

**ANALISIS *IN SILICO* MUTASI HEMAGGLUTININ, NEURAMINIDASE, DAN
MATRIX2 VIRUS H5N1 INDONESIA TERKAIT DENGAN
TINGKAT PATOGENISITASNYA YANG TINGGI**

AGUS LIMANTO

0304030014



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

**ANALISIS *IN SILICO* MUTASI HEMAGGLUTININ, NEURAMINIDASE, DAN
MATRIX2 VIRUS H5N1 INDONESIA TERKAIT DENGAN
TINGKAT PATOGENISITASNYA YANG TINGGI**

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

Oleh :

AGUS LIMANTO

0304030014



DEPOK

2009

**SKRIPSI : ANALISIS *IN SILICO* MUTASI HEMAGGLUTININ,
NEURAMINIDASE, DAN MATRIX2 VIRUS H5N1 INDONESIA
TERKAIT DENGAN TINGKAT PATOGENISITASNYA YANG
TINGGI**

NAMA : AGUS LIMANTO

NPM : 0304030014

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, Desember 2009

Prof. Dr. Usman Sumo Friend Tambunan

PEMBIMBING

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana : Desember 2009

Penguji I :

Penguji II :

Penguji III :

ABSTRAK

Pada tahun 2007, terjadi wabah *avian influenza* di Indonesia yang menyebabkan tingkat kematian hampir 85%. Melihat tingginya tingkat kematian yang terjadi di Indonesia dibandingkan dengan negara lainnya yang mengalami wabah *avian influenza*, WHO kemudian mengumumkan bahwa virus HPAI H5N1 Indonesia memiliki tingkat patogenisitas tertinggi. Hal ini menjelaskan bahwa mutasi yang terjadi baik berupa *antigenic drift* maupun *antigenic shift* dapat mempengaruhi tingkat patogenisitas dari virus influenza. Studi dilakukan terhadap *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), dan *matrix2* (M2) karena ketiga protein ini mempunyai peranan penting pada proses infeksi virus *avian influenza*. Analisis mutasi secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan metode *multiple alignment* disertai pembuatan *phylogenetic tree*. Mutasi yang diamati untuk *hemagglutinin* dilakukan pada daerah *cleavage site* dan *active site*, sedangkan untuk *neuraminidase* dan *matrix2* dilakukan pada *active site*. Perubahan sifat asam amino dari hidrofilik menjadi hidrofobik memberikan pengaruh terhadap tingkat pathogenesis. Hasil analisis mutasi dilanjutkan dengan prediksi pemotongan oleh pro-P (furin) khusus untuk HA, prediksi struktur 3D, *molecular docking* dan *molecular dynamic*. Berdasarkan hasil analisis mutasi pada daerah *cleavage site* HA, didapatkan pola untuk H5N1 Indonesia dan Hongkong adalah R-X-K/R-R, hasil prediksi pro-P Furin menunjukkan bahwa memang benar pola ini menyebabkan HA H5N1 mudah terpotong oleh furin. Hasil analisis struktur 3D menggunakan *molecular docking* dan *molecular dynamic* juga menunjukkan HA dan NA yang berasal dari virus H5N1 Indonesia berikatan dengan lebih baik dengan reseptor *sialic acid* pada manusia, sedangkan untuk protein M2 virus H5N1 menunjukkan adanya resistensi terhadap obat jenis *amantadine* dan *rimantadine*.

Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan, adanya mutasi pada HA, NA, dan M2 memiliki keterkaitan dengan tingkat patogenisitas dari virus *avian influenza* H5N1 di Indonesia.

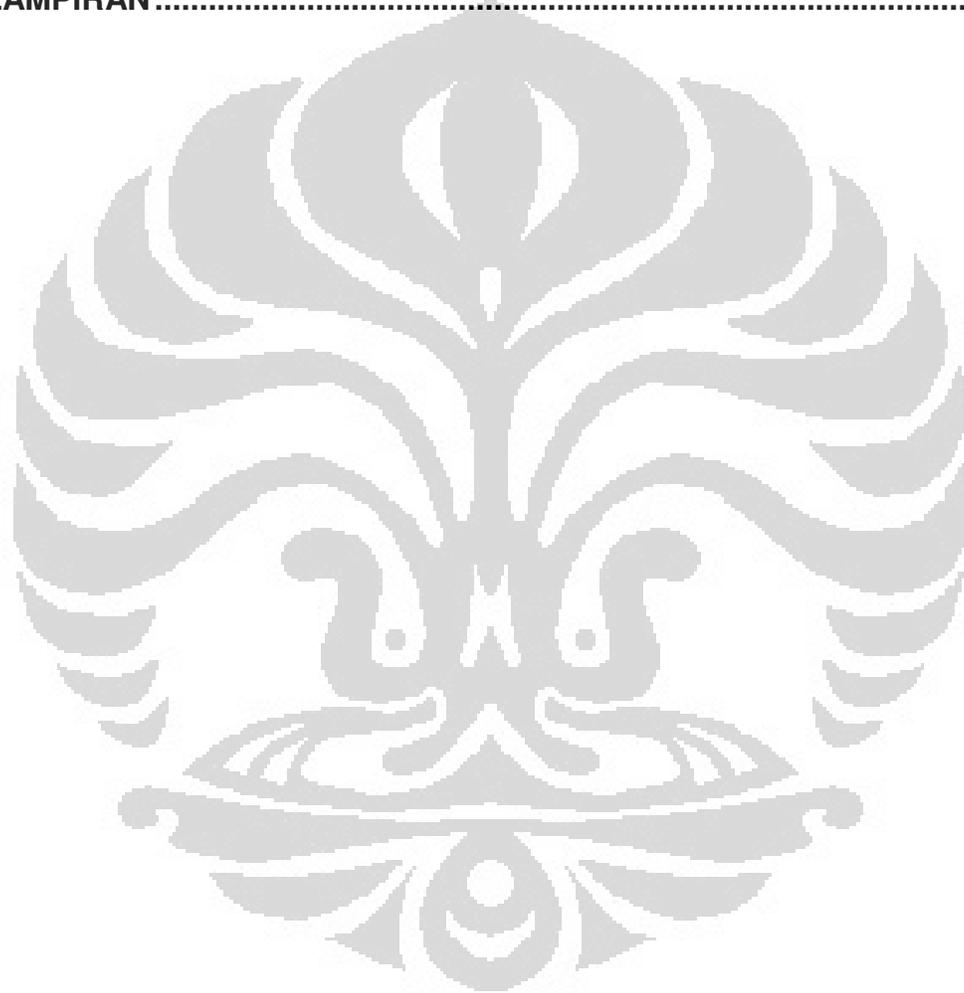
Kata kunci: *avian influenza*, *hemagglutinin*, *neuraminidase*, *matrix2*, H5N1, patogenisitas, *molecular docking*, *molecular dynamic*.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Virus Influenza	6
B. <i>Avian Influenza</i>	7
C. Proses Replikasi Virus Avian Influenza.....	8
D. Hemagglutinin(HA)	10
E. Neuraminidase (NA)	11
F. Matrix Protein.....	12
G. Reseptor Sel Permukaan pada Saluran Pernapasan	13
H. Patogenesis Avian Influenza (H5N1)	14
I. Antigenik Shift	16
J. Antigenik Drift	17
K. Bioinformatika	18

L.	Phylogenetic Tree	18
M.	Molecular Docking	19
N.	Molecular Dynamics	20
O.	Molecular Operating Environment (MOE)	22
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN		23
A.	Pencarian dan Pemilihan Sekuen.....	23
B.	<i>Multiple Alignment</i>	23
C.	Pembuatan Pohon Filogenetik	24
D.	Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein (Furin)...	24
E.	Pencarian Struktur 3-D	24
F.	Molecular Docking	25
G.	Molecular Dynamic	25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		26
A.	Pencarian Sekuen Hemagglutinin, Neuraminidase, dan Matrix2	26
B.	<i>Multiple Sequence Alignment</i>	27
C.	Pembuatan Pohon Filogenetik (<i>Phylogenetic Tree</i>).....	30
D.	Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein (Furin)...	31
E.	Pencarian Struktur Tiga Dimensi Hemagglutinin, Neuraminidase, dan Matrix2	32
F.	Molecular Docking	34

G. Molecular Dynamic	41
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	47
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	52



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur Virus Influenza.....	6
Gambar 2. Ekologi Virus Influenza A	7
Gambar 3. Ekologi Virus H5N1	8
Gambar 4. Siklus Hidup Virus Influenza	9
Gambar 5. Struktur Hemagglutinin.....	10
Gambar 6. Struktur Neuraminidase	11
Gambar 7. Struktur Matrix	12
Gambar 8. Reseptor Sel Permukaan	13
Gambar 9. Struktur Sia(α 2-3)Gal dan Sia(α 2-6)Gal	14
Gambar 10. <i>Cleavage Site Hemagglutinin (HA)</i>	15
Gambar 11. Antigenik <i>Shift</i>	16
Gambar 12. Antigenik <i>Drift</i>	17
Gambar 13. Sisi Aktif HA	33
Gambar 14. Sisi Aktif NA	33
Gambar 15. Sisi aktif M2.....	34
Gambar 16. Visualisasi <i>Docking</i> 2IBX Terhadap <i>Sialic Acid</i>	37
Gambar 17. Visualisasi <i>Docking</i> 2FK0 Terhadap <i>Sialic Acid</i>	37
Gambar 18. Visualisasi <i>Docking</i> 2HTY Terhadap <i>Sialic Acid</i>	38
Gambar 19. Visualisasi <i>Docking</i> 2HU0 terhadap <i>Sialic Acid</i>	38

Gambar 20. Visualisasi Simulasi <i>Docking</i> 2RLF Terhadap <i>Amantadine</i>	39
Gambar 21. Visualisasi Simulasi <i>Docking</i> 2KIH Terhadap <i>Amantadine</i>	39
Gambar 22. Visualisasi Simulasi <i>Docking</i> 2RLF dengan <i>Rimantadine</i>	40
Gambar 23. Visualisasi Simulasi <i>Docking</i> 2KIH dengan <i>Rimantadine</i>	40
Gambar 24. Visualisasi <i>Dynamic</i> 2IBX Terhadap <i>Sialic Acid</i>	42
Gambar 25. Visualisasi <i>Dynamic</i> 2FK0 Terhadap <i>Sialic Acid</i>	43
Gambar 26. Visualisasi Simulasi <i>Dynamic</i> 2HTY Terhadap <i>Sialic Acid</i>	43
Gambar 27. Visualisasi Simulasi <i>Dynamic</i> 2HU0 Terhadap <i>Sialic Acid</i>	44
Gambar 28. Visualisasi Simulasi <i>Dynamic</i> 2RLF dengan <i>Amantadine</i>	44
Gambar 29. Visualisasi Simulasi <i>Dynamic</i> 2KIH dengan <i>Amantadine</i>	45
Gambar 30. Visualisasi Simulasi <i>Dynamic</i> 2RLF dengan <i>Rimantadine</i>	45
Gambar 31. Visualisasi Simulasi <i>Dynamic</i> 2KIH dengan <i>Rimantadine</i>	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Jumlah Sekuen Protein Influenza A yang Diperoleh	27
Tabel 2. Hasil Analisis <i>Sequence Alignment</i> HA.....	28
Tabel 3. Hasil Analisis <i>Sequence Alignment</i> NA.....	28
Tabel 4. Hasil Analisis <i>Sequence Alignment</i> M2.....	29
Tabel 5. Hasil Pemotongan HA oleh Furin.....	31
Tabel 6. Hasil Pencarian Struktur 3-D.....	32
Tabel 7. Data <i>Docking</i> HA dengan α -2,6 <i>Sialic Acid</i>	36
Tabel 8. Data <i>Docking</i> NA dengan α -2,6 <i>Sialic Acid</i>	37
Tabel 9. Data <i>Docking</i> M2 dengan <i>Amantadine</i>	39
Tabel 10. Data <i>Docking</i> M2 dengan <i>Rimantadine</i>	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Bagan Penelitian.....	52
Lampiran 2. Hasil Pencarian Sekuen <i>Hemagglutinin</i> Virus H5N1.....	53
Lampiran 3. Hasil Pencarian Sekuen <i>Neuraminidase</i> H5N1.....	55
Lampiran 4. Hasil Pencarian Sekuen <i>Matrix 2</i> virus H5N1.....	57
Lampiran 5. Analisis sekuens virus H5N1 Indonesia.....	59
Lampiran 6. <i>Phylogenetic Tree</i> HA virus H5N1.....	60
Lampiran 7. <i>Phylogenetic Tree</i> NA virus H5N1.....	61
Lampiran 8. <i>Phylogenetic Tree</i> M2 virus H5N1.....	62
Lampiran 9. Daftar Asam Amino.....	63
Lampiran 10. Visualisasi Simulasi <i>docking</i>	66
Lampiran 11. <i>Ligand Interaction Report</i>	70

BAB I

PENDAHULUAN

Influenza atau yang lebih dikenal sebagai flu, merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh virus dan dapat menyebabkan infeksi pada manusia dan hewan (unggas dan mamalia). Secara umum, virus influenza merupakan virus yang memiliki penyebaran yang sangat spesifik terhadap spesies tertentu. Hal ini berarti ketika virus tersebut menginfeksi satu spesies akan tetap menginfeksi spesies tersebut dan pada proses penyebarannya jarang sekali dapat menyebabkan infeksi pada spesies lain. Gejala umum dari penyakit ini adalah demam, sakit tenggorokan, sakit kepala, dan batuk. Dalam kasus yang lebih serius, influenza dapat menyebabkan pneumonia dan berakhir pada kematian (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

Virus influenza termasuk dalam orde *Mononegavirales*, famili *Orthomyxoviridae*, yang memiliki genom tunggal bersegmen. Berdasarkan genusnya, ada tiga tipe virus influenza yaitu influenza virus A, B, dan C. Virus influenza A dan B memiliki 8 segmen RNA, sedangkan virus influenza C memiliki 7 segmen RNA. Asam nukleat dari virus influenza ini mengkode sekitar 10 protein yaitu *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), *matrix* protein (M1 dan M2), *nonstructural* protein (NS1 dan NS2), *nucleocapsid* protein (NP), *polymerase basic* (PB1 dan PB2), dan *polymerase acidic* (PA) (Guan *et al.*, 2007).

Virus influenza A lebih lanjut dibedakan berdasarkan antigennya yaitu *hemagglutinin* dan *neuraminidase*, yang merupakan protein yang terletak pada

selubung virus. Sampai saat ini telah diketahui terdapat 16 jenis HA dan 9 jenis NA (Peiris *et al.*, 2007).

Virus influenza A H5N1, dikenal juga sebagai *avian influenza*, merupakan subtipe dari virus influenza A yang dapat menyebabkan infeksi pada unggas. Namun pada perkembangannya, virus ini juga dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Dari sekian banyak *strain* virus *avian influenza* A, hanya empat *strain* yang diketahui dapat menyebabkan infeksi pada manusia yaitu H5N1, H7N3, H7N7, dan H9N2 (Guan *et al.*, 2007).

Avian influenza A terbagi menjadi dua kelompok yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Patogenisitas berarti kemampuan virus untuk menyebabkan penyakit. HPAI H5N1, sering direferensikan sebagai “*Asian*” H5N1 yang menjadi perhatian masyarakat dunia. Sedangkan LPAI H5N1, sering direferensikan sebagai “*North American*” H5N1 (USDA, 2007).

Virus influenza A pada abad 20 ini menjadi sebuah pandemik yang menakutkan di seluruh dunia. Tiga pandemik influenza yang terjadi mengakibatkan kematian pada puluhan juta manusia di seluruh dunia. Pandemi pertama (*Spanish Flu*) pada periode 1918-1919 disebabkan oleh subtipe H1N1 dan menyebabkan kematian 50 juta orang. Pandemi kedua (*Asian Flu*) pada periode 1957-1958 disebabkan oleh subtipe H2N2 dan diperkirakan menyebabkan kematian 1 juta orang. Pandemi ketiga (*HongKong Flu*) pada periode 1967-1968 disebabkan oleh subtipe H3N2 dan diperkirakan menyebabkan kematian 1 juta orang (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

Pada tahun 1996, virus *highly pathogenic* H5N1 diisolasi dari peternakan angsa di Provinsi Guangdong, China. Pada tahun 1997, virus *highly pathogenic* H5N1 (*Avian*

Flu) berjangkit di peternakan ayam dan pasar hewan di HongKong. Selain itu, *avian influenza* H5N1 menyebabkan kematian pada 6 orang dari 18 orang yang terinfeksi (Guan *et al.*, 2007). 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. Hingga saat ini penelitian membuktikan bahwa infeksi virus influenza H5N1 ke manusia terjadi karena akibat kontak langsung antara manusia dengan unggas dan belum mampu menyebar dari manusia ke manusia lainnya (Ungchusak *et al.*, 2005).

Pada tahun 2004, virus H5N1 mencapai proporsi untuk menjadi pandemik di berbagai negara di Asia dan terjadi wabah HPAI di China, Jepang, Korea Selatan, Thailand, Vietnam, Indonesia, Kamboja, dan Laos. Wabah *avian influenza* H5N1 pertama kali terjadi di Indonesia pada tahun 2005, terdapat 20 kasus infeksi pada manusia dan 13 kasus di antaranya mengakibatkan kematian. Pada tahun 2006, terdapat 55 kasus infeksi dan 45 kasus di antaranya mengakibatkan kematian. Selanjutnya pada tahun 2007, terdapat 42 kasus infeksi dan 37 kasus di antaranya mengakibatkan kematian. Dari data kasus *avian influenza A* pada tahun 2005-2009 di Indonesia, dengan total 141 kasus infeksi dan 115 kasus di antaranya mengakibatkan kematian, maka WHO mengumumkan bahwa virus *avian influenza A* H5N1 di Indonesia merupakan virus *avian influenza A* yang paling patogen.

Penentuan tinggi rendahnya tingkat patogenitas virus influenza dilihat dari berbagai aspek berikut, yaitu (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 (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

Pada kasus virus *avian influenza* A H5N1 di Indonesia, proses masuknya virus ke dalam sel inang terjadi melalui kontak langsung dengan lendir burung, air liur, feses, dan darah. Proses dari infeksi virus ini sangat cepat dan cenderung sulit dicegah, terlebih karena kurangnya pengetahuan masyarakat akan bahaya virus *avian influenza* A H5N1. Pengaruh infeksi virus influenza A H5N1 di Indonesia terhadap sistem imun dan tingkat kerusakan sel oleh infeksi virus sangat tinggi. Hal ini dapat dilihat dari jumlah kasus kematian yang sangat tinggi dari kasus infeksi virus influenza A H5N1 di Indonesia. Spesifisitas dari sel inang pada kasus penyebaran virus influenza A H5N1 di Indonesia juga sangat kompleks, karena terjadi kasus infeksi pada unggas yang kemudian berpindah pada manusia (Radji, 2006).

Berubahnya spesifitas infeksi virus influenza A H5N1 dari unggas ke manusia disebabkan oleh terjadinya substitusi asam amino tunggal pada posisi 226 dan 228 pada *hemagglutinin* yang dapat mengubah *receptor binding site* dari posisi spesifik pada unggas yaitu α -2,3 *linked sialic acid* menjadi posisi spesifik pada manusia yaitu α -2,6 *linked sialic acid* (Ungchusak *et al.*, 2005). Perubahan ini disebabkan oleh kemampuan virus influenza A melakukan mutasi secara *antigenic drift* maupun *antigenic shift*, sehingga membuat virus tersebut menjadi lebih bersifat patogen dan meningkatkan kemampuan virus untuk menyebabkan infeksi pada manusia secara lebih efektif (Bouvier and Palese *et al.*, 2008).

Penelitian tentang penyakit ini secara intensif telah dilakukan, khususnya untuk

identifikasi penyakit, pengembangan diagnostik, dan pencegahan agar pandemik H5N1 tidak terjadi, karena virus ini mudah mengalami mutasi secara cepat menjadi virus yang dapat menular antar manusia. Hasil studi *in silico* virus H5N1 dari propinsi Banten menunjukkan adanya substitusi asam amino dan terdapat perubahan struktur sekunder dari hasil perbandingan beberapa virus influenza H5N1 yang diamati. (Tambunan *et al.*, 2008).

Penelitian ini dilakukan untuk melihat apakah mutasi pada *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), dan *matrix 2* (M2) terkait dengan tingkat patogenisitas yang tinggi pada virus influenza A H5N1 di Banten, Indonesia, pada tahun 2007. Alasan dilakukan studi pada HA, NA, dan M2 adalah ketiganya berperan dalam proses infeksi virus *avian influenza* dan proses ini menentukan tingkat patogenisitas dari suatu virus.

Tujuan penelitian ini adalah melakukan analisis secara *in silico* mutasi HA, NA, dan M2 pada virus influenza A H5N1 di Indonesia yang berpengaruh pada tingkat patogenisitas yang tinggi terhadap manusia dengan melakukan langkah-langkah berikut yaitu pembuatan pohon filogenetik, prediksi pemotongan HA oleh furin, pencarian struktur tiga dimensi, *molecular docking* dan *molecular dynamic*.

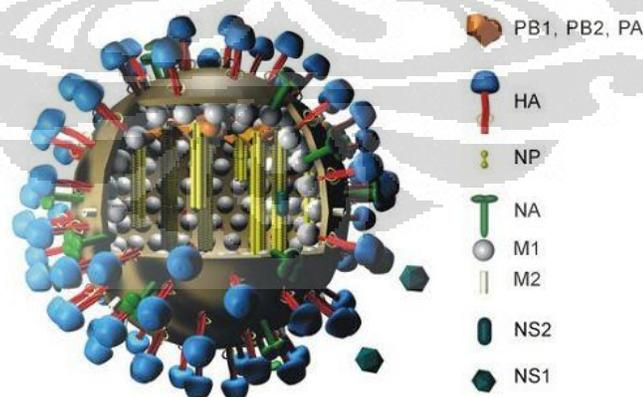
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Virus Influenza

Virus influenza merupakan virus yang termasuk dalam orde *Mononegavirales*, famili *Orthomyxoviridae*, mempunyai selubung (*envelope*), dan genom RNA berupa rangkaian tunggal berpolaritas negatif (*negative sense*) sebanyak 7-8 segmen (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

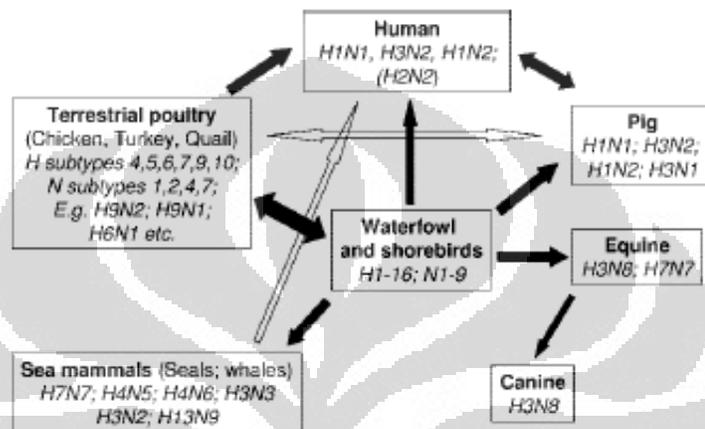
Berdasarkan genusnya, ada tiga tipe virus influenza yaitu influenza virus A, B dan C. Virus influenza A dan B memiliki 8 segmen RNA, sedangkan virus influenza C memiliki 7 segmen RNA. Asam nukleat dari virus influenza ini mengkode sekitar 10 protein yaitu *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), *matrix* protein (M1 dan M2), *nonstructural* protein (NS1 dan NS2), *nucleocapsid* protein (NP), *polymerase basic* (PB1 dan PB2), dan *polymerase acidic* (PA) (Guan *et al.*, 2007).



Gambar 1. Struktur Influenza

(Kamps, Hoffman and Preiser, 2006)

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 memiliki 16 subtipe HA dan 9 subtipe NA (Guan *et al.*, 2007). Ekologi virus influenza A dapat dilihat pada gambar 2.



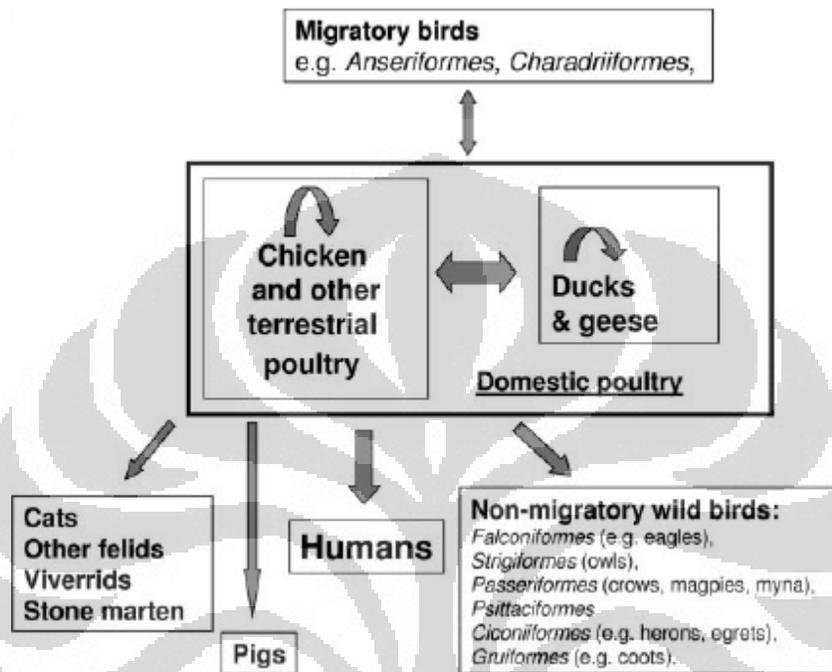
Gambar 2. Ekologi virus influenza A
(Guan *et al.*, 2007)

B. Avian Influenza

Avian influenza adalah penyakit viral pada unggas, yang disebabkan oleh virus influenza tipe A, yang salah satunya adalah subtipe H5N1. Virus *avian influenza* pada awalnya hanya menyebabkan infeksi pada unggas, namun pada perkembangannya dapat menyebabkan infeksi pada manusia.

Dari beberapa penelitian yang ada, diketahui ada beberapa subtipe *avian influenza* yang mampu menyebar dari unggas ke manusia seperti subtipe H5, H7, dan H9 (Liu *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2007). Namun hingga saat ini, beberapa hasil penelitian membuktikan bahwa infeksi virus influenza H5N1 pada manusia adalah

akibat kontak langsung dari unggas dan virus tersebut belum mampu menyebar antar manusia (Ungchusak *et al.*, 2005). Ekologi dari virus H5N1 dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Ekologi virus H5N1

(Guan *et al.*, 2007)

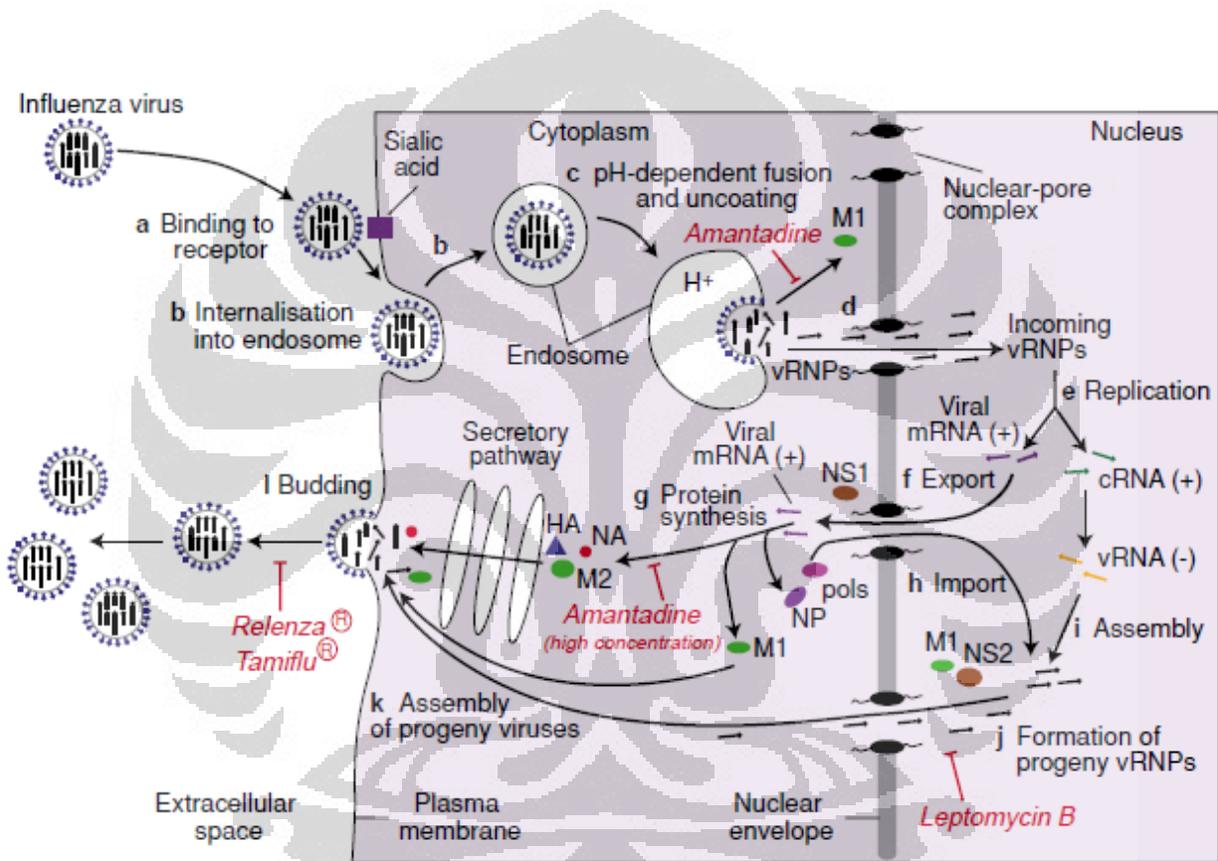
C. Proses Replikasi Virus Avian Influenza

Siklus hidup *avian influenza* dimulai dari proses infeksi virus *avian influenza*.

Virus *avian influenza* ini menempel pada permukaan sel *host* dengan melekatkan *hemagglutinin* (HA) pada *sialic acid* yang terdapat pada reseptor sel *host*. Pengikatan HA terhadap α -2,3 *linked sialic acid* (pada burung) atau α -2,6 *linked sialic acid* (pada manusia) akan bergantung kepada spesifitas dari sel *host*

(<http://journals.cambridge.org>).

Setelah menempel pada reseptor, virus masuk ke dalam sel *host* melalui proses endositosis dengan mediasi penurunan pH. Di dalam endosom, terjadi proses *fusion* dan *uncoating*, yang sangat tergantung pada pH. Pada fase ini, M2 berperan untuk mencegah terjadinya penurunan pH dan proses *fusion* dan *uncoating* virus berjalan dengan lancar (<http://journals.cambridge.org>).



Gambar 4. Siklus hidup virus influenza

(<http://journals.cambridge.org>)

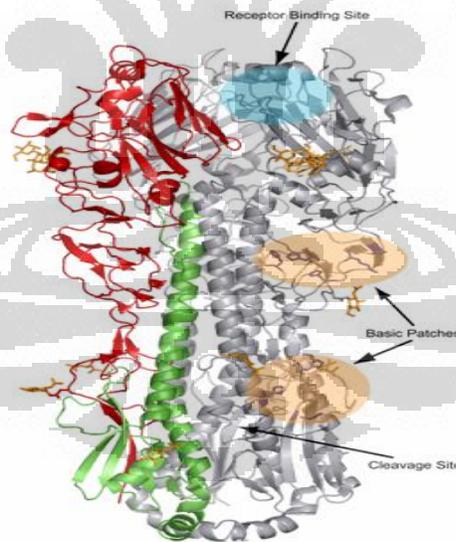
Ketika tahap *uncoating* selesai, maka virus mulai melepaskan *viral ribonucleoproteins* (vRNPs) dan ke dalam sitoplasma. vRNP ini kemudian dibawa ke dalam nukleus untuk melakukan proses replikasi yang akan menghasilkan *viral mRNA* dan cRNA. *Viral mRNA* dibawa keluar ke sitoplasma untuk melakukan sintesis protein

virus, sedangkan cRNA tetap berada di nukleus untuk melakukan sintesis (-)vRNA.

Setelah sintesis protein di sitoplasma selesai, sebagian protein dibawa kembali ke dalam nukleus untuk membantu pembentukan vRNP. Sebagian protein yang tidak dibawa kembali ke nukleus, diteruskan ke retikulum endoplasma dan badan *Golgi* untuk diproses lebih lanjut (<http://journals.cambridge.org>).

Pada tahap akhir, vRNP yang baru terbentuk dibawa keluar dari nukleus dan bersama dengan M1 membentuk partikel virus baru. Setelah partikel virus terbentuk, virus baru tersebut dikeluarkan dari sel *host* dengan bantuan *neuraminidase*. Proses ini dikenal dengan nama *budding* (<http://journals.cambridge.org>).

D. Hemagglutinin (HA)



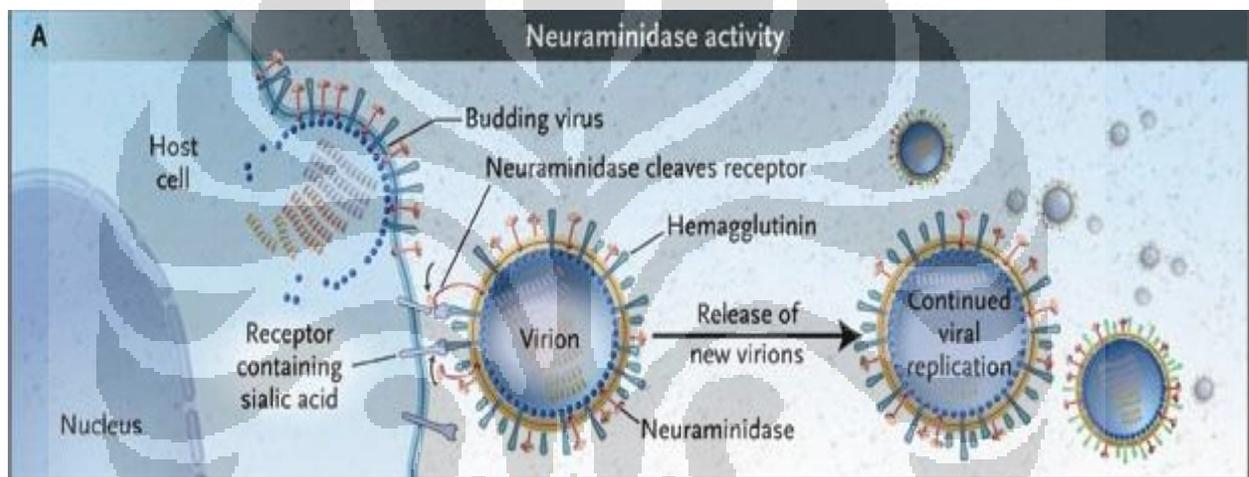
Gambar 5. Struktur *Hemagglutinin*

(Stevens *et al.*, 2006)

Hemagglutinin merupakan antigen utama dari virus influenza, yang terletak pada permukaan virus. *Hemagglutinin* merupakan glikoprotein yang memiliki dua atau tiga

glycosylation site dengan berat molekul sekitar 76.000 dan berfungsi sebagai reseptor dalam pengikatan virus terhadap sel *host*. *Hemagglutinin* akan berikatan dengan *sialic acid* (N-acetyl-neuraminic acid) dan menstimulasi penetrasi materi genetik virus dengan *membrane fusion* (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

E. *Neuraminidase* (NA)

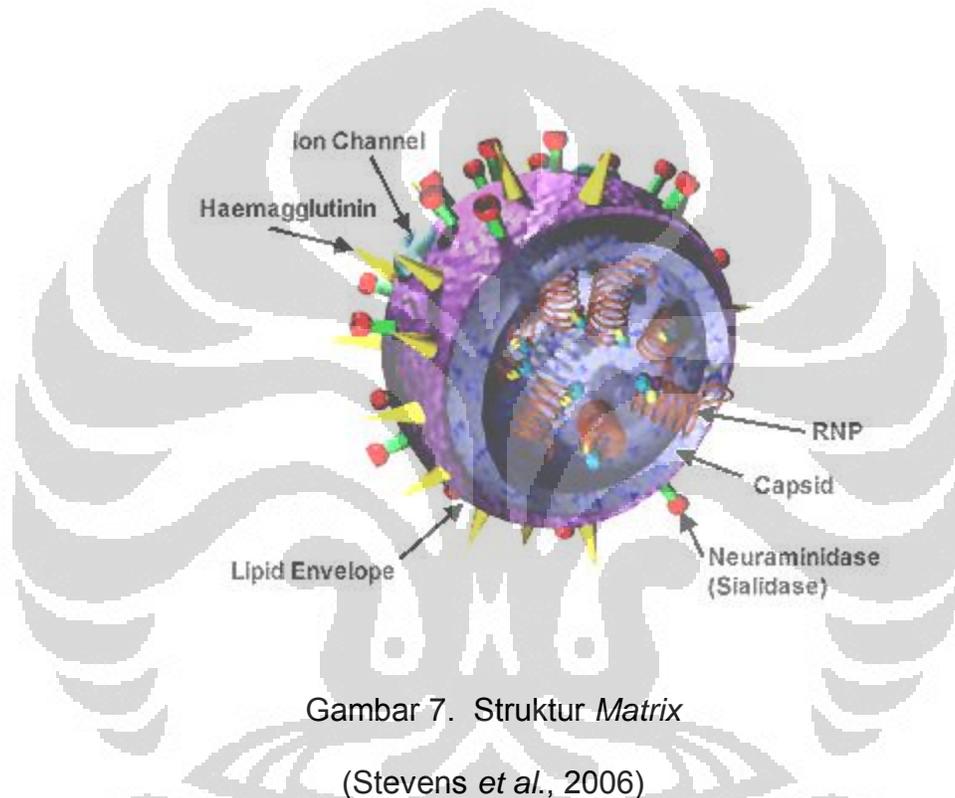


Gambar 6. Struktur *Neuraminidase*
(Stevens *et al.*, 2006)

Neuraminidase merupakan glikoprotein seperti *hemagglutinin* yang berada di permukaan virus membentuk struktur *tetramer* dengan rata-rata berat molekul 220.000 (Kamps, Hoffman and Preiser, 2008). *Neuraminidase* berfungsi sebagai suatu enzim yang dapat menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan *sialic acid* pada rantai ujung oligosakarid-glikoprotein. Fungsi lain dari *neuraminidase* adalah untuk melepaskan partikel virus yang sudah selesai bereplikasi dalam sel *host* dan mencegah virus yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor *sialic acid* melalui tonjolan

hemagglutinin. Oleh karena itu, efisiensi replikasi virus *avian influenza* sangat bergantung pada proses yang dilakukan oleh protein *hemagglutinin* dan *neuraminidase* dari virus (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

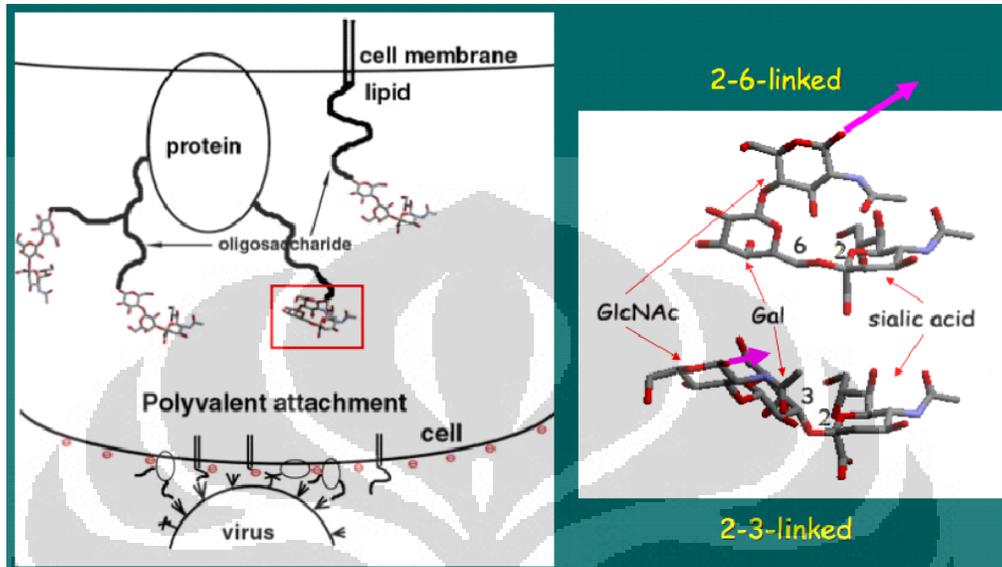
F. *Matrix Protein (M)*



Gambar 7. Struktur *Matrix*
(Stevens *et al.*, 2006)

Protein *matrix* dari virus influenza A terdiri atas dua macam protein yaitu protein *matrix1* (M1) dan protein *matrix2* (M2). Protein *matrix* mempunyai peran dalam penyusunan *virion* virus influenza. Bersama dengan protein *hemagglutinin* dan *neuraminidase*, protein M2 menyusun struktur selubung virus dan berperan sebagai saluran ion. Protein M2 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan untuk mencegah penurunan pH ketika virus berada di dalam sel pada saat proses endositosis (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

G. Reseptor Sel Permukaan pada Saluran Pernapasan



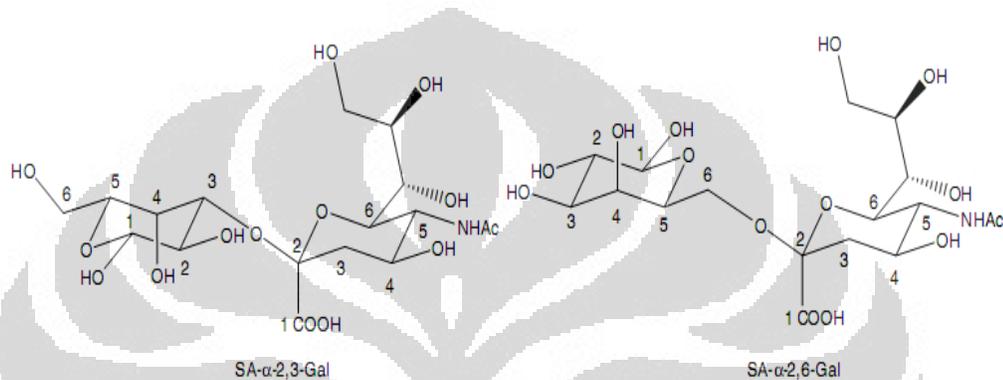
Gambar 8. Reseptor sel permukaan

(Matrosovich, 2004)

Salah satu faktor virus influenza dapat menginfeksi manusia disebabkan adanya kecocokan antara *hemagglutinin* virus dengan reseptor *sialic acid* pada permukaan sel dari *host*. Permukaan sel *host* mengandung gugus terminal *sialyl-galactosyl* Sia(α -2,3)Gal atau Sia(α -2,6)Gal. Sia(α -2,3)Gal merupakan reseptor sel permukaan pada unggas, sedangkan Sia(α -2,6)Gal merupakan reseptor sel permukaan pada manusia (Matrosovich, 2004).

Beberapa penelitian terakhir telah mengungkapkan bahwa manusia mempunyai reseptor sel permukaan Sia(α -2,3)Gal dalam jumlah kecil pada saluran pernapasan bagian bawah. Penemuan ini menjelaskan kemampuan virus *avian influenza* yang mampu menyebabkan infeksi pada manusia meskipun manusia mempunyai reseptor

sel permukaan Sia(α -2,6)Gal. Penemuan lain juga mengungkapkan bahwa ada beberapa unggas tidak hanya memiliki reseptor sel permukaan Sia(α -2,3)Gal tetapi juga memiliki Sia(α -2,6)Gal seperti pada ayam dan burung puyuh. Berbeda dengan ayam dan burung puyuh, bebek hanya memiliki reseptor sel permukaan Sia(α -2,3)Gal (Matrosovich, 2004).



Gambar 9. Struktur Sia(α 2-3)Gal dan Sia(α 2-6)Gal

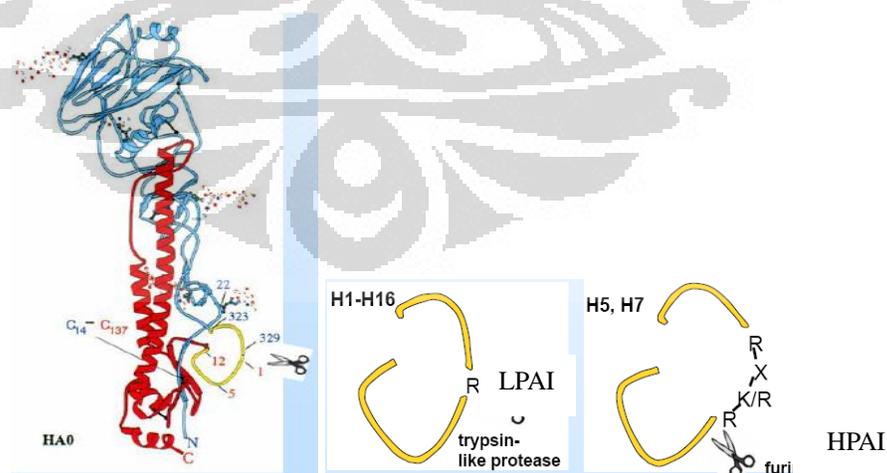
(Minyong Li & Binghe Wang, 2006).

H. Patogenisitas *Avian Influenza* (H5N1)

Pada tahun 1997 virus *avian influenza* tipe H5N1 pertama kali terdeteksi di Hongkong yang menyebabkan infeksi pada manusia sebanyak 18 orang dan 6 orang di antaranya meninggal. Sejak akhir 2003, virus *avian influenza* sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara di 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* juga menyebabkan infeksi pada manusia. Di Indonesia sampai 2009 tercatat 141 orang terinfeksi dan 115 orang di antaranya meninggal dunia (WHO, 2009).

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa selain reseptor Sia(α -2,6)Gal yang mayoritas terdapat pada jaringan trakheobronkhial manusia, juga terdapat sel bersilia yang mengandung reseptor dengan gugus Sia(α -2,3)Gal dalam proporsi yang rendah. Reseptor Sia(α 2-3)Gal juga ditemukan pada pneumosit di saluran respirasi manusia bagian bawah. Keberadaan reseptor ini kemungkinan besar berperan utama pada proses masuknya virus *avian influenza* ke dalam tubuh manusia (Guan *et al.*, 2007).

Virus yang termasuk dalam kelompok HPAI mempunyai *hemagglutinin* yang terdiri dari *polybasic amino acid* pada lokasi pemecahan, sedangkan pada virus LPAI mempunyai *hemagglutinin* yang mengalami kehilangan residu asam amino pada lokasi pemecahan. Hal ini membuat *hemagglutinin* HPAI menjadi sasaran pemecahan *protease* endogen sel *host* seperti furin, sedangkan *hemagglutinin* LPAI tidak menjadi sasaran pemecahan *protease*. Akibatnya virus HPAI termasuk H5N1 dapat menyebar bukan hanya pada sel saluran pernapasan saja dan hal ini akan meningkatkan patogenisitas dari *avian influenza* tersebut (Klenk, 2007).



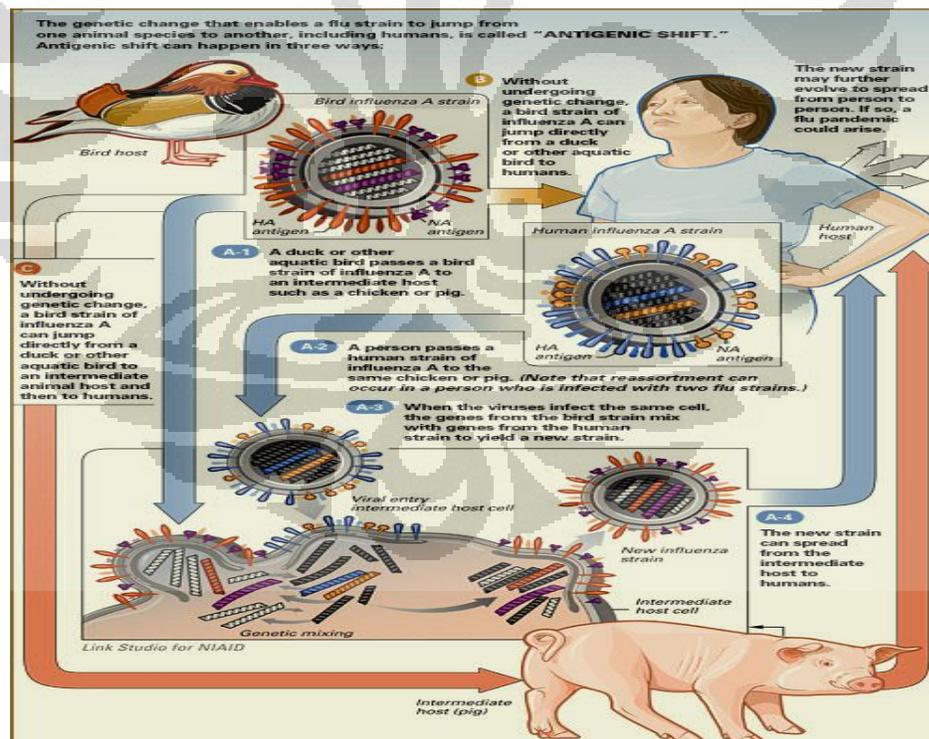
Gambar 10. *Cleavage site Hemagglutinin (HA)*

(Klenk, Hans Dieter. 2007)

Pada daerah pemecahan (*cleavage site*) dari HA HPAI terdapat residu *polybasic amino acid region R-X-K/R-R* (Gambar 10).

Virus *avian influenza* 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, 2006). Mutasi pada sisi antigenik virus *avian influenza* dapat terjadi melalui dua cara yaitu *shift* dan *drift* (Kamps, Hoffman and Preiser, 2006).

I. Antigenik Shift

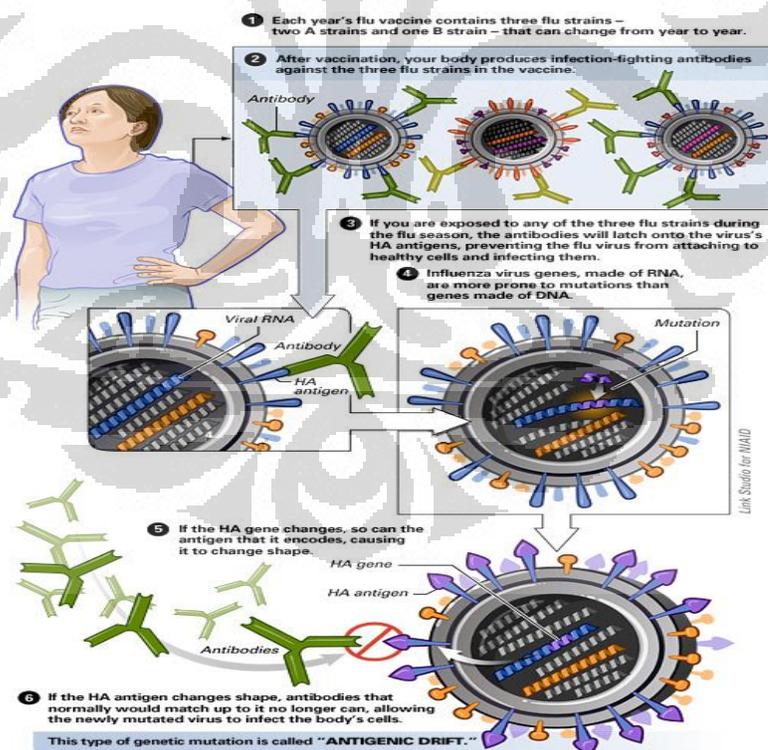


Gambar 11. Antigenik shift

(National Institute of Allergy and Infectious Disease)

Antigenik *shift* merupakan mutasi yang terjadi akibat *gene reassortment* (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada dua atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang berpeluang sebagai genom virus influenza yang baru. Antigenik *shift* terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada genom virus influenza. Sebagai contoh virus dengan *hemagglutinin* sub tipe H1 digantikan dengan sub tipe H5 menghasilkan genom 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 *et al.*, 2007).

J. Antigenik *Drift*



Gambar 12. Antigenik *Drift*

(National Institute of Allergy and Infectious Disease)

Antigenik *drift* terjadi jika terdapat perubahan susunan asam amino ketika virus influenza melakukan *encoding* terhadap genom virus setiap kali virus melakukan replikasi sehingga menghasilkan *strain* virus yang baru. Antigenik *drift* dapat terjadi karena adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada genom dari virus influenza (Guan *et al.*, 2007).

K. Bioinformatika

Bioinformatika merupakan penerapan dari teknologi informasi pada bidang ilmu biologi molekular. Bioinformatika meliputi pengelolaan informasi biologis yang diperoleh dari berbagai penelitian yang menghasilkan data dalam jumlah banyak dan kompleks. Salah satu pemanfaatan bioinformatika adalah dalam melakukan permodelan struktur 3-D dari protein. Permodelan struktur 3-D dari protein ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman akan proses biologis dengan mempertimbangkan hubungan serta pola data biologis (Baxevanis dan Oullete, 2005).

L. *Phylogenetic Tree*

Phylogenetic tree adalah proses untuk mengklasifikasikan makhluk hidup berdasarkan tingkat similaritasnya. Dalam konteks ini, diasumsikan bahwa semakin *similar* 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

di antara mereka. Filogeni bermanfaat untuk merekonstruksi sejarah kehidupan dan menjelaskan diversifitas dari makhluk hidup (Baxevanis dan Ouellette, 2005).

M. Molecular Docking

Dalam *molecular modeling*, *docking* adalah sebuah metode yang memprediksikan kecenderungan dari sebuah molekul ketika berikatan dengan molekul lain untuk membentuk ikatan kompleks yang stabil. *Molecular docking* dapat dianalogikan seperti teori "*induce fit*" yang menjelaskan kecenderungan dari sebuah ligan yang berinteraksi dengan protein tertentu.

Evaluasi energi dapat diselesaikan dengan bantuan *scoring function*. *Scoring function* yang umum biasanya berdasarkan atas *forcefield* yang dirancang untuk mensimulasikan fungsi dari protein. *Forcefield* merupakan fungsi empiris energi potensial permukaan dari suatu protein, didapatkan dengan mengembangkan model melalui kombinasi antara bentuk ikatan (jarak ikatan, sudut ikatan, sudut torsi, dan lain-lain) dan bentuk tanpa ikatan (van der Waals dan elektrostatik) (Kitchen *et al.*, 2004).

Dengan demikian energi total (disebut *force field*) molekul dapat ditentukan oleh hukum Hooke yang secara umum dinyatakan sebagai

$$E_T = E_{str} + E_{bend} + E_{tor} + E_{oop} + E_{vdw} + E_{elec}$$

dengan E_T = energi total molekul, E_{str} = energi *bond stretching*, E_{bend} = energi *angle bending*, E_{tor} = energi torsional, E_{oop} = energi *out-of-plane*, E_{vdw} = energi van der Waals dan E_{elec} = energi elektrostatik (Kitchen *et al.*, 2004).

Hubungan antara enzim dan inhibitor dalam suatu *scoring function* $\Delta G_{\text{binding}}$ dapat dilihat dari persamaan berikut di bawah ini :

$$\Delta G = -RT \ln K_A \qquad K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Berdasarkan interaksi yang terjadi, terdapat beberapa jenis *molecular docking*, yaitu:

1. *Docking* protein-protein
2. *Docking* ligan-protein
3. *Docking* ligan-DNA

Tujuan dari *molecular docking* adalah mendapatkan gambaran afinitas pengikatan kompleks yang terbentuk antara *receptor* dengan *ligand* menggunakan berbagai *score* seperti ΔG° binding, *Konstanta Inhibition*, ikatan hidrogen dan kontak hidrofobik (Kitchen *et al.*, 2004).

N. *Molecular Dynamic*

Molecular dynamic adalah sebuah bentuk simulasi komputer yang menggambarkan atom dan molekul dapat berinteraksi untuk beberapa waktu dan memberikan gambaran dari pergerakan partikel. Simulasi ini digunakan dalam pembelajaran protein dan biomolekular. Dalam *molecular dynamic*, dapat memberikan gambaran dari pergerakan protein dan ligan dalam berinteraksi untuk membentuk ikatan kompleks yang stabil menggunakan teori pendekatan Laplace dan Hamiltonian untuk memprediksikan energi total semua molekul yang

berinteraksi melalui angka (http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_dynamics, 16 November 2009, 01.44 WIB). Dalam *molecular dynamics* terdapat empat model yaitu:

I. *Microcanonical Ensemble* (NVE)

Sistem hanya diisolasi dari perubahan mol (N), volum (V), dan energi (E). Desain ini menggunakan pendekatan secara adiabatik tanpa adanya perubahan panas dalam sistem. Dalam NVE mungkin terlihat sebagai perubahan dari energi potensial dan energi kinetik, dengan energi sistem yang tetap dipertahankan (http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_dynamics, 16 November 2009, 01.44 WIB).

II. *Canonical Ensemble* (NVT)

Dalam *canonical ensemble*, mol (N), volum, (V), dan temperatur (T) tetap dipertahankan. *Canonical ensemble* kadang disebut dengan *constant temperature molecular dynamics* (CTMD). Dalam NVT, pertukaran energi dari proses endotermik dan eksotermik menggunakan suatu *thermostat* (http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_dynamics, 16 November 2009, 01.44 WIB).

III. *Isothermal-Isobaric Ensemble* (NPT)

Dalam *isothermal-isobaric ensemble* mol (N), tekanan, (P), dan temperatur (T) tetap dipertahankan. Dalam NPT, selain *thermostat* digunakan juga suatu *barostat* (untuk menjaga tekanan selalu tetap). Kondisi ini menyerupai kondisi yang sering digunakan di dalam eksperimen laboratorium

(http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_dynamics, 16 November 2009, 01.44

WIB).

IV. *Generalized Ensemble*

Generalized ensemble dibuat untuk memprediksi pergerakan lambat karena adanya ketidakteraturan perputaran dalam sistem. Hal ini disebut juga dengan *parallel tempering*. Formulasi ini dibuat untuk mengendalikan *multiple-minima problem* dengan jalan menukar temperatur *non-interaction replicas* pada sistem yang berlangsung dengan beberapa temperatur

(http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_dynamics, 16 November 2009, 01.44

WIB).

O. *Molecular Operating Environment (MOE)*

Molecular Operating Environment (MOE) merupakan *software* yang dibuat oleh *chemical computing group* untuk membantu *cheminformatics*, *molecular modeling*, *bioinformatics*, *virtual screening*, *structured based design* dan pembuatan aplikasi baru yang berbasis SVL (*Scientific Vector Language*).

(http://www.macresearch.org/review_moe_molecular_operating_environment, 16 November 2009. 22:30 WIB).

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan menggunakan perangkat komputer dan data yang tersedia di database. Data diunduh untuk dianalisis dan diinterpretasikan dengan berbagai *software* yang didukung oleh ketersediaan jaringan internet. Secara garis besar, penelitian ini dilakukan dengan pencarian sekuen, *multiple alignment*, pembuatan pohon filogenetik, prediksi situs pemotongan HA0 oleh furin, pencarian struktur tiga dimensi, *molecular docking* dan *molecular dynamic*.

A. Pencarian dan Pemilihan Sekuen

Sekuen *hemagglutinin*, *neuraminidase*, dan *matrix2* dari subtipe H5N1 diunduh dari Influenza Virus Resource database yang disediakan oleh National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.html>.

B. Multiple Alignment

Multiple alignment dilakukan dengan menggunakan program ClustaW yang disediakan secara *online* dengan mengakses www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html. Hasil *alignment* tersebut diinterpretasikan untuk mengetahui posisi asam amino yang berbeda pada *Region Receptor Binding Domain* antara virus H5N1 dari Indonesia

dengan virus H5N1 dari negara lain. Hasil dari *alignment* ini akan digunakan untuk analisa mutasi dari virus H5N1 di Indonesia.

C. 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.

D. 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 melalui prediksi menggunakan server online pro-protein (furin) yang dapat diakses melalui website <http://cbs.dtu.dk/services/ProP>.

E. Pencarian Struktur 3-D

Pencarian dilakukan dengan menggunakan Swiss-Model *homology modeling server* untuk mendapatkan struktur 3-D dari virus H5N1. Struktur tiga dimensi yang dipilih adalah yang mempunyai kesamaan sekuen mendekati 100 % terhadap sekuen dari virus yang dimiliki. Hasil yang diperoleh berupa file dalam bentuk PDB, dan

ditampilkan dengan menggunakan program *Molecular Operating Environment*.

F. Molecular Docking

Terhadap struktur tiga dimensi dari protein dilakukan *molecular docking* terhadap *ligand*. Sebelum dilakukan *molecular docking*, terlebih dahulu dilakukan preparasi awal terhadap struktur protein dan struktur ligan. Preparasi yang dilakukan adalah penghapusan molekul air, penambahan atom hidrogen, penghitungan *charges* dan proses minimasi (metode MMFF94x) menggunakan *software Molecular Operating Environment* (MOE 2008.10). Program yang digunakan untuk melakukan *molecular docking* MOE 2008.10. Parameter yang digunakan untuk menganalisis kompleks yang terjadi antara protein dan ligan adalah nilai ΔG° *binding* dan *Konstanta Inhibition*.

G. Molecular Dynamics

Simulasi *molecular dynamics* antara *ligand* dengan protein dilakukan setelah *molecular docking* dengan menggunakan *software* MOE 2008.10. Sebelum dilakukan *molecular dynamic*, terlebih dahulu dilakukan preparasi protein seperti pada *molecular docking*, kemudian menyisipkan *ligand* agar terbentuk kompleks protein-ligan. Kemudian kompleks diminimisasi dengan *force field* MMFF94x dan solvasi dalam bentuk *Born*. Parameter yang digunakan sesuai dengan *default* pada MOE yaitu *ensemble* NVT (N, jumlah atom; V, volume; T, temperatur) dengan algoritma NPA. Simulasi dinamik ini dilakukan dengan perangkat komputer yang menggunakan *operating system* Microsoft Windows XP.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pencarian Sekuen *hemagglutinin*, *neuraminidase*, dan *matrix2*

Sekuen protein *hemagglutinin* (HA), *neuraminidase* (NA), dan *matrix2* (M2) dari virus influenza A yang digunakan adalah sekuen yang berasal dari subtipe H5N1. Pemilihan subtipe H5N1 karena subtipe ini telah menyebabkan wabah *avian influenza* di berbagai negara termasuk Indonesia dari tahun 2003-2007 dan virus subtipe H5N1 dari Indonesia memiliki tingkat patogenisitas yang paling tinggi.

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 virus influenza A dengan subtipe H5N1HPAI yang berasal dari *host* manusia dan H5N1 LPAI yang berasal dari *host avian*. Sekuen subtipe H5N1 HPAI dipilih berasal dari HongKong, China, Vietnam, Thailand, Laos, dan Indonesia. Sedangkan subtipe H5N1 LPAI dipilih berasal dari Amerika dan Kanada. Sekuen protein yang diambil adalah sekuen *full length* dari HA, NA, dan M2 dengan tujuan memudahkan dalam analisis selanjutnya (Tabel 1).

Subtipe	Jumlah sekuens yang diambil		
	HA	NA	M2
HPAI H5N1	34	34	30
LPAI H5N1	4	3	4

Tabel 1. Jumlah Sekuen Protein Influenza A yang Diperoleh

Data sekuen yang ditampilkan berupa format GBFF yang terdiri atas *header*, *feature*, dan sekuen protein. Untuk analisis selanjutnya dengan menggunakan *software* maupun server yang digunakan dalam penelitian memerlukan input file dalam format FASTA yang terdiri dari *definition line* dan sekuen asam amino menggunakan kode satu huruf. Oleh karena itu, format *file* terlebih dahulu dirubah menjadi format FASTA sebelum diunduh (Lampiran 2,3, dan 4).

B. Multiple Sequence Alignment

Sekuen HA, NA, dan M2 yang telah diperoleh dalam format FASTA, dilakukan *Multiple Sequence Alignment* menggunakan program ClustalW2 yang diakses secara online melalui website <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Program ini akan menjajarkan susunan asam amino sehingga dapat dianalisis mutasi yang terjadi pada sekuen HA, NA, dan M2 virus HPAI H5N1 Indonesia pada kasus terakhir yang dilaporkan ke WHO (A/Indonesia/CDC1047/2007) dengan sekuens HPAI H5N1 yang sudah dikristalkan oleh *protein data bank* (PDB). Analisis mutasi yang dilakukan hanya

dibatasi pada asam amino yang berperan dalam *active site*, karena hal ini menjadi penentu proses masuknya virus ke dalam tubuh sel *host*. *Active site* pada HA dan NA berperan dalam pengikatan terhadap reseptor Sia (α -2,6) Gal, sedangkan pada M2 berperan sebagai *ion proton channel* dan sekaligus menjadi target inhibisi dari obat *amantadine* dan *rimantadine*. Posisi *receptor binding site* pada HA berada pada posisi 190, 225, 226, dan 228; pada NA berada pada posisi 118, 152, 276, 292, dan 371; dan pada M2 berada pada posisi 27, 30, 31, 34, 37, dan 41.

Dari hasil *alignment* HA virus H5N1 Indonesia dengan HA dari PDB (2FK0) terlihat adanya mutasi dari virus H5N1 Indonesia pada posisi *receptor binding site* yaitu E190 → V190, G225 → L225, Q226 → V226, G228 → K228. Pada posisi 190 dan 226 terlihat adanya perubahan asam amino yang bersifat hidrofilik menjadi hidrofobik. Sedangkan pada posisi 225 dan 228 perubahan asam aminonya tetap memiliki sifat hidrofobik (Lampiran 5).

Sekuen	Posisi			
	190	225	226	228
<i>Hemagglutinin</i>				
H5N1 Indonesia	V	L	V	K
H5N1 PDB	E	G	Q	G

Tabel 2. Hasil analisis *sequence alignment* HA

Sekuen	Posisi				
	118	152	276	292	371
<i>Neuraminidase</i>					
H5N1 Indonesia	A	S	W	Y	G
H5N1 PDB	R	R	E	R	R

Tabel 3. Hasil analisis *sequence alignment* NA

Dari hasil *alignment* NA virus H5N1 di Indonesia dengan NA dari PDB (2HU0), terlihat adanya mutasi dari virus H5N1 pada posisi *receptor binding site* yaitu R118 → A118, R152 → S152, E276 → W276, R292 → Y292, R371 → G371. Pada posisi 118, 276, 292, dan 371 terlihat adanya perubahan asam amino yang bersifat hidrofilik menjadi hidrofobik. Sedangkan pada posisi 152 perubahan asam aminonya tetap memiliki sifat hidrofilik (Lampiran 5).

Sekuen <i>Matrix2</i>	Posisi					
	27	30	31	34	37	41
H5N1 Indonesia	A	A	N	G	H	W
H5N1 PDB	V	A	N	G	H	W

Tabel 4. Hasil analisis *sequence alignment* M2

Dari hasil *alignment* M2 virus H5N1 di Indonesia dengan M2 dari PDB (2KIH), terlihat adanya mutasi dari virus H5N1 pada posisi *active site* yaitu V27 → A27. Pada posisi 27 perubahan asam amino yang terjadi tetap memiliki sifat hidrofobik. Asam amino pada posisi 30, 34, dan 41 memiliki sifat hidrofobik, sedangkan pada posisi 31 dan 37 memiliki sifat hidrofilik (Lampiran 5).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa perubahan sifat asam amino pada HA dan NA dari hidrofilik menjadi hidrofobik mengakibatkan HA dan NA mendapatkan konformasi yang lebih stabil ketika berikatan dengan *sialic acid*. Hal inilah yang membuat tingkat patogenisitas dari virus H5N1 di Indonesia meningkat.

Selain dilakukan *alignment* antara H5N1 Indonesia dengan H5N1 PDB, proses *alignment* juga dilakukan terhadap seluruh sekuen yang telah dipilih. Hasil *alignment* ini akan digunakan untuk proses penggambaran pohon filogenetik.

C. Pembuatan Pohon Filogenetik (*Phylogenetic Tree*)

Hasil dari *alignment* sebelumnya kemudian digunakan untuk membuat pohon filogenetik sehingga dapat diketahui hubungan kekerabatan antara HPAI H5N1 dari Indonesia dengan HPAI H5N1 dari negara lain.

Dari hasil pohon filogenetik yang dibuat dengan menggunakan program *CLC Main Workbench 5.0* didapatkan bahwa HPAI H5N1 yang merupakan *strain* dengan patogenitas tinggi berada pada cabang yang berdekatan dengan HPAI H5N1 dari negara lain sehingga dapat disimpulkan bahwa mereka memiliki kekerabatan yang dekat.

Dari gambar pohon filogenetik, terlihat pula bahwa sekuen HA, NA, dan M2 dari virus H5N1 Indonesia memiliki kekerabatan yang dekat dengan virus H5N1 dari negara lain yang tergolong HPAI dan memiliki kekerabatan yang jauh dengan virus LPAI H5N1 (Lampiran 6,7, dan 8).

D. Prediksi Situs Pemotongan HA0 oleh pro-Protein (Furin)

Protein HA berguna dalam proses pelekatan dengan reseptor *sialic acid* pada sel *host*, setelah melalui aktivasi proteolitik dari HA prekursor berubah 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* golongan *Low Pathogenicity* memiliki satu residu arginin

pada daerah pemecahan sehingga hanya dipotong oleh *protease* ekstraselular seperti tripsin. Hal ini membuat infeksi virus menjadi secara lokal saja pada sel *host* (Klenk *et al.*, 2007), sedangkan virus *avian influenza* golongan *Highly Pathogenic* memiliki *polybasic amino acid* sehingga dapat dipotong oleh *protease* intraselular seperti furin. Hal ini membuat infeksi virus dapat menyebar luas secara sistemik ke seluruh jaringan sel *host* (Klenk *et al.*, 2007).

Sample	<i>Furin-type Cleavage Site Prediction</i>
A/Indonesia/CDC1047/2007 (H5N1)	ESRRKKR GL (346)
A/HongKong/482/97 (H5N1)	ERRRKKR GL (346)
A/Shanghai/1/2006 (H5N1)	RERRRKR GL (345)
A/mallard/ON/499/2005 (H5N1)	none

Tabel 5. Hasil Pemotongan HA oleh furin

Dari hasil server *online* pro-protein (furin) yang dapat diakses melalui website <http://cbs.dtu.dk/services/ProP> terlihat bahwa virus A/Indonesia/CDC1047/2007 telah memiliki pola R-X-K/R-R yang serupa dengan yang dimiliki oleh A/Hongkong/482/97, sehingga termasuk ke dalam golongan *Highly Pathogenic*.

E. Pencarian Struktur 3-D Protein *Hemagglutinin*, *Neuraminidase*, dan *Matrix2*

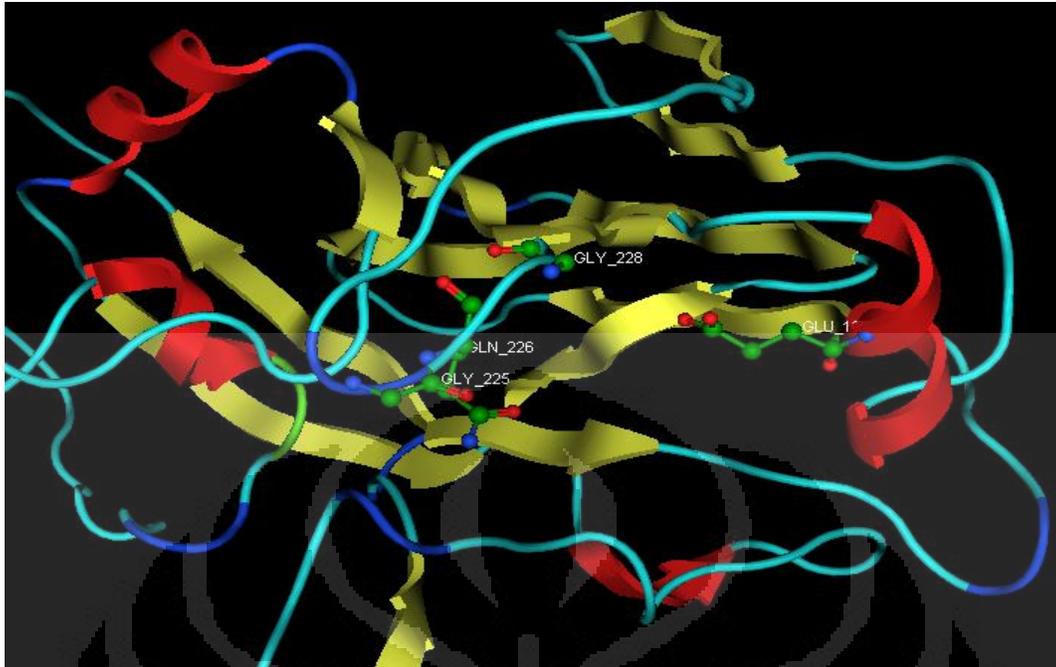
Pencarian struktur 3-D dilakukan melalui server yang diakses melalui <http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=search/index.html>. Pada server ini, pencarian struktur 3-D dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti memasukkan kode *input* PDB, berdasarkan nama protein, atau membandingkan sekuen input terhadap database. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah melakukan *homology modeling* pada *hemagglutinin*, *neuraminidase*, dan *matrix2* dari virus H5N1 Indonesia dengan menggunakan server *SWISS-MODEL Workspace*. Proses ini dilakukan dengan memasukkan input *file* sekuen yang ingin dicari struktur 3-D nya dalam format FASTA dengan bantuan fitur *automated mode*.

Struktur tiga dimensi yang dicari harus memiliki kesamaan sekuen asam amino 100% terhadap sekuen input. *File* hasil struktur 3-D dapat diunduh dalam format PDB.

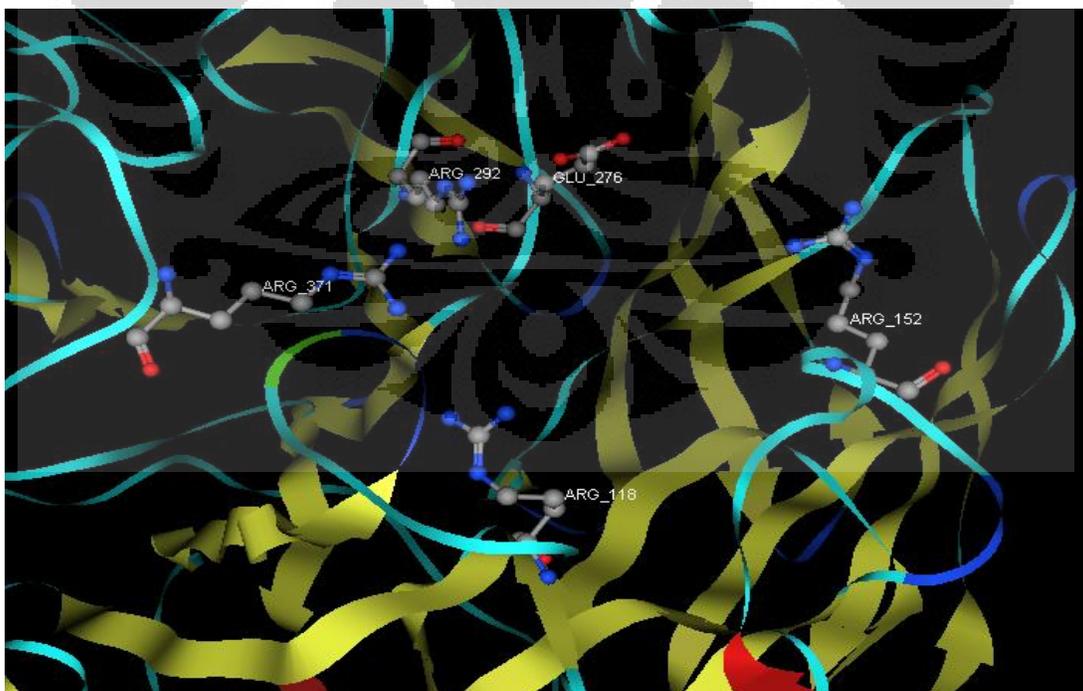
Protein	Kode PDB		
	HA	NA	M2
H5N1 Indonesia	2ibx (chain e)	2hty (chain f)	2rlf (chain c)
H5N1 PDB	2fk0 (chain a)	2hu0 (chain a)	2kih (chain a)

Tabel 6. Hasil Pencarian Struktur 3-D

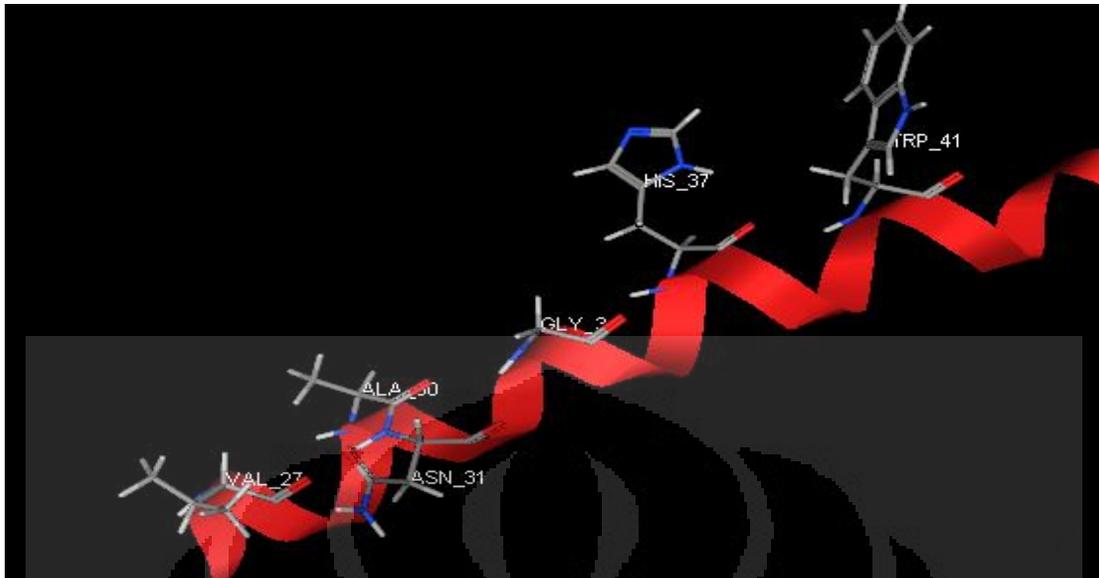
Dari hasil pencarian struktur 3-D protein virus, selanjutnya dilakukan visualisasi pada sisi aktif dari protein virus H5N1.



Gambar 13. Sisi aktif HA



Gambar 14. Sisi aktif NA



Gambar 15. Sisi aktif M2

F. *Molecular Docking*

Struktur 3-D yang telah *download* kemudian dilakukan simulasi *molecular docking* terhadap ligan Sia(α -2,6)Gal. Simulasi *molecular docking* menggunakan *software* MOE-*dock* 2008.10. Untuk struktur ligan, digambar menggunakan *software* MOE 2008.10 pada fitur *builder*. Sebelum melakukan *molecular docking*, ligan digambar dan dipreparasi terlebih dahulu. Preparasi ligan yang dilakukan menggunakan fungsi *wash* dan *forcefield* MMFF94x dengan solvasi gas. Perbaikan terhadap *partial charge* dan atom hidrogen juga dilakukan yang bertujuan untuk mendapatkan keadaan optimum dari ligan. Setelah preparasi ligan selesai, preparasi terhadap struktur 3-D HA, NA, dan M2 juga dilakukan. Hal ini juga memiliki tujuan untuk mendapatkan keadaan optimum dari protein HA, NA, dan M2.

Setelah semua preparasi ligan dan protein selesai, proses *docking* mulai

dijalankan. *Placement method* yang digunakan adalah *triangle matcher* yang merupakan *default* parameter MOE dengan *poses* 2500000. Poses ini menggambarkan jumlah maksimum evaluasi pose konformasi ligan. Metode *Triangle matcher* melakukan proses random terhadap pose ligan pada sisi aktif untuk menentukan orientasi ikatan yang optimal. Perhitungan energi bebas ikatan dari orientasi ini menggunakan fungsi *scoring* London dG dengan *retain* 30 tanpa duplikasi. Fungsi *scoring* London dG mengestimasi energi bebas ikatan dari pose ligan berdasarkan perhitungan

$$\Delta G = c + E_{flex} + \sum_{h-bonds} c_{HB} f_{HB} + \sum_{m-lig} c_M f_M + \sum_{atoms\ i} \Delta D_i$$

Pengaturan *retain* 30 dilakukan berdasarkan *default* dari *software* MOE 2008.10. *Retain* dilakukan untuk mengatur jumlah konformasi ligan terbaik yang akan ditampilkan.

Hasil pose ligan dari tahap *placement* diperbaiki lebih lanjut pada tahap *refinement*. *Refinement* berupa *force field* menggunakan *Generalized Born solvation model* (GB/VI) pada tahap evaluasi akhir dari energi. *Refinement* menggunakan *force field* lebih akurat dibandingkan dengan *GridMin* yang menggunakan kalkulasi elektrostatik pada proses minimisasi. Pengaturan *default* dari *refinement force field* menggunakan *pocket cut off* 6Å, yaitu jarak reseptor yang diikutsertakan pada proses *docking*. *Retain* terakhir diatur 10, dengan tujuan untuk mendapatkan konformasi yang sesuai dengan paling optimal.

Hasil simulasi *docking* merupakan fungsi *scoring* yang menggambarkan energi

bebas pengikatan $\Delta G_{binding}$ dalam kkal/mol (S). Harga S ini menunjukkan total score akhir dari tahapan *docking*, hal ini dapat terlihat bahwa nilai S sama dengan E_refine. E_refine ini merupakan total dari perhitungan Energi yang lainnya.

$$E(x) = E_{str} + E_{ang} + E_{stb} + E_{oop} + E_{tor} + E_{vdw} + E_{ele} + E_{sol} + E_{res}$$

Hasil data kemudian di urutkan berdasarkan harga S terendah hingga terbesar.

$\Delta G_{binding}$ menggambarkan kuat ikatan antara protein dengan ligan. Semakin rendah harga $\Delta G_{binding}$ maka ikatan kompleks protein-ligan akan semakin kuat. Hal ini didasarkan pada persamaan

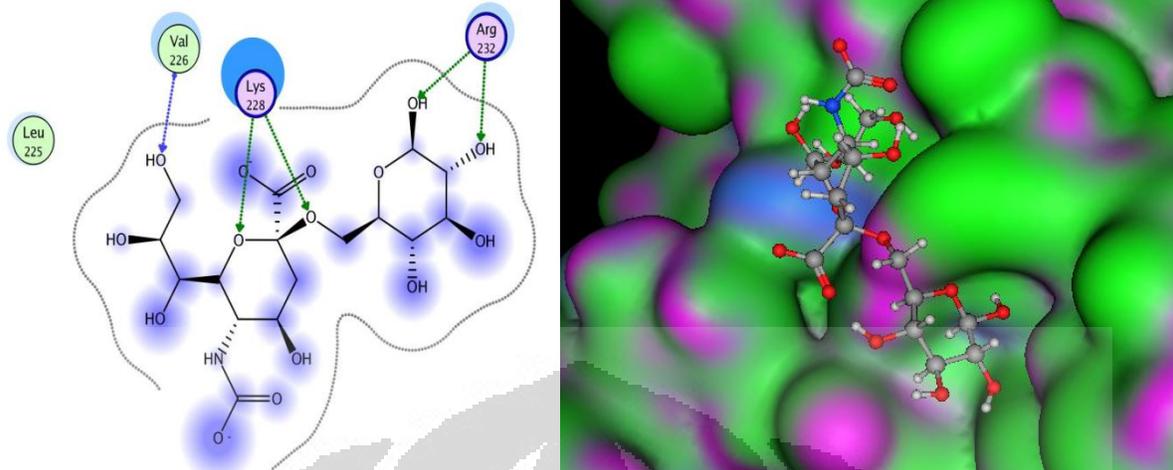
$$\Delta G = -RT \ln K_A \qquad K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Dari hasil simulasi *docking* diperoleh data sebagai berikut

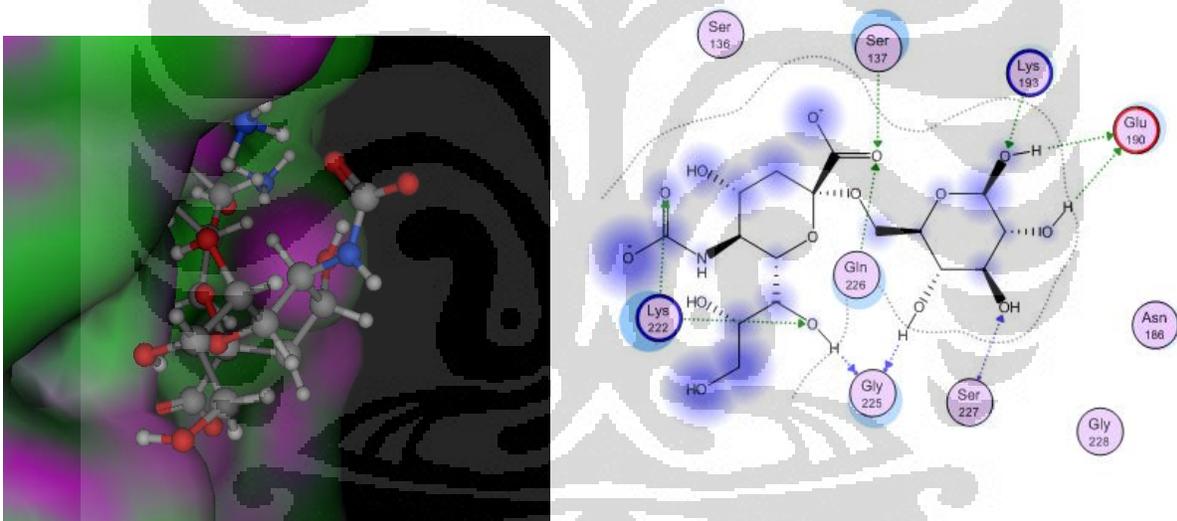
HA	S (kkal/mol)	pKi	Ki
2ibx (Indonesia)	-9.2200	6.72	0.19 μ M
2fk0 (PDB)	-8.4613	6.16	0.69 μ M

Tabel 7. Data *docking* HA dengan α -2,6 sialic acid

Berdasarkan data S di atas, terlihat bahwa HA virus H5N1 Indonesia memiliki afinitas pengikatan terhadap *sialic acid* yang lebih tinggi. Hal ini didukung dengan visualisasi simulasi *docking* HA dari 2IBX dan 2FK0.



Gambar 16. Visualisasi *docking* 2IBX terhadap *sialic acid*

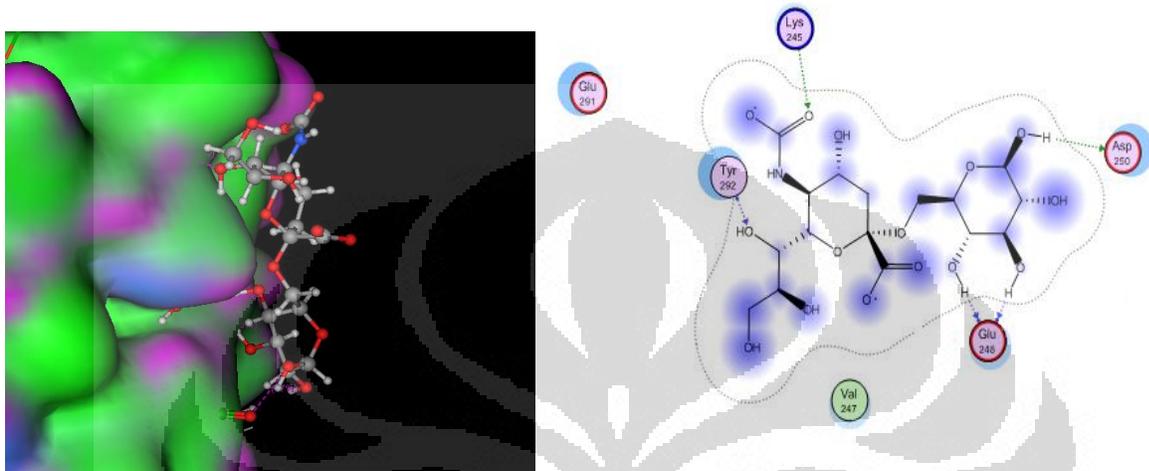


Gambar 17. Visualisasi *docking* 2FK0 terhadap *sialic acid*

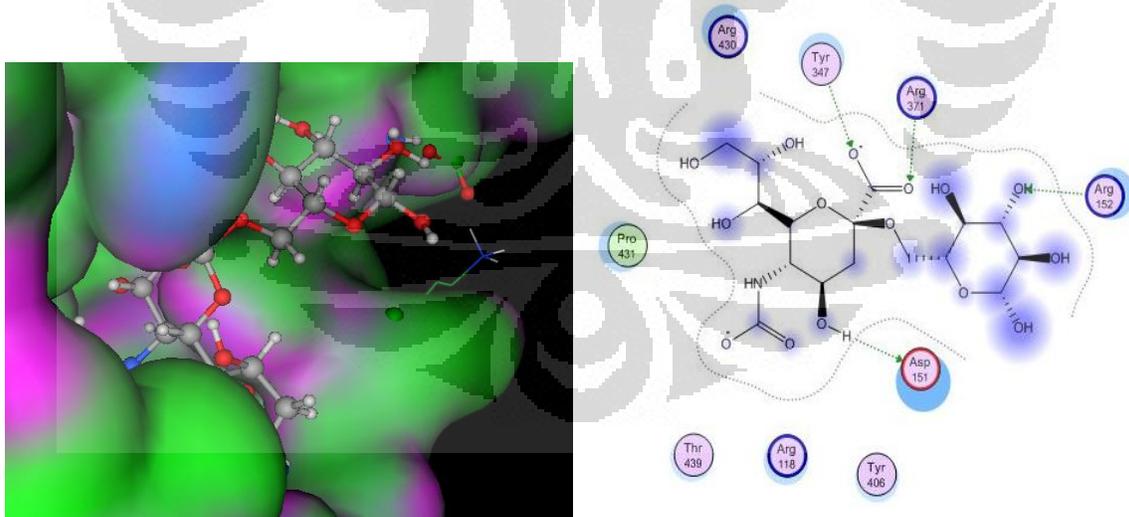
NA	S (kkal/mol)	pKi	Ki
2hty (Indonesia)	-9.1216	6.64	0.23 μM
2hu0 (PDB)	-7.8524	5.72	1.89 μM

Tabel 8. Data *docking* NA dengan α -2,6 *sialic acid*

Berdasarkan data S di atas, terlihat bahwa NA virus H5N1 Indonesia memiliki afinitas pengikatan terhadap *sialic acid* yang lebih tinggi. Hal ini didukung dengan visualisasi simulasi *docking* NA dari 2HTY dan 2HU0.



Gambar 18. Visualisasi *docking* 2HTY terhadap *sialic acid*

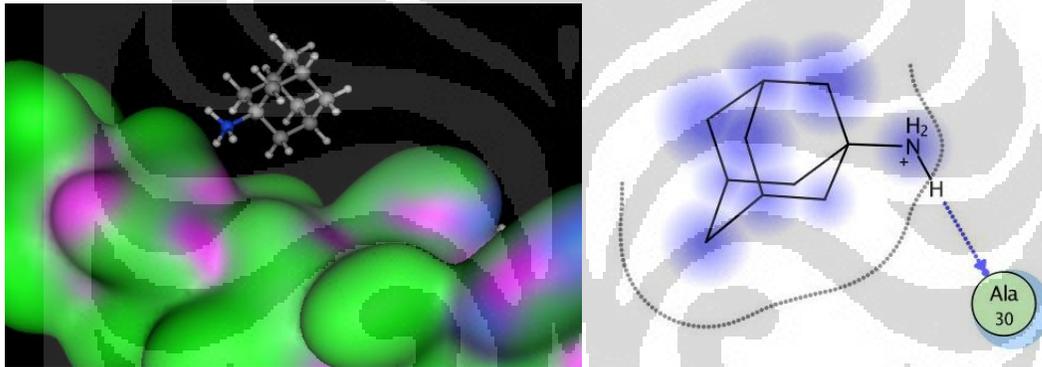


Gambar 19. Visualisasi *docking* 2HU0 terhadap *sialic acid*

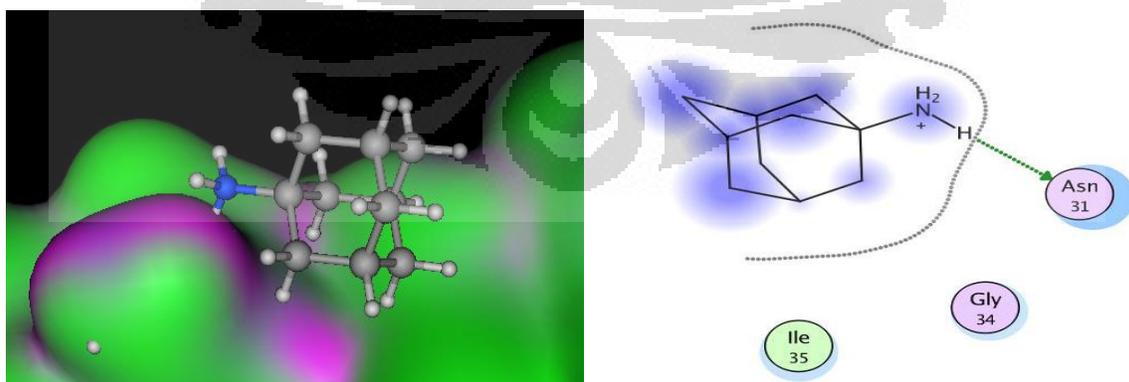
M2	S (kkal/mol)	pKi	Ki
2rf (Indonesia)	-2.8202	2.05	8.79 mM
2kih (PDB)	-5.4129	3.94	0.11 mM

Tabel 9. Data *docking* M2 dengan *amantadine*

Berdasarkan data S di atas, terlihat bahwa M2 virus H5N1 Indonesia memiliki afinitas pengikatan terhadap *amantadine* yang lebih rendah. Hal ini didukung dengan visualisasi simulasi *docking* NA dari 2RLF dan 2KIH



Gambar 20. Visualisasi simulasi *docking* 2RLF terhadap *amantadine*

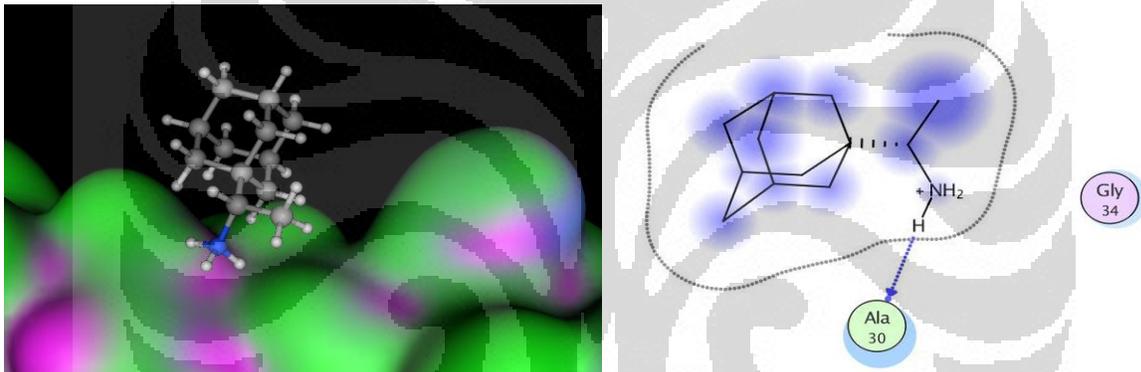


Gambar 21. Visualisasi simulasi *docking* 2KIH terhadap *amantadine*

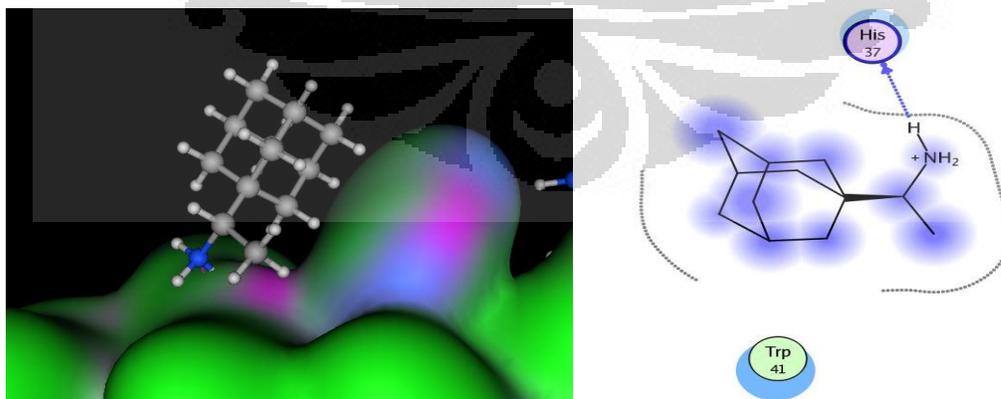
M2	S (kkal/mol)	pKi	Ki
2rf (Indonesia)	-4.6186	3.36	0.42 mM
2kih (PDB)	-5.1680	3.76	0.17 mM

Tabel 10. Data *docking* M2 dengan *rimantadine*

Berdasarkan data S di atas, terlihat bahwa M2 virus H5N1 Indonesia memiliki afinitas pengikatan terhadap *rimantadine* yang lebih rendah. Hal ini didukung dengan visualisasi simulasi *docking* NA dari 2RLF dan 2KIH.



Gambar 22. Visualisasi simulasi *docking* 2RLF dengan *rimantadine*



Gambar 23. Visualisasi simulasi *docking* 2KIH dengan *rimantadine*

Data visual yang didapat dari simulasi *docking* ini, terlihat bahwa HA dan NA dari virus H5N1 Indonesia berikatan lebih baik dibandingkan dengan virus H5N1 yang telah dikristalkan sebelumnya oleh PDB. Hal ini menunjukkan bahwa efisiensi dari virus H5N1 Indonesia dalam melakukan infeksi terhadap manusia jauh lebih efektif dibandingkan virus H5N1 lainnya sehingga membuat tingkat patogenisitas virus H5N1 Indonesia lebih tinggi dibandingkan virus H5N1 lainnya.

Demikian pula, data visual dari simulasi *docking* M2 terhadap obat *rimantadine* dan *amantadine*, terlihat bahwa virus H5N1 Indonesia menunjukkan kekebalan / resistensi terhadap kedua jenis obat tersebut dibandingkan dengan virus H5N1 yang telah dikristalkan oleh PDB. Hal ini membuat penanggulangan infeksi virus H5N1 menjadi semakin sulit untuk diatasi.

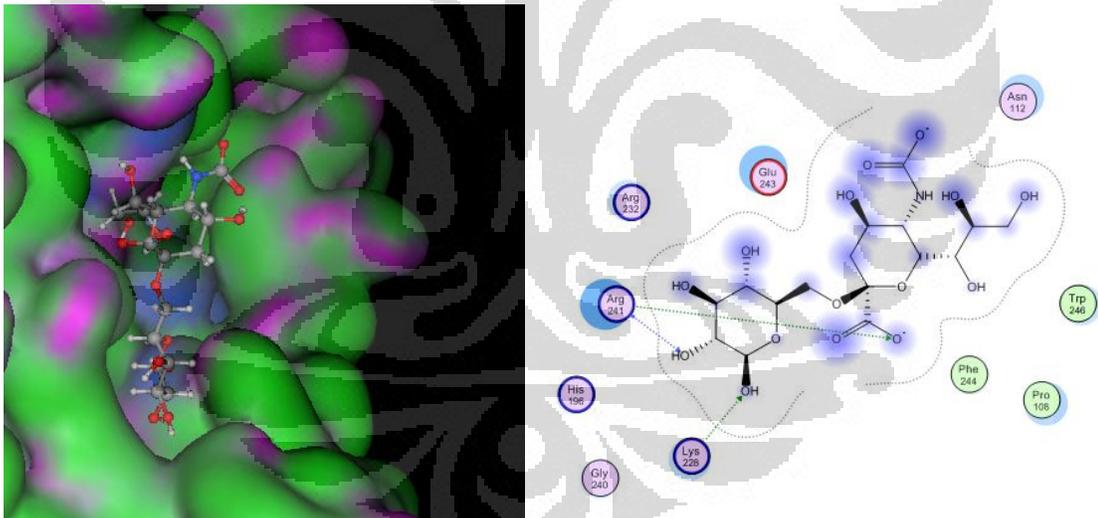
G. Molecular Dynamic

Molecular dynamic terhadap HA, NA dan M2 dari virus H5N1 Indonesia dan struktur kristal dari virus H5N1 yang ada di *Protein Data Bank* dilakukan untuk memvalidasi interaksi antara protein dengan ligan. Proses simulasi *dynamic* yang dilakukan baru pada tahap inialisasi. Kompleks protein-ligan yang akan digunakan dilakukan optimasi *partial charges* dan minimisasi terlebih dahulu dengan *force field* MMFF94x. Berbeda dengan simulasi *docking* yang menggunakan solvasi *gas phase*, simulasi *dynamics* menggunakan solvasi *Born*. Solvasi *Born* ini menggunakan perhitungan *Esol* pada sistem. Pada proses ini simulasi dilakukan dengan

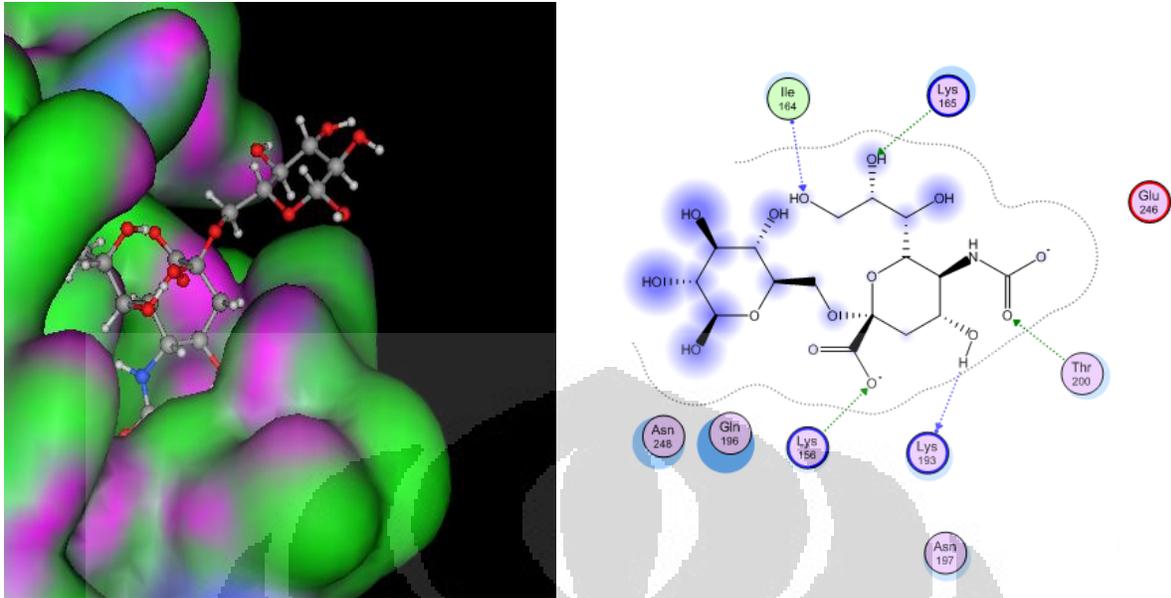
menggunakan pelarut.

Spesifikasi statistik yang akan digunakan pada simulasi untuk menghasilkan konformasi, diatur pada *ensemble*. *Ensemble* yang digunakan sesuai dengan *default* pada MOE yaitu *ensemble* NVT (N, jumlah atom; V, volume; T, temperatur) dengan temperatur konstan 300K dan tekanan 101kPa serta menggunakan algoritma NPA (*Nosé-Poincaré-Anderson*) yang dapat mengatur *ensemble* secara tepat. Hasil *position*, *velocity* dan *acceleration* disimpan setiap 0,5 piko detik.

Hasil simulasi *dynamic* merupakan pergerakan kompleks protein-ligan setiap 0,5 piko detik sampai 100 piko detik. Analisis simulasi *dynamics* dilakukan dengan melihat interaksi kompleks protein-ligan antara atom ligan dengan atom-atom protein.

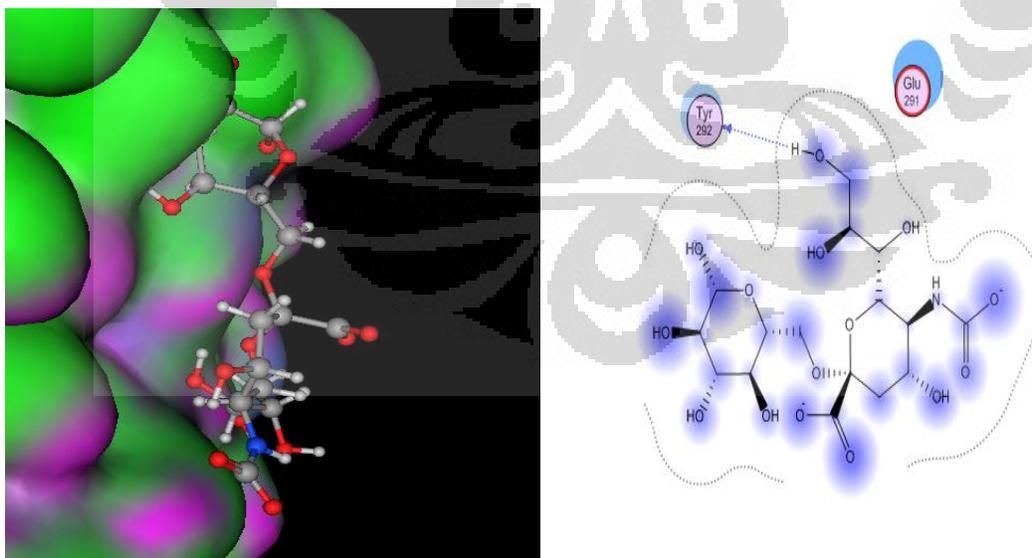


Gambar 24. Visualisasi *dynamic* 2IBX terhadap *sialic acid*

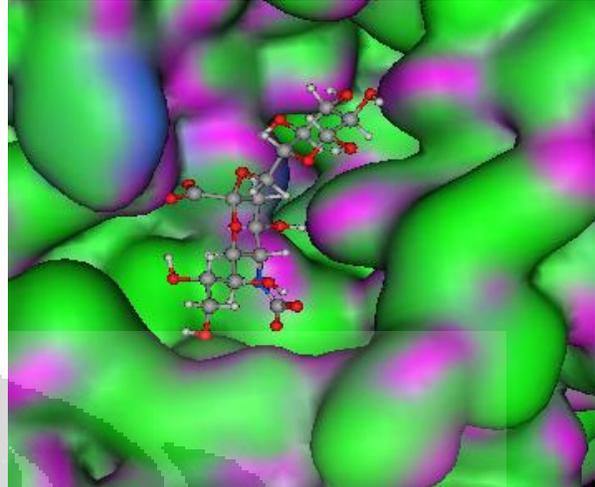
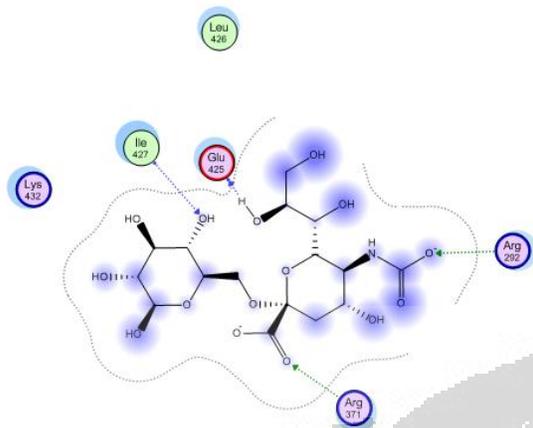


Gambar 25. Visualisasi *dynamic* 2FK0 terhadap *sialic acid*

Dari data visual yang diperoleh, terlihat bahwa *sialic acid* masih tetap berikatan dengan *active site* dari HA virus H5N1 Indonesia. Sementara pada virus H5N1 PDB terlihat *sialic acid* terlihat berikatan dengan *hemagglutinin* virus, tetapi tidak berikatan pada posisi *receptor binding site*.

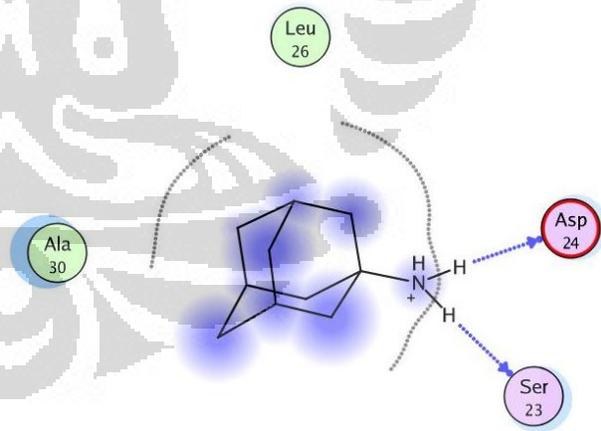
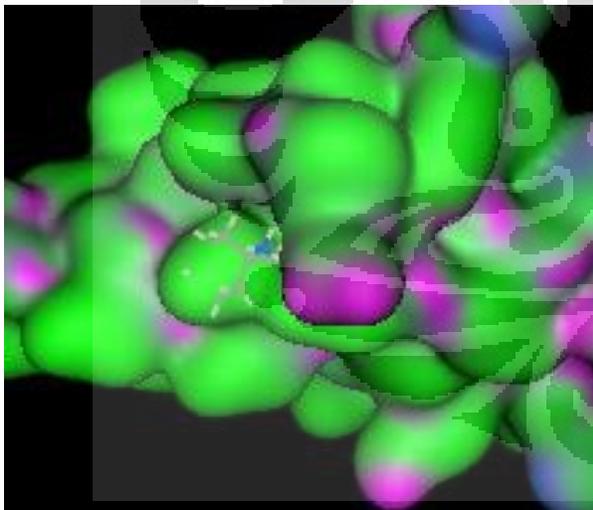


Gambar 26. Visualisasi simulasi *dynamic* 2HTY terhadap *sialic acid*

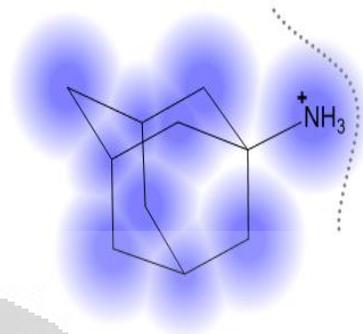
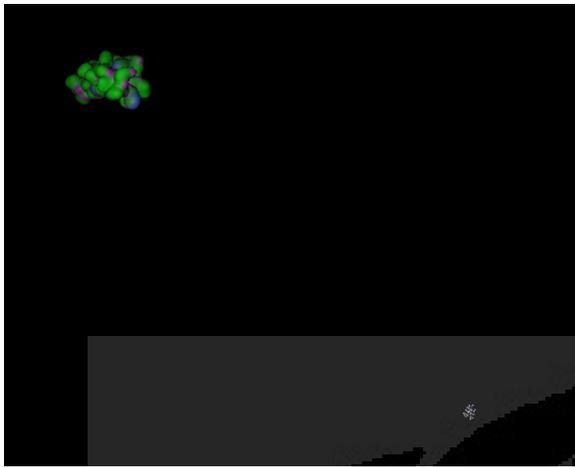


Gambar 27. Visualisasi simulasi *dynamic* 2HU0 terhadap *sialic acid*

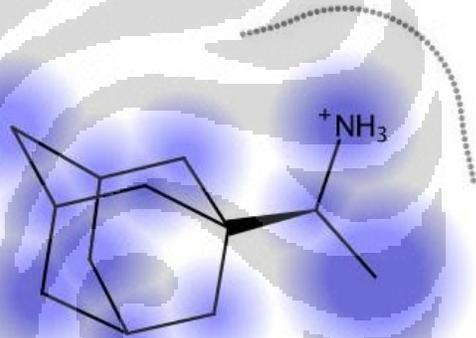
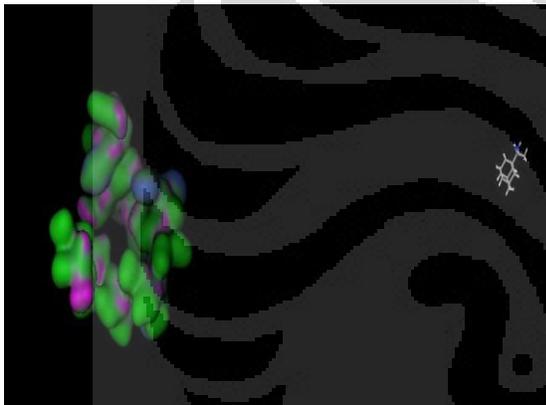
Dari data visual yang diperoleh, terlihat bahwa *sialic acid* masih tetap berikatan dengan *active site* dari NA virus H5N1 Indonesia. Sementara pada virus H5N1 PDB terlihat *sialic acid* terlihat berikatan dengan *neuraminidase* virus.



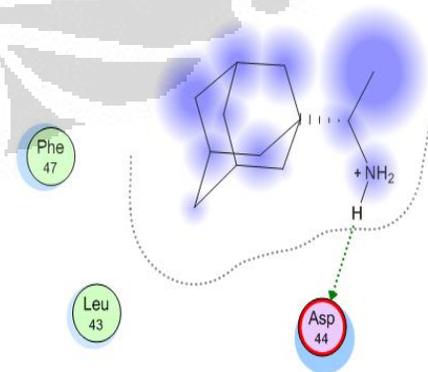
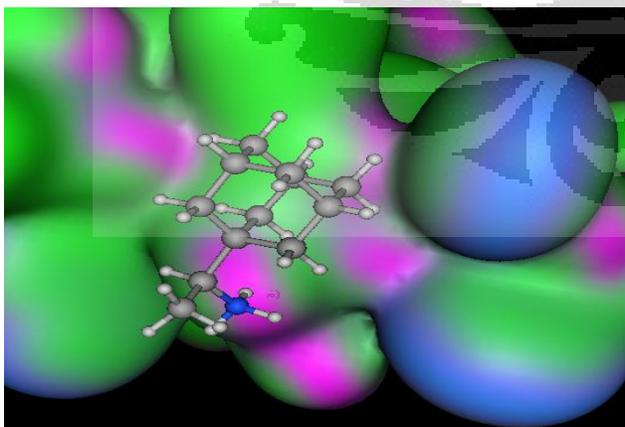
Gambar 28. Visualisasi simulasi *dynamic* 2RLF dengan *amantadine*



Gambar 29. Visualisasi simulasi *dynamic* 2KIH dengan *amantadine*

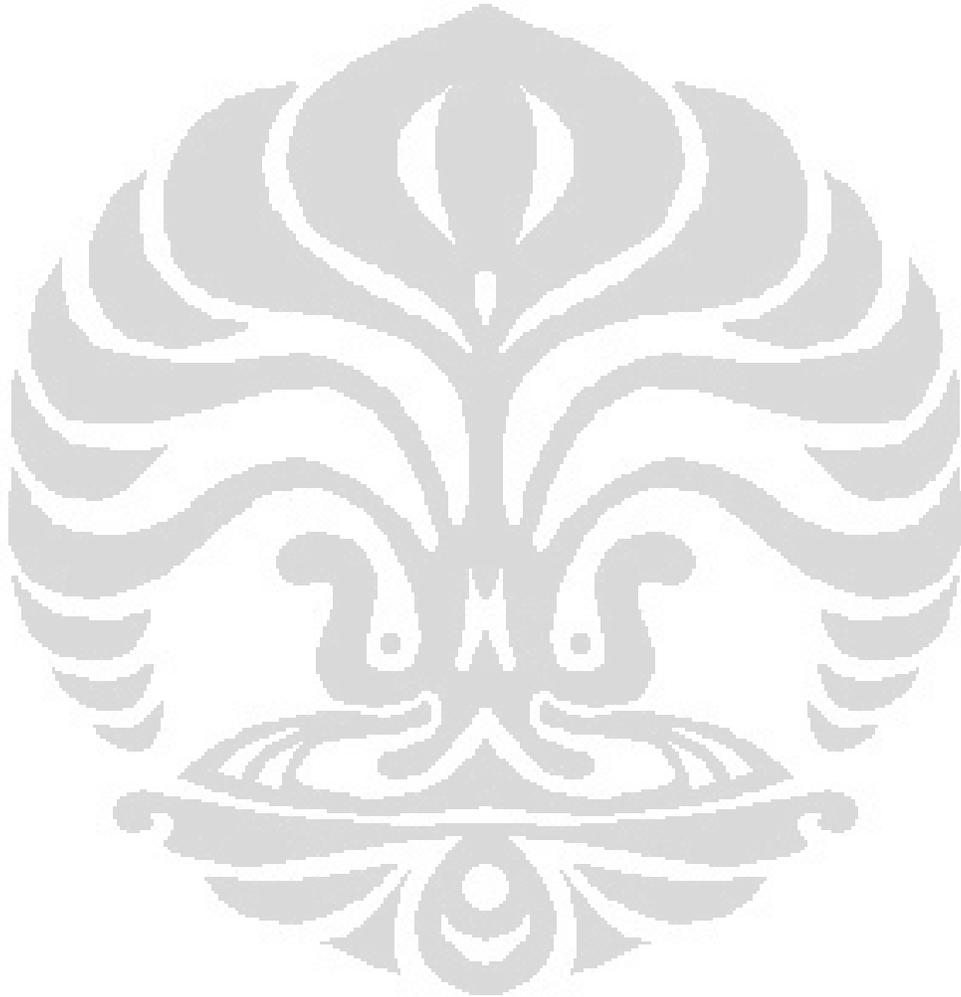


Gambar 30. Visualisasi simulasi *dynamic* 2RLF dengan *rimantadine*



Gambar 31. Visualisasi simulasi *dynamic* 2KIH dengan *rimantadine*

Dari hasil simulasi *dynamic*, virus H5N1 menunjukkan kekebalan/resistensi terhadap kedua jenis obat, karena kedua jenis obat tersebut tidak berikatan dengan pusat aktif dari M2.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

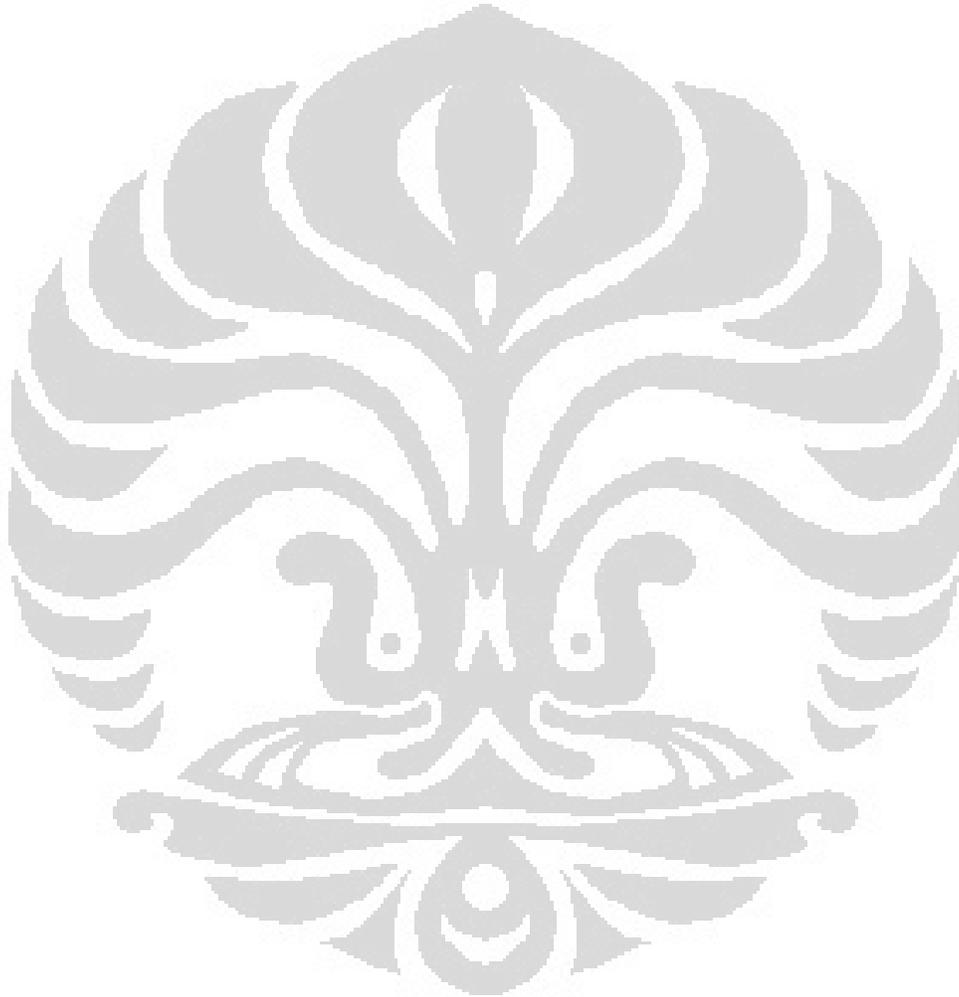
A. Kesimpulan

Mutasi pada virus H5N1 Indonesia memiliki keterkaitan dengan tingkat pathogenisitasnya didasarkan pada hasil analisis sebagai berikut:

- Analisis *phylogenetic tree*, menunjukkan virus H5N1 walaupun memiliki kekerabatan yang dekat dengan virus HPAI H5N1 dari negara lain, tetapi membentuk kelompok sendiri yang mungkin saja disebabkan oleh perbedaan tingkat pathogenisitasnya.
- Analisis *sequence alignment* menunjukkan pada HA, NA, dan M2 virus H5N1 Indonesia mengalami mutasi asam amino pada *active site* dan disertai dengan perubahan sifat asam amino dari hidrofilik menjadi hidrofobik membuat tingkat pathogenisitas dari virus H5N1 Indonesia menjadi lebih tinggi.
- Analisis *molecular docking* menunjukkan bahwa HA dan NA virus H5N1 Indonesia memiliki kemampuan yang lebih baik untuk mengikat reseptor *sialic acid*, serta aktivitas dari *amantadine* dan *rimantadine* yang tidak memberikan inhibisi pada pusat kerja M2 virus H5N1 Indonesia membuat tingkat pathogenisitas virus ini menjadi lebih tinggi.
- Simulasi *molecular dynamic* pada tahap inialisasi masih menunjukkan kemampuan HA dan NA virus H5N1 Indonesia untuk berikatan dengan *sialic acid*.

B. Saran

Perlu dilakukan studi lebih lanjut menggunakan simulasi *molecular dynamic* untuk melihat mutasi yang terjadi pada HA, NA, dan M2 virus H5N1 Indonesia terkait dengan tingkat patogenisitasnya yang tinggi.



DAFTAR PUSTAKA

- Anwar T, Sunil K. Lal, and Asad U. Khan. 2006. *In Silico Analysis of Genes Nucleoprotein, Neuraminidase, and Hemagglutinin : A Comparative Study On Different Strains of Influenza A (Bird Flu) Virus Sub-type H5N1*. *J. In Silico Biology* 6 Vol 6, No:3 : 161-168.
- Baxevanis, A. D., Ouelette, B.F.F. 2005. *Bioinformatics A Practical Guide to The Analysis of Genes and Proteins*. 3rd ed. Wiley Interscience.
- Bock, Joel R. dan David A. Gough. 2002. *A New Method to Estimate Ligand-Receptor Energetics*. USA: University of California.
- Claverie, M. J., Notredame, C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing.
- Guan, Yi *et al.* 2007. *Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health*. *Clin. Microbiol.* **20**: 243-267.
- Hikmawan O., 2007. *Studi In Silico Mutasi Virus Influenza A H5N1 strain Indonesia*. Departemen Kimia Universitas Indonesia.
- Kamps, S.B., et al. 2006. *Influenza report 2006*. Flying Publisher. Paris, Cagliari, Sevilla.
- Kitchen, Douglas. B, Hélène Decomez, John R.Furr, dan Jürgen Bajorath. 2004. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Application. *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY*. VOLUME 3 | NOVEMBER 2004.

- Klenk, Hans Dieter. 2007. *Molecular Mechanisms of Pathogenicity and Interspecies Transmission of Avian Influenza Virus*. Germany: Institut für Virologie Philipps Universität Marburg.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Li-Ching, W. Jorng-Tzong, H. Hsien-Da, H., and Wei-Long C. 2008. *Identifying Discriminative Amino Acids Within the Hemagglutinin of Human Influenza A H5N1 Virus Using a Decision Tree*. *Information Technology in Biomedicine*, vol. 12, no. 6, november 2008
- Li, Minyong., Binghe Wang. 2006. *Computational Studies of H5N1 Hemagglutinin binding with Sia(α 2-3)Gal and Sia(α 2-6)Gal*. *Sciencedirect* 347 : 662-668
- 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.
- Morris, G. M. et al. 1998. *Automated docking using a Lamarkian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. *J. Comp. Chem.* 19, 1639-1662
- Panigrahi, Sunil K. dan Gautam R. Desiraju. 2007. *Strong and Weak Hydrogen Bonds in the Protein–Ligand Interface*. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 67:128–141. India: University of Hyderabad.
- Radji, M. 2006. *Avian Influenza A (H5N1): Patogenesis, Pencegahan, dan Penyebaran pada Manusia*. *Majalah ilmu Kefarmasian*. 3: 55-65.

- Ridlo, N. 2008. *Studi Mekanisme Mutasi Virus Influenza A Membentuk Subtipe H5N1 pada Manusia Secara in silico*. Departemen Kimia Universitas Indonesia.
- Salahuddin P, Asad U. Khan. 2009. *Identification of mutations at the antigenic and glycosilation sites in hemagglutinin protein of H5N1 strain*. *Bioinformation* (4): 30-35 (2009).
- Stevens J. *et al.*, 2006. *Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus*. *Science* : 1124513
- Syahdrajat, T. 2007. *Masalah Avian Influenza di Indonesia*. Deka Media. 20:103-106.
- Tambunan S.F, Hikmawan O., & Theofilus A., 2008. *In Silico Mutation Study of Hemagglutinin and Neuraminidase on Banten Province Strain Influenza A H5N1 Virus*. *Trends in Bioinformatic : Science Allert*
- 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.
- Ungchusak K. *et al.*, 2005. *Probable Person to Person Transmision of Avian Influenza A (H5N1)*. *The New England. J. Medicine* Vol 352 (4): 333-340.
- Yen, Hui-Ling. *et al.*, 2006. *Importance of Neuraminidase Active-Site Residues to the Neuraminidase Inhibitor Resistance of Influenza Viruses*. *Journal of Virology*, Sept. 2006, p 8787-8795.
- WHO, 2009. Avian Influenza Disease Outbreak News
http://www.who.int/csr/don/2009_09_31/en/index.html, diakses 31 September 2009 pukul 23.30 WIB.