasil allignment sebelumnya, dan akan diperoleh mutasi spesifik terhadap sekuen-sekuen tersebut.

3.5 Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein (Furin)

Salah satu faktor penentu patogenitas adalah pola pemecahan HA oleh protein *intraselular* salah satunya adalah Furin. Maka dari itu untuk melihat pola pemecahan yang terjadi oleh furin dapat dilakukan prediksi menggunakan server online pro-protein (furin) yang dapat diakses melalui website <http://cbs.dtu.dk/services/ProP>.

3.6 Prediksi Struktur Sekunder

Perubahan susunan asam amino berdasarkan hasil analisis menggunakan Amino Track dilihat apakah ada pengaruh terhadap perubahan struktur sekunder protein. Prediksi struktur sekunder melalui server *Jpred 3*

yang dapat diakses melalui <http://compbio.dundee.ac.uk/> dengan cara memasukkan sekuen asam amino dari isolat yang akan diamati dalam format FASTA.

3.7 Prediksi Lokasi *Burried/ Exposed* dari Sekuen Protein

Prediksi mutasi spesifik yang terjadi apakah pada daerah yang *burried/exposed* dapat dilakukan menggunakan server *Conseq* yang dapat diakses melalui website <http://conseq.bioinfo.tau.ac.il>

3.8 Prediksi Epitope HA dan NA

Program yang dapat digunakan untuk prediksi epitope ini salah satunya adalah Immuneepitope. Program ini dapat diakses melalui website <http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc-binding.html>. Dari analisa menggunakan server ini diharapkan dapat mengetahui perubahan yang terjadi dari pengenalan epitope oleh karena perubahan susunan asam amino

3.9 Prediksi Struktur 3D protein

Penggambaran struktur 3D dari protein dapat membantu memperlihatkan kesamaan dari fisiologis struktur pada tiap sekuen protein yang ada. Program online yang dapat digunakan dapat diakses melalui <http://ps2.life.nctu.edu.tw>.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pencarian Sekuen Protein

Subtipe virus influenza A yang digunakan adalah subtipe H1N1, H1N2, H3N2, dan H5N1 dari *host* manusia. Pemilihan subtipe dari virus influenza A ini bertujuan untuk membandingkan sekuen H5N1 di Indonesia yang memiliki tingkat keganasan tinggi dengan subtipe influenza A lainnya yang mempunyai tingkat keganasan yang relatif kecil bagi manusia. Dalam hal ini secara umum virus influenza subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 merupakan strain virus influenza A yang telah mampu menyebar antar manusia dan memiliki tingkat keganasan yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan subtipe H5N1. Akan tetapi ada beberapa kasus H1N1 yang juga memiliki tingkat keganasan yang cukup tinggi seperti strain H1N1 pada tahun 1918 dan 2009. Maka dari itu dalam proses pemilihan sekuen ini juga diperhatikan secara seksama apakah ada kasus-kasus khusus seperti kedua strain H1N1 tersebut pada subtipe H1N2 maupun H3N2 yang dipilih. Sekuen protein influenza yang dipilih dalam penelitian ini adalah Hemagglutinin (HA), Non Struktural 1 (NS1), dan Matrix 1 (M1)

Pencarian seluruh sekuen protein yang diinginkan ini dapat dilakukan dengan mengakses website National Center of Biotechnology Information dengan alamat situs <http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database.html>.

Dalam situs ini terdapat *influenza data search* yang kemudian dilakukan *advanced data search* sesuai dengan spesifikasi virus influenza yang kita inginkan. Spesifikasi ini meliputi tipe influenza, *host* dari virus, asal negara virus diisolasi, jenis sekuen protein yang diinginkan, serta subtipe dari virus influenza.

Dalam penelitian ini digunakan tipe influenza A dengan subtipe H1N1, H1N2, H3N2, serta H5N1 yang berasal dari *host* manusia. Untuk H1N1 serta H3N2 diambil sekuen yang berasal dari wilayah di Asia, sedangkan H1N2 diambil dari seluruh wilayah yang ada di database dikarenakan sekuen yang tersedia untuk subtipe ini di wilayah Asia tidak sebanyak subtipe yang lain. Sedangkan sekuen subtipe H5N1 yang diambil berasal dari Indonesia. Sekuen protein yang diambil adalah HA, NS1, dan M1 serta dipilih sekuen yang *full length* guna memudahkan dalam analisa selanjutnya (Tabel 2).

Tabel 2. Jumlah sekuen protein influenza A yang diperoleh

Subtipe	Protein		
	HA	NS1	M1
H1N1	79 sekuen	34 sekuen	69 sekuen
H1N2	30 sekuen	32 sekuen	34 sekuen
H3N2	430 sekuen	130 sekuen	510 sekuen
H5N1 Indonesia	97 sekuen	85 sekuen	81 sekuen

Data sekuen yang di dapat berupa format GBFF yang terdiri atas *Header*, *Feature*, serta sekuen protein. *Header* berisi data identitas

organisme dari mana sampel virus diambil, seperti nama gen, waktu diambil, dan nomor akses. *Feature* berisi informasi biologi yang penting, seperti nama genus, spesies, jaringan, serta kromosom. Sedangkan bagian terakhir adalah susunan lengkap asam aminonya (Lampiran 1). Untuk analisis selanjutnya dengan menggunakan software maupun server yang digunakan dalam penelitian maka lebih mudah apabila merubah format tersebut ke dalam format FASTA (Lampiran 2).

4.2 Multiple Sequence Alignment

Sekuen HA, NS1, dan M1 yang telah diperoleh dalam format FASTA kemudian dilakukan *Multiple Sequence Alignment* dengan menggunakan program *CLC Main Workbench 5.0*. Untuk sekuen hemagglutinin (HA) difokuskan untuk melihat perubahan sekuen protein di daerah pemotongan HA1 dan HA2. Sedangkan untuk protein yang lainnya dilakukan *alignment* secara menyeluruh untuk mengetahui perbedaan sekuen protein yang terjadi.

Dalam penelitian ini ingin dilihat perbedaan yang terjadi pada sekuen protein H5N1 host manusia yang berasal dari Indonesia dengan kasus-kasus virus influenza subtipe lain yang pernah terjadi. Untuk mempermudah penentuan faktor penyebab patogenisitas yang tinggi pada H5N1 *host* manusia di Indonesia, maka diambil 2 sekuen H5N1 *host* manusia dari Indonesia sebagai perwakilan untuk protein HA, NS1, dan M1. Sekuen yang dipilih didasarkan pada kasus pertama H5N1 yang menyerang manusia di

Indonesia (A/Indonesia/5/2005) serta kasus terakhir yang dilaporkan ke database NCBI (A/Indonesia/CDC1032/2007).

Sebagai pembanding juga diambil sekuen yang memiliki tingkat keganasan yang tinggi terhadap manusia yaitu subtipe H1N1 tahun 1918 (A/Brevig Mission/1/18) dan 2009 (A/Mexico/InDRE4487/2009) serta strain H5N1 Hongkong *host* manusia (A/Hong Kong/156/97). Sekuen-sekuen yang memiliki tingkat patogenitas tinggi ini selanjutnya dijadikan sebagai kontrol untuk melihat perbedaan sekuen protein yang terjadi bila dibandingkan dengan kasus influenza dari subtipe lain yang relatif rendah patogenitasnya terhadap manusia.

Dari sekuen yang memiliki tingkat patogenitas tinggi tersebut kemudian dilakukan *alignment* dengan sekuen H1N1, H1N2, serta H3N2. Hasil dari *alignment* ini berupa file dengan *extension* *.aln. Hasil *multiple sequence alignment* ini dapat dilihat pada Lampiran 3.

4.3 Pembuatan Pohon Filogenetik (*Phylogenetic Tree*)

Dalam analisa sekuen selanjutnya diperlukan pembuatan pohon filogenetik untuk pemilihan sekuen dari H1N1, H1N2, maupun H3N2 yang akan digunakan untuk melihat faktor penyebab patogenitas yang tinggi pada H5N1. Hasil dari *alignment* sebelumnya kemudian digunakan untuk membuat *phylogenetic tree* sehingga dapat diketahui kedekatan kekerabatan antara kontrol dengan sekuen-sekuen yang dipilih dari berbagai subtipe.

Dari hasil pohon filogenetik yang berhasil dibuat menggunakan program *CLC Main Workbench 5.0* didapatkan bahwa kontrol yang merupakan strain dengan patogenitas tinggi berada pada cabang yang berdekatan sehingga dapat disimpulkan bahwa mereka memiliki kekerabatan yang dekat. Data yang cukup menarik adalah ditemukan masing-masing satu sekuen untuk H1N1, H1N2, dan H3N2 yang berpatogenitas relatif rendah memiliki kekerabatan cukup dekat dengan kontrol yang digunakan (Tabel 3). Sekuen-sekuen protein ini dapat dijadikan sebagai pembandingan dan dapat dicari mutasi spesifik yang berpengaruh pada tingkat patogenitas suatu virus. Hasil penggambaran pohon filogenetik dari masing-masing protein dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 3. Sekuen virus influenza A H1N1, H1N2, dan H3N2 yang memiliki kekerabatan dekat dengan kontrol

Subtipe	Protein		
	HA	NS1	M1
H1N1	A/Thailand/271/2005	A/Thailand/271/2005	A/Thailand/271/2005
H1N2	A/Philippine/344/2004	A/Philippine/344/2004	A/Philippine/344/2004
H3N2	A/HongKong/1774/99	A/HongKong/1774/99	A/HongKong/1774/99

4.4 Analisis Mutasi

Setelah didapatkan sekuen protein yang akan dibandingkan dengan kontrol berdasarkan analisis pohon filogenetik, maka langkah berikutnya adalah melakukan analisis mutasi terhadap sekuen-sekuen tersebut.

Dalam proses ini digunakan server Amino Track yang dapat diakses melalui <http://apps.sbri.org/AminoTrack/>. Amino Track merupakan server yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya mutasi yang terjadi seperti *deletion*, *substitution*, maupun *insertion* hasil multiple alignment suatu sekuen asam amino yang hasilnya berupa perbandingan antara satu sekuen sebagai referensi dengan sekuen lainnya dengan dasar pemrograman statistik (Mahalanabis, M., J *et al.* 2006).

Input dari server ini adalah hasil *multiple sequence alignment* yang dirubah menjadi format FASTA. Untuk itu diperlukan software *Jalview* yang dapat merubah hasil alignment berformat *.aln menjadi format FASTA.

Output dari Amino Track berupa suatu file dalam format *zip* yang berisi file dalam format *microsoft excel*. Dengan menggunakan server ini memudahkan untuk melihat posisi perubahan sekuen protein pada tiap isolat virus yang digunakan dalam analisis.

4.4.1 Mutasi Hemagglutinin

Hasil analisis mutasi menggunakan Amino Track untuk sekuen protein Hemagglutinin pada daerah pemotongan HA0 (*cleavage site*) pada Tabel 4.

Tabel 4. Mutasi yang terjadi pada daerah *cleavage site* HA

Sampel	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	N	S	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1)	N	S	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G
A/HongKong/156/97 (H5N1)	N	T	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G
A/SouthCarolina/1/18 (H1N1)	N	I	P	S	I	Q	S	R	-	-	-	-	G
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	N	V	P	S	I	Q	S	R	-	-	-	-	G
A/Thailand/271/2005 (H1N1)	N	I	P	S	I	Q	S	R	-	-	-	-	G
A/Philippines/344/2004(H1N2)	N	I	P	S	I	Q	S	R	-	-	-	-	G
A/HongKong/1774/99 (H3N2)	N	I	P	E	K	Q	T	R	-	-	-	-	G

HA selain berperan dalam pengikatan terhadap reseptor, juga berperan dalam proses fusi virus untuk melepaskan materi genetiknya ke dalam sel *host*. Proses ini memerlukan aktivasi pemotongan dari prekursor molekul HA menjadi HA1 dan HA2 oleh protease sel *host* (Korteweg, Christine., Gu, Jiang. 2007).

Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa sekuen H5N1 *host* manusia yang berasal dari Indonesia maupun HongKong terdapat insersi berupa *polybasic amino acid region* R-X-K/R-R sedangkan sekuen H1N1, H1N2, dan H3N2

hanya memiliki satu arginin di daerah pemotongan. Pola yang dimiliki oleh sekuen H5N1 asal Indonesia telah sesuai dengan kasus avian influenza yang tergolong *Highly Pathogenic* seperti A/HongKong/156/97(H5N1).

4.4.2 Mutasi Non Struktural 1 (NS1)

Mutasi spesifik pada sekuen NS1 ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Mutasi spesifik NS1

a. Kontrol vs H1N1															
Sampel	3	47	51	53	80	81	82	83	84	137	145	164	173	176	216
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	S	G	G	D	-	-	-	-	-	I	I	P	D	N	P
A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-	-	-	-
A/HongKong/156/97 (H5N1)	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-	-	-	-
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-	-	-	-
A/Thailand/271/2005 (H1N1)	P	S	S	N	T	I	A	S	V	V	T	L	N	D	S

b. Kontrol vs H1N2													
Sampel	53	56	57	66	73	80	81	82	83	84	180	183	211
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	D	T	A	E	S	-	-	-	-	-	V	G	R
A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	-	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-
A/HongKong/156/97 (H5N1)	-	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	-	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-
A/Philippine/344/2004 (H1N2)	E	P	S	K	Y	T	I	A	S	V	T	K	G

Tabel 5 (Lanjutan). Mutasi spesifik NS 1

c. Kontrol vs H3N2													
Sampel	53	56	66	73	80	81	82	83	84	98	180	183	185
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	D	T	E	S	-	-	-	-	-	M	V	G	L
A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-	-
A/HongKong/156/97 (H5N1)	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-	-
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	-	-	-	-	T	I	A	S	V	-	-	-	-
A/HongKong/1774/99 (H3N2)	E	P	K	Y	T	I	A	S	V	I	I	K	F

Dari tabel 5 terlihat bahwa mutasi spesifik kontrol dengan sekuen H1N1 terjadi pada posisi 3, 47, 51, 53, 137, 145, 164, 173, 176, dan 216. Mutasi spesifik kontrol dengan H1N2 terjadi pada posisi 53, 56, 57, 66, 73, 180, 183, dan 211. Sedangkan mutasi spesifik kontrol dengan H3N2 terjadi pada posisi 53, 56, 66, 73, 98, 180, 183, dan 185. Hal yang menarik adalah terjadinya *deletion* pada posisi 80, 81, 82, dan 83 untuk sekuen H5N1 isolat asal Indonesia. Pada posisi 53 terjadi mutasi untuk sekuen kontrol baik dengan H1N1, H1N2, maupun H3N2. Mutasi D53N pada H1N1 dan D53E pada H1N2/ H3N2.

Tingkat patogenitas dari virus influenza sangat dipengaruhi oleh kerja dari protein NS1, dimana protein ini berperan dalam menghambat proses *innate immune response* yang dimediasi oleh interferon tipe 1. Kehadiran asam glutamat pada posisi 92 dari NS 1 akan menyebabkan virus tersebut

resisten terhadap IFN, sedangkan apabila posisi 92 berupa asam aspartat maka virus influenza tersebut menjadi sensitif terhadap IFN (Z, Maria C. 2001).

Pada sekuen A/HongKong/156/97 (H5N1) ditemukan asam glutamat pada posisi 92, sedangkan pada isolat H5N1 asal Indonesia ditemukan asam aspartat pada posisi 92 begitu juga isolat H1N1, H1N2, serta H3N2. Yang membedakan adalah H5N1 asal Indonesia memiliki daerah *deletion*, ini berbeda dengan sekuen virus yang lain. Daerah *deletion* ini juga dimungkinkan berpengaruh pada tingkat patogenitas dari virus influenza terutama H5N1 (Korteweg, Christine., Gu, Jiang. 2007).

Sekuen A/Brevig Mission/1/18(H1N1) dan A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1) juga memiliki asam aspartat pada posisi 92, akan tetapi kedua sekuen ini memiliki tingkat patogenitas yang tinggi terhadap manusia. Hal ini dapat menggambarkan bahwa mutasi D92E pada NS 1 bukan satu-satunya faktor penentu patogenitas dari virus influenza A.

Selanjutnya hasil dari analisis mutasi spesifik tersebut dilihat pengaruhnya terhadap perubahan struktur sekunder dan prediksi epitope.

4.4.3 Mutasi Matrix 1

Hasil analisa menggunakan server Amino Track didapatkan beberapa posisi terjadinya mutasi pada sekuen Matrik 1. Dari hasil ini kemudian dicari

posisi dimana terjadi mutasi spesifik kontrol dengan sekuen H1N1, H1N2, dan H3N2 yang telah dipilih (Tabel 6).

Tabel 6. Mutasi spesifik M1

a. Kontrol vs H1N1		c. Kontrol vs H3N2	
Sampel	248	Sampel	193
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	M	A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	A
A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	-	A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	-
A/HongKong/156/97 (H5N1)	-	A/HongKong/156/97 (H5N1)	-
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	-	A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	-
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	-	A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	-
A/Thailand/271/2005(H1N1)	I	A/HongKong/1774/99(H3N2)	V

b. Kontrol vs H1N2	
Sampel	9 10 11 12 13 14 201 208 248
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	T Y V L S I E Q M
A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	- - - - - - - - -
A/HongKong/156/97 (H5N1)	- - - - - - - - -
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	- - - - - - - - -
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	- - - - - - - - -
A/Philippines/344/2004(H1N2)	N V C S L Y D K I

Mutasi spesifik yang terjadi antara kontrol dengan H1N1 dan H3N2 terjadi hanya pada satu posisi yaitu 248 untuk H1N1 dan 193 untuk H3N2. Sedangkan mutasi spesifik antara kontrol dengan H1N2 terjadi pada posisi 9, 10, 11, 12, 13, 14, 201, 208, dan 248. Posisi mutasi tidak ditemukan yang identik untuk ketiga sub tipe. Hanya posisi 248 yang mengalami perubahan pada H1N1 dan H3N2.

Selanjutnya hasil dari analisis mutasi spesifik tersebut dilihat pengaruhnya terhadap perubahan struktur sekunder dan prediksi epitope sama seperti protein NS 1.

4.5 Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein (Furin)

Protein HA berguna dalam proses pelekatan dengan reseptor *sialic acid* pada sel host dan setelah melalui aktivasi proteolitik dari prekursor HA menjadi HA1 dan HA2, virus mulai melakukan fusi dengan sel host. Studi yang telah dilakukan menyebutkan bahwa tingkat kemudahan pemotongan HA merupakan faktor penting dalam virulensi dari virus avian influenza. Virus avian influenza yang memiliki tingkat patogenitas rendah atau digolongkan sebagai *Low Pathogenicity* biasanya memiliki satu residu arginin pada daerah pemecahan sehingga hanya dapat dipotong oleh protease ekstraselular seperti tripsin, yang terdapat pada saluran pernapasan atas serta saluran gastrointestinal. Hal ini memberikan efek infeksi virus secara lokal saja. Sedangkan virus avian influenza yang digolongkan ke dalam *Highly Pathogenic* memiliki *polybasic amino acid* sehingga dapat dipotong oleh banyak intraselular protease seperti furin. Hal ini menyebabkan infeksi secara sistemik pada host (Korteweg, Christine., Gu, Jiang. 2007).

Dari hasil *multiple alignment* dan analisis mutasi menggunakan Amino Track pada sekuen-sekuen yang digunakan terlihat bahwa isolat H5N1 *host* manusia asal Indonesia telah memiliki pola R-X-K/R-R yang serupa dengan

yang dimiliki oleh A/Hongkong/156/97. Secara menyeluruh terlihat bahwa seluruh sekuen virus H5N1 host manusia asal Indonesia telah memiliki pola tersebut, sehingga termasuk ke dalam golongan *Highly Pathogenic*.

Untuk membuktikan bahwa pola ini mempengaruhi kemudahan pemotongan menggunakan intraselular protease seperti furin, digunakan server online pro-protein (furin) yang dapat diakses melalui website <http://cbs.dtu.dk/services/ProP>. Melalui server ini dapat diketahui pemecahan yang terjadi pada sekuen HA oleh Furin, dimana input data berupa sekuen HA yang berformat FASTA dan output berupa tabel yang berisikan data residu asam amino tempat diperkirakan terjadi proses pemotongan oleh furin. Skor diberikan untuk memudahkan menunjukkan posisi yang paling mungkin terjadinya proses pemotongan HA (Lampiran 5).

Berikut ditampilkan hasil prediksi server pro-P untuk sekuen HA yang digunakan (Tabel 7).

Tabel 7. Hasil prediksi pro-P

Sampel	<i>Furin-type Cleavage Site Prediction</i>
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	ESRRKKR GL
A/Indonesia/CDC1032 /2007(H5N1)	ESRRKKR GL
A/HongKong/156/97 (H5N1)	ERRRKKR GL
A/SouthCarolina/1/18 (H1N1)	<i>none</i>
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	<i>none</i>
A/Thailand/271/2005(H1N1)	<i>none</i>
A/Philippines/344/2004(H1N2)	<i>none</i>
A/HongKong/1774/99(H3N2)	<i>none</i>

Dari Tabel 7 terlihat bahwa adanya penambahan *polybasic aminon acid* menyebabkan sekuen dari H5N1 mudah untuk dipecah oleh furin. Sedangkan pada subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 tidak ditemukan adanya pemecahan oleh furin.

Hal yang perlu digaris bawah adalah pada sekuen H1N1 tahun 1918 (A/SouthCarolina/1/18) dan H1N1 tahun 2009 (A/Mexico/InDRE4487/2009). Kedua sekuen tersebut merupakan strain yang menimbulkan kematian cukup besar bagi manusia seperti halnya juga pada kasus H5N1. Akan tetapi kedua sekuen tersebut tidak memiliki pola seperti yang dimiliki oleh H5N1. Hal ini menggambarkan bahwa faktor virulensi atau patogenitas dari virus influenza terhadap manusia bukan hanya sekadar dipengaruhi oleh situs pemotongan HA saja. Akan tetapi ada faktor genetik lainnya yang mempengaruhi tingkat keganasan virus influenza tersebut.

Walaupun virus influenza H1N1 tahun 1918 tidak memiliki *polybasic amino acid* pada daerah pemotongan HA, akan tetapi sifat yang dimilikinya menunjukkan tingkat kemudahan pemotongan HA yang tinggi. Ini terbukti bahwa virus ini dapat juga dipotong dengan ketidakhadiran dari tripsin. Sampai saat ini mekanisme dari tingkat kemudahan pemotongan HA pada H1N1 tahun 1918 belum teridentifikasi secara jelas (Korteweg, Christine., Gu, Jiang. 2007).

4.6 Prediksi Struktur Sekunder

Penentuan struktur sekunder terhadap virus influenza diprediksi melalui server *Jpred 3* yang dapat diakses melalui <http://compbio.dundee.ac.uk/> dengan cara memasukkan sekuen asam amino dari isolat yang akan diamati dalam format FASTA. Hasil yang diperoleh berupa prediksi struktur sekunder untuk tiap asam amino yang terdapat dalam sekuen. Bentuk struktur sekunder *helix* diberi inisial (H), *extended strand* diberi inisial (E), dan tanda (-) untuk *random coil* (Lampiran 6). Hasil prediksi struktur sekunder terhadap posisi asam amino yang mengalami mutasi spesifik pada Non Struktural 1 (NS 1) dapat dilihat pada Lampiran 7 . Sedangkan hasil prediksi struktur sekunder terhadap posisi asam amino yang mengalami mutasi spesifik pada Matrix 1 (M 1) dapat dilihat pada Lampiran 8 .

Dari hasil prediksi struktur sekunder protein NS1 didapatkan bahwa perubahan asam amino pada posisi mutasi spesifik tidak terlalu mempengaruhi struktur sekunder yang dihasilkan. Hal ini terlihat bahwa hanya ada satu posisi yaitu posisi 51 pada mutasi spesifik kontrol vs H1N1 yang mengalami perubahan struktur sekunder dari *coil* menjadi *extended strand*.

Prediksi struktur sekunder pada mutasi spesifik protein Matrix 1 (M1) didapatkan bahwa perubahan struktur sekunder hanya terjadi pada sekuen H1N2. Dimana pada posisi 11 dan 12 terjadi perubahan dari *extended strand* menjadi *helix* dan pada posisi 14 terjadi perubahan dari *extended strand*

menjadi coil. Perubahan mutasi pada H1N1 dan H3N2 tidak memberikan perubahan struktur sekunder dari protein M1. Dari sini dapat dilihat bahwa struktur sekuen dari M1 H5N1 Indonesia , H5N1 Hongkong, H1N1 1918, dan H1N1 Meksiko 2009 lebih dekat dengan sekuen dari H1N1 dan H3N2 yang belum memiliki tingkat patogenitas tinggi.

4.7 Prediksi Mutasi *Burried/ Exposed*

Prediksi mutasi spesifik yang terjadi apakah pada daerah yang *burried/exposed* dapat dilakukan menggunakan server *Conseq* yang dapat diakses melalui website <http://conseq.bioinfo.tau.ac.il> . Sebagai *input* digunakan sekuen protein berformat FASTA dimana sekuen protein A/Indonesia/5/2005 (H5N1) dijadikan sebagai pembanding. Hasil *output* berupa jajaran sekuen yang dilengkapi dengan data prediksi letak tiap sekuen asam amino pada struktur 3 dimensi. Dengan prediksi ini dapat diketahui letak mutasi spesifik yang terjadi di struktur 3 dimensi dari protein. Apabila terjadi di daerah *burried* berarti mutasi tersebut akan mempengaruhi struktur 3 dimensi protein, sedangkan apabila terjadi di daerah *exposed* dimungkinkan akan mempengaruhi sifat fungsional yang dimiliki oleh protein tersebut.

Hasil yang diperoleh untuk daerah mutasi spesifik dari NS1 dapat dilihat pada Lampiran 9 . Mutasi spesifik antara kontrol dengan H1N1 di daerah *exposed* (posisi 3, 53, 164, 173, 176, 216), sedangkan di daerah *burried*

(posisi 47, 51, 137, 145). Mutasi spesifik antara kontrol dengan H1N2 di daerah *exposed* (posisi 53, 56, 66, 211), sedangkan di daerah *burried* (posisi 57, 73, 180, 183). Mutasi spesifik antara kontrol dengan H3N2 di daerah *exposed* (posisi 53, 56, 66), sedangkan di daerah *burried* (posisi 73, 98, 180, 183, 185). Daerah mutasi yang terjadi pada protein NS 1 terlihat merata baik di daerah *exposed* maupun *burried*. Posisi 53 yang menjadi titik mutasi spesifik antara kontrol dengan H1N1, H1N2, dan H3N2 terletak pada daerah *exposed* sehingga dimungkinkan mempengaruhi aktivitas spesifik dari protein,

Hasil yang diperoleh untuk daerah mutasi spesifik dari M1 dapat dilihat pada Lampiran 10. Mutasi spesifik antara kontrol dengan H1N1 terjadi di daerah *burried* (posisi 248). Mutasi spesifik antara kontrol dengan H1N2 terjadi di daerah *exposed* (posisi 9, 201, 208), sedangkan di daerah *burried* (posisi 10, 11, 12, 13, 14, 248). Mutasi spesifik antara kontrol dengan H3N2 terjadi di daerah *exposed* (posisi 93).

4.8 Prediksi Epitope

Untuk mengetahui apakah ada pengaruh perubahan dari asam amino terhadap perubahan pengenalan epitope, digunakan server *Immuneepitope* dengan alamat website <http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc-binding.html> . Server tersebut memprediksi pengenalan epitope menggunakan *input* sekuen protein berformat FASTA.

Dalam server ini dilakukan pemilihan kelas MHC (Major Histocompatibility Complex) yang akan digunakan dalam prediksi epitope. Dalam penelitian ini dilakukan prediksi menggunakan MHC kelas I yang berhubungan dengan fragmen peptida intraselular dan diaktifkan oleh CD8⁺ (Ulmer *et al.* 2003).

Output prediksi immuneepitope diberikan dalam unit IC50 nM. Dari prediksi ini apabila terdapat peptida yang memiliki nilai IC50 (*Inhibitory Concentration*) kurang dari 50nM maka peptida tersebut memiliki afinitas tinggi, nilai IC50 kurang dari 500nM memiliki afinitas intermediate, dan nilai IC50 kurang dari 5000nM memiliki afinitas rendah (<http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc-binding.html>, diakses 18 Mei 2009, 10.45 WIB).

Epitope adalah bagian dari antigen yang dapat membuat kontak fisik dengan reseptor antibodi, menginduksi pembentukan antibodi dan dapat diikat dengan spesifik oleh bagian dari antibodi atau reseptor antibodi. Dengan membandingkan epitope NS1 dan M1 antara kontrol dengan subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 kita dapat melihat apakah ada perubahan pengenalan epitope yang diprediksikan sehingga merubah tingkat patogenitas dari virus tersebut.

Dari prediksi epitope untuk NS 1 (Lampiran 10) diperoleh sekuen protein yang memiliki nilai IC50 terendah adalah LKANFSVVF sebesar 0,98nM. Sekuen protein ini terdapat pada isolat A/Thailand/271/2005(H1N1) posisi 130-138 dengan pengenalan oleh HLA B*1503. Pada posisi ini juga

terjadi pengenalan pada isolat A/HongKong/156/97 (H5N1), A/BrevigMission /1/18 (H1N1), A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1), A/Philippines/344/2004(H1N2), A/HongKong/1774/99(H3N2) dengan sekuen protein LKANFSVIF dan mempunyai IC50 sebesar 1,2nM. Untuk sekuen asal Indonesia, epitope yang diprediksi memiliki IC50 sebesar 1,0nM pada posisi 196-204 adalah ETIQRFAWR dengan pengenalan HLA A*6801. Nilai-nilai IC50 kurang dari 50nM tersebut memperlihatkan bahwa seluruh isolat virus yang digunakan mudah untuk diinhibisi oleh sistem imunitas tubuh. Sehingga dapat disimpulkan bahwa mutasi spesifik yang terjadi tidak terlalu berpengaruh terhadap prediksi epitope ini.

Prediksi epitope untuk M1 (Lampiran 11) diperoleh sekuen protein yang memiliki nilai IC50 terendah adalah RCLKREITF sebesar 1,1nM. Sekuen protein ini terdapat pada isolat A/Brevig_Mission /1/18 (H1N1) posisi 101-109 dengan pengenalan oleh HLA B*1503. Pada posisi ini juga terjadi pengenalan pada isolat A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1), A/Philippines/344/2004(H1N2), A/HongKong/1774/99(H3N2) dengan sekuen KCLKREITF dan mempunyai IC50 sebesar 1,4 nM. Isolat A/HongKong/156/97 (H5N1) juga memiliki daerah epitope pada posisi ini dengan sekuen KCLKREMTF dan mempunyai IC50 sebesar 1,3nM. Untuk isolat asal Indonesia, epitope yang diprediksi memiliki IC50 sebesar 1,3nM pada posisi 160-168 adalah RSHRQMATI dengan pengenalan oleh HLA B*1517. Sama seperti prediksi epitope untuk NS1, seluruh isolat memiliki nilai IC50 dibawah 50nM sehingga dapat dikenali oleh HLA secara baik dan

mudah untuk diinhibisi. Mutasi spesifik yang terjadi tidak mempengaruhi perubahan dari prediksi epitope maupun nilai IC50 yang diperoleh.

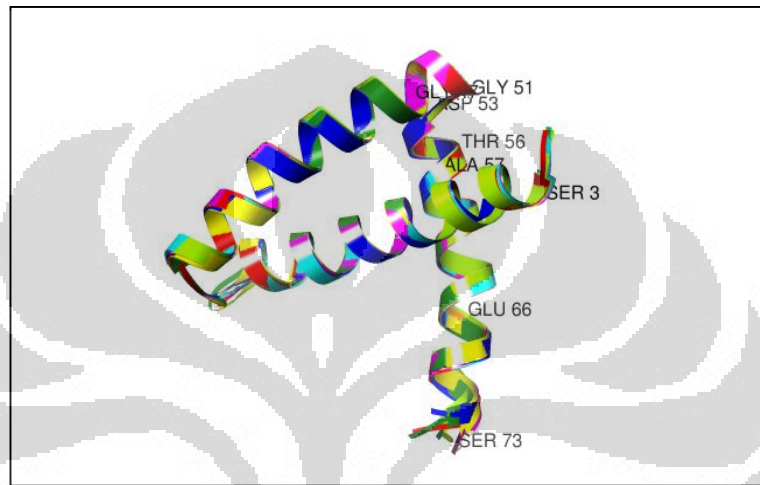
4.9 Prediksi Struktur 3D

Prediksi struktur 3D protein NS 1 dan M1 dilakukan untuk mengetahui sejauh mana perubahan yang terjadi akibat mutasi tersebut. Prediksi ini dikenal dengan istilah *homology modelling*. Proses ini menggunakan server *online* yang dapat diakses melalui <http://ps2.life.nctu.edu.tw>. Input berupa sekuen protein yang akan diprediksi dengan format FASTA, kemudian akan dilakukan proses Blast dalam pencarian template yang memiliki tingkat homology paling tinggi untuk sekuen yang akan diprediksi.

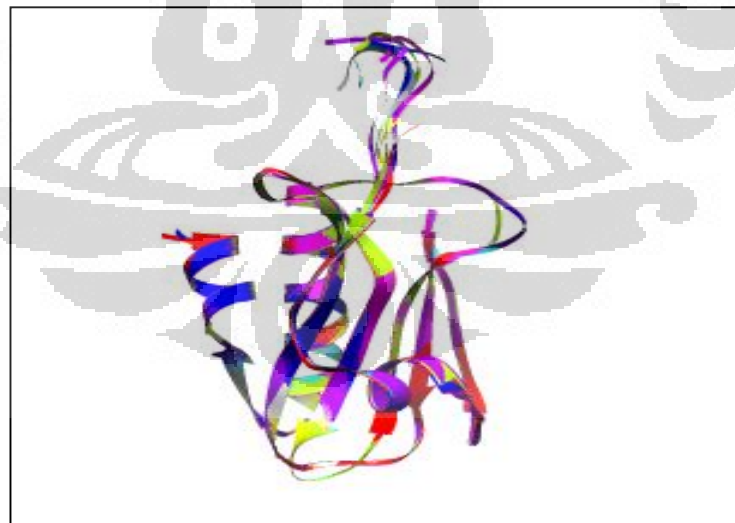
Hasil pencarian template untuk protein NS1 seluruh isolat virus yang digunakan memiliki kesamaan. Template untuk daerah RNA *Binding Domain* yaitu 2ZoaA (Lampiran 12) dan daerah effector domain yaitu 2gx9A (Lampiran 13). Hasil pencarian template untuk protein Matrix 1 seluruh isolat virus yang digunakan memiliki kesamaan yaitu 1aa7A (Lampiran 14).

Output dari prediksi ini berupa file berformat *pdb* yang dapat dibuka melalui software *Deepview*. Melalui software ini kemudian dilakukan superimpose struktur hasil prediksi untuk mengetahui perubahan yang terjadi akibat mutasi asam amino, kemudian untuk pencitraan hasil dari *superimpose* digunakan software *Chimera*.

Gambar 5 dan 6 memperlihatkan struktur 3D protein NS 1 dari sekuen yang dipilih dan telah dilakukan *superimpose* terhadap struktur protein A/Indonesia/5/2005.



Gambar 5. *Superimpose* RNA Binding Domain NS 1

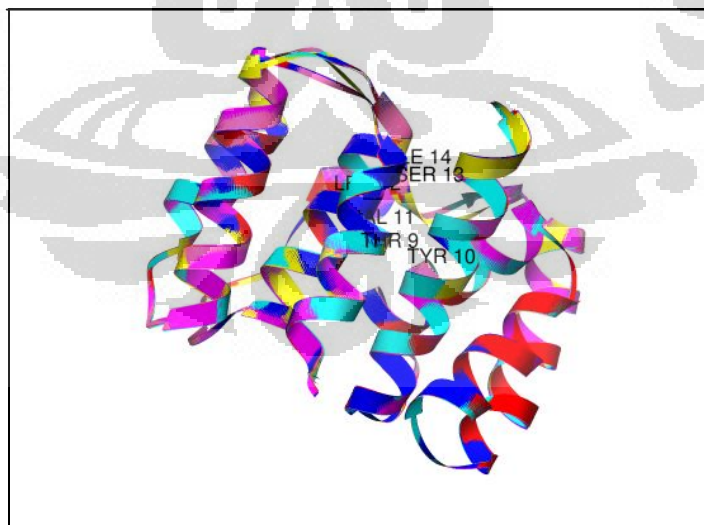


Gambar 6. *Superimpose* Effector Domain NS 1

Tabel 8. Data RMSD Non Struktural 1

Sekuen	RMSD (Å)	
	RNA Binding domain	Effector Domain
A/HongKong/156/97 (H5N1)	0,361	0,222
A/SouthCarolina/1/18 (H1N1)	0,27	0,135
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	0,356	0,152
A/Thailand/271/2005(H1N1)	0,427	0,17
A/Philippines/344/2004(H1N2)	0,379	0,235
A/HongKong/1774/99(H3N2)	0,433	0,117

Gambar 7 memperlihatkan struktur 3D protein M1 dari sekuen yang dipilih dan telah dilakukan *superimpose* terhadap struktur protein A/Indonesia/5/2005.

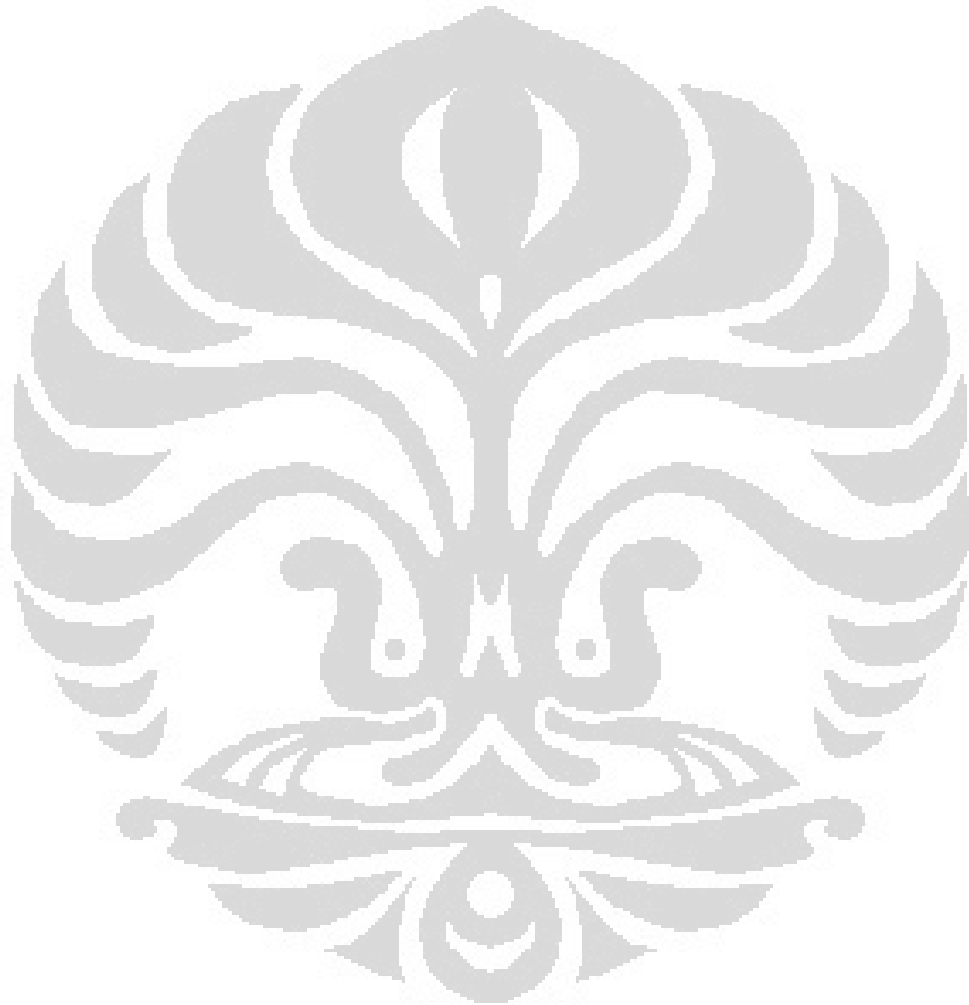


Gambar 7. *Superimpose* Matrik 1

Tabel 9. Data RMSD Matrik 1

Sekuen	RMSD (Å)
A/HongKong/156/97 (H5N1)	0,139
A/SouthCarolina/1/18 (H1N1)	0,191
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	0,201
A/Thailand/271/2005(H1N1)	0,134
A/Philippines/344/2004(H1N2)	0,148
A/HongKong/1774/99(H3N2)	0,134

Nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) memperlihatkan kemiripan yang sangat dekat untuk tiap struktur hasil prediksi (Lampiran 15) . Sehingga dapat disimpulkan bahwa mutasi spesifik yang terjadi tidak mempengaruhi struktur tersier dari protein secara signifikan.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Analisis mutasi menggunakan *multiple sequence alignment* dan *server amino track* ditemukan mutasi spesifik pada sekuen HA H5N1 isolat asal Indonesia dan Hongkong pada daerah pemotongan (*cleavage site*) HA0 menjadi HA1 dan HA2. Pada daerah ini sekuen H5N1 memiliki pola R-X-K/R-R, sedangkan sekuen subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 tidak memiliki pola ini. Pengaruh dari *insertion* ini pada H5N1 adalah kemudahannya dalam proses pemotongan HA oleh protease intraselular seperti furin. Hasil prediksi p-prot Furin menunjukkan bahwa memang benar pola ini menyebabkan HA H5N1 mudah terpotong oleh furin. Sedangkan HA H1N1, H1N2, dan H3N2 tidak dapat dipotong oleh furin. Dari hasil ini disimpulkan khususnya virus avian influenza H5N1 dapat menyebabkan infeksi secara sistemik pada host dibandingkan dengan isolat yang lain. Walaupun tanpa pola ini isolat H1N1 1918 dan H1N1 Meksiko 2009 juga memberikan patogenitas yang tinggi terhadap host.

Mutasi spesifik pada sekuen NS1 untuk kontrol dengan subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 terdapat di posisi 53. Pada posisi 53 terjadi mutasi untuk sekuen kontrol baik dengan H1N1, H1N2, maupun H3N2. Mutasi D53N pada H1N1 dan D53E pada H1N2/ H3N2. Pada M1 tidak ditemukan posisi mutasi

spesifik yang identik untuk ketiga subtipe tersebut. Hanya posisi M248I yang mengalami perubahan pada H1N1 dan H3N2.

Prediksi pengenalan epitope menjelaskan bahwa sekuen NS1 dan M1 baik kontrol maupun subtipe H1N1, H1N2, dan H3N2 sama memiliki nilai IC50 dibawah 50nM sehingga masih dapat dikenali dengan baik oleh sistem imun host. Mutasi spesifik tidak terjadi pada daerah pengenalan epitope.

Hasil mutasi spesifik yang terjadi ini baik untuk NS1 dan M1 tidak mempengaruhi perubahan struktur sekunder dan struktur tersier secara signifikan. Terlihat dari nilai RMSD setelah dilakukan *superimpose* terhadap sekuen yang digunakan.

5.2 Saran

Melakukan penelitian lebih lanjut terhadap mutasi spesifik yang didapatkan pada penelitian ini secara *in silico* dengan melihat pengaruh perubahan asam amino secara lebih molekular. Dengan cara melihat interaksi-interaksi yang terjadi pada posisi sekuen yang mengalami mutasi spesifik tersebut terhadap residu-residu asam amino yang berdekatan ataupun dengan substrat yang ada. Sehingga dapat diketahui secara lebih jelas pengaruh adanya mutasi spesifik dengan fungsi dari protein tersebut. Salah satu teknik yang dapat digunakan adalah *Molecular Dynamic Symulation*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2000. A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. *Vet.Microbiol.* 74: 3-13.
- Asmara, W. 2007. *Peran Biologi Molekuler Dalam Pengendalian Avian Influenza dan Flu Burung*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru besar pada FKH UGM.
- Baigent, Susan J & John W, McCauley. 2003. *Influenza Type A in Humans Mammals and Birds: Determinants of Virus Virulence, Host range and interspecies Transmission*. *BioEssays.* 25: 657-671.
- Baxevanis, A. D., Ouelette, B.F.F. 2005. *Bioinformatics A Practical Guide to The Analysis of Genes and Proteins*. 3rd ed. Wiley Interscience.
- Chen C.C., Hwang J.K., Yang JM. 2006. (PS)²: ProteinStructure Prediction Server. NAR, Vol. 34, W152-W157.
- Cox et al. 2005. *Orthomyxoviridae*. *Sem. Virol.* 6: 359-70.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk H.D, Stech J. 2005. *The Viral Polymerase Mediates Adaptation of an Avian Influenza Virus to a Mammalian Host*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 18590-18595
- Gao, P., Watanabe, S., Ito, T., Goto, H., Wells, K., McGregor, M., Cooley, A. J. & Kawaoka, Y. 1999. *Biological Heterogeneity, Including Systemic Replication in Mice, of H5N1 Influenza A Virus Isolates from Humans in Hongkong*. *J virol.* 73: 3184-3189.

- Guan, Yi et al. 2007. *Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health*. Clin. Microbiol.20: 243-267.
- Horimoto, T., and Kawaoka, Y. 2001. *Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A Viruses*. Clin. Microbiol. Rev. 14: 129-149.
- Kamps, S.B., et al. 2006. *Influenza report 2006*. Flying Publisher. Paris, Cagliari, Sevilla.
- Katz, J. M., Lu, X., Tumpey, T. M., Smith, C. B., Shaw, M. W. & Subbarao, K. 2000. *Molecular Correlates of Influenza A H5N1 Virus Pathogenesis in Mice*. J Virol. 74:10807–10810.
- Klenk, Hans Dieter. 2007. *Molecular Mechanisms of Pathogenicity and Interspecies Transmission of Avian Influenza Virus*. Germany: Institut für Virologie Philipps Universität Marburg.
- Kulkarni-Kale, U., S, Bhosle., A.S. Kolakar. 2005. *CEP: a Conformational Epitope Prediction Server*. Nuc. Acid Research. Vol. 33.
- Mahalanabis, M., J. Blue, and N. L. Haigwood. 2006. *AminoTrack™ : Automating the Entry and Analysis of Mutations in Multiple Protein Sequences Using a Spreadsheet Format*. In H. R. Arabnia (ed.), Proceedings of the 2006 International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (BIOCOMP'06). CSREA Press, Las Vegas, NV. pp. 549-555.
- Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.D. 2004. *Human and Avian Influenza Viruses Target different Cell*

- Types in Cultures of Human Airway Epithelium*. PNAS. 101 (13) : 4620-2624.
- Radji, M. 2006. *Avian Influenza A (H5N1): Patogenesis, Pencegahan, dan Penyebaran pada Manusia*. Majalah ilmu Kefarmasian. **3**: 55-65.
- Reid, A.H et al. 2002. *Characterization of The 1918 Spanish Influenza Virus Matrix Gene Segment*. J. Virol. 76: 10717-10723.
- Seo, S.H., Hoffmann, E. & Webster, R.G. 2002. *Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Anti-Viral Cytokine Responses*. Nat Med. 8: 950-954.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taunberger, J.K., Paulson, J.C. & Wilson, I.A. 2006. *Structure and Receptor Specificity of Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus*. Science. 312: 404-410
- Subbarao, K. & Shaw, M. W. 2000. *Molecular Aspects of Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans*. Rev Med Virol. 10: 337–348.
- Supadi PZ. 2005. *Influenza Burung pada Manusia*. Prosiding simposium. Jakarta: Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FKUI.
- Swayne, D.E., and Suarez, D.L. 2003. *Biology of Avian Influenza Especially the Change of Low Pathogenicity Virus to High Pathogenicity*. Proc.Latin American Poultry Congress.
- Sweet, C & H, Smith. 1980. *Pathogenicity of Influenza Virus*. Microbiological Review. 44: 303-330

- Syahdrajat, T. 2007. *Masalah Avian Influenza di Indonesia*. Dexa Media.
20:103-106.
- Thompson, C.I., Barclay, W.S., Zambon, M.C. and Pickles, R.J. 2006.
*Infection of Human Airway epithelium by Human and Avian Strains of
Influenza A virus*. J. Virol. 80(16) : 8060-68.
- Tumpey, T.M., Suarez, D.L., Perkin, L.E.L. 2002. *Characterization of Highly
Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated From Duck Meat*. J.
Virol. 76 (12): 6344-6355.
- Ulmer, J. B. 2006. *Novel Vaccines: Bridging Research, Development and
Production-CHI's Inaugural Conference*. Drugs.9(10).
- Utama, A. 2003. *Peranan Bioinformatika Dalam Dunia Kedokteran*. Ilmu
Komputer.com.
- Zambon, Maria C. 2001. *The Pathogenesis of Influenza in Humans*. Rev.Med.
Virol. 11: 227-241
- Zhang, G.L., A. M. Khan, K. N. Srinivasan, J.T. Angust, V. Brusic. 2005.
*MULTIPRED: a Computational System for Prediction of Promiscuous
HLA Binding Peptides*. Nuc. Acids Res.
- <http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc-binding.html>, diakses 18 Mei
2009, 10.45 WIB
- http://www.who.int/csr/don/2009_06_12/en/index.html, diakses 14 Juni 2009
pukul 23.30 WIB.

Lampiran 1. Sekuen Format GBFF

a. Hemagglutinin

```
LOCUS      ABP51969                568 aa                linearVRL 01-MAY-2008
DEFINITION hemagglutinin [Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))].
ACCESSION  ABP51969
VERSION    ABP51969.1  GI:145284450
DBSOURCE   accession EF541394.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))
  ORGANISM Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))
            Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
            Influenzavirus A.
REFERENCE  1 (residues 1 to 568)
AUTHORS    Smith,C.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (19-MAR-2007) Centers for Disease Control and
            Prevention,
            1600 Clifton Road, Mailstop G-16, Atlanta, GA 30329, USA
COMMENT    Method: conceptual translation.
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..568
            /organism="Influenza A virus
            (A/Indonesia/5/2005(H5N1))"
            /strain="A/Indonesia/5/05"
            /serotype="H5N1"
            /isolation_source="38 year-old male"
            /host="Homo sapiens"
            /db_xref="taxon:400788"
            /segment="4"
            /country="Indonesia"
            /collection_date="2005"
            /note="passage level E"
  Protein  1..568
            /product="hemagglutinin"
  Region   19..568
            /region_name="Hemagglutinin"
            /note="Hemagglutinin; pfam00509"
            /db_xref="CDD:109560"
  CDS      1..568
            /gene="HA"
            /coded_by="EF541394.1:9..1715"
ORIGIN
1 mekivlllai vslvksdqic igyhannste qvdtmeknv tvthaqdile kthngklcdl
61 dgvkplilrd csvagwllgn pncdefinvp ewsyivekan ptndlcypps fndyeelkhl
121 lsrinhfeki qiipksswsd heassgvssa cpylgspsff rnvvwlkkn styptikksy
181 nntnqedllv lwgihhpnda aeqtrlyqnp ttyisigtst lnqrlvpkia trskvngqsg
241 rmeffwtilk pndainfesn gnfiapeyay kivkkgdsai mkseleygnc ntkcqtpmga
301 inssmpfhni hpltigecpk yvksnrlvla tglrnspqre srrkkrglfg aiagfiaggw
361 qgmvdgwygy hhsneqgsgy aadkestqka idgvtnkvns iidkmntqfe avgrefnle
421 rrienlnkkm edgfldvwtv naellvlmen ertldfhdsn vknlydkvrl qlrdnakelg
481 ngcfefyhkc dncemesirn gtynypqyse earlkreeis gvklesigty qilsiystva
541 sslalaima glslwmcnsg slqcrici
```

b. Non Struktural 1 (NS 1)

LOCUS ABI36006 225 aa linear VRL 25-APR-2008
DEFINITION nonstructural protein 1 [Influenza A virus
(A/Indonesia/5/2005(H5N1))].
ACCESSION ABI36006
VERSION ABI36006.1 GI:113494204
DBSOURCE accession CY014174.1
KEYWORDS .
SOURCE Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))
ORGANISM Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))
Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
Influenzavirus A.
REFERENCE 1 (residues 1 to 225)
AUTHORS Balish,A., Bright,R., Deyde,V., Garten,R., Jadhao,S.,
Lindstrom,S.,
Loftin,L., Matsuoka,Y., Shaw,M., Shu,B., Smith,C., Smith,E. and
Xu,X.
TITLE Avian Influenza Associated with Outbreaks in Indonesia
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (residues 1 to 225)
AUTHORS Balish,A., Bright,R., Deyde,V., Garten,R., Jadhao,S.,
Lindstrom,S.,
Loftin,L., Matsuoka,Y., Shaw,M., Shu,B., Smith,C., Smith,E. and
Xu,X.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-AUG-2006) WHO Collaborating Center for
Surveillance,
Epidemiology and Control of Influenza, Influenza Branch, Centers
for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road NE,
Atlanta,
COMMENT Method: conceptual translation.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..225
/organism="Influenza A virus
(A/Indonesia/5/2005(H5N1))"
/strain="A/Indonesia/5/2005"
/serotype="H5N1"
/isolation_source="gender:M; age:38"
/host="Human"
/db_xref="taxon:400788"
/segment="8"
/country="Indonesia"
/collection_date="08-Jul-2005"
Protein 1..225
/product="nonstructural protein 1"
Region 1..211
/region_name="Flu_NS1"
/note="Influenza non-structural protein (NS1);
pfam00600"
/db_xref="CDD:109648"
CDS 1..225
/gene="NS1"
/coded_by="CY014174.1:27..704"
ORIGIN
1 mdsntvlsfq vdcflwhvrk rfadqelgda pfldrlrrdq kslrgrgntl gldietatra
61 gkqiverile eesdealkmp asryltdmtl eemsrdwfm1 mpkqkvagsl cikmdqaimd
121 ktiilkanfs vifdrletli llrafteega ivgeisplps lpghtgedvk naigvliggl
181 ewndntvrvs etiqrfawrg sdedgrlpfp pnqkrkmart iesev

c. Matrix 1

```

LOCUS       ABI36004                252 aa                linearVRL 25-APR-2008
DEFINITION matrix protein 1 [Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))].
ACCESSION   ABI36004
VERSION     ABI36004.1  GI:113494144
DBSOURCE    accession CY014173.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))
  ORGANISM  Influenza A virus (A/Indonesia/5/2005(H5N1))
            Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
            Influenzavirus A.
REFERENCE   1 (residues 1 to 252)
  AUTHORS   Balish,A., Bright,R., Deyde,V., Garten,R., Jadhao,S.,
            Lindstrom,S.,
            Loftin,L., Matsuoka,Y., Shaw,M., Shu,B., Smith,C., Smith,E. and
            Xu,X.
  TITLE     Avian Influenza Associated with Outbreaks in Indonesia
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (residues 1 to 252)
  AUTHORS   Balish,A., Bright,R., Deyde,V., Garten,R., Jadhao,S.,
            Lindstrom,S.,
            Loftin,L., Matsuoka,Y., Shaw,M., Shu,B., Smith,C., Smith,E. and
            Xu,X.
  COMMENT   Method: conceptual translation.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..252
                       /organism="Influenza A virus
                       (A/Indonesia/5/2005(H5N1))"
                       /strain="A/Indonesia/5/2005"
                       /serotype="H5N1"
                       /isolation_source="gender:M; age:38"
                       /host="Human"
                       /db_xref="taxon:400788"
                       /segment="7"
                       /country="Indonesia"
                       /collection_date="08-Jul-2005"
     Protein            1..252
                       /product="matrix protein 1"
     Region             2..157
                       /region_name="Flu_M1"
                       /note="Influenza Matrix protein (M1); pfam00598"
                       /db_xref="CDD:109646"
     Region             158..252
                       /region_name="Flu_M1_C"
                       /note="Influenza Matrix protein (M1) C-terminal domain;
                       smart00759"
                       /db_xref="CDD:128998"
     CDS                1..252
                       /gene="M1"
                       /coded_by="CY014173.1:26..784"
ORIGIN
1  msl1teveyt vlsiipsgpl kaeiaqkled vfagkntdle almewlktrp ilspltkgil
61  gfvftltvps erglqrrrfv qnalngngdp nmmdravkly kklkreitfh gakevslsys
121 tgalascmg1 iynrmgtvtt evafglvcat ceqiadsqhr shrqmatitn plirhenrmv
181 lasttakame qmagsseqaa eamevanqar qmvqamrtig thpnssaglr dnllenlqay
241 qkrmgvqmqr fk

```

Lampiran 2. Sekuen Format FASTA

a. Hemagglutinin

>A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)/1-566

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKLCCKL
RGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSV
SSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGGK
EVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTL
VEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAINSTLFPQNIHPI
TIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGS
YAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYN
AELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGT
YDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRI
I

>A/Philippines/344/2004(H1N2)/1-566

MKATLVLLYTFATTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENKHNGKLCCKL
RGVAPLHLGKCNIAGWLLGNPECELLTARSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSS
VSSFERFEIFPKASSWPNHETNRGVTAAACPYAGANSFYRNLIWLTKKGNSYPKLSKSYVNNKG
KEVLVLWGIHHPPTSTDQQSLYQNADAYVFGTSKYNKKFNPEIATRPKVRDQAGRMNYYW
TLIEPGDTITFEATGNLVVPRYAFAMKRGSGSGIIISDAPVHDCNTTCQTPRGAINSTLFPQNVH
PVTIGECPKYVKSTKLRLMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
GYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTY
NAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDDTCMESVKNG
TYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRI
CI

>A/Thailand/271/2005(H1N1)/1-568

MKAILLVLLCTLAAA-NADTLCIGYHANNSTDTVDTILEKNVTVTHSVNLLLEDRHNGKLCNLR
GEAPLHLGKCNIAGWLLGNPECELLFAVNSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFITSYEELREQLSSV
SSFERFEIFPKASSWPNHETNRGVTAAACPYAGTNSFYRNLIWLVKKGNSYPKLSKSYVNNKKK
EVLVLWGIHHPPTNADQQSLYQNADAYVFGSSKYNKKFKPEIAKRPKVRGQAGRMNYYW
TLVEPGDTITFEATGNLVAPRYAFAMNRDPGSGIITSDAPIHDCNATCQTPKGAINSTLFPQNIH
PITIGECPKYVKSTRRLMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNGQGS
GYAADQKSTQNAIDRITNKVNSVIEKMNIQFTAVGKEFNHLERRIENLNKKVDDGFLDVWTY
NAELLVLENERTLDFHDSNVKTLYEKVKTLQRNNAKEIGNGCFEFYHKCDDTCMESIKNGT
YDYPKYSKESKLNREEIDGVQLESTRLYQILAIYSTAASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRI
CIKN

>A/SouthCarolina/1/18(H1N1)/1-566

MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDHNGKLCCKL
GIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDLLTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVS
SFEKFEIFPKTSSWPNHETTKGVTAACSYAGASSFYRNLLWLTKKGSSYPKLSKSYVNNKGKE
VLVLWGVHHPPTGTDQQSLYQNADAYVSVGSSKYNRRFTPEIAARPKVRDQAGRMNYYWT
LLEPGDTITFEATGNLIAPWYAFALNRGSGSGIITSAPVHDCNTKCQTPHGAINSSLFPQNIHP
VTIGECPKYVRSTKLRLMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
YAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNLERRIENLNKKVDDGFLDIWTYN
AELLVLENERTLDFHDSNVRNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDDACMESVRNGT
YDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRI
CI

>A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1)/1-552

DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLL
GNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGDFNDYEELKHLRSRINHFEKIQIIPKSSWSDHE
ASSGVSSACPYLGSPPFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNNEEQT

RLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPPEYA
YKIVKKGDSAIMKSELEYSNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSSRLVLATGL
RNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGV
TNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDF
HDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKRE
EISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMIAGLSLWMCSNGSLQCRICI

>A/Indonesia/5/2005(H5N1)/1-568

MEKIVL-LLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDDL
GVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRI
NHFEKIQIIPKSSWSDEASSGVSSACPYLGSPPFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLL
VLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPN
DAINFESNGNFIAPPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIG
ECPKYVKSRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQ
SGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVW
TYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRN
GTYNYPQYSEEARLKREIEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQ
CRICI

>A/HongKong/156/97(H5N1)/1-568

MERTVL-LLATVSLV-KSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILERTHNGKLCDLN
GVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKASPANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRI
NHFEKIQIIPKSSWSNHDASSGVSSACPYLGRSSFFRNVVWLIKKNAYPTIKRSYNNTNQEDLL
VLWGVHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPEIATRPKVNGQSGRMEFFWTILKPN
DAINFESNGNFIAPPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTI
GECPKYVKSRLVLATGLRNTPQRERRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQ
GSCYSADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVW
TYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESV
NGTYDYPQYSEEARLNREEISGVKLESIMGTQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSL
QCRICI

>A/HongKong/1774/99(H3N2)/1-565

MKTIIALSIFCMVLGQDLPGKGNNTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQVEVTNATELVQNL
MGKICSNPHRILDGANCTLIDALLGDPHCDGFQNEKWDLFIERSKAFSNCPYDVPÉHASLRS
LIASSGTLEFVNESFNWTGVTQNGGSNACKRGPDSFFSRLNWLKSGNTYPMNLVTPNSD
GFDKLYIWGVHHPSTDREQINLYVQASGKITVSTKRSQQTIIPNVGSRPWVRLSSRSIYWTIV
KPGDILIISSNGNLIAPRGYFKVHTGKSSIMRSDAPIETCSSECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGA
CPKYVKQNTLKLATGMRNIPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRRHQNSEGTGQAA
DLKSTQAAINQINGKLNRIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLV
ALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRKQLRENAEDMGNGCLKIYHKCDNSCIDSIRNGTYDHNEY
RDEALNRRFQIKSVELKTGYKDWILWISFAISCFLLCVVWLGFI-MWACQKGNIRCNIC

b. Non Struktural 1

>A/Indonesia/5/2005(H5N1)/1-225

MDSNTVLSFQVDCFLWHVRRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIETATRAG
KQIVERILEEESDEALKMPASRYLTDMTLEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCIKMDQAIMDKTI
ILKANFSVIFGRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTGEDVKNAIGVLIGGLEWNTVVR
VSETIQRFARWGSEDEDGRLPFPNQRKRMARTIESEV

>A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1))/1-225

MDSNTVLSFQVDCFLWHVRRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTLGLDIETATRAG
KQIVERILEEESDEALKMPASRYLTDMSLEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCIKMDQAIMDKTII
LKANFSVIFGRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTGEDVKNAIGVLIGGLEWNTVVR
SETIQRFARWGSEDEDGRLPFPNQRKRMARTIESEV

>A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)/1-230
MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGK
QIVERILKEESDEALKMTIASVPASRYLTDMTLEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCIRMDQAIM
DKNIILKANFSVIFDRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTDEDVKNAVGVLIGGLEWND
NTVRVSETLQRFARSSNENGRPPLPPKQKRKMARTIKSEV

>A/HongKong/156/97(H5N1)/1-230
MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIRTATREGK
HIVERILEEESDEALKMTIASVPAPRYLTEMLEEMSRDWMMLIPKQKVTVGSLCIRMDQAIMD
KDIIILKANFSVIFNRLEALILLRAFTDEGAIVGEISPLPSLPGHTEEDVKNAIGVLIGGLEWNDNT
VRVSETLQRFRTWRSSDENGRSPLPPKQKRKMERTIEPEV

>A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)/1-219
MDSNTMSSFQVDCFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTLGLDIETATLVGK
QIVEWILKEESSETLRMTIASVPTSRYLSDMTLEEMSRDWFMLMPRQKIIGPLCVRLDQAIMK
NIVLKANFSVIFNRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTYEDVKNAVGVLIGGLEWNGNT
VRVSENIQRFARWNCDENGRPSLPPEQK>A/Thailand/271/2005(H1N1)/1-219

MDPNTMSSFQVDCFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRSSTLSLNIETATLIGKQ
IVEWILKEESNEALKMTIASVPAPRYLADMTLEEMSRDWFMLMPMQKVKGSLCVRMDQAIM
EKNIIILKANFSVIFNRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTHENVKDAVGVVIGGLEWN
GNTVRVSENLRFAWRSCNENGRPPLPSEQK

>A/Philipine/344/2004(H1N2)/1-225
VSSFQVDCFLWHVRKRFADWGLGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLEIEPSTRAGKQIVKRI
LKEEYDEALKITIASVPTSRYLTDMTLEEMSRDWFMLMPKQKMAGSLCIRMDQAIMDKTITL
KANFSVIFDRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTDEDVKNAIGTLIKGLEWNDNTVRVS
EALQRFARWSINEDGGPPFPKQKRKMARTIGPEV

>A/HongKong/1774/99(H3N2)/1-230
MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADWGLGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLEIEPATRAGK
QIVKHILEEYDEALKITIASVPASRYLTDMTLEEISRDWFMLMPKQKVAGSLCIRMDQAVME
KSITLKANFSVIFDRLETLILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTDEDVKNAIGILIKGFENDNT
VRVSEALQRFARWSINENGRPPFPKQKRKVARTTGPEV

c. Matrik 1

>A/Indonesia/5/2005/1-252
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
LTVPSERGLQRRRFVQNALNGNDPNMMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVSLSYSTGALASC
MGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLASTTAKAM
EQMAGSSEQAEEAMEVANQARQMVQAMRTIGTHPNSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQM
QRFK

>A/Indonesia/CDC1032/2007/1-252
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDVFAGKNADLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
LTVPSERGLQRRRFVQNALNGNDPNMMDKAVKLYKCLKREITFHGAKEVALSYSTGALAS
CMGLIYNRMGAVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLASTTAKA
MEQMAGSSEQAEEAMEVANQARQMVQAMRTIGTHPNSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQ
MHRFK

>HKG156/1997/1-252
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
LTVPSERGLQRRRFVQNALNGNDPNMMDRAVKLYKCLKREMTFHGAKEVALSYSTGALAS
CMGLIYNRMGTVTTEVALGLVCATCEQIADAQHRSHRQMATTTNPLIRHENRMVLASTTAK
AMEQMAGSSEQAEEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQ
MQRFK

>1918/1-252

MSLLTEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
TLTVPSEGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYRKLKREITFHGAKEVALSYSAGALA
SCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTNTNPLIRHENRMVLA STTAK
AMEQMAGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSSAGLKDDLIENLQAYQKRMGVQ
MQRFK

>A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)/1-252

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLESVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
LTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVSLSYSTGALASC
MGLIYNRMGTVTTEAAFGFLVCATCEQIADSQHRSHRQMATTNPLIRHENRMVLA STTAKA
MEQMAGSSEQAAEAMEVANQTRQMVHAMRTIGTHPSSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQ
MQRFK

>A/Thailand/271/2005(H1N1)/1-252

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEGVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
LTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVSLSYSTGALASC
MGLIYNRMGTVTTEAAFGFLVCATCEQIADSQHRSHRQMATTNPLIRHENRMVLA STTAKA
MEQMAGSSEQAAEAMEVASQTRQMVHAMRTIGTHPSSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQ
QRFK

>A/Philippines/344/2004(H1N2)/1-252

MSLLTEVENVCSLYHPVGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFV
FTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVSLSYSTGALA
SCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMATTNPLIRHENRMVLA STTAK
AMEQMAGSSEQAADAMEVASKARQMVHAMRTIGTHPSSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGV
QIQRFK

>A/HongKong/1774/99(H3N2)/1-252

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEGVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFT
LTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVSLSYSTGALASC
MGLIYNRMGTVTTEAAFGFLVCATCEQIADSQHRSHRQMATTNPLIRHENRMVLA STTAKA
MEQMAGSSEQAAEAMEVANQTRQMVHAMRTIGTHPSSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQ
MQRFK

Lampiran 3. Multiple sequence Alignment

a. Hemagglutinin

Alignment: C:\Users\TOSHIBA\Documents\data fix\HA\kontrol vs all.aln

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  DTLCIGYHAN NSTDTVDTVL EKNVTVTHSV NLLLEDKHNGK LCKLRGVAPL
A/Philippines/344/2004(H1N2)  DTLCIGYHAN NSTDTVDTVL EKNVTVTHSV NLLLENKHNGK LCKLRGVAPL
A/Thailand/271/2005(H1N1)    DTLCIGYHAN NSTDTVDTIL EKNVTVTHSV NLLLEDRHNGK LCNLRGEAPL
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   DTICIGYHAN NSTDTVDTVL EKNVTVTHSV NLLLEDSHNGK LCKLKGIAPL
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) DQICIGYHAN NSTEQVDTIM EKNVTVTTHAQ DILEKTHNGK LCDLDGVKPL
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     DQICIGYHAN NSTEQVDTIM EKNVTVTTHAQ DILEKTHNGK LCDLDGVKPL
A/HongKong/156/97(H5N1)      DQICIGYHAN NSTEQVDTIM EKNVTVTTHAQ DILERHNGK  LCDLNGVKPL
A/HongKong/1774/99(H3N2)     ATLCGLGHAV PNGTLVKTTT DDQVEVTNAT ELVQNLSMGK ICS-NPHRIL
Clustal Consensus              : **:* . **:* :

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90         100
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  HLGKCNIAGW ILGNPECESL STASSWSYIV ETSSSDNGTC YPGDFIDYEE
A/Philippines/344/2004(H1N2)  HLGKCNIAGW LLGNPECELL LTARSWSYIV ETSNSDNGTC YPGDFINYEE
A/Thailand/271/2005(H1N1)    HLGKCNIAGW LLGNPECELL FAVNSWSYIV ETSNSDNGTC YPGDFTSYEE
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   QLGGKCNIAGW LLGNPECDLL LTASSWSYIV ETSNSENCTC YPGDFIDYEE
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) ILRDCSVAGW LLGNPMCDEF INVPEWSYIV EKANPTNDLC YPGSFNDYEE
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     ILRDCSVAGW LLGNPMCDEF INVPEWSYIV EKANPTNDLC YPGSFNDYEE
A/HongKong/156/97(H5N1)      ILRDCSVAGW LLGNPMCDEF INVPEWSYIV EKASPANDLC YPGNFNDYEE
A/HongKong/1774/99(H3N2)     DGANCTLIDA LLGDPHCDFG QN-EKWDLFI ERSKAFSN-C YPYDVPEHAS
Clustal Consensus              * **:: : : **:* * .*: .:** * * :

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  LREQLSSVSS FERFEIFPKT SSWPNHDSNK GVTAACPHAG AKSFYKLIWF
A/Philippines/344/2004(H1N2)  LREQLSSVSS FERFEIFPKA SSWPNHETNR GVTAACPYAG ANSFYRNLIW
A/Thailand/271/2005(H1N1)    LREQLSSVSS FERFEIFPKA SSWPNHETNR GVTAACPYAG TNSFYRNLIW
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   LREQLSSVSS FEKFEIFPKT SSWPNHETTK GVTAACSYAG ASSFYRNLLW
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) LKHLLSRINH FEKIQIIPK- SWSWDEASS GVSSACPYLG SPSFFRNVDW
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     LKHLLSRINH FEKIQIIPK- SWSWDEASS GVSSACPYLG SPSFFRNVDW
A/HongKong/156/97(H5N1)      LKHLLSRINH FEKIQIIPK- SWSWDEASS GVSSACPYLG SPSFFRNVDW
A/HongKong/1774/99(H3N2)     LRSLIASSGT LE---FVNES FNVWTG-VTQN GGSNACKRGP DSSFFRNLW
Clustal Consensus              .* .:** : . . . ** . . . : * : : . * : : . *

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  LVKKGNSYPK LSKSYINDRG KEVLVLWGIH HPSTADQQS LYQNADAYVF
A/Philippines/344/2004(H1N2)  LTKKGNSYPK LSKSYVNNKG KEVLVLWGIH HPPTSTDQQS LYQNADAYVF
A/Thailand/271/2005(H1N1)    LVKKGNSYPK LSKSYVNNKG KEVLVLWGIH HPPTNADQQS LYQNADAYVF
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   LTKKGSSYPK LSKSYVNNKG KEVLVLWGVH HPPTGTDQQS LYQNADAYVS
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) LIKKNSTYPT IKKSYNNTNQ EDLLVLWGIH HPNNEEQTR LYQNPTTYIS
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     LIKKNSTYPT IKKSYNNTNQ EDLLVLWGIH HPNDAEQTR LYQNPTTYIS
A/HongKong/156/97(H5N1)      LIKKNSAYPT IKRSYNNTNQ EDLLVLWGVH HPNDAEQTR LYQNPTTYIS
A/HongKong/1774/99(H3N2)     LYKSGNTYPM LNVTMPNSDG FDKLYIWGVH HPSTDREQIN LYVQASGKIT
Clustal Consensus              . . : * : ** * * : : * * * . . : * : :

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  VGSSRYSKKF KPEIAIRPKV RDQEGRMNYY WTLVEPGDKI TFEATGNLVV
A/Philippines/344/2004(H1N2)  VGTSKYNKFF NPEIATRPKV RDQAGRMNYY WTLIEPGDTI TFEATGNLVV
A/Thailand/271/2005(H1N1)    VGSSKYNKFF KPEIAKRPKV RGQAGRMNYY WTLVEPGDTI TFEATGNLVA
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   VGSSKYNRRF TPEIARPKV RDQAGRMNYY WTLLEPGDTI TFEATGNLIA
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) IGTSTLNQRL VPKIATRISKV NGQSGRMEFF WTILKPNDAI NFESENGNFA
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     IGTSTLNQRL VPKIATRISKV NGQSGRMEFF WTILKPNDAI NFESENGNFA
A/HongKong/156/97(H5N1)      VGTSTLNQRL VPEIATRPKV NGQSGRMEFF WTILKPNDAI NFESENGNFA
A/HongKong/1774/99(H3N2)     VSTKRSQQT IIPNVGSRPVW RGLSSRSIY WTIVKPGDIL IISSNGNLIA

```



```

Clustal Consensus      * :*:***      :* **  ..  : : : .  . : : * : . * . * ..

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                260          270          280          290          300
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  PRYAFAMERN AGSGIIISDT PVHDCNTTCQ TPKGAINSTL PFQNIHPITI
A/Philippines/344/2004(H1N2)  PRYAFAMKRG SGSGIIISDA PVHDCNTTCQ TPRGAINSTL PFQNVHPVTI
A/Thailand/271/2005(H1N1)    PRYAFAMNRD PGSGIITSDA PIHDCNATCQ TPKGAINSTL PFQNIHPITI
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   PWYAFALNRG SGSGIITSDA PVHDCNTKCQ TPHGAINSSL PFQNIHPVTI
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) PEYAYKIVKK GDSAIMKSEL EYSNCNTKCQ TPMGAINSSM PFHNIHPLTI
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     PEYAYKIVKK GDSAIMKSEL EYGCNCTKCQ TPMGAINSSM PFHNIHPLTI
A/HongKong/156/97(H5N1)      PEYAYKIVKK GDSAIMKSEL EYGCNCTKCQ TPMGAINSSM PFHNIHPLTI
A/HongKong/1774/99(H3N2)     PRGYFKV-HT GKSSIMRSDA PIETCSSECI TPNGSIPNDK PFQNVNKITY
Clustal Consensus          .*: .*: :*: :*: * : : . : : * : * : * :

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                310          320          330          340          350
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  GKCPKYVKST KLRLATGLRN VPSIQSR--- -GLFGAIAGF IEGGWVGMVD
A/Philippines/344/2004(H1N2)  GECPKYVKST KLRMATGLRN IPSIQSR--- -GLFGAIAGF IEGGWVGMVD
A/Thailand/271/2005(H1N1)    GECPKYVKST RLRMATGLRN IPSIQSR--- -GLFGAIAGF IEGGWVGMVD
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   GECPKYVVRST KLRMATGLRN IPSIQSR--- -GLFGAIAGF IEGGWVGMVD
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) GECPKYVKSS RLVLATGLRN SPQRESRRKK RGLFGAIAGF IEGGWQGMVD
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     GECPKYVKSN RLVLATGLRN SPQRESRRKK RGLFGAIAGF IEGGWQGMVD
A/HongKong/156/97(H5N1)      GECPKYVKSN RLVLATGLRN TPQRERRRKK RGLFGAIAGF IEGGWQGMVD
A/HongKong/1774/99(H3N2)     GACPKYVKQN TLKLGATGMRN IPEKQTR--- -GIFGAIAGF IENGWEGMVD
Clustal Consensus          *: * ** *:* .. **: *:* :* * * :*:.. * :*:** *

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                360          370          380          390          400
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  GWYGYHHQNE QGSGYAADLK STQNAIDEIT NKVNSVIEKM NTQFTAVGKE
A/Philippines/344/2004(H1N2)  GWYGYHHQNE QGSGYAADQK STQNAIDGIT NKVNSVIEKM NTQFTAVGKE
A/Thailand/271/2005(H1N1)    GWYGYHHQNG QGSGYAADQK STQNAIDRIT NKVNSVIEKM NIQFTAVGKE
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   GWYGYHHQNE QGSGYAADQK STQNAIDGIT NKVNSVIEKM NTQFTAVGKE
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) GWYGYHHSNE QGSGYAADKE STQKAIDGVT NKVNSIIDKM NTQFEAVGRE
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     GWYGYHHSNE QGSGYAADKE STQKAIDGVT NKVNSIIDKM NTQFEAVGRE
A/HongKong/156/97(H5N1)      GWYGYHHSNE QGSCYSADKE STQKAIDGVT NKVNSIINKM NTQFEAVGRE
A/HongKong/1774/99(H3N2)     GWYGRFRHNS EGTQAADLK STQAAINQIN GKLNRVIEKT NEKFHQIEKE
Clustal Consensus          : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                410          420          430          440          450
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  FNHLEKRIEN LNKKVDDGFL DIWTYNAELL VLENERTLD YHDSNVKNLY
A/Philippines/344/2004(H1N2)  FNHLEKRIEN LNRKVDDGFL DIWTYNAELL VLENERTLD YHDSNVKNLY
A/Thailand/271/2005(H1N1)    FNHLEERRIEN LNKKVDDGFL DVWTYNAELL VLENERTLD FHDSNVKTLY
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   FNNLEERRIEN LNKKVDDGFL DIWTYNAELL VLENERTLD FHDSNVRNLY
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) FNNLEERRIEN LNKKMEDGFL DVWTYNAELL VLMENERTLD FHDSNVKNLY
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     FNNLEERRIEN LNKKMEDGFL DVWTYNAELL VLMENERTLD FHDSNVKNLY
A/HongKong/156/97(H5N1)      FNNLEERRIEN LNKKMEDGFL DVWTYNAELL VLMENERTLD FHDSNVKNLY
A/HongKong/1774/99(H3N2)     FSEVEGRIQD LEKYVEDTKI DLWSYNAELL VALENQHTID LTDSEMKNLF
Clustal Consensus          **: :*: * :*: * : * : * : * : * : * : * : * : * :

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                460          470          480          490          500
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)  EKVRSQLKNN AKEIGNGCFE FYHKCDNTCM ESVKNGTYDY PKYSEAKLN
A/Philippines/344/2004(H1N2)  EKVRSQLKNN AKEIGNGCFE FYHKCDDTCM ESVKNGTYDY PRYSEESKLN
A/Thailand/271/2005(H1N1)    EKVKTQLRNN AKEIGNGCFE FYHKCDDTCM ESIKNGTYDY PKYSKESKLN
A/SouthCarolina/1/18(H1N1)   EKVRSQLKNN AKEIGNGCFE FYHKCDDACM ESVRNGTYDY PKYSEESKLN
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) DKVRLQLRDN AKELGNGCFE FYHKCDNECM ESIRNGTYNY PQYSEEARLK
A/Indonesia/5/2005(H5N1)     DKVRLQLRDN AKELGNGCFE FYHKCDNECM ESIRNGTYNY PQYSEEARLK
A/HongKong/156/97(H5N1)      DKVRLQLRDN AKELGNGCFE FYHKCDNECM ESVKNGTYDY PQYSEEARLN
A/HongKong/1774/99(H3N2)     EKTRKQLREN AEDMNGCLK IYHKCDNSCI DSIRNGTYDH NEYRDEALNN
Clustal Consensus          :***** : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510      520      530      540      550
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) REEIDGVKLE STRIYQILAI YSTVASSLVL VVSLGAISFW MCSNGSLQCR
A/Philippines/344/2004(H1N2) REEIDGVKLE STRIYQILAI YSTVASSLVL LVSLGAISFW MCSNGSLQCR
A/Thailand/271/2005(H1N1) REEIDGVQLE STRIYQILAI YSTAASSLVL LVSLGAISFW MCSNGSLQCR
A/SouthCarolina/1/18(H1N1) REEIDGVKLE SMGVYQILAI YSTVASSLVL LVSLGAISFW MCSNGSLQCR
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) REEISGVKLE SIGTYQILSI YSTVASSLAL AIMIAGLSLW MCSNGSLQCR
A/Indonesia/5/2005(H5N1) REEISGVKLE SIGTYQILSI YSTVASSLAL AIMMAGLSLW MCSNGSLQCR
A/HongKong/156/97(H5N1) REEISGVKLE SMGTQILSI YSTVASSLAL AIMVAGLSLW MCSNGSLQCR
A/HongKong/1774/99(H3N2) RFQIKSVELK TGYKDWILWI SFAISCFLLC VVWLGFI-MW ACQKGNIRCN
Clustal Consensus      ***: *:*: :****: .* .*: .* : *..*:*: ** * :

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ..
      560      570      580
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) ICI--.....
A/Philippines/344/2004(H1N2) ICI--.....
A/Thailand/271/2005(H1N1) ICIKN.....
A/SouthCarolina/1/18(H1N1) ICI--.....
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) MDSNTVSSFQ VDCFVHVRK RFADQELGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGSTL
A/Indonesia/5/2005(H5N1) ICI--.....
A/HongKong/156/97(H5N1) ICI--.....
A/HongKong/1774/99(H3N2) IC--.....
Clustal Consensus      :. * : :. : * * . : * : * : * *

```

b. Non Struktural 1

Alignment: C:\Users\TOSHIBA\Documents\data fix\NS1\A_Indonesia_5_2005-1_alignment.aln

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50
A/Indonesia/5/2005(H5N1) MDSNTVLSFQ VDCFVHVRK RFADQELGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGNTL
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) MDSNTVLSFQ VDCFVHVRK RFADQELGDA PFLDRLRRDQ KSLKGRGNTL
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1) MDSNTVSSFQ VDCFVHVRK RFADQELGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGSTL
A/HongKong/156/97(H5N1) MDSNTVSSFQ VDCFVHVRK RFADQELGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGSTL
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) MDSNTMSSFQ VDCFVHIRK RFADNGLGDA PFLDRLRRDQ KSLKGRGNTL
A/Thailand/271/2005(H1N1) MDPNTMSSFQ VDCFVHIRK RFADNGLGDA PFLDRLRRDQ KSLKGRSSTL
A/Philippine/344/2004(H1N2) ----VSSFQ VDCFVHVRK RFADWGLGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGSTL
A/HongKong/1774/99(H3N2) MDSNTVSSFQ VDCFVHVRK RFADWGLGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGSTL
Clustal Consensus      : *** *****:* ** ** ** ***** **:*..**

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80      90      100
A/Indonesia/5/2005(H5N1) GLDIETATRA GKQIVERILE EESDEALKM- ----PASRYL TDMTLEEMSR
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) GLDIETATRA GKQIVERILE EESDEALKK- ----PASRYL TDMSLEEMSR
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1) GLDIETATRA GKQIVERILK EESDEALKMT IASVPASRYL TDMTLEEMSR
A/HongKong/156/97(H5N1) GLDIRTATRE GKHIVERILE EESDEALKMT IASVPAPRYL TEMTLEEMSR
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) GLDIETATLV GKQIVIEWILK EESSETLRMT IASVPTSRYL SDMTLEEMSR
A/Thailand/271/2005(H1N1) SLNIETATLI GKQIVIEWILK EESNEALKMT IASVPAPRYL ADMTLEEMSR
A/Philippine/344/2004(H1N2) GLEIEPSTRA GKQIVKRILK EEYDEALKIT IASVPTSRYL TDMTLEEMSR
A/HongKong/1774/99(H3N2) GLEIEPATRA GKQIVKHILE EEYDEALKIT IASVPASRYL TDMTLEEISR
Clustal Consensus      .*:..*: *:*: * : * * .*: : *:* ** :*:*: **

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110      120      130      140      150
A/Indonesia/5/2005(H5N1) DWFMLMPKQK VAGSLCICKMD QAIMDKTIIL KANFSVIFDR LETLILLRAF
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) DWFMLMPKQK VAGSLCICKMD QAIMDKTIIL KANFSVIFDR LETLILLRAF
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1) DWFMLMPKQK VAGSLCIRMD QAIMDKNIIL KANFSVIFDR LETLILLRAF
A/HongKong/156/97(H5N1) DWLMLIPKQK VTGSLCIRMD QAIMDKDIIL KANFSVIFNR LEALILLRAF
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) DWFMLMPRQK IIGPLCVRLD QAIMEKNIVL KANFSVIFNR LETLILLRAF
A/Thailand/271/2005(H1N1) DWFMLMPQK VKGSLCVRMD QAIMEKNIIL KANFSVIFNR LENLTLILRAF

```

```

A/Philippine/344/2004(H1N2) DWFMLMPKQK MAGSLCIRMD QAIMDKTITL KANFSVIFDR LETLILLRAF
A/HongKong/1774/99(H3N2) DWFMLMPKQK VAGSLCIRMD QAVMEKSITL KANFSVIFDR LETLILLRAF
Clustal Consensus          **:***:* * * : *.*:***: * **:*:* * * *****:*. * ** * *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160      170      180      190      200
A/Indonesia/5/2005(H5N1) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT GEDVKNAIGV LIGGLEWNDN TVRVSETIQR
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT GEDVKNAIGV LIGGLEWNDN TVRVSETIQR
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT DEDVKNAVGV LIGGLEWNDN TVRVSETLQR
A/HongKong/156/97(H5N1) TDEGAIVGEI SPLPSLPGHT EEDVKNAIGV LIGGLEWNDN TVRVSETLQR
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT YEDVKNAVGV LIGGLEWNGN TVRVSENIQR
A/Thailand/271/2005(H1N1) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT HENVKDAVGV LIGGLEWNGN TVRVSENLQR
A/Philippine/344/2004(H1N2) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT DEDVKNAIGT LIKGLEWNDN TVRVSEALQR
A/HongKong/1774/99(H3N2) TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT DEDVKNAIGI LIKGFEWNDN TVRVSEALQR
Clustal Consensus          *:***** ** * ***** *:***:* * **:*:* * ***** :**

      ....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210      220      230
A/Indonesia/5/2005(H5N1) FAWRGSEDEG RLPFPNQKR KMARTIESEV
A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1) FAWRGSEDEG RLPFPNQKR KMARTIESEV
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1) FAWRSSNENG RPPLPPKQKR KMARTIKSEV
A/HongKong/156/97(H5N1) FTWRSSDENG RSPLPPKQKR KMERTIEPEV
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) FAWRNCDENG RPSLPPEQK- -----
A/Thailand/271/2005(H1N1) FAWRSCNENG RPPLPSEQK- -----
A/Philippine/344/2004(H1N2) FAWRSINEDG GPPFPKQKR KMARTIGPEV
A/HongKong/1774/99(H3N2) FAWRSINENG RPPFPKQKR KVARTTGPEV
Clustal Consensus          *:***. :** * ..*.:**

```

c. Matrik 1

```

Alignment: C:\Users\TOSHIBA\Documents\data fix\M1\kontrol vs all.aln

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40
50
A/Indonesia/5/2005 MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
A/Indonesia/CDC1032/2007 MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNADLE ALMEWLKTRP
HKG156/1997 MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQRLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
1918 MSLLTEVETY VLSIVPSGPL KAEIAQRLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQRLES VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
A/Thailand/271/2005(H1N1) MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQRLEG VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
A/Philippines/344/2004(H1N2) MSLLTEVENV CSLYHPVGPL KAEIAQRLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
A/HongKong/1774/99(H3N2) MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQRLEG VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
Clustal Consensus          *****. * ** *****:*. *****:*** *****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90
100
A/Indonesia/5/2005 ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
A/Indonesia/CDC1032/2007 ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDKAVKLY
HKG156/1997 ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
1918 ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1) ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
A/Thailand/271/2005(H1N1) ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
A/Philippines/344/2004(H1N2) ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
A/HongKong/1774/99(H3N2) ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNDP NMDRAVKLY
Clustal Consensus          ***** * ***** ***** ***** *****:*****

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```

```

110      120      130      140
150
A/Indonesia/5/2005      KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVCAT
A/Indonesia/CDC1032/2007 KKLKREITFH GAKEVALSYS TGALASCMGL IYNRMGAVTT EVAFGLVCAT
HKG156/1997      KKLKREITFH GAKEVALSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EVALGLVCAT
1918      RKLKREITFH GAKEVALSYS AGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVCAT
A/Mexico/IndRE4487/2009(H1N1) KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EAAFGLVCAT
A/Thailand/271/2005(H1N1) KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EAAFGLVCAT
A/Philippines/344/2004(H1N2) KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVCAT
A/HongKong/1774/99(H3N2) KKLKREITFH GAKEVSLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVTT EAAFGLVCAT
Clustal Consensus      :****:* ** * :***** *****:* *.:*****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
160      170      180      190
200
A/Indonesia/5/2005      CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
A/Indonesia/CDC1032/2007 CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
HKG156/1997      CEQIADAQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
1918      CEQIADSQHR SHRQMVTTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
A/Mexico/IndRE4487/2009(H1N1) CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
A/Thailand/271/2005(H1N1) CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
A/Philippines/344/2004(H1N2) CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
A/HongKong/1774/99(H3N2) CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA
Clustal Consensus      *****:* ** * ***** ***** **.******

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
210      220      230      240
250
A/Indonesia/5/2005      EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THPNSSAGLR DNLLLENLQAY QKRMGVQMQR
A/Indonesia/CDC1032/2007 EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THPNSSAGLR DNLLDNLQAY QKRMGVQMHR
HKG156/1997      EAMEVASQAR QMVQAMRTIG THPSSSAGLK DDLIENLQAY QKRMGVQMQR
1918      EAMEVASQAR QMVQAMRTIG THPSSSAGLK DDLIENLQAY QKRMGVQMQR
A/Mexico/IndRE4487/2009(H1N1) EAMEVANQTR QMVHAMRTIG THPSSSAGLK DDLENLQAY QKRMGVQMQR
A/Thailand/271/2005(H1N1) EAMEVASQTR QMVHAMRTIG THPSSSAGLK DDLENLQAY QKRMGVQIQR
A/Philippines/344/2004(H1N2) DAMEVASKAR QMVHAMRTIG THPSSSAGLK DDLENLQAY QKRMGVQIQR
A/HongKong/1774/99(H3N2) EAMEVANQTR QMVHAMRTIG THPSSSAGLK DDLENLQAY QKRMGVQMQR
Clustal Consensus      :*****.:* **.****** **.****** *.:***** *****:.*

```

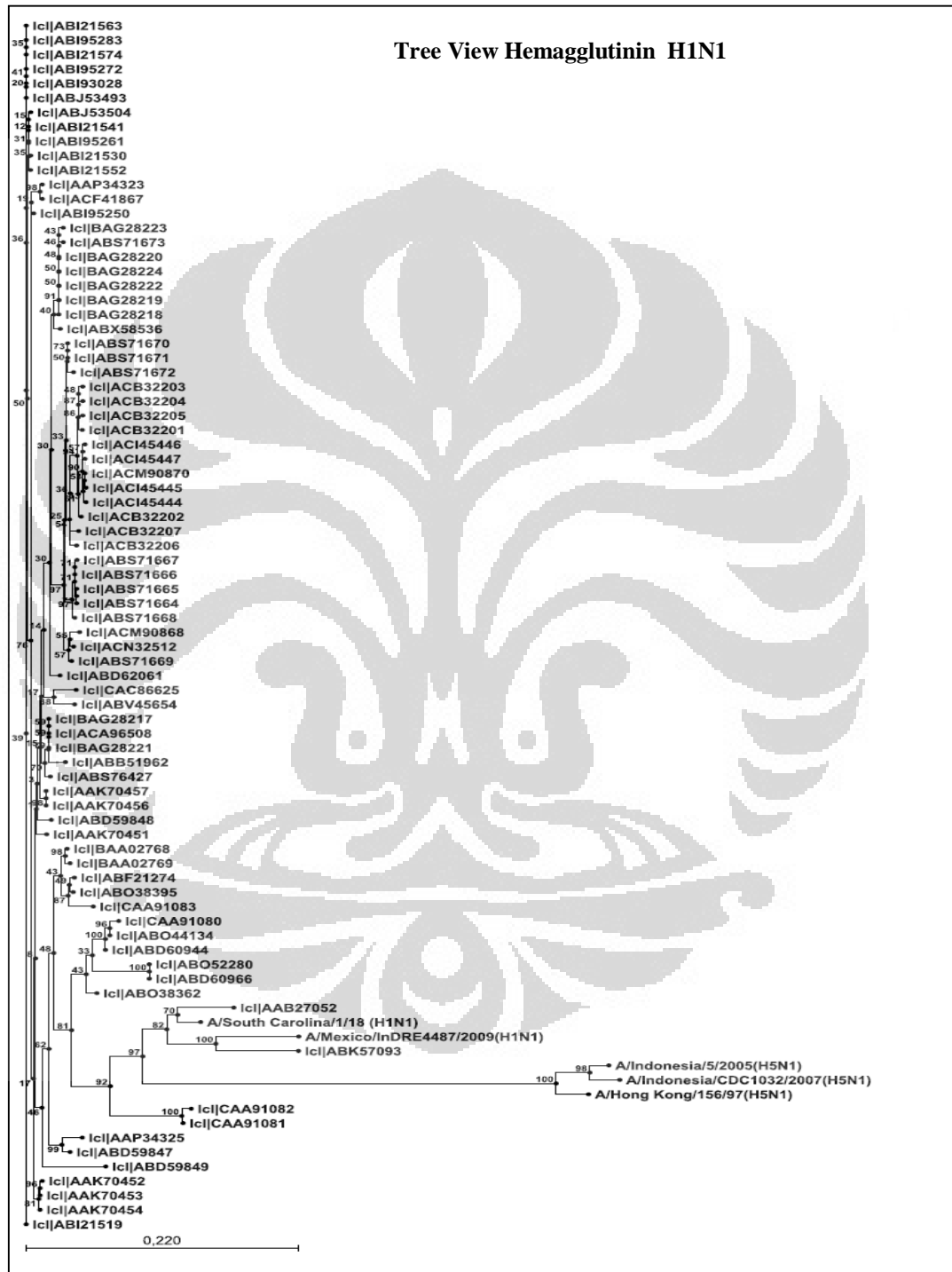
```

..
A/Indonesia/5/2005      FK
A/Indonesia/CDC1032/2007 FK
HKG156/1997      FK
1918      FK
A/Mexico/IndRE4487/2009(H1N1) FK
A/Thailand/271/2005(H1N1) FK
A/Philippines/344/2004(H1N2) FK
A/HongKong/1774/99(H3N2) FK
Clustal Consensus      **

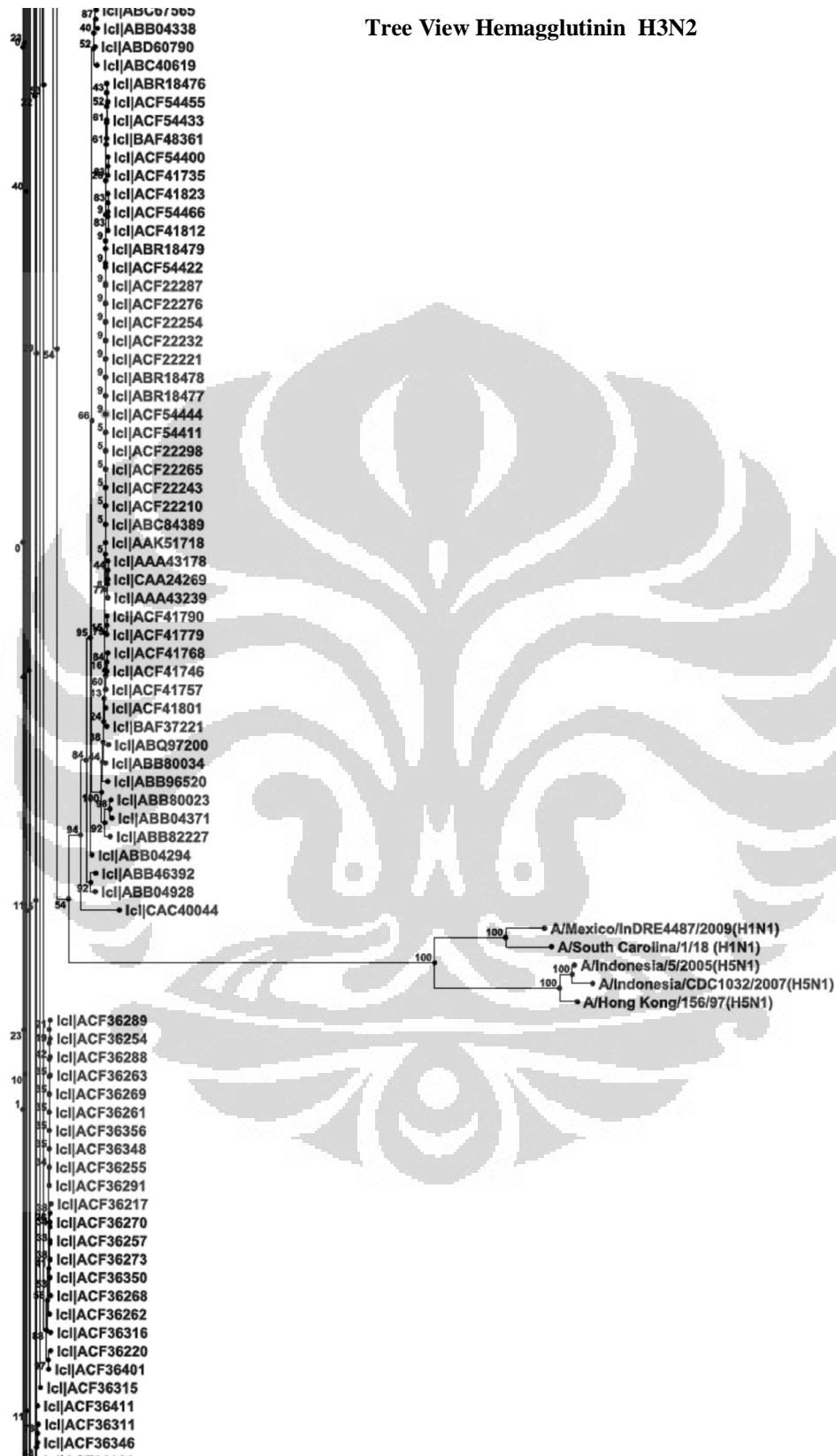
```

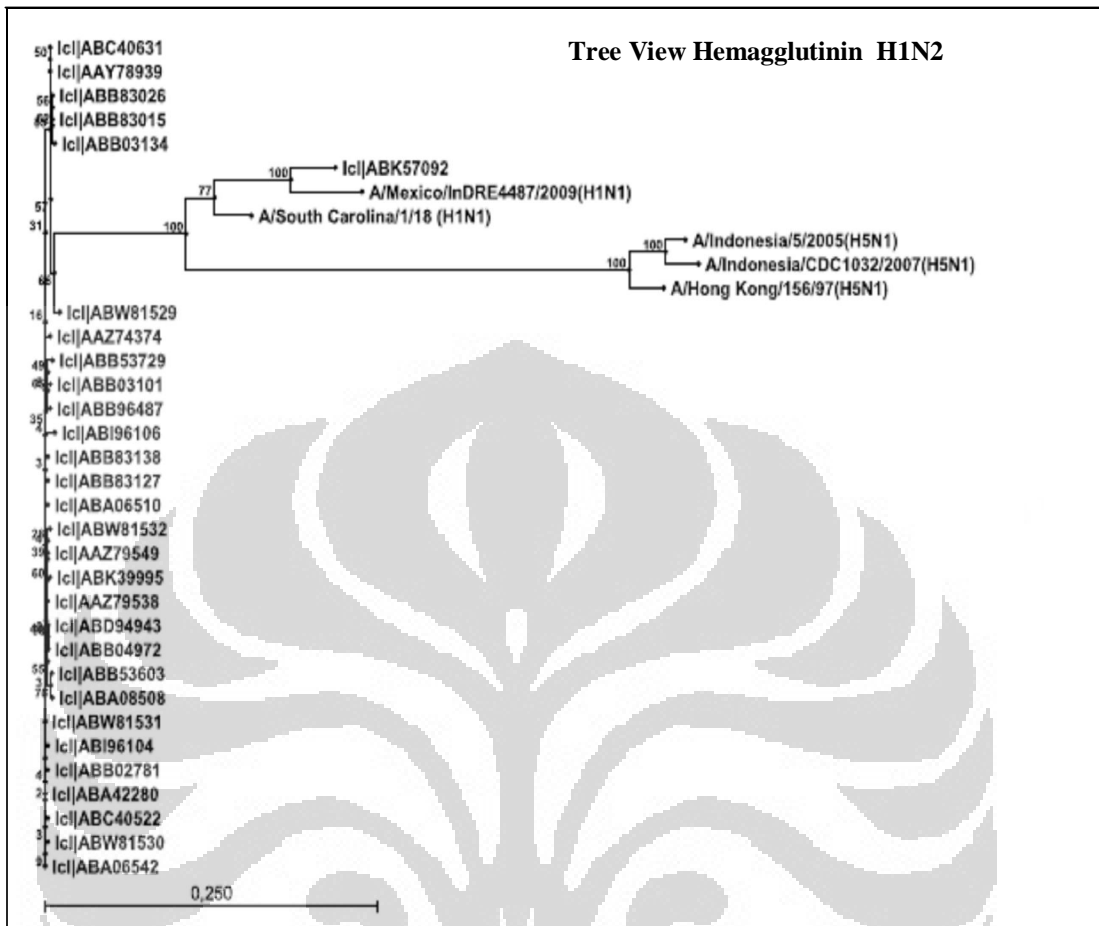
Lampiran 4. Pohon Filogenetik

a. Hemagglutinin

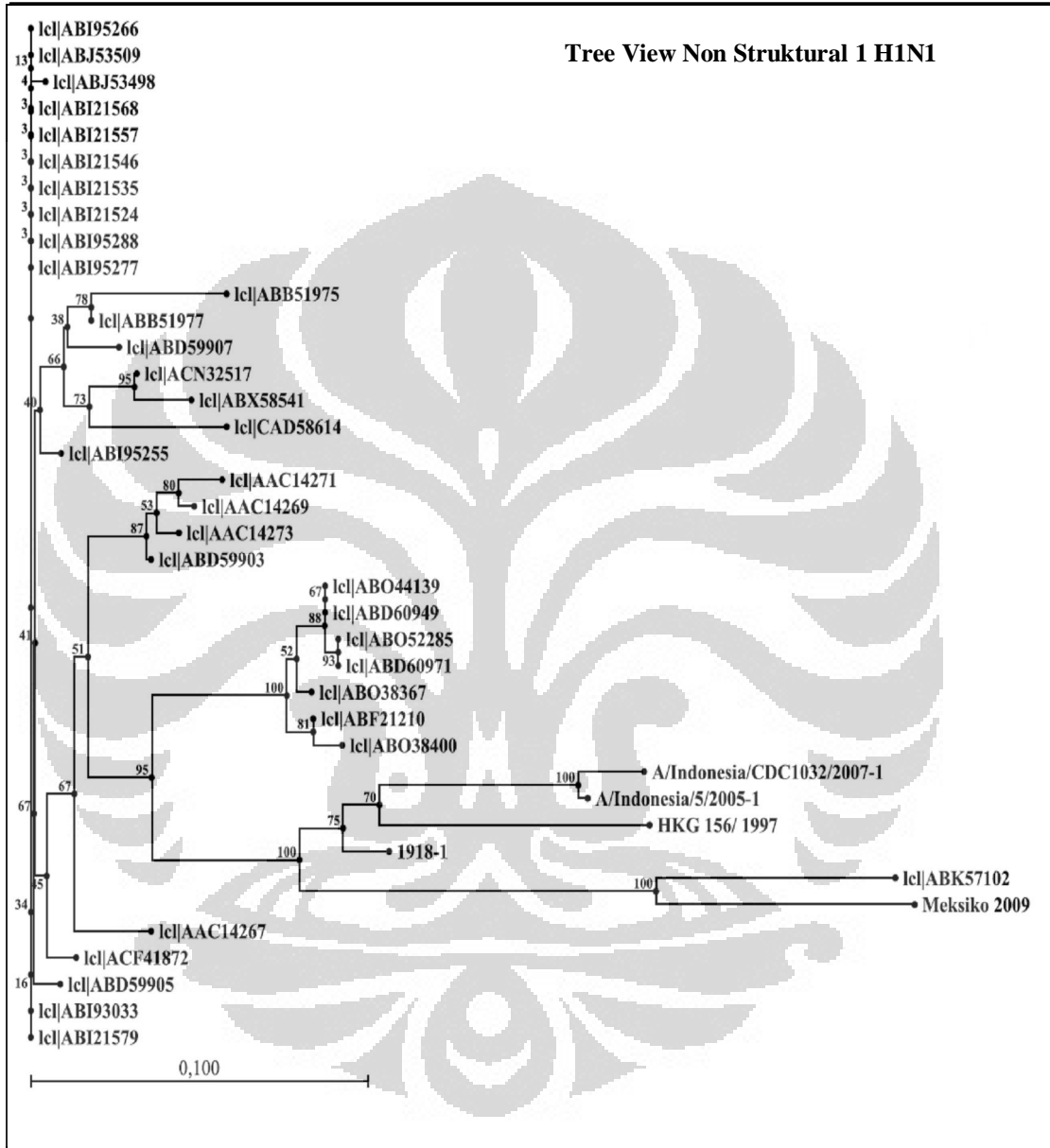


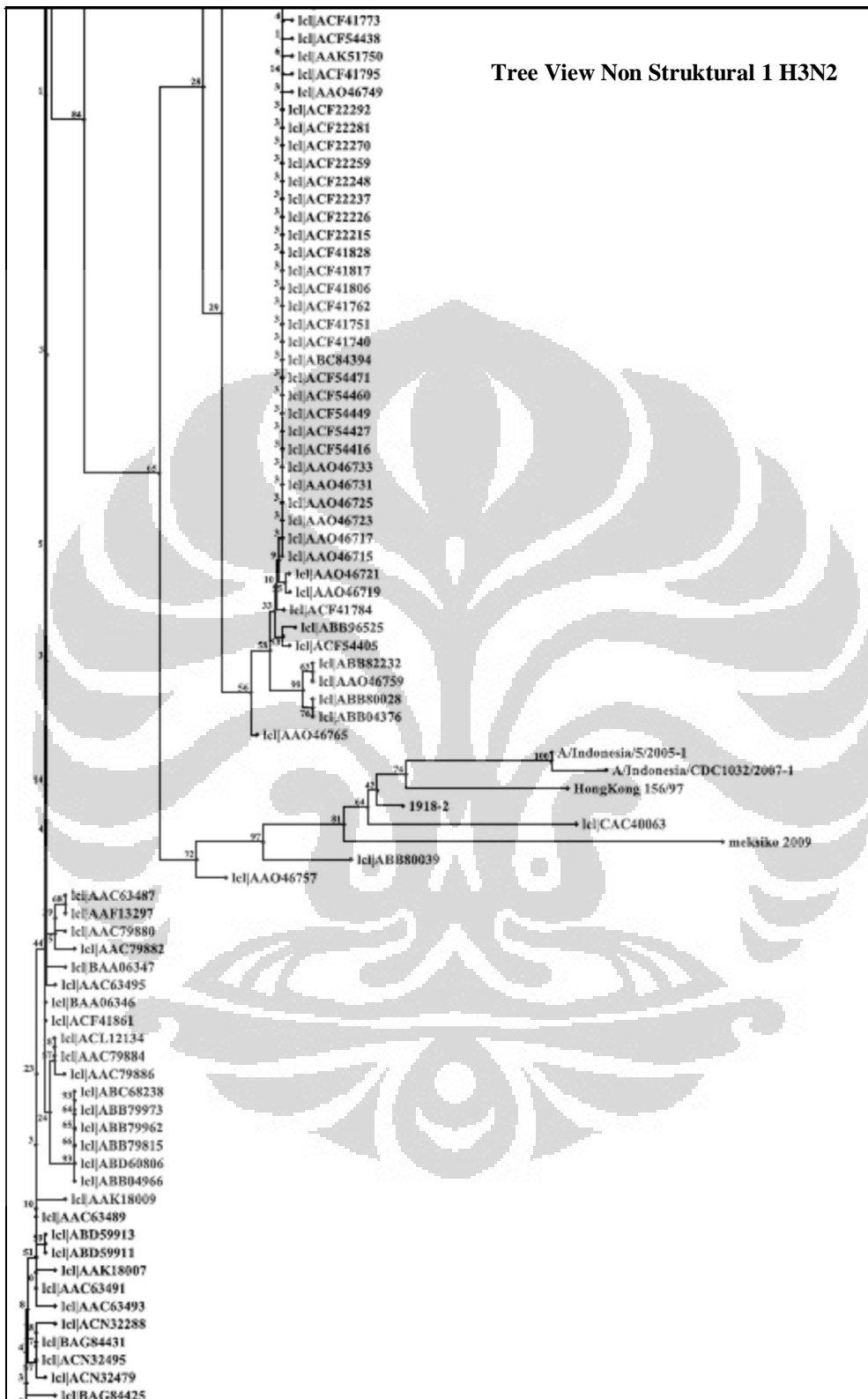
Tree View Hemagglutinin H3N2



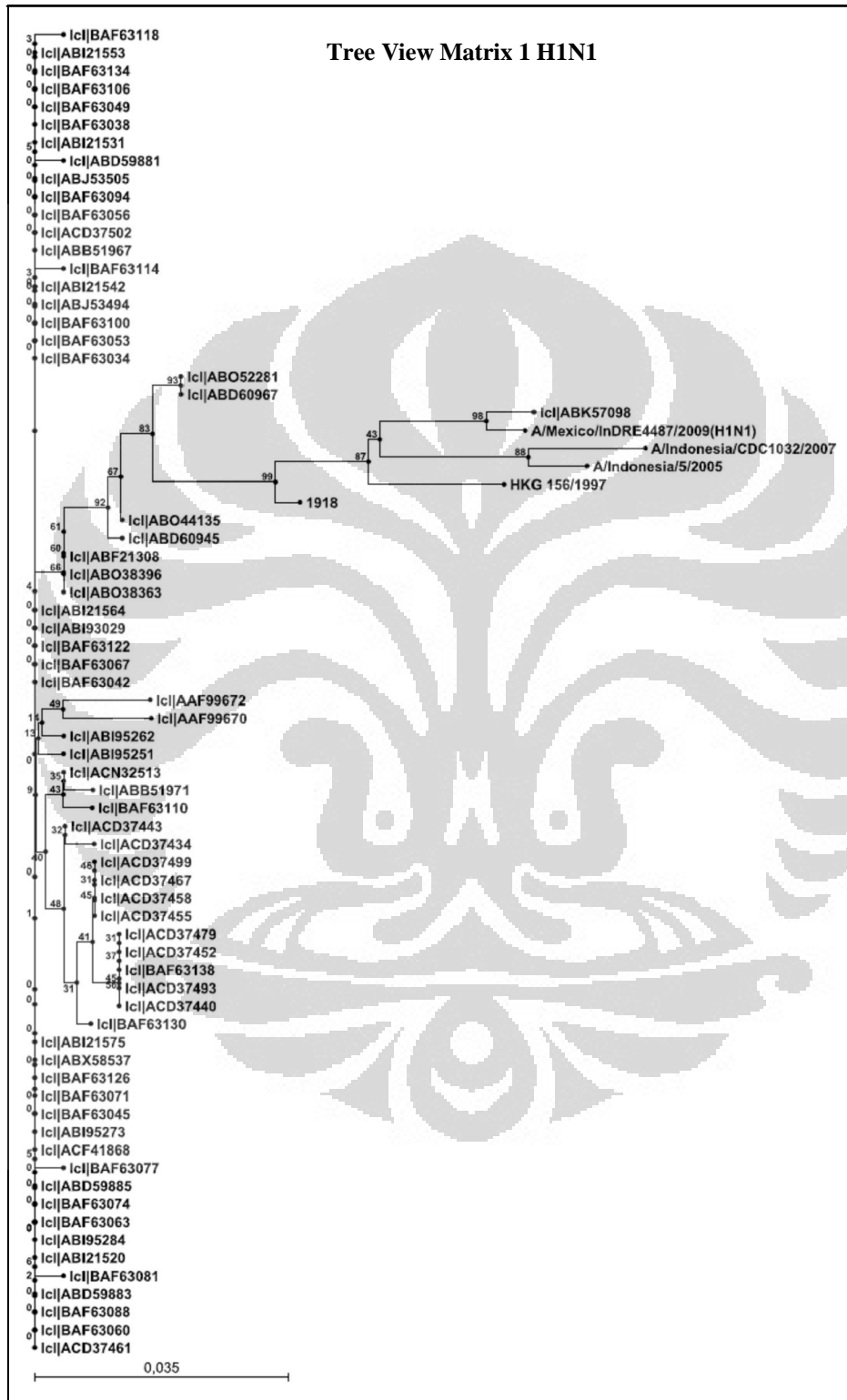


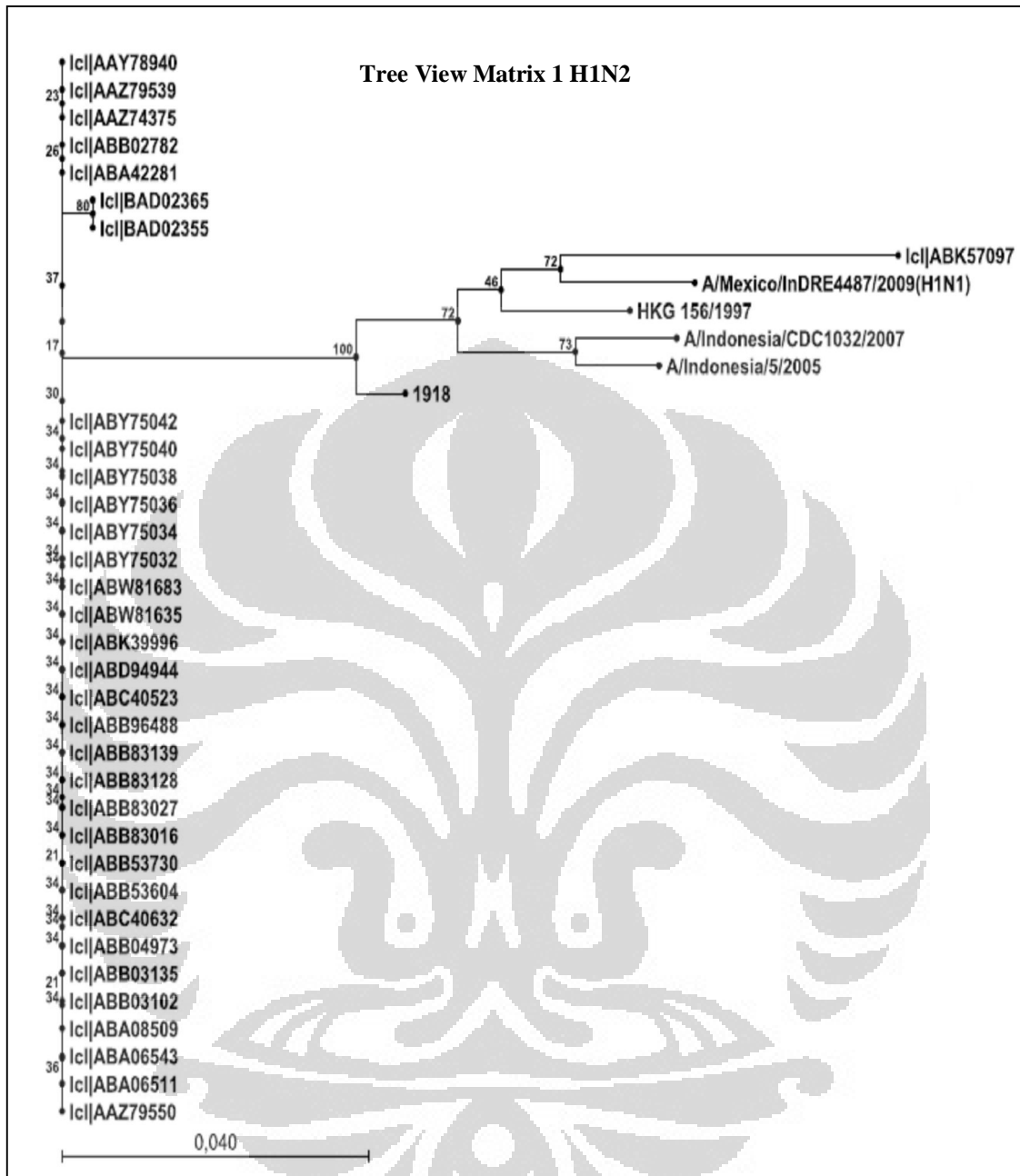
b. Non Struktural 1 (NS 1)





c. Matrik 1





Lampiran 5. Hasil pro-P

a. H5N1

ProP v.1.0b ProPeptide Cleavage Site Prediction

Furin-type cleavage site prediction (Arginine/Lysine residues)

```

569 lcl_ABI36012
XXXXXXXXXXXXXXXXXXDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLIL
RDCSVAGWLLGN      80
PMCDEFINVPESYIIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEDIQIIPKSSWSDHEASSGVS
SACPYLGSSSFF      160
RNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPK
IATRSKVNQSG      240
RMEFFWTILKPNDAINFESNGNFI APEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGAINSSMPFH
NIHPLTIGECPK      320
YVKS NRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQ
KAIDGVTNKVNS      400
IIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKV
RLQLRDNAKELG      480
NGCFEFYHKCDNECIESIRNGTYNYPQYSEEARLKRREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIM
MAGLSLWMCSSNG      560
SLQCRICIX
640

```

Signal peptide cleavage site predicted: none

Propeptide cleavage sites predicted: Arg(R)/Lys(K): 1

Name	Pos	Context	Score	Pred
lcl_ABI36012	38	VDTIMEK NV	0.068	.
lcl_ABI36012	51	AQDILEK TH	0.061	.
lcl_ABI36012	56	EKTHNGK LC	0.059	.
lcl_ABI36012	64	CDLDGVK PL	0.053	.
lcl_ABI36012	69	VKPLILR DC	0.094	.
lcl_ABI36012	98	WSYIVEK AN	0.065	.
lcl_ABI36012	118	NDYEELK HL	0.065	.
lcl_ABI36012	123	LKHLLSR IN	0.095	.
lcl_ABI36012	129	RINHF EK IQ	0.066	.
lcl_ABI36012	135	KIQIIPK SS	0.074	.
lcl_ABI36012	161	GSSSFFR NV	0.153	.
lcl_ABI36012	168	NVVWLIK KN	0.061	.
lcl_ABI36012	169	VVWLIK NS	0.066	.
lcl_ABI36012	177	STYPTIK KS	0.064	.
lcl_ABI36012	178	TYPTIKK SY	0.110	.
lcl_ABI36012	205	DAAEQTR LY	0.081	.
lcl_ABI36012	224	TSTLNQR LV	0.103	.
lcl_ABI36012	228	NQRLVPK IA	0.078	.
lcl_ABI36012	232	VPKIATR SK	0.138	.
lcl_ABI36012	234	KIATRSK VN	0.087	.
lcl_ABI36012	241	VNGQSGR ME	0.083	.

lcl_ABI36012	250	FFWTILK	PN	0.058	.
lcl_ABI36012	271	APEYAYK	IV	0.083	.
lcl_ABI36012	274	YAYKIVK	KG	0.063	.
lcl_ABI36012	275	AYKIVKK	GD	0.172	.
lcl_ABI36012	282	GDSAIMK	SE	0.093	.
lcl_ABI36012	293	YGNCNTK	CQ	0.064	.
lcl_ABI36012	320	TIGCEPK	YV	0.084	.
lcl_ABI36012	323	ECPKYVK	SN	0.076	.
lcl_ABI36012	326	KYVKSNR	LV	0.107	.
lcl_ABI36012	334	VLATGLR	NS	0.072	.
lcl_ABI36012	339	LRNSPQR	ES	0.118	.
lcl_ABI36012	342	SPQRESR	RK	0.348	.
lcl_ABI36012	343	PQRESRR	KK	0.158	.
lcl_ABI36012	344	QRESRRK	KR	0.087	.
lcl_ABI36012	345	RESRRKK	RG	0.298	.
lcl_ABI36012	346	ESRRKKR	GL	0.793	*Prop*
lcl_ABI36012	384	SGYAADK	ES	0.065	.
lcl_ABI36012	389	DKESTQK	AI	0.073	.
lcl_ABI36012	397	IDGVTNK	VN	0.069	.
lcl_ABI36012	404	VNSIIDK	MN	0.081	.
lcl_ABI36012	414	QFEAVGR	EF	0.092	.
lcl_ABI36012	421	EFNNLER	RI	0.082	.
lcl_ABI36012	422	FNNLERR	IE	0.108	.
lcl_ABI36012	428	RIENLNK	KM	0.075	.
lcl_ABI36012	429	IENLNKK	ME	0.115	.
lcl_ABI36012	452	VLMENER	TL	0.075	.
lcl_ABI36012	462	FHDSNVK	NL	0.058	.
lcl_ABI36012	467	VKNLYDK	VR	0.060	.
lcl_ABI36012	469	NLYDKVR	LQ	0.078	.
lcl_ABI36012	473	KVRLQLR	DN	0.118	.
lcl_ABI36012	477	QLRDNK	EL	0.087	.
lcl_ABI36012	489	CFEFYHK	CD	0.061	.
lcl_ABI36012	499	ECIESIR	NG	0.077	.
lcl_ABI36012	513	QYSEEAR	LK	0.110	.
lcl_ABI36012	515	SEEARLK	RE	0.064	.
lcl_ABI36012	516	EEARLKR	EE	0.490	.
lcl_ABI36012	523	EEISGVK	LE	0.057	.
lcl_ABI36012	565	NGSLQCR	IC	0.110	.

b. H1N1

ProP v.1.0b ProPeptide Cleavage Site Prediction #####

Furin-type cleavage site prediction (Arginine/Lysine residues)

```

568 lcl_AAB27052
MKARLLVLLCAFAATNADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLGGIAPLQ
LGKCNIAGRLLG      80
NPECELLLTVSSWSYIVETS DSDNGTCYPGDFIDYEELREQLNSMSSF EKFEIFPKTSSWPNHETTKG
VTAACPYAGASS      160

```

```

FYRNLLWLVKKENSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTSTDQQSLYQNADAYVSVGSSKYYRRFT
REIAARPKVRGQ      240
AGRMNYYWTLLEPGDITIFEATGNLVAPRYAFALNRGSGSGIITSNAPVHDCDTKCQTPHGAINSSLP
FQNVHPVTIREC      320
PRYVKSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGLIDGWYGYHHQNGQGSGYAADQKSTQNA
IDGITNKVNSVI      400
EKMNTQFTAVGKEFNNLERRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVRS
QLRNNAKEIGNG      480
CFEFYHKCDDRCMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESMMVYQILAIYSTVASSLVLLVSLG
AISFWMCSNGSL      560
QCRICIXX
640

```

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 17 and 18:
TNA-DT

Propeptide cleavage sites predicted: Arg(R)/Lys(K): 0

Name	Pos	Context	Score	Pred
lcl_AAB27052	2	-----MK	AR 0.059	.
lcl_AAB27052	4	---MKAR	LL 0.080	.
lcl_AAB27052	39	VDTVLEK	NV 0.062	.
lcl_AAB27052	57	EDSHNGK	LC 0.069	.
lcl_AAB27052	60	HNGKLCR	LG 0.111	.
lcl_AAB27052	71	APLQLGK	CN 0.065	.
lcl_AAB27052	77	KCNIAGR	LL 0.113	.
lcl_AAB27052	119	IDYEELR	EQ 0.078	.
lcl_AAB27052	130	SMSSF EK	FE 0.067	.
lcl_AAB27052	136	KFEIFPK	TS 0.063	.
lcl_AAB27052	147	PNHETTK	GV 0.101	.
lcl_AAB27052	163	GASSFYR	NL 0.102	.
lcl_AAB27052	170	NLLWLVK	KE 0.053	.
lcl_AAB27052	171	LLWLVKK	EN 0.089	.
lcl_AAB27052	177	KENSYPK	LS 0.064	.
lcl_AAB27052	180	SYPKLSK	SY 0.070	.
lcl_AAB27052	186	KSYVNNK	GK 0.073	.
lcl_AAB27052	188	YVNNKGK	EV 0.076	.
lcl_AAB27052	222	VSVGSSK	YY 0.068	.
lcl_AAB27052	225	GSSKYR	RF 0.114	.
lcl_AAB27052	226	SSKYR	FT 0.208	.
lcl_AAB27052	229	YYRRFTR	EI 0.249	.
lcl_AAB27052	234	TREIAAR	PK 0.128	.
lcl_AAB27052	236	EIAARPK	VR 0.078	.
lcl_AAB27052	238	AARPKVR	GQ 0.108	.
lcl_AAB27052	243	VRGQAGR	MN 0.101	.
lcl_AAB27052	269	GNLVAPR	YA 0.136	.
lcl_AAB27052	276	YAFALNR	GS 0.128	.
lcl_AAB27052	295	VHDCDTK	CQ 0.061	.
lcl_AAB27052	318	VHPVTIR	EC 0.076	.
lcl_AAB27052	322	TIRECPR	YV 0.122	.
lcl_AAB27052	325	ECPRYVK	ST 0.125	.
lcl_AAB27052	328	RYVKSTK	LR 0.058	.

lcl_AAB27052	330	VKSTKLR	MV	0.214	.
lcl_AAB27052	336	RMVTGLR	NI	0.073	.
lcl_AAB27052	344	IPSIQSR	GL	0.207	.
lcl_AAB27052	383	GYAADQK	ST	0.094	.
lcl_AAB27052	395	IDGITNK	VN	0.075	.
lcl_AAB27052	402	VNSVIEK	MN	0.077	.
lcl_AAB27052	412	QFTAVGK	EF	0.064	.
lcl_AAB27052	419	EFNNLER	RI	0.087	.
lcl_AAB27052	420	FNNLERR	IE	0.092	.
lcl_AAB27052	426	RIENLNK	KV	0.101	.
lcl_AAB27052	427	IENLNKK	VD	0.101	.
lcl_AAB27052	450	VLLENER	TL	0.068	.
lcl_AAB27052	460	FHDSNVK	NL	0.058	.
lcl_AAB27052	465	VKNLYEK	VR	0.065	.
lcl_AAB27052	467	NLYEKVR	SQ	0.111	.
lcl_AAB27052	471	KVRSQLR	NN	0.084	.
lcl_AAB27052	475	QLRNNAK	EI	0.096	.
lcl_AAB27052	487	CFEFYHK	CD	0.063	.
lcl_AAB27052	491	YHKDDR	CM	0.099	.
lcl_AAB27052	497	RCMESVR	NG	0.075	.
lcl_AAB27052	505	GTYDYPK	YS	0.070	.
lcl_AAB27052	511	KYSEESK	LN	0.073	.
lcl_AAB27052	514	EESKLNK	EE	0.107	.
lcl_AAB27052	521	EEIDGVK	LE	0.057	.
lcl_AAB27052	563	NGSLQCR	IC	0.110	.

c. H1N2

ProP v.1.0b ProPeptide Cleavage Site Prediction

Furin-type cleavage site prediction (Arginine/Lysine residues)

566 lcl_AAY78939
MKVKLLILLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCLLKGIAPLQ
LGNC SVAGWILG 80
NPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCPYGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHXTVTG
VSASC SHNGKSS 160
FYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLILWGVHHPNIGDQRTLYHTENAYVSVVSSHYSRRFT
PEITKRPKVRDQ 240
EGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDACQTPQGAINSSLP
FQNVHPVTIGEC 320
PKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNA
INGITNKVNSVI 400
EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWYTNAELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKS
QLKNNAKEIGNG 480
CFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLG
AISFWMC SNGSL 560
QCRICI
640

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 17 and 18:
TYA-DT

Propeptide cleavage sites predicted: Arg(R)/Lys(K): 0

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
lcl_AAY78939	2	----MK VK	0.058	.
lcl_AAY78939	4	---MKVK LL	0.058	.
lcl_AAY78939	39	VDTVLEK NV	0.062	.
lcl_AAY78939	57	EDSHNGK LC	0.061	.
lcl_AAY78939	62	GKLCLLK GI	0.068	.
lcl_AAY78939	90	CELLISK ES	0.054	.
lcl_AAY78939	119	ADYEELR EQ	0.075	.
lcl_AAY78939	130	SVSSFER FE	0.092	.
lcl_AAY78939	136	RFEIFPK ES	0.065	.
lcl_AAY78939	158	SCSHNGK SS	0.085	.
lcl_AAY78939	163	GKSSFYR NL	0.111	.
lcl_AAY78939	171	LLWLTGK NG	0.054	.
lcl_AAY78939	180	LYPNLSK SY	0.064	.
lcl_AAY78939	186	KSYANNK EK	0.068	.
lcl_AAY78939	188	YANNKEK EV	0.079	.
lcl_AAY78939	206	PNIGDQR TL	0.097	.
lcl_AAY78939	225	VSSHYSR RF	0.104	.
lcl_AAY78939	226	SSHYSRR FT	0.270	.
lcl_AAY78939	233	FTPEITK RP	0.050	.
lcl_AAY78939	234	TPEITKR PK	0.175	.
lcl_AAY78939	236	EITKRPK VR	0.065	.
lcl_AAY78939	238	TKRPKVR DQ	0.209	.
lcl_AAY78939	243	VRDQEGR IN	0.089	.
lcl_AAY78939	276	YAFALSR GF	0.138	.
lcl_AAY78939	295	MDECDAK CQ	0.073	.
lcl_AAY78939	322	TIGCEPK YV	0.083	.
lcl_AAY78939	325	ECPKYVR SA	0.107	.
lcl_AAY78939	328	KYVRSK LR	0.104	.
lcl_AAY78939	330	VRSKLR MV	0.248	.
lcl_AAY78939	336	RMVTGLR NI	0.073	.
lcl_AAY78939	344	IPSIQSR GL	0.207	.
lcl_AAY78939	383	GYAADQK ST	0.092	.
lcl_AAY78939	395	INGITNK VN	0.078	.
lcl_AAY78939	402	VNSVIEK MN	0.077	.
lcl_AAY78939	412	QFTAVGK EF	0.067	.
lcl_AAY78939	416	VGKEFNK LE	0.059	.
lcl_AAY78939	419	EFNKLER RM	0.078	.
lcl_AAY78939	420	FNKLERR ME	0.088	.
lcl_AAY78939	426	RMENLNK KV	0.103	.
lcl_AAY78939	427	MENLNKK VD	0.107	.
lcl_AAY78939	450	VLLENER TL	0.068	.
lcl_AAY78939	460	FHDSNVK NL	0.058	.
lcl_AAY78939	465	VKNLYEK VK	0.066	.
lcl_AAY78939	467	NLYEKVK SQ	0.079	.
lcl_AAY78939	471	KVKSQK NN	0.059	.
lcl_AAY78939	475	QLKNNK EI	0.086	.

lcl_AAY78939	487	CFEFYHK	CN	0.062	.
lcl_AAY78939	497	ECMESVK	NG	0.058	.
lcl_AAY78939	505	GTYDYPK	YS	0.068	.
lcl_AAY78939	511	KYSEESK	LN	0.073	.
lcl_AAY78939	514	EESKLNK	EK	0.117	.
lcl_AAY78939	516	SKLNREK	ID	0.078	.
lcl_AAY78939	521	EKIDGVK	LE	0.063	.
lcl_AAY78939	563	NGSLQCR	IC	0.104	.

d. H3N2

ProP v.1.0b ProPeptide Cleavage Site Prediction

Furin-type cleavage site prediction (Arginine/Lysine residues)

566 lcl_AAK63819
 MKTLIALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRIC
 DSPHQILDGENC 80
 TLIDALLGDPHCDGFQNKKEWNLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNENFNWTGVAQ
 NGTSSACKRRSI 160
 KSFFSRLNWLHQLKYRYPALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPSTSDQTSLYAQASGRVTVSTKRSQQT
 VIPNIGSGPWVR 240
 GVSSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDK
 PFQNVNRITYGA 320
 CPHYVQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMMDGWYGRHQNSEGTGQAADLKSTQA
 AINQINGKLNRL 400
 IEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFFERTR
 KQLRENAEDMGN 480
 GCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLL
 GFIMWACQKGNL 560
 RCNICI
 640

Signal peptide cleavage site predicted: between pos. 16 and 17:
 VFA-QK

Propeptide cleavage sites predicted: Arg(R)/Lys(K): 0

Name	Pos	Context	Score	Pred	
lcl_AAK63819	2	----MK	TI	0.066	.
lcl_AAK63819	18	CLVFAQK	LP	0.062	.
lcl_AAK63819	43	PNGTLVK	TI	0.061	.
lcl_AAK63819	66	QSSSTGR	IC	0.095	.
lcl_AAK63819	98	CDGFQNK	EW	0.064	.
lcl_AAK63819	106	WNLFVER	SK	0.096	.
lcl_AAK63819	108	LFVERSK	AY	0.067	.
lcl_AAK63819	125	PDYASLR	SL	0.124	.
lcl_AAK63819	156	GTSSACK	RR	0.070	.

lcl_AAK63819	157	TSSACKR	RS	0.345	.
lcl_AAK63819	158	SSACKRR	SI	0.395	.
lcl_AAK63819	161	CKRRSIK	SF	0.248	.
lcl_AAK63819	166	IKSFFSR	LN	0.101	.
lcl_AAK63819	174	NWLHQLK	YR	0.070	.
lcl_AAK63819	176	LHQLKYR	YP	0.097	.
lcl_AAK63819	189	TMPNNDK	FD	0.060	.
lcl_AAK63819	192	NNDKFDK	LY	0.073	.
lcl_AAK63819	217	YAQASGR	VT	0.082	.
lcl_AAK63819	223	RVTVSTK	RS	0.058	.
lcl_AAK63819	224	VTVSTKR	SQ	0.218	.
lcl_AAK63819	240	GSGPWVR	GV	0.156	.
lcl_AAK63819	245	VRGVSSR	IS	0.111	.
lcl_AAK63819	254	IYWTIVK	PG	0.060	.
lcl_AAK63819	271	GNLIAPR	GY	0.116	.
lcl_AAK63819	275	APRGYFK	IR	0.065	.
lcl_AAK63819	277	RGYFKIR	SG	0.148	.
lcl_AAK63819	280	FKIRSGK	SS	0.187	.
lcl_AAK63819	285	GKSSIMR	SD	0.194	.
lcl_AAK63819	292	SDAPIGK	CN	0.069	.
lcl_AAK63819	308	GSIPNDK	PF	0.069	.
lcl_AAK63819	315	PFQNVNR	IT	0.102	.
lcl_AAK63819	323	TYGACPR	YV	0.138	.
lcl_AAK63819	326	ACPRYVK	QN	0.107	.
lcl_AAK63819	331	VKQNTLK	LA	0.073	.
lcl_AAK63819	337	KLATGMR	NV	0.133	.
lcl_AAK63819	342	MRNVPEK	QT	0.112	.
lcl_AAK63819	345	VPEKQTR	GI	0.165	.
lcl_AAK63819	370	DGWYGFR	HQ	0.080	.
lcl_AAK63819	384	GQAADLK	ST	0.100	.
lcl_AAK63819	396	INQINGK	LN	0.071	.
lcl_AAK63819	399	INGKLNK	LI	0.110	.
lcl_AAK63819	403	LNRLIEK	TN	0.067	.
lcl_AAK63819	407	IEKTNEK	FH	0.062	.
lcl_AAK63819	413	KFHQIEK	EF	0.072	.
lcl_AAK63819	421	FSEVEGR	IQ	0.079	.
lcl_AAK63819	427	RIQDLEK	YV	0.095	.
lcl_AAK63819	433	KYVEDTK	ID	0.054	.
lcl_AAK63819	462	TDSEMNK	LF	0.075	.
lcl_AAK63819	466	MNKLFER	TR	0.079	.
lcl_AAK63819	468	KLFERTR	KQ	0.071	.
lcl_AAK63819	469	LFERTRK	QL	0.230	.
lcl_AAK63819	472	RTRKQLR	EN	0.085	.
lcl_AAK63819	484	MGNGCFK	IY	0.078	.
lcl_AAK63819	488	CFKIYHK	CD	0.062	.
lcl_AAK63819	498	ACIGSIR	NG	0.074	.
lcl_AAK63819	508	YDHDVYR	DE	0.095	.
lcl_AAK63819	515	DEALNNR	FQ	0.092	.
lcl_AAK63819	519	NNRFQIK	GV	0.097	.
lcl_AAK63819	524	IKGVELK	SG	0.074	.
lcl_AAK63819	528	ELKSGYK	DW	0.059	.
lcl_AAK63819	557	IMWACQK	GN	0.063	.
lcl_AAK63819	561	CQKGNIR	CN	0.081	.

^

Lampiran 6. Prediksi Struktur Sekunder

a. Non Struktural 1

A/HongKong/1774/99(H3N2)

MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADWGLGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLEIEPATRAGKQIVKHI
LEEEYDEALKITIASVPASRYLTDMTLEEISRDWFMLMPKQKVAGSLCIRMDQAVMEKSITLKANFSVIFD
RLETLILLRAFTEEGAIUGEISPLPSLPGHTDEDVKNAGILIKGFWDNDNTVRVSEALQRFARWSINENG
RPPFPKQKRKVARTTGPEV
-----EEEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----
EEEE-----HHHH-HHHHHHHH-H-----EEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----
EEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHH-----

A/Philipine/344/2004(H1N2)

VSSFQVDCFLWHVRKRFADWGLGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLEIEPSTRAGKQIVKRILKEEY
DEALKITIASVPTSRYLTDMTLEEMSRDWFMLMPKQKMGASLCIRMDQAIMDKTITLKANFSVIFDRLET
LILLRAFTEEGAIUGEISPLPSLPGHTDEDVKNAGTLIKGLEWNDNTVRVSEALQRFARWSINEDGGPPF
PPKQKRKMARTIGPEV
---EEEEHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE--
-----HHHH-HHHHHHHH-----HEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----
HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHH-----

A/Thailand/271/2005(H1N1)

MDPNTMSSFQVDCFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRSSTLSLNIETATLIGKQIVIEWILK
EESNEALKMTIASVPAPRYLADMTLEEMSRDWFMLMPKQKVGSLCVRMDQAIMKNIILKANFSVVF
NRLENLTLRAFTEEGAIUGEISPLPSLPGHTHENVKDAVGLIGGLEWNGNTVRVSENLRQRFARWSNEN
ENGRPPLPSEQK
-----EEEEHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----
EEEE-----HHHH-HHHHHHHH-H-----EEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----
EEEE-----HHHHHHHHHHHE--E-----EEEHHHHHHHHHH-----

A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)

MDSNTMSSFQVDCFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTLGLDIETATLVGKQIVIEWIL
KEESSETLRMTIASVPTSRYLSDMTLEEMSRDWFMLMPKQKIGPLCVRDQAIMKNIILKANFSVVF
RLETLILLRAFTEEGAIUGEISPLPSLPGHTYEDVKNAGVGLIGGLEWNGNTVRVSENIQRFARWRNCNEN
GRPSLPPEQK
-----EEEEHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE--
-----HHHH-HHHHHHHH-----HEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----
--HHHHHHHHHHHE--E-----EEEHHHHHHHHHH-----

A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)

MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERI
LKEESDEALKMTIASVPASRYLTDMTLEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCIRMDQAIMDKNIILKANFSVIF
DRLETLILLRAFTEEGAIUGEISPLPSLPGHTDEDVKNAGVGLIGGLEWNDNTVRVSETLQRFARWRSSNE
NGRPPPPKQKRKMARTIKSEV
-----EEEEHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE--
-----HHHH-HHHHHHHH-H-----EEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----
-HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHH-----

A/HongKong/156/97(H5N1)

MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIRTATREGKHIVERI
LEEESEDEALKMTIASVPAPRYLTEMTEEMSRDWLMLIPKQKVAGSLCIRMDQAIMDKDIILKANFSVVF
RLEALILLRAFTDEGAIVGEISPLPSLPGHTEEDVKNAGVGLIGGLEWNDNTVRVSETLQRFWRSSDEN
GRSPLPPKQKRKMERTIEPEV
-----EEEEHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE--
-----HHHH-HHHHHHHH-----EEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----
HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHH-----

A/Indonesia/5/2005(H5N1)
MDSNTVLSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIETATRAGKQIVERI
LEESDEALKMPASRYLTDMLTEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCICKMDQAIMDKTIILKANFSVIFDRLET
LILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTGEDVKNAIGVLIGGLEWNDNTVTVRVSETIQRFAWRGSDDEDGRLP
FPPNQKRKMARTIESEV
-----EEEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----EEHHHHHHHHHHHHHHHH-----
--HHHH-HHHHHHH-----EEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----
HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHH-----HHHHHHHH--

A/Indonesia/CDC1032/2007(H5N1)
MDSNTVLSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTLGLDIETATRAGKQIVERIL
EESDEALKKMPASRYLTDMSLEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCICKMDQAIMDKTIILKANFSVIFGRLET
ILLRAFTEEGAIVGEISPLPSLPGHTGEDVKNAIGVLIGGLEWNDNTVTVRVSETIQRFAWRGGDEDGRLP
FPPNQKRKMARTIESEV
-----EEEEHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----EEHHHHHHHHHHHHHHHH-----
--HHHH-HHHHHHH-----EEEHHHHHH--EEEE--HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----
HHHHHHHHHHHH-----EEEHHHHHHHH-----HHHHHHHH--

b. Matrik 1

>A/Indonesia/5/2005
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER
GLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVLSYSTGALASCMGLIYNRMGTVT
EVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQMAGSSEQA AEAMEVAN
QARQMVQAMRTIGTHPSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQMQRFK
--HHHHHHHHHEEEEE-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHEEEEE-----
HHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHEEE-----EEEE--HHHHHHHHHH-----
EEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHEE-----EEEEEE-HHHHHHH-----
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHH--EEEE--

>A/Indonesia/CDC1032/2007/1-252
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDVFAGKNADLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER
GLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYKCLKREITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGAVTT
EVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQMAGSSEQA AEAMEVAN
QARQMVQAMRTIGTHPSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQMHRFK
--HHHHHHHHHEEEEE-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHEEEEE-----
HHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHEE-----HHHH-----HHHHHHHHHHHH-----
EEHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHEE-----EEEEEE-HHHHHHH-----
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHH--EEEE--

>HKG156/1997/1-252
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER
GLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKCLKREITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVT
TEVALGLVCATCEQIADAQHRSHRQMATTTNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQMAGSSEQA AEAMEVA
SQARQMVQAMRTIGTHPSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK
--HHHHHHHHHEEEEE-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHEEEEE-----
HHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----
EEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHEE-----EEEEEE-HHHHHHH-----
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHH--EEEE--

>1918/1-252
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSE
RGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYRKLKREITFHGAKEVALSYAGALASCMGLIYNRMGTVT
TTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNP LIRHENRMVLA STTAKAMEQMAGSSEQA AEAMEV
ASQARQMVQAMRTIGTHPSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK
--HHHHHHHHHEEEEE-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHEEEEE-----
HHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHEE-----HHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----

Lampiran 7. Mutasi Spesifik Struktur Sekunder Non Struktural 1

a. Kontrol vs H1N1

Isolat	Posisi									
	3	47	51	53	137	145	164	173	176	216
A/Indonesia/5/2005-1	Coil	Coil	Coil	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil
A/Indonesia/CDC1032/2007	Coil	Coil	Coil	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	Coil	Coil	Coil	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil
A/HongKong/156/97(H5N1)	Coil	Coil	Coil	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil
A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1)	Coil	Coil	Coil	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil
A/Thailand/271/2005 (H1N1)	Coil	Coil	Extended Strand	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil

b. Kontrol vs H1N2

Isolat	Posisi							
	53	56	57	66	73	180	183	211
A/Indonesia/5/2005-1	Extended Strand	Helix	Helix	Helix	Coil	Helix	Coil	Coil
A/Indonesia/CDC1032/2007-1	Extended Strand	Helix	Helix	Helix	Coil	Helix	Coil	Coil
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)	Extended Strand	Helix	Helix	Helix	Coil	Helix	Coil	Coil
A/HongKong/156/97(H5N1)	Extended Strand	Helix	Helix	Helix	Coil	Helix	Coil	Coil
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	Extended Strand	Helix	Helix	Helix	Coil	Helix	Coil	Coil
A/Philipine/344/2004(H1N2)	Extended Strand	Helix	Helix	Helix	Coil	Helix	Coil	Coil

c. Kontrol vs H3N2

Isolat	Posisi							
	53	56	66	73	98	180	183	185
A/Indonesia/5/2005-1	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil	Coil
A/Indonesia/CDC1032/2007-1	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil	Coil
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil	Coil
A/HongKong/156/97(H5N1)	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil	Coil
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	Extended Strand	Helix	Helix	Coil	Helix	Helix	Coil	Coil

Lampiran 8. Mutasi Spesik Struktur Sekunder Matrik 1

a. Kontrol vs H1N1

Isolat	Posisi
	248
A/Indonesia/5/2005	Ekstended strand
A/Indonesia/CDC1032/2007	Ekstended strand
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)	Ekstended strand
A/HongKong/156/97(H5N1)	Ekstended strand
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	Ekstended strand
A/Thailand/271/2005(H1N1)	Ekstended strand

b. Kontrol vs H1N2

Isolat	Posisi								
	9	10	11	12	13	14	201	208	248
A/Indonesia/5/2005-1	Helix	Helix	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Helix	Helix	Ekstended strand
A/Indonesia/CDC1032/2007-1	Helix	Helix	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Helix	Helix	Ekstended strand
A/Brevig_Mission/1/18(H1N1)	Helix	Helix	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Helix	Helix	Ekstended strand
A/HongKong/156/97(H5N1)	Helix	Helix	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Helix	Helix	Ekstended strand
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	Helix	Helix	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Ekstended strand	Helix	Helix	Ekstended strand
A/Philippine/344/2004(H1N2)	Helix	Helix	Helix	Helix	Ekstended strand	Coil	Helix	Helix	Ekstended strand

c. Kontrol vs H3N2

Sample	Posisi
	193
A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	Coil
A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)	Coil
A/HongKong/156/97 (H5N1)	Coil
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)	Coil
A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)	Coil
A/HongKong/1774/99(H3N2)	Coil

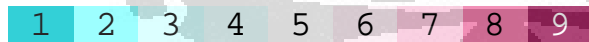
Lampiran 9. Prediksi *Buried/ Exposed*

a. Non Struktural 1 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1))

1	11	21	31	41
MDSNTVL S FQ	VDCFLW H VRK	RFADQ E LGDA	PFLDRLRRD Q	KSLRGRGNTL
eeeeee e e	bbbbbb b ee	eb e eeeeeb	eb e e e ee	ee e ee e eb
ff ff f f	s ss	f f ffs	f ff f ff	f ff f
51	61	71	81	91
GLDIETATRA	GKQIVER I LE	EESDEAL K MP	ASRYLTD M TL	EEMSRDW F ML
bb e ee e ee	bee b ee b e	ee e ee b e	bee b bb e bb	ee b ee b bb
fsf	ff f s	f f s	f sfss	f sf s
101	111	121	131	141
MPK K VAGSL	C I KMDQ A IMD	K T IILKAN F S	V I FDRL E TL I	L L RAF T EEGA
be e ee e ee	bb e bb e bb	ee b bb e be	bb e ee b bb	bb e bb e eb
fff f	s sfs s	f s fsf	f ss s	fs f
151	161	171	181	191
IVGEIS P LPS	LPGHT G EDVK	NAIGV L IGGL	EWNDNT V RV S	ET I OR F AWRG
bb e bb e ee	be e ee e ee	eb b bb b bb	eb e ee e be	eb b ee b be
s fssf ff	fff ffsf	fs s	ffff f f	f
201	211	221		
SDE D GR L PF P	P N Q K R K M A R T	I E SE V		
ee e ee e ee	ee e ee b ee	be e ee		
	ff s f			

Legend:

The conservation scale:



Variable Average Conserved

e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.

b - A buried residue according to the neural-network algorithm.

f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).

s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).

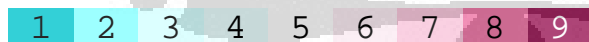
X - Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

b. Matrik 1 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1))

1	11	21	31	41
MSLLTEVETY	VLSIIPSGPL	KAEIAQKLED	VFAGKNTDLE	ALMEWLKTRP
eeebeebb	bbbbbeeeeb	ebbbbeebee	bbeeeeeeebe	bbbebbbeebe
fff ffssf	s ss ffff	fsfss f	s ffff f f	sf ffsf
51	61	71	81	91
ILSPLTKGIL	GFVFTLTVPS	ERGLQRRRFV	QNALNGNGDP	NNMDRAVKLY
bbbbebb	bbbbbbbee	eebeeeebb	eebeeeeeeee	eebeebb
s sf sff	s s s ff	fff ffff s	ffsf fffff	ffsf s f
101	111	121	131	141
KKLRKREITFH	GAKEVSLSYS	TGALASCMGL	IYNRMGTVTT	EVAFGLVCAT
eebeeebebe	bbbebbbbbb	bebbbbbbbbb	bbbbbbbebbb	ebbbbbbbbbe
f ff f	sf	s fs ss s	s sss sss	f s sf
151	161	171	181	191
CEQIADSOHR	SHRQMATITN	PLIRHENRMV	LASTAKAME	QMAGSSEQAA
beebbeeeeee	eeeebbebee	bbbeebbbbbb	bbbbbbbebbe	eebeeeeeebb
f ssf ff	f ffs f f	sffsssss	ssf sf	f fff ffss
201	211	221	231	241
EAMEVANQAR	QMVQAMRTIG	THPNSSAGLR	DNLLLENLQAY	QKRMGVQMQR
ebbebbbeebe	ebbebbbbbbb	eebeeeeebe	eebbeebbeb	eebeeeebbee
s s f	ss sss	fsf ff f	ff ff	f fffff f
251				
FK				
ee				
f				

Legend:

The conservation scale:



Variable Average Conserved

e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.

b - A buried residue according to the neural-network algorithm.

f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).

s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).

X - Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

Lampiran 10. Prediksi Epitope Non Struktural 1 (NS 1)

Lampiran 10. Hasil Prediksi Epitope Non Struktural 1 (NS1)

a. A/Indonesia/5/2005 (H5N1) dan A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA A*6801	1:191-199	9	ETIQRFAWR	1.0
HLA B*1503	1:125-133	9	LKANFSVIF	1.2
HLA B*1503	1:24-32	9	DQELGDAPF	2.8
HLA B*1517	1:93-101	9	MSRDWFMLM	3.3
HLA B*1517	1:121-129	9	KTIILKANF	5.0

b. A/HongKong/156/97 (H5N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:130-138	9	LKANFSVIF	1.2
HLA A*0203	1:76-84	9	ALKMTIASV	2.2
HLA B*1517	1:98-106	9	MSRDWLMLI	2.7
HLA B*1503	1:24-32	9	DQELGDAPF	2.8
HLA B*1517	1:81-89	9	IASVPAPRY	3.6
HLA A*6801	1:80-88	9	TIASVPAPR	5.1

c. A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:130-138	9	LKANFSVIF	1.2
HLA A*0203	1:76-84	9	ALKMTIASV	2.2
HLA B*1503	1:24-32	9	DQELGDAPF	2.8
HLA B*1517	1:98-106	9	MSRDWFMLM	3.3
HLA B*1517	1:81-89	9	IASVPASRY	4.1
HLA A*6801	1:196-204	9	ETLQRFAWR	5.2

d. A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:130-138	9	LKANFSVIF	1.2
HLA B*1517	1:6-14	9	MSSFQVDCF	3.1
HLA B*1517	1:81-89	9	IASVPTSRV	3.3
HLA B*1517	1:98-106	9	MSRDWFMLM	3.3
HLA A*0203	1:76-84	9	TLRMTIASV	4.0

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:69-77	9	LKEESSETL	5.2

e. A/Thailand/271/2005 (H1N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:130-138	9	LKANFSVVF	0.98
HLA B*1517	1:46-54	9	RSSTLSLNI	2.0
HLA A*0203	1:76-84	9	ALKMTIASV	2.2
HLA B*1517	1:6-14	9	MSSFQVDCF	3.1
HLA B*1517	1:98-106	9	MSRDWFMLM	3.3
HLA B*1503	1:111-119	9	VKGSLCVRM	3.5
HLA B*1517	1:81-89	9	IASVPAPRY	3.6
HLA A*3201	1:193-201	9	RVSENLQRF	4.4
HLA A*6801	1:80-88	9	TIASVPAPR	5.1

f. A/Philippine/344/2004(H1N2)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:125-133	9	LKANFSVIF	1.2
HLA B*1503	1:60-68	9	VKRILKEEY	3.0
HLA A*0203	1:71-79	9	ALKITIASV	3.2
HLA B*1517	1:76-84	9	IASVPTSRY	3.3
HLA B*1517	1:93-101	9	MSRDWFMLM	3.3
HLA B*1503	1:98-106	9	FMLMPKQKM	4.6
HLA A*3201	1:174-182	9	GTLIKGLEW	5.5
HLA A*3201	1:188-196	9	RVSEALQRF	5.9

g. A/HongKong/1774/99(H3N2)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:130-138	9	LKANFSVIF	1.2
HLA B*1503	1:65-73	9	VKHILEEEY	1.7
HLA A*0203	1:76-84	9	ALKITIASV	3.2
HLA B*1517	1:81-89	9	IASVPASRY	4.1
HLA A*3001	1:209-217	9	NGRPPFPPK	5.0
HLA A*3201	1:193-201	9	RVSEALQRF	5.9

Lampiran 11. Hasil Prediksi Epitope Matrik 1

a. A/Indonesia/5/2005 (H5N1) dan A/Indonesia/CDC1032/2007 (H5N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1517	1:160-168	9	RSHRQMATI	1.3
HLA B*1503	1:101-109	9	KCLKREITF	1.4
HLA B*1503	1:157-165	9	SQHRSHRQM	2.6
HLA B*1517	1:165-173	9	MATITNPLI	2.7
HLA B*1503	1:240-248	9	YQKRMGVQM	3.1
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQMQRF	4.3
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8

b. A/HongKong/156/97 (H5N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:101-109	9	KCLKREMTF	1.3
HLA B*1503	1:157-165	9	AQHRSHRQM	1.5
HLA B*1503	1:240-248	9	YQKRMGVQM	3.1
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1517	1:165-173	9	MATTTNPLI	3.8
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQMQRF	4.3
HLA B*1517	1:138-146	9	VTTEVALGL	4.7
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8

c. A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:101-109	9	RCLKREITF	1.1
HLA B*1503	1:157-165	9	SQHRSHRQM	2.6
HLA B*1503	1:240-248	9	YQKRMGVQM	3.1
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQMQRF	4.3
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8

d. A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)

Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:101-109	9	KKCLKREITF	1.4
HLA B*1503	1:157-165	9	SQHRSHRQM	2.6
HLA B*1503	1:240-248	9	YQKRMGVQM	3.1
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1517	1:165-173	9	MATTTNPLI	3.8
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQMQRFF	4.3
HLA B*1517	1:138-146	9	VTTEAAFGL	4.9
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8
HLA B*1503	1:24-32	9	IAQRLESVF	5.9

e. A/Thailand/271/2005 (H1N1)

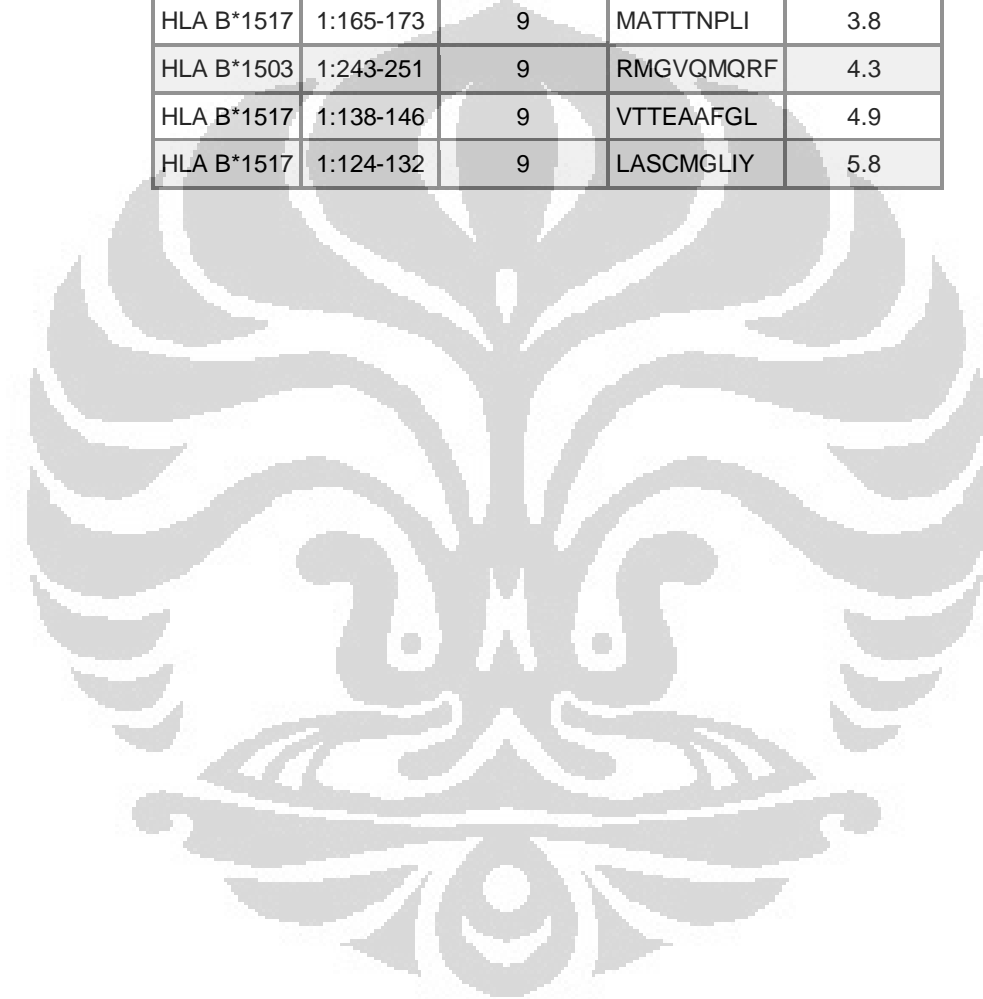
Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:101-109	9	KKCLKREITF	1.4
HLA B*1503	1:157-165	9	SQHRSHRQM	2.6
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1517	1:165-173	9	MATTTNPLI	3.8
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQIQRF	4.2
HLA B*1517	1:138-146	9	VTTEAAFGL	4.9
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8

f. A/Philippine/344/2004(H1N2)

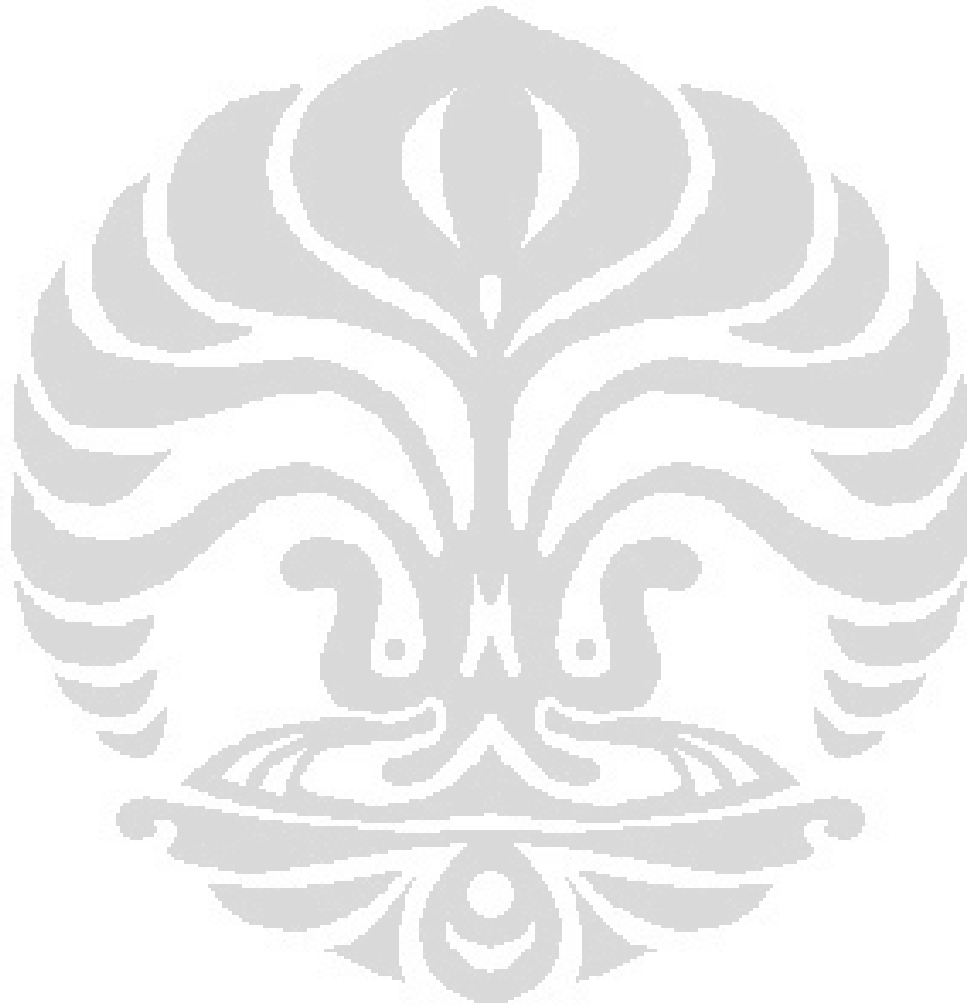
Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:101-109	9	KKCLKREITF	1.4
HLA B*1503	1:157-165	9	SQHRSHRQM	2.6
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1517	1:165-173	9	MATTTNPLI	3.8
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQIQRF	4.2
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8

g. A/HongKong/1774/99(H3N2)

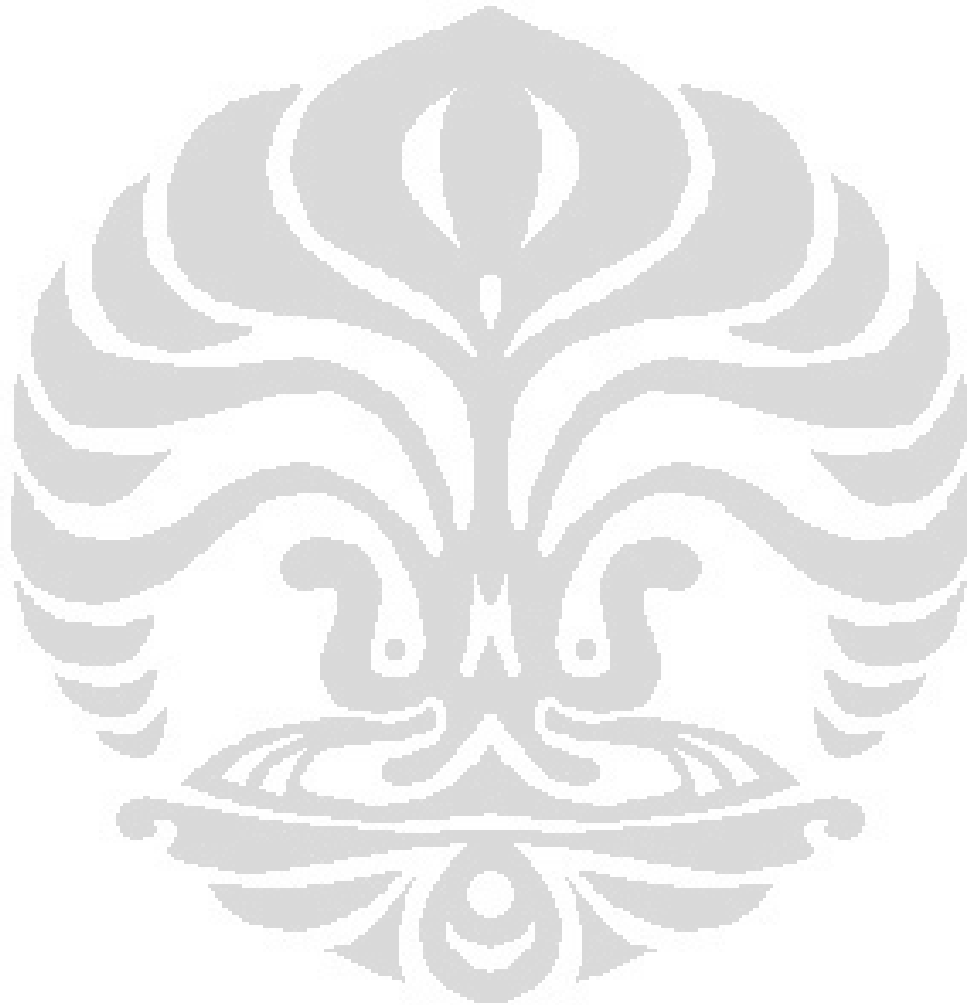
Allele	Position	PepLength	Sequence	IC50 [nM]
HLA B*1503	1:101-109	9	KCLKREITF	1.4
HLA B*1503	1:157-165	9	SQHRSHRQM	2.6
HLA B*1503	1:240-248	9	YQKRMGVQM	3.1
HLA A*3001	1:47-55	9	KTRPILSPL	3.7
HLA B*1517	1:165-173	9	MATTTNPLI	3.8
HLA B*1503	1:243-251	9	RMGVQMQRF	4.3
HLA B*1517	1:138-146	9	VTTEAAFGL	4.9
HLA B*1517	1:124-132	9	LASCMGLIY	5.8



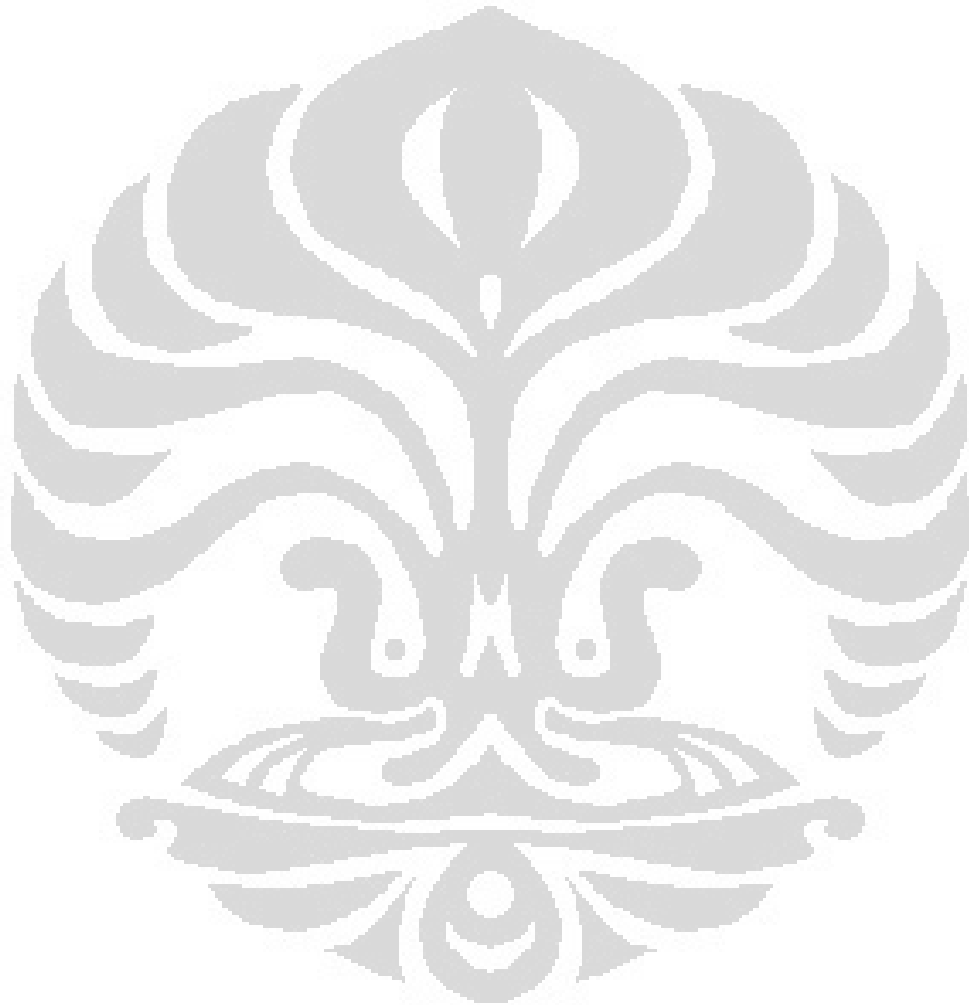
Lampiran 12. *Template RNA Binding Domain NS 1*



Lampiran 13. *Template Effector Domain NS1*



Lampiran 14. *Template Matrik 1*



Lampiran 15. Daftar RMSD

RMSD (Å)	Structure Comparison Comment
>12	Completely unrelated
7,0	Dubius relationship
5,0	Maybe structurally related
4,0	Good Structural relationship
2,0	Closely related
1,5	Very close related
0,8	Differences are not obvious
0,4	Essentially indistinguishable

Baxevanis, A. D., Ouelette (2005)

Lampiran 16. Daftar Singkatan



BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
GBFF	<i>Gen Bank Flatfile Format</i>
HA	<i>Hemagglutinin</i>
HPAI	<i>Highly Pathogenicity Avian Influenza</i>
IC	<i>Inhibitory Concentration</i>
IFN	<i>Interferon</i>
LPAI	<i>Low Pathogenicity Avian Influenza</i>
M 1	<i>Matrik 1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NA	<i>Neuraminidase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NS 1	<i>Non Struktural 1</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

Lampiran 17. Daftar Kode Asam Amino

No	Kode satu Huruf	Kode tiga huruf	Nama
1	A	Ala	Alanin
2	R	Arg	Arginin
3	N	Asn	Asparagin
4	D	Asp	Asam Aspartat
5	C	Cys	Sistein
6	Q	Gln	Glutamin
7	E	Glu	Asam Glutamat
8	G	Gly	Glisin
9	H	His	Histidin
10	I	Ile	Isoleusin
11	L	Leu	Leusin
12	K	Lys	Lisin
13	M	Met	Metionin
14	F	Phe	Fenilalanin
15	P	Pro	Prolin
16	S	Ser	Serin
17	T	The	Treonin
18	W	Trp	Triptofan
19	Y	Tyr	Tirosin
20	V	Val	Valin

Lampiran 18. Bagan Kerja Penelitian

