

**PERUBAHAN GENOM DAN KARAKTER VIRUS AVIAN
INFLUENZA SUBTIPE H5N1 PADA UNGGAS DI INDONESIA**

DISERTASI

Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Bidang Ilmu Biomedik pada
Universitas Indonesia di Jakarta untuk dipertahankan di hadapan sidang Terbuka Senat
Guru Besar Universitas Indonesia di bawah pimpinan

Rektor Universitas Indonesia

Prof. Dr. der. Soz Gumilar Rusliwa Soemantri

Pada hari Selasa, tanggal 22 Desember 2009, pukul 10.00 WIB

**NLP Indi Dharmayanti
NPM. 0606027884**



**PROGRAM PASCASARJANA ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, DESEMBER 2009**

**PERUBAHAN GENOM DAN KARAKTER VIRUS AVIAN
INFLUENZA SUBTIPE H5N1 PADA UNGGAS DI INDONESIA**

DISERTASI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor
dalam Ilmu Biomedik**

**NLP Indi Dharmayanti
NPM. 0606027884**

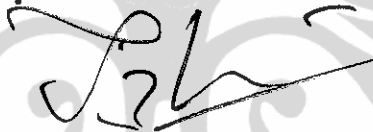


**PROGRAM PASCASARJANA ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, DESEMBER 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar,**

Nama : NLP Indi Dharmayanti
NPM : 0606027884
Tanda Tangan :



Tanggal : 22 Desember 2009

PROMOTOR

Prof. dr Amin Soebandrio W Kusumo, PhD., SpMK

Guru Besar Tetap Ilmu Mikrobiologi (Virologi)

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

KO-PROMOTOR

dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK

Doktor Ilmu Mikrobiologi Molekuler

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

TIM PENGUJI

KETUA

Prof. Drs. Purnomo Soeharso, PhD

Guru Besar Tetap Ilmu Biologi Molekuler

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

ANGGOTA

Prof.dr. Mohamad Sadikin, DSc

Guru Besar Tetap Ilmu Biokimia dan Biologi Molekuler

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Dr. Rer. physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi

Doktor Ilmu Biokimia dan Biologi Molekuler

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Dr. drh. Chairul Anwar Nidom, MS

Doktor Ilmu Biokimia dan Biologi Molekuler

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

dr. T. Mirawati Sudiro, PhD

Doktor Ilmu Mikrobiologi (Virologi)

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh

Nama : NLP Indi Dharmayanti
NPM : 0606027884
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Disertasi : Perubahan Genom Dan Karakter Virus Avian
Influenza Subtipe H5N1 Pada Unggas di Indonesia

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Promotor : Prof. dr. Amin Soebandrio W Kusumo, PhD, SpMK ()

Kopromotor : dr. Fera Ibrahim, PhD, MSc, SpMK ()

Tim Penguji : Prof. Drs. Poernomo Soeharso, PhD (Ketua) ()

Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc (Anggota) ()

Dr. Rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi (Anggota) ()

Dr. drh. Chairul Anwar Nidom, MS (Anggota) ()

dr. T. Mirawati Sudiro, PhD (Anggota) ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 22 Desember 2009

KATA PENGANTAR

Puji syukur yang dalam saya panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat, karunia, kemurahan dan pertolongan-Nya sehingga Disertasi dengan judul **“Perubahan Genom dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Pada Unggas di Indonesia”** dapat terselesaikan. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang begitu besar kepada Prof. dr Amin Soebandrio W Kusumo, PhD., SpMK, selaku promotor dan dr. Fera Ibrahim, SpMK, MSc, PhD selaku ko-promotor atas bimbingan, perhatian, kesabaran, pengarahan, ketelatenan dan diskusi yang sangat berguna dalam penelitian dan penyusunan serta penyelesaian disertasi ini.

Terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Dr. dr. Ratna Sitompul, SpMK dan Wakil Dekan Prof. Dr. Pratiwi Pujilestari Sudarmono, PhD, SpMK atas kesempatan menyelesaikan program studi doktor. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Biomedik Universitas Indonesia dan seluruh staf pengajar program S3 Biomedik atas ilmu yang sangat berguna yang telah diberikan selama penulis belajar di Program Studi S3 Biomedik-Universitas Indonesia.

Penulis menyampaikan penghargaan terima kasih sedalam-dalamnya kepada Tim Penguji yaitu Prof. dr. Amin Soebandrio, W Kusumo, PhD, SpMK., Prof.dr. Mohamad Sadikin, DSc., Prof. Drs. Purnomo Soeharso, PhD., dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD., SpMK., Dr. Rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi., Dr. drh. Chairul Anwar Nidom, MS., dr. T. Mirawati Sudiro, PhD atas saran, masukan dan perbaikan yang sangat bermanfaat kepada penulis untuk kesempurnaan disertasi ini.

Penulis mengucapkan terima kasih setulusnya kepada Dr.drh. Darminto selaku Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner periode 1999-2004 dan 2006-2009 atas begitu banyak kesempatan, dorongan dan dukungan kepada penulis sejak pertama kali penulis menjadi staf peneliti di Balai Besar Penelitian Veteriner sampai sekarang. Ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Kusuma Diwyanto, MSc Kepala Pusat Pengembangan Peternakan periode 2002-2006 yang senantiasa memberikan dukungan, semangat, nasehat dan kesempatan yang begitu berharga kepada penulis dalam pengembangan kemampuan sebagai peneliti.

Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih kepada keluarga besar Laboratorium Virologi - BBalitvet yang telah banyak memberikan dukungan, bantuan dan pengalaman. Kepada Bapak Nana Suryana, SE yang telah banyak membantu dalam penelitian saya sejak pertama kali penulis menjadi peneliti di BBalitvet sampai sekarang, penulis menghaturkan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya. Ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada teman

dan kolega saya di tim Penelitian Avian Influenza BBalitvet : Ibu Risa Indriani, Ssi., Drh. Dyah AH, Drh. Atik R., Drh. Risza H., atas bantuannya selama ini, tidak lupa rasa terima kasih kepada Ibu Hanipah, Pak Ace Endang, Ibu Yoyoh Mulyanah atas bantuannya dalam penelitian kepada penulis selama ini. Kepada semua Staf Peneliti dan Teknisi Lab. Virologi, yang tidak dapat disebutkan satu persatu, penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan dan dukungannya di penelitian selama ini kepada penulis. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada drh. Hermawan dan Ir. Gunawan Ramli atas bantuan pengadaan bahan dan barang penelitian selama penelitian ini berlangsung.

Saya mengucapkan terima kasih dan hormat yang sedalam-dalamnya kepada kedua orang tua saya, Bapak I. Wayan Suwarya dan Ibu Dwi Anna Sulasi atas doa dan dukungan yang tiada henti. Doa beliau adalah kekuatan bagi penulis. Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya persembahkan dengan setulusnya untuk suami tercinta Sutanto Arso Birowo, S.Pt yang dengan sabar, penuh kasih sayang, perhatian, menemani dan begitu banyak membantu penulis selama menjalani pendidikan dan pengerjaan disertasi. Kepada ananda terkasih Muhammad Fikri Dharmasutanto, penulis mengucapkan terima kasih atas pengertiannya dan perhatian yang berkurang selama pengerjaan disertasi ini. Terima kasih kepada kedua adik penulis M. Oktavia Vidiyanti, SPd, MPd dan N. Mei Diana Ariyanti, SH, atas doa dan dukungannya selama ini, jarak yang memisahkan tidak mengurangi kasih sayang diantara kita.

Tidak lupa penulis sampaikan ucapan terima kasih kepada semua teman-teman Biomedik-S3 angkatan tahun 2006 atas pertemanan yang baik selama belajar di Biomedik. Semoga silaturahmi diantara kita tetap terbina. Rasa terima kasih kepada dr.Vivi Setyawati, MBiomed dan drh. Susan M Noor, MVSc atas diskusi, dukungan, teman curhat dan bantuannya kepada penulis. Kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan baik secara langsung ataupun tidak langsung, yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu, tidak ada yang dapat penulis berikan selain ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya, diiringi doa semoga budi baik dan bantuan yang telah dilimpahkan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT.

Jakarta, Desember 2009

Penulis



Wahai orang-orang yang beriman, makanlah dari rizki yang baik-baik yang telah Kami berikan kepadamu, dan bersyukurlah kepada Allah jika benar-benar hanya kepadaNya kamu menyembah (Al-Baqarah : 172)

Jika Allah menolong kamu, maka tidak ada orang yang dapat mengalahkan kamu, dan jika Allah membiarkan kamu (tidak memberi pertolongan), maka siapakah yang dapat menolong kamu sesudah itu (Ali-Imran : 160)

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : NLP Indi Dharmayanti
NPM : 0606027884
Program Studi : Ilmu Biomedik
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah yang berjudul :

Perubahan Genom Dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Pada Unggas di Indonesia

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (data base), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada Tanggal : 22 Desember 2009
Yang Menyatakan,



(NLP Indi Dharmayanti)

ABSTRAK

Nama : NLP Indi Dharmayanti
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Disertasi : Perubahan Genom Dan Karakter Virus Avian
Influenza Subtipe H5N1 Pada Unggas di Indonesia

Latar Belakang

Di Indonesia, virus AI H5N1 telah bersirkulasi lebih dari lima tahun. Tingginya kasus AI H5N1 pada manusia dan status endemis AI pada peternakan di Indonesia memungkinkan munculnya virus AI subtipe H5N1 yang lebih mudah beradaptasi dengan manusia. Sementara itu, data penelitian tentang karakter virus AI subtipe H5N1 asal unggas yang menginfeksi manusia maupun yang berasal dari sektor peternakan masih sangat terbatas. Keterbatasan dalam beberapa hal membuat penelitian tentang virus AI asal Indonesia masih sangat sedikit dilakukan. Pada penelitian bertujuan untuk mengetahui karakter molekuler virus AI dari berbagai latar belakang yang berbeda. Latar belakang tersebut diantaranya adalah virus asal unggas tanpa vaksinasi, virus yang berasal dari peternakan yang melakukan vaksinasi AI serta virus asal unggas disekitar kasus infeksi AI subtipe H5N1 pada manusia.

Metodologi

Dua puluh isolat virus AI subtipe H5N1 asal unggas yang koleksi tahun 2003 sampai dengan 2008 digunakan dan dianalisis pada penelitian ini. Empat belas virus diisolasi dari wabah/dugaan AI pada unggas dan enam virus diisolasi dari unggas disekitar kejadian infeksi virus AI subtipe H5N1 pada manusia. Sekuensing dan analisis dilakukan terhadap hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix (M) dan non struktural (NS) karena berkaitan dengan perannya sebagai binding reseptor, epitop, patogenisitas, virulensi dan resistensi amantadin. Uji amantadin secara *in vitro* dilakukan menggunakan metode *cell-based virus reduction assay*.

Hasil Penelitian

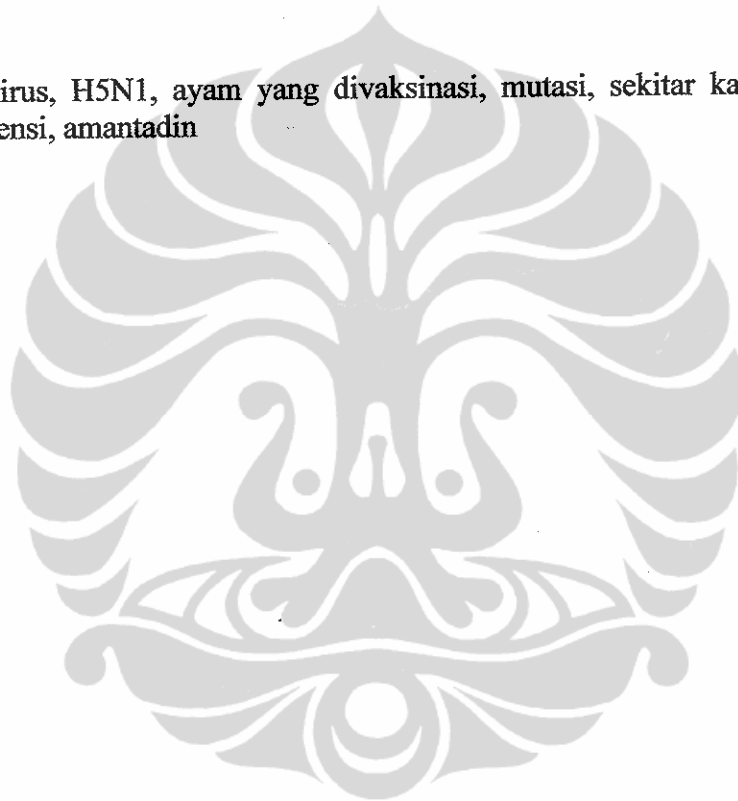
Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua puluh virus AI yang dianalisis merupakan virus HPAI, masih mengenal avian reseptor, dan sebagian besar mempunyai motif PDZ asal unggas dan dua virus lainnya mempunyai motif PDZ asal manusia. Analisis sekuen menunjukkan satu virus adalah virus *reassortant* (A/Ck/Pessel/BPPVRII/07) yang merupakan hasil *genetic reassortment* antara virus H5N1 Indonesia dengan virus H3N2 Hong Kong. Virus yang diisolasi dari ayam yang divaksinasi AI memperlihatkan mutasi pada gen HA, NA, M dan NS lebih tinggi dibandingkan virus AI asal unggas yang tidak divaksinasi. Virus tahun 2008 yang diisolasi asal unggas yang divaksinasi mempunyai mutasi yang tidak dimiliki oleh virus asal unggas yang divaksinasi yang diisolasi pada tahun 2006-2007.

Pada penelitian ini virus yang diisolasi dari unggas disekitar kasus manusia terinfeksi H5N1 memperlihatkan adanya substitusi yang spesifik pada protein M yang juga ditemukan pada virus AI asal manusia dan virus asal unggas yang divaksinasi. Motif ini diperkirakan dapat dijadikan sebagai petanda molekuler virus AI yang dapat menginfeksi manusia.

Hasil analisis resistensi virus terhadap amantadin menunjukkan bahwa sekitar 62,58% (92/147) virus mengalami resistensi terhadap amantadin dan 10 diantaranya mengalami mutasi ganda (V27A and S31N). Hasil uji in vitro yang dilakukan menunjukkan virus dengan mutasi ganda tidak lebih resisten terhadap amantadin.

Kata Kunci :

Avian influenza, virus, H5N1, ayam yang divaksinasi, mutasi, sekitar kasus manusia terinfeksi AI, resistensi, amantadin



ABSTRACT

Name : NLP Indi Dharmayanti
Study Program : Biomedical Science
Title : Mutation of the Genome and Character of Avian Influenza Viruses H5N1 Subtype Isolated From Avian Species in Indonesia

Background

In Indonesia, the avian influenza H5N1 subtype had circulating more than five years. Endemic status in domestic poultry and the large number of H5N1 human cases can create virus that more adaptive to human. The data of character of AI H5N1 from Indonesia still limited. The purpose of the study to characterize the viruses from different backgrounds, such as from vaccinated chickens, non-vaccinated chickens and surrounding H5N1 human cases in Indonesia on the molecular level.

Methods

We used twenty of AI H5N1 subtype viruses which were collected during 2003-2008. Fourteen viruses were isolated from avian species outbreak of AI and six viruses isolated from avian species around the H5N1 human cases. The DNA sequencing was conducted to analyze the genes namely hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix (M) and non structural (NS) that responsible to receptor binding, pathogenicity, virus virulence and amantadine resistance. The amantadine sensitivity test was conducted using cell-based virus reduction assay.

Result

Result of study showed that all of the viruses were HPAI, recognize avian receptor and most of them possessed avian origin of PDZ motif and two other viruses have human origin motif. We found that the one from twenty viruses used in this study probably was a first genetic shift virus in Indonesia. In this study revealed that the viruses from vaccinated chickens had higher mutation in the HA molecule compared to poultry or other avian species, without vaccination. The mutation not only occurred in the HA gene but also at NA, M1 and NS1 genes. Viruses from vaccinated chickens in 2008 have different substitution that only found in those viruses. The other result from this study showed that the AI viruses isolated from birds around humans infected by H5N1 virus and viruses which were isolated from vaccinated chickens had specific characteristics namely the presence of several amino acid substitutions especially on the M1 and M2 proteins. The substitutions were similar in most of H5N1 human cases in Indonesia.

Furthermore, the study found that the M2 protein of 147 Indonesian avian influenza (AI) viruses data available in public database (NCBI) including twenty AI isolates used in this study showed that around 62.58% (92/147) of AI viruses in Indonesia have experienced resistances to amantadine and ten of them have dual mutations at V27A and S31N.

Key words : avian influenza subtype H5N1 virus, vaccinated chicken, mutation, surrounding H5N1 human cases, amantadine resistance



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	ix
ABSTRAK	x
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxiv
BAB 1	
PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Pertanyaan Penelitian	6
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.4. Manfaat Penelitian	7
BAB 2	
TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Struktur Virus Influenza A, B dan C	11
2.1.1. Genom Virus	
2.1.2. Struktur dan Fungsi Haemagglutinin virus Influenza A	13
2.1.3. Struktur dan Fungsi Neuraminidase virus Influenza A	16
2.1.4. Struktur dan Fungsi Matrix	18
2.1.4.1. Protein M1	18
2.1.4.2. Protein M2	21
2.1.5. Struktur dan Fungsi Protein NonStruktural (NS)	24
2.1.5.1. Sintesis dan Biokimia NS1	25
2.1.5.2. Struktur protein NS1	28
2.1.5.3. NS1 membatasi aktivitas PKR dan OAS	31
2.1.5.4. NS1 dan Respon apoptosis inang	34
2.1.5.5. Dereglulasi Sitokin dan Virulensi	36
2.1.5.6. Sinyal Sel dan Virulensi	37
2.2. Filogenetika Molekuler	40
2.2.1. Hubungan analisis filogenetik dengan alignment/penjejeran sekuen	41
2.2.2. Konsep Pohon Evolusi	43
2.2.3. Prediksi filogenetik yang dipercaya	54
2.3. Virus Avian Influenza di Indonesia	55

BAB 3	METODOLOGI PENELITIAN	59
	3.1. Lokasi dan Pelaksanaan Penelitian	61
	3.2. Sampel Penelitian	61
	3.3. Bahan dan Cara Kerja	61
	3.3.1. Wilayah Pengambilan sampel	61
	3.3.2. Penanganan spesimen	62
	3.3.2.1. Sampel Organ	62
	3.3.2.2. Sampel swab kloaka, swab trakea atau feses	62
	3.3.3. Inokulasi pada Telur Berembrio <i>Specific Pathogen Free</i>	63
	3.3.4. Panen Cairan alantois	63
	3.3.5. Titrasi virus avian influenza (AI) subtype H5N1	64
	3.3.6. Ekstraksi RNA virus	66
	3.3.7. Identifikasi Virus avian influenza subtype H5N1 dengan <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	67
	3.3.8. Visualisasi Fragmen DNA/Amplikon	69
	3.3.8.1. Pembuatan gel agarosa 2%	69
	3.3.8.2. Elektroforesis	69
	3.3.9. Amplifikasi gen lengkap HA, NA, NS dan M	70
	3.3.10. Sekuensing DNA	73
	3.3.10.1. Purifikasi produk PCR	73
	3.3.10.2. Reaksi Sekuensing PCR	74
	3.3.10.3. Purifikasi hasil sekuensing	75
	3.3.11. Analisis Sekuen	75
	3.3.12. Analisis Bioinformatika	76
	3.3.13. Prediksi dan Visualisasi Struktur Tiga Dimensi Protein	76
	3.3.13.1. Penggunaan Discovery Studio untuk prediksi dan visualisasi 3D	77
	3.3.14. Uji Resistensi Amantadin pada kultur sel Madin Darby Canine Kidney (MDCK)	78
	3.3.14.1. Penyiapan Sel MDCK	78
	3.3.14.2. Inokulasi Virus pada sel MDCK	79
	3.3.14.3. Uji Resistensi Amantadin	79
	3.3.14.4. Uji Hemagglutinasinasi (HA)	80

BAB 4	HASIL PENELITIAN	82
	4.1. Virus AI	83
	VI.1.1 Pengukuran titer virus	85
	4.2. Hasil Sekuensing	88
	4.3. Hasil analisis bioinformatika	91
	4.4. Mutasi virus avian influenza sub tipe H5N1	98
	4.4.1. Substitusi Nukleotida	98
	4.4. 2. Karakter molekuler virus AI H5N1 yang berasal dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI	101
	4.4.2.1. Latar belakang virus yang dikoleksi	101
	4.4.2.2. Analisis sekuen protein Hemagglutinin (HA)	104
	4.4.2.3. Prediksi struktur tiga dimensi (3D) Protein	113
	4.4.2.4. Analisis Sekuen pada protein Neuraminidase (NA)	117
	4.4. 2.5. Analisis sekuen protein Matrix (M) dan Non Struktural (NS)	120
	4.5. Karakter Molekuler Virus AI disekitar kasus AI sub tipe H5N1 pada manusia	129
	4.5.1. Analisis pada protein Hemagglutinin (HA)	130
	4.5.2. Analisis pada protein Neuraminidase (NA)	136
	4.5.3. Analisis pada protein Matrix (M)	140
	4.5.4. Analisis protein non struktural (NS)	143
	4.6. Resistensi Virus Terhadap Amantadin	147
BAB 5	PEMBAHASAN	158
	5.1. Perubahan virus influenza sub tipe H5N1 dan karakter virus AI asal unggas dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi	159
	5.2. Karakter Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 Asal Unggas disekitar kasus Manusia Terinfeksi Virus H5N1	169
	5.2.1. Unggas Air Sebagai Sumber Penularan Virus Influenza H5N1 pada manusia	177
	5.2.2. Prediksi Kemungkinan Virus AI Yang Dapat Menginfeksi Manusia	178
	5.3. Resistensi Virus Terhadap Amantadin	181
	5.4. Pengaruh Mutasi dan perubahan Genom Virus	185

BAB 6	KETERBATASAN PENELITIAN	188
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	190
BAB 8	DAFTAR PUSTAKA	194
Lampiran		



Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Virus AI yang diperoleh dalam penelitian	214
Lampiran 2. Perhitungan konsentrasi cetakan DNA yang digunakan dalam reaksi sekuensing	215
Lampiran 3. Hasil elektroforesis/amplikon dengan primer Matrix, H5 dan N1 dari 20 virus AI yang digunakan dalam penelitian ini	218
Lampiran 4. Hasil perhitungan EID ₅₀ dua puluh virus AI yang digunakan dalam penelitian ini	221
Lampiran 5. Analisis komposisi protein masing-masing virus	231
Lampiran 6. Hasil prediksi protein transmembran dengan menggunakan TMHMM	237
Lampiran 7. Persentase mutasi virus AI asal Indonesia pada protein HA, NA, M1 dan NS1	240
Lampiran 8. Hasil penjejeran asam amino protein HA1 virus pav-AI dengan virus yang menjadi seed vaksin (Mex/232/94; Wisc/68 dan N28/73) di Indonesia	250
Lampiran 9. Total jumlah dan posisi tempat glikosilasi virus AI yang di gunakan dalam penelitian ini	253
Lampiran 10. Visualisasi tiga dimensi (3D) protein HA, NA, M dan NS virus yang digunakan dalam penelitian ini	254
Lampiran 11. Data kasus AI dan sampel yang diisolasi dari unggas disekitar kasus manusia terinfeksi H5N1	257
Lampiran 12. Hasil penjejeran asam amino protein M1 dan M2 dari virus H5N1 yang diisolasi dari unggas disekitar kasus manusia terinfeksi H5N1 dibandingkan dengan data virus H5N1 manusia yang diperoleh dari GenBank (NCBI)	271

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1.	Gen Virus Influenza A, B dan C serta produk protein yang dihasilkan	11
Tabel 2.	Susunan sekuen primer untuk mengidentifikasi virus avian influenza sub tipe H5N1	67
Tabel 3.	Jenis primer untuk RT-PCR dan kondisi amplifikasi yang digunakan untuk identifikasi virus AI dan sub tipe H5N1 serta untuk mengamplifikasi gen lengkap HA, NA, M dan NS	68
Tabel 4.	Susunan sekuen primer untuk mengamplifikasi gen lengkap HA,NA, M dan NS	71
Tabel 5.	Jumlah isolat virus H5N1 yang diperoleh dalam penelitian ini	83
Tabel 6.	Virus AI sub tipe H5N1 yang digunakan pada penelitian ini	85
Tabel 7.	Nama virus dan hasil perhitungan EID ₅₀ dua puluh virus AI yang digunakan pada penelitian ini	87
Tabel 8.	Dua puluh virus AI dan jumlah basa yang disekuensing pada masing-masing gen serta reading frame dan jumlah basa yang dianalisa	89
Tabel 9.	Nomer akses gen HA, NA, M dan NS dari dua puluh virus AI yang telah didaftarkan di NCBI	90
Tabel 10a.	Analisis asam amino protein HA dengan menggunakan ProtParam	91
Tabel 10b.	Analisis asam amino protein NA dengan menggunakan ProtParam	92
Tabel 10c.	Analisis asam amino protein M1 dengan menggunakan ProtParam	92
Tabel 10d.	Analisis asam amino protein M2 dengan menggunakan ProtParam	93
Tabel 10e.	Analisis asam amino protein NS1 dengan menggunakan ProtParam	94
Tabel 10f.	Analisis asam amino protein NS2 dengan menggunakan ProtParam	94

Tabel 11a. Jumlah substitusi sinonim dan non sinonim gen HA, NA dan NS1 virus avian influenza yang digunakan pada penelitian ini	99
Tabel 11b. Jumlah substitusi sinonim dan non sinonim gen NS2, M1 dan M2 virus avian influenza yang digunakan pada penelitian ini	100
Tabel 12. Virus avian influenza dan asal sampel yang berasal dari peternakan ayam yang divaksinasi AI dan gejala klinis yang menyertai penyakit	103
Tabel 13. Jumlah dan persentase perbedaan serta homologi asam amino seed vaksin H5N2 dan H5N9 dengan isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian	105
Tabel 14. Sampel yang diambil dari unggas disekitar kasus manusia yang terinfeksi AI subtype H5N1	130
Tabel 15. Karakter genetik virus H5N1 asal unggas dibandingkan dengan kasus H5N1 pada manusia di Indonesia yang mempunyai kekerabatan terdekat dengan virus yang digunakan pada penelitian ini	131
Tabel 16. Prediksi asam amino protein M virus H5N1 virus dari spesies unggas yang dihubungkan dengan kasus infeksi H5N1 pada manusia di Indonesia	141
Tabel 17. Prediksi asam amino yang bertanggung jawab pada sensitivitas amantadin pada protein M2	148
Tabel 18. Rerata titer HA virus avian influenza pada pada uji sensitivitas amantadin	150

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Mekanisme resistensi terhadap inhibitor M2	23
Gambar 2. Sekuen asam amino C-terminal protein NS1 virus influenza manusia	26
Gambar 3. Struktur protein NS1	29
Gambar 4. Representasi skematik protein NS1 dan protein yang berinteraksi	31
Gambar 5. Diagram skematik dari multifungsi NS1 dalam sel terinfeksi	31
Gambar 6. Struktur pohon evolusi	44
Gambar 7. Set sekuen yang ideal yang mana panjang cabang pohon yang diasumsikan	50
Gambar 8. Diagram Alur Penelitian	60
Gambar 9. Gambaran strategi sekuensing dari gen HA (a), NA(b), M(c) dan NS(d)	72
Gambar 10. Prediksi protein transmembran dari protein HA virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM	95
Gambar 11. Prediksi protein transmembran dari protein NA virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM	96
Gambar 12. Prediksi protein transmembran dari protein M2 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM	96
Gambar 13. Prediksi protein transmembran dari protein M1 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM	97

Gambar 14.	Prediksi protein transmembran dari protein NS1 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM	97
Gambar 15.	Prediksi protein transmembran dari protein NS2 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM	97
Gambar 16.	Hasil Penjejeran prediksi sekuen pada protein HA.	111
Gambar 17.	Pohon filogenetik gen hemagglutinin (HA) virus avian influenza di Indonesia tahun 2003-2008	113
Gambar 18.	Lokasi substitusi asam amino pada monomer protein HA1	116
Gambar 19.	Penjejeran sekuen asam amino protein NA	119
Gambar 20.	Pohon filogenetik gen NA virus asal Indonesia	119
Gambar 21.	Penjejeran prediksi asam amino protein M1	122
Gambar 22.	Pohon filogenetik gen M1 virus AI di Indonesia	123
Gambar 23.	Penjejeran prediksi sekuen asam amino protein NS1	125
Gambar 24.	Pohon filogenetik gen NS1	126
Gambar 25.	Penjejeran prediksi sekuen asam amino protein M1 dua puluh virus yang digunakan dalam penelitian ini	128
Gambar 26.	Pohon filogenetik gen hemagglutinin (HA) enam virus avian influenza asal unggas yang dikoleksi disekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia di Indonesia.	133
Gambar 27.	Hasil penjejeran prediksi asam amino protein HA enam virus AI asal unggas yang dikoleksi disekitar kasus AI H5N1 pada manusia	134
Gambar 28.	Pohon filogenetik gen NA di Indonesia termasuk enam virus AI asal unggas di sekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia di Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini.	138

lambar 29.	Penjejeran prediksi asam amino protein NA virus AI asal unggas disekitar kasus H5N1 pada manusia	139
lambar 30.	Pohon filogenetik gen M1 dari enam virus AI di Indonesia yang diisolasi dari unggas disekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia	142
lambar 31.	Pohon filogenetik gen NS1 enam virus asal unggas yang diisolasi disekitar kasus manusia terinfeksi virus H5N1.	146
lambar 32.	Penjejeran prediksi asam amino protein NS1 virus AI asal unggas disekitar kasus H5N1 pada manusia	147
lambar 33.	Rerata titer HA virus avian influenza pada pada uji sensitivitas amantadin diilustrasikan dalam bentuk grafik	152
lambar 34.	Gambaran sel MDCK normal dan terinfeksi virus yang sensitif dan resisten amantadin	154
lambar 35.	Pohon filogenetik gen M2 virus AI asal unggas di sekitar kasus H5N1 pada manusia.	156

DAFTAR SINGKATAN

lingkatan asam amino :

A	Ala/Alanin
C	Cys/Cysteine
D	Asp/Asam aspartat
E	Glu/asam glutamat
F	Phe/Phenylalanine
G	Gly/Glycine
H	His/Histidine
I	Ile/Isoleucine
K	Lys/Lysine
L	Leu/Leucine
M	Met/Methionine
N	Asn/Asparagine
P	Pro/Proline
Q	Gln/Glutamine
R	Arg/Arginine
S	Ser/Serine
T	Thr/Threonine
V	Val/Valine
W	Trp/Tryptophan
Y	Tyr/Tyrosine
ug	Micro gram
μl	Micro liter
3D	Tiga Dimensi
AI	Avian Influenza
Bbalivet	Balai Besar Penelitian Veteriner
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPPVR II	Balai Penyidikan Penyakit Veteriner Regional II
CDC	Center Disease Control
CPE	Cytophatic Effect
del	delesi
DMEM	Dulbelco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxynucleic acid
dsRNA	Double strand Ribonucleic acid
EID50	Egg Infectious Dose 50
EJ	East Java

Expasy	Expert Protein Analysis System
F	Forward
FBS	Foetal Calf Serum
HA	Hemagglutinin
HEF	Haemagglutinin-esterase fussion
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
IFN- β	Interferon- β
LPAI	Low Pathogenic Avian Influenza
M	Matrix
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MLD50	Mice Lethal Dose 50
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NA	Neuraminidase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	neighbor-joining
NLS	Nuclear Localization Signal
NP	Nucleoprotein
NS	Non Structural
OAS	2'-5'-oligoadenylate synthetase
OIE	World Organization for Animal/Office International des Epizooties
ORF	Open Reading Frame
PA	Polymerase Acidic Protein
Pav-AI	Virus AI sub tipe H5N1 yang diisolasi unggas yang divaksin dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI sub tipe H5
PB protein	Polymerase Basic Protein
pb	pasang basa
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
pH	$-\log(\text{H}^+)$
pI	Point Isoelectric
PKR	dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase R
PL	PDZ domain ligand
ProtParam	Protein Paramater
R	Reverse
RNA	Ribonucleic acid
RNP	Ribonucleoprotein
rpm	radial per minute
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SPF	Specific Pathogen Free
TBE	Tris-Boric acid-EDTA

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Virus influenza adalah virus RNA berpolaritas negatif, termasuk famili *Orthomyxoviridae* yang diklasifikasikan menjadi tipe A, B dan C berdasarkan pada mayoritas antigen protein internal yaitu nukleoprotein (NP) dan Matrix (M1). Virus influenza A adalah virus yang paling virulen dari tiga tipe influenza tersebut dan dapat menyebabkan penyakit saluran napas dengan rentang gejala ringan sampai parah dan kadang fatal. Influenza A diklasifikasikan ke dalam beberapa subtipe berdasarkan antigenisitas kedua protein permukaan yaitu HA dan NA. Protein permukaan virus yang telah diidentifikasi sampai saat ini terdapat sebanyak 16 subtipe HA (H1-H16) dan 9 subtipe NA (N1-N9) (Rohm dkk., 1996; Lamb dan Krug., 2001; Wright and Webster, 2001; Fouchier dkk., 2005).

Virus influenza A dapat diisolasi dari berbagai spesies makhluk hidup, seperti manusia, babi, kuda, unggas air, ayam, mamalia laut dan unta (Webster dkk., 1992). Diantara inang virus avian influenza, unggas air merupakan *reservoir* dari virus ini. Berdasarkan studi yang dilakukan, diketahui bahwa semua virus yang bersirkulasi pada spesies hewan lainnya berasal dari unggas air (Webster dkk., 1992). Virus avian influenza tidak bereplikasi secara efisien pada manusia (Beare dkk., 1991) dan virus influenza pada manusia tidak dapat bereplikasi secara efisien pada itik (Hinshaw dkk., 1983).

Virus influenza mengalami evolusi secara terus menerus, terutama pada glikoprotein permukaan virus ini. Variabilitas pada virus ini merupakan hasil dari akumulasi perubahan molekular dari delapan segmen RNA yang dapat terjadi melalui mekanisme mutasi titik (*antigenic drift*), *gene reassortment* (*antigenic shift*), *defective-interfering particles* dan rekombinasi RNA. Setiap mekanisme ini berkontribusi terhadap evolusi virus avian influenza (Webster dkk., 1992). Mutasi yang meliputi substitusi, delesi, dan insersi adalah salah satu yang mekanisme paling penting dalam menyebabkan variasi dalam virus influenza. Enzim polimerase virus ini tidak mempunyai kemampuan *proofreading* sehingga diperkirakan berperan dalam kesalahan replikasi yaitu sekitar 1 basa dalam setiap 10^4 basa (Holland dkk., 1982; Steinhauer dan Holland, 1987).

Virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) H5N1 diketahui pertama kali dapat menginfeksi manusia pada tahun 1997, ketika virus avian influenza ditransmisikan secara langsung dari unggas ke manusia di Hong Kong dan menyebabkan 18 kasus penyakit pernapasan termasuk diantaranya sebanyak 6 orang meninggal akibat penyakit ini (Bender dkk., 1994; Katz dkk., 2000; Class dkk., 1998; Suarez dkk., 1998; Subbarao dkk., 1998; Shortridge dkk., 1998).

Pada akhir tahun 2003 dan awal tahun 2004, wabah virus influenza *highly pathogenic* H5N1 terjadi di peternakan ayam pada delapan negara di Asia (Li dkk., 2004; Viseshakul dkk., 2004; Tiensin dkk., 2005). Virus ini telah menjadi endemik pada peternakan ayam dan menyebabkan penyakit zoonosis yang menular ke manusia. (Chotpitayasunondh dkk., 2005; Hien dkk., 2004a,b; Puthavathana dkk., 2005). Paparan virus H5N1 pada manusia yang terus menerus

akan meningkatkan kemungkinan bahaya pandemi influenza pada manusia. Virus unggas melalui *reassortment* dengan galur virus influenza dapat beradaptasi lebih efisien pada manusia (Webster dkk., 1992; Taubenberger dkk., 2005). Beberapa kasus infeksi H5N1 pada manusia adalah *family cluster*, namun demikian transmisi virus ini dari manusia ke manusia dapat dikatakan masih sangat terbatas (Ungehusak dkk., 2005). Transmisi virus antar manusia belum dapat dibuktikan, sehingga sebagian besar kasus pada manusia terjadi karena penularan virus dari unggas terinfeksi (WHO, 2005b).

Virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia pertama kali diidentifikasi pada tahun 2003 (Wiyono dkk., 2004; Dharmayanti dkk., 2004). Analisis genetik menunjukkan bahwa sebagian besar virus influenza H5N1 dari unggas dan manusia di Asia termasuk Indonesia dalam golongan genotipe Z, serupa dengan virus yang pertama kali diidentifikasi pada unggas di Cina Selatan (Guan dkk., 2004; Li dkk., 2004; Puthavathana dkk., 2005; WHO, 2005a).

Virus avian influenza H5N1 di Indonesia yang diisolasi sepanjang tahun 2003-2005 menunjukkan motif rangkaian asam amino basa pada *cleavage site* HA yang merupakan karakteristik virus HPAI (PQRERRRKKR//G) (Nidom, 2005; Dharmayanti dkk., 2005b; Smith dkk., 2006). Motif tersebut mulai berubah seperti yang dilaporkan oleh Dharmayanti dan Indriani (2007) bahwa terdapat satu virus H5N1 yang diisolasi pada bulan Februari 2005 menunjukkan motif PQRESRRKKR//G. Hal ini menarik karena motif pada *cleavage site* virus tersebut serupa dengan virus H5N1 manusia yaitu A/Indonesia/5/05 yang merupakan kasus pertama infeksi virus ini pada manusia.

Pada tahun 2005, Dharmayanti dkk (2005c) juga mengamati mulai adanya mutasi titik pada gen HA pada virus avian influenza di Indonesia. Mutasi selain pada gen HA juga terjadi pada virus H5N1 asal Indonesia yaitu Smith dkk (2006) menyatakan bahwa virus asal Sumatra menunjukkan mutasi Ser31Asn pada protein M2. Mutasi tersebut mengindikasikan bahwa virus dari Sumatra telah mengalami resistensi terhadap amantadin. Cheung dkk (2006) menyebutkan bahwa 6,3% virus H5N1 Indonesia telah mengalami resistensi terhadap amantadin. Namun demikian, data terbaru tentang sensitivitas virus AI subtipe H5N1 di Indonesia terhadap amantadin sangat terbatas.

Dharmayanti dkk (2007) menunjukkan bahwa sebagian besar virus influenza subtipe H5N1 tahun 2003-2006 telah mengalami mutasi pada epitope A dan B pada protein HA, dan mutasi tertinggi telah terjadi pada dua virus H5N1 yaitu A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006 dan Ck/WestJava/Smi-Pat/06. Kedua virus ini diisolasi dari peternakan ayam komersil yang rutin melakukan vaksinasi H5N2. Mutasi yang terjadi pada virus tersebut kemungkinan akibat adanya tekanan imunologis yang dapat menimbulkan perubahan antigenisitas virus. Hasil tersebut diperkuat dengan adanya studi pendahuluan ujiantang terhadap semua vaksin unggas (H5N1, H5N2, H5N9) yang beredar di Indonesia dengan menggunakan virus tantang tahun 2006 yaitu A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa seluruh vaksin yang beredar di Indonesia tidak mempunyai kemampuan untuk memproteksi ayam terhadap virus tersebut (Swayne, 2007). Hal ini menjadi menarik karena virus yang mengalami

mutasi tertinggi ditemukan setelah dua tahun pemerintah mengimplementasikan vaksinasi pada unggas yang dimulai sejak tahun 2004.

Beberapa penemuan tersebut memperlihatkan bahwa virus H5N1 Indonesia telah mulai berubah. Situasi AI terkini di Indonesia adalah kebijakan vaksinasi pada unggas masih dilakukan dan menggunakan bibit vaksin heterolog. Sementara itu, sebanyak 31 provinsi dari 33 provinsi di Indonesia merupakan wilayah tertular AI yang tersebar di 295 kota dari 498 kota. (Syamsudin, 2009). Sementara itu, manusia yang terinfeksi virus H5N1 mencapai lebih dari 100 orang (WHO, 2009). Manusia yang terinfeksi virus H5N1 kemungkinan mendapatkan infeksi H5N1 dari unggas yang terlebih dahulu terinfeksi virus ini.

Tingginya kasus AI H5N1 pada manusia dan status endemis AI pada peternakan di Indonesia memungkinkan munculnya virus AI subtipe H5N1 yang lebih mudah beradaptasi dengan manusia. Sementara itu, data penelitian tentang karakter virus AI subtipe H5N1 asal unggas yang menginfeksi manusia maupun yang berasal dari sektor peternakan masih sangat terbatas. Keterbatasan dalam beberapa hal membuat penelitian tentang virus AI asal Indonesia masih sangat sedikit dilakukan. Hal tersebut menyebabkan data genetik dan karakter virus Indonesia yang telah diketahui sangat terbatas sehingga analisis molekuler dan upaya untuk mengetahui karakter virus ini sangat penting untuk dilakukan.

Penelitian disertasi ini bertujuan untuk mengetahui karakter molekuler dari virus AI subtipe H5N1 dari beberapa latar belakang yang berbeda. Latar belakang tersebut diantaranya adalah virus asal unggas tanpa vaksinasi, virus yang berasal dari peternakan yang melakukan vaksinasi AI serta virus asal

unggas disekitar kasus infeksi AI subtipe H5N1 pada manusia. Gen-gen yang dianalisis adalah gen hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix (M) dan non struktural (NS) karena berkaitan dengan perannya sebagai binding reseptor, epitop, patogenisitas, virulensi dan resistensi amantadin. Data yang diperoleh diharapkan dapat memprediksi dan mengetahui sifat virus avian influenza subtipe H5N1 Indonesia terkini untuk meningkatkan kewaspadaan kita dalam menghadapi pandemi yang mungkin terjadi.

1.2. PERTANYAAN PENELITIAN

Berdasarkan uraian di atas maka pertanyaan penelitian yang diajukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah terjadi perubahan molekuler pada gen HA, NA, NS dan M pada virus AI subtipe H5N1 setelah lebih dari lima tahun bersirkulasi di Indonesia ?
2. Bagaimanakah karakter molekuler virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI ?
3. Bagaimanakah karakter molekuler virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas di sekitar manusia yang terinfeksi AI subtipe H5N1?
4. Apakah perubahan karakter molekuler virus AI subtipe H5N1 mempengaruhi sensitivitas virus terhadap obat antivirus amantadin ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1. Menganalisis karakter molekuler pada gen HA, NA, NS dan M yang bertanggung jawab terhadap spesifisitas reseptor, patogenisitas dan virulensi virus pada virus AI sub tipe H5N1
2. Menganalisis perbedaan molekuler virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI dengan virus AI asal unggas pada umumnya
3. Mendapatkan karakter dan petanda molekuler virus AI H5N1 pada unggas yang menginfeksi manusia di Indonesia
4. Mendapatkan data resistensi virus AI di Indonesia terhadap amantadin

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1. Di tinjau dari aspek keilmuan, penelitian ini akan memberikan data perubahan virus AI yang dapat memprediksikan kemungkinan adanya mutasi pada virus yang dapat menyebabkan perubahan keganasan, adaptasi virus pada inang dan resistensi virus terhadap obat amantadin.
2. Hasil penelitian ini sangat berguna sebagai bahan acuan untuk penentuan kebijakan kesesuaian penggunaan bibit vaksin dengan virus yang bersirkulasi di lapangan.
3. Data molekuler yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan strategi pengembangan uji deteksi, vaksin dan obat antivirus.

4. Memberi masukan informasi data genetik dan karakter virus AI kepada pengguna atau penentu kebijakan untuk menentukan atau memperbaiki arah kebijakan pengendalian AI di Indonesia.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Struktur Virus Influenza A, B dan C

Famili *Orthomyxoviridae* mempunyai empat genera yaitu virus influenza A, B, C dan Thogotovirus. Virus influenza B dan C sebagian besar hanya terbatas menginfeksi manusia, sedangkan influenza A menginfeksi spesies unggas dan hanya beberapa yang dapat menginfeksi manusia dan hewan lainnya khususnya kuda dan babi (Pringle, 1996).

Virus influenza adalah virus yang mempunyai materi genetik RNA untai tunggal berpolaritas negatif dengan genom bersegmen. Virus influenza A dan B mempunyai delapan segmen, sedangkan virus influenza C mempunyai tujuh segmen (McGeoch dkk., 1976; Desselberger dkk., 1980). Segmen-segmen tersebut secara bebas diselubungi oleh nukleoprotein dan dihubungkan dengan polimerase kompleks. Partikel subviral terdiri dari RNA viral (vRNA), NP dan kompleks polimerase yang disebut dengan partikel ribonukleoprotein (RNP). Delapan (atau tujuh) partikel terletak di dalam selubung protein M1 yang membatasi membran lemak virus. Membran lemak diturunkan dari membran plasma sel terinfeksi selama proses *budding* (Kates dkk., 1962). Tiga protein virus terdapat dalam membran adalah dua glikoprotein permukaan (*spike*) yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) dan protein *membran-channel*, (M2) (Zebedee dan Lamb, 1988). Haemagglutinin (HA) terdiri dari trimer subunit yang identik yang mempunyai aktifitas pengikatan terhadap reseptor dan aktivitas fusi

membran yang diaktivasi dengan pH rendah dalam endosom selama masuknya virus ke dalam sel (Wharton dkk., 1990). Neuraminidase terdiri dari tetramer subunit yang identik yang mempunyai aktifitas menghancurkan reseptor untuk membebaskan virus baru dari permukaan sel yang terinfeksi (Colman, 1989). Bentuk M2 adalah tetramer membran *channel* (Sugrue dan Hay 1991; Pinto dkk., 1992). *Channel* ini kemungkinan berperan pada proses asidifikasi dalam virus ketika melewati endosom asidik yang dibutuhkan untuk membebaskan partikel RNP ke dalam sitoplasma setelah melalui tahap fusi membran (Burkrinskaya dkk 1982; Hay dkk., 1985; Wharton dkk., 1990; Martin dan Helenius, 1991).

Struktur influenza A dan B adalah hampir sama, walaupun virus B lebih reguler. Perbedaan utama virus A dan B adalah rentangan *channel* membran yaitu pada virus A adalah protein M2 (Zabedee dan Lamb, 1988) dikode dengan potongan mRNA dari gen segmen 7 yang juga mengkode M1 (Lamb dkk., 1981). Pada virus B adalah protein NB (Betakova dkk., 1996; Brassard dkk., 1996) yang dikode oleh segmen 6 dari RNA yang mempunyai *overlapping reading frame* dalam mRNA yang sama untuk mengkode NA (Shaw dkk., 1983). Pada virus C, *channel* membran adalah CM2 dan dikode oleh segmen 6 RNA (Hongo dkk., 1997).

Perbedaan lainnya antara virus A dan B adalah ukuran genomnya yaitu 13.588 nukleotida untuk virus A dan 14.639 nukleotida untuk virus B. Perbedaan ini tidak merefleksikan ukuran protein tetapi pada RNA virus B mempunyai sekuen *non-coding* lebih panjang. Sekuen *non-coding* ini kemungkinan mengandung signal yang spesifik tipe untuk mengemas virus baru.

Perbedaan besar antara virus A dan B terhadap virus C adalah virus C hanya mempunyai satu glikoprotein permukaan (Compans dkk., 1977; Herrler dkk., 1979, 1981) dan mengandung hanya tujuh segmen RNA (Desselberger dkk., 1980). Glikoprotein tersebut mempunyai aktivitas fusi dan pengikatan reseptor yang dimiliki protein HA pada virus A dan B (Herrler dkk., 1981; Kitame dkk., 1982). Glikoprotein tersebut juga mempunyai aktifitas penghancuran reseptor seperti pada protein NA pada virus A dan B (Kendal dkk., 1975) merupakan esterase (Herrler dkk., 1985) yang disebut sebagai protein *haemagglutinin-esterase fusion* (HEF).

2.1.1. Genom Virus

Panjang segmen genom dan protein virus influenza A, B dan C dapat dilihat pada Tabel 1. Protein M dan NS adalah segmen terkecil yang mengkode hanya satu produk gen. Sekuen pendek *non-coding* yaitu sekuen nukleotida 11-13 pada ujung 5' dan nukleotida 9-11 pada ujung 3' sangat *conserved* diantara tujuh atau delapan segmen RNA dari genom dan sangat mirip diantara virus A, B dan C (Skehel dkk., 1978; Desselberger dkk., 1980; Stoeckle dkk., 1987).

Gen terbesar dikode oleh komponen RNA polimerase dari influenza A yaitu PB1, PB2 dan PA (Horisberger, 1980) dan ekuivalen dengan virus B dan C (Yamashita dkk., 1989). Segmen 4 mengkode haemagglutinin (HA) dari virus influenza A dan B dan HEF pada influenza C. Segmen 5 mengkode nukleoprotein, komponen struktural utama yang berhubungan dengan RNA menjadi bentuk ribonucleoprotein (RNP). Segmen 6 virus A dan B mengkode

neuraminidase (NA); tidak ada segmen RNA yang ekuivalen dengan neuraminidase pada virus C, tetapi fungsinya dilakukan oleh protein HEF. Segmen 6 pada virus influenza B juga mengkode protein NB. Dua protein yaitu NA dan NB ditranslasikan dari *reading frame overlapping bicistronic* mRNA; NB menginisiasi pertama pada AUG, empat nukleotida sebelum AUG yang menginisiasi translasi NA (Shaw dkk., 1983). Sebanyak 300 nukleotida mengkode 100 asam amino NB, sedangkan sekuen nukleotida sebanyak 1398 mengkode sebanyak 466 asam amino NA yang menempati sebagian besar transkrip mRNA (Betakova dkk., 1996; Brassard dkk., 1996). Berdasarkan kemiripan dan aktivitas *ion channel* diperkirakan bahwa NB mempunyai fungsi yang mirip dalam *uncoating* virus seperti pada M2 yang merupakan produk gen M virus influenza A.

Tabel 1. Gen virus influenza A, B dan C serta produk protein yang dihasilkan

Segmen Genom	Influenza A		Influenza B		Influenza C	
	Panjang segmen RNA (basa)	Panjang polipeptida (asam amino)	Panjang segmen RNA (basa)	Panjang polipeptida (asam amino)	Panjang segmen RNA (basa)	Panjang polipeptida (asam amino)
PB2	2341	759	2396	770	2365	774
PB1	2341	757	2386	752	2363	754
PA	2233	716	2308	726	2183	704
HA	1778	566	1882	584	2071	654
NP	1565	498	1842	560	1809	565
NA	1413	454	1557	466 (NA)	-	-
				100 (NB)		

M	1027	252 (M1)	1188	248 (M1)	1180	241 (M1)
		97 (M2)		109 (BM2)		139 (CM2)
NS	890	230 (NS1)	1098	281 (NS1)	934	216 (NS1)
		121 (NS2)		122 (NS2)		122 (NS2)

2.1.2. Struktur dan Fungsi Haemagglutinin virus Influenza A

Protein hemagglutinin adalah protein membran integral dan antigen permukaan utama dari virus influenza. Protein ini berfungsi untuk pengikatan reseptor sel target dan fusi diantara selubung virion dan sel target. Hemagglutinin dikode oleh RNA segmen 4 dan mengalami tiga jenis proses pasca translasi yaitu: pemisahan proteolitik, glikosilasi dan *fatty acid acylation*.

Hemagglutinin sebagai determinan patogenisitas

Glikoprotein HA berperan sangat penting (Garten dan Klenk, 1999; Steinhauer, 1999). Infeksi diawali dengan pengikatan virus pada reseptor sel dan menyebabkan lepasnya viral RNP melalui fusi membran (White dkk., 1982). Aktivasi proteolitik *post translation* dari prekursor molekul HA (HA0) menjadi subunit HA1 dan HA2 oleh protease inang menghasilkan *domain fusogenic* pada amino terminus dari HA2, yang memperantarai fusi diantara amplop virus dan membran endosom. Aktivasi proteolitik dari molekul HA sangat penting untuk infektivitas (Klenk dkk., 1975; Lazarowitz dan Chopin, 1975) dan untuk penyebaran virus pada tubuh inang (Garten dan Klenk, 1999). Hemagglutinin virus avirulen biasanya dapat terpisah terbatas hanya pada beberapa tipe sel, sehingga virus dapat menyebabkan infeksi lokal dalam saluran napas dan saluran

pencernaan, atau pada keduanya menghasilkan infeksi ringan atau asimtomatik. Hemaglutinin pada virus avian tipe virulen dapat terbelah pada berbagai macam jenis sel dan dapat menyebabkan infeksi sistemik sehingga dapat menyebabkan kematian pada ayam. Pada kultur jaringan, virus HA tipe virulen dapat terbelah tanpa protease eksogen seperti tripsin, sedangkan pada virus avirulen hal ini tidak dapat dilakukan. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan sensitivitas dari dua jenis HA terhadap protease selular endogen (Bosch dkk., 1979). Penemuan ini berimplikasi bahwa *cleavability* HA adalah satu dari determinan utama pada jaringan virus avian influenza. Perbedaan distribusi protease jaringan dan kepekaan HA terhadap enzim ini menentukan terjadinya infeksi virus.

Sekuen yang dibutuhkan untuk *cleavability* hemagglutinin dan virulensi

Dua bentuk struktur yang berperan dalam *cleavability* HA; sekuen asam amino pada *cleavage site* dan karbohidrat dalam *vicinity* dari *cleavage site*. Perbandingan sekuen asam amino di alam antara virus avian influenza avirulen dan virulen telah menunjukkan bahwa HA dengan *cleavability* yang terbatas (tipe avirulen) biasanya mempunyai Arginin tunggal (R) sedangkan tipe virulen dengan *cleavability* yang tinggi mempunyai rangkaian residu asam amino basa pada *upstream* dari *cleavability site* (Bosch dkk., 1981). Sebagian besar virus avian influenza mempunyai R pada karboksil terminus dari HA1 dan glisin (G) pada amino terminus dari HA2, meskipun beberapa mempunyai Lisin (K) pada posisi tersebut (Gunther dkk., 1993; Kawaoka dkk., 1990). Diantara virus H5, Prolin (P) dan Glutamin (Q), berlokasi di proksimal *upstream* dari karboksil terminus HA1,

dan juga *conserved*. Diantara residu Q dan G terdapat daerah yang didisain sebagai *connecting peptide* (-P-Q-X-....-X-R//G-, dimana // menunjukkan *cleavage site* diantara HA1 dan HA2 dan X adalah asam amino bukan basa. Sekuen di daerah ini bervariasi dalam komposisi asam amino dan jumlah asam amino tergantung strain virus. Secara alami virus H5 avirulen mempunyai empat asam amino pada *connecting peptide*; sebagian besar mempunyai R-E-T-R (jarang yang mempunyai K-Q-T-R, R-E-T-K, I-G-E-R dan R-E-A-R (Senne dkk., 1996). Hemagglutinin (HA) tipe virulen mengandung B-X-B-R (B adalah asam amino basa) dalam ketidakterdapatannya *carbohydrate side chain* didekatnya. Jika *carbohydrate moiety* ada, insersi dua asam amino yaitu X-X-B-X-B-R, atau dibutuhkan perubahan pada *conserved* prolin (P) atau glutamin (Q) ke residu basa, B(X)-X(B)-B-X-B-R, sehingga virus ini adalah *nonpathogenic* (Kawaoka dkk., 1984).

Hampir sama dengan virus H7 residu *conserved* ditemukan pada *upstream* dari *carboxyl terminus* HA1 : P-E-X-P-X-....-X-R//G- atau P-E-P-S-X-..-X-R//G. Residu diantara P atau S dan G terletak pada *connecting peptide*. Sebagian besar virus H7 avirulen mempunyai motif K-X-R. Penjejeran sekuen *connecting peptide* dari virus avirulen dan avirulen mutan menunjukkan bahwa R-X-B-R adalah sekuen minimal yang dibutuhkan untuk H7 tipe virulen (Vey dkk., 1992). Apakah K pada posisi keempat *upstream* dari *cleavage site* diterima untuk *cleavability* HA tergantung pada HA. Mutan avirulen dari A/Fowl/Victoria/75 mempunyai K-K-K-E-K-R pada *cleavage site* (Vey dkk., 1992) sedangkan isolat virulen Chicken/Leipzig/79 (H7N7) mempunyai sekuen HA *cleavage site* K-K-

K-K-R dan A/Goose/Leipzig/187-7/79 (H7N7)-mempunyai sekuen HA *cleavage site* K-K-K-K-K-K-R (Rohm dkk., 1996).

Aktivitas *error-prone* RNA polimerase menyebabkan HA virus AI mempunyai rata-rata mutasi yang sangat tinggi. Mutasi diperkirakan sekitar 2×10^{-3} substitusi basa per posisi per generasi virus atau sekitar substitusi satu basa pada gen HA per generasi virus. Seleksi substitusi asam amino sedikitnya dikendalikan oleh tekanan imunologis karena HA adalah target utama dari respon imun inang. Walaupun HA merupakan molekul yang sangat cepat bermutasi, asam amino di daerah penempelan reseptor pada protein HA (sebagian besar adalah asam amino prolin dan sistein) adalah sangat *conserved*. Di alam setidaknya terdapat 16 subtipe HA (H1, H2, dst) (Murphy dan Webster ., 1996 ; Fouchier dkk., 2005) dan berbeda sekitar 30% sekuen asam amino pada protein HA1 dan secara serologi tidak bereaksi silang (Rohm dkk., 1996).

2.1.3. Struktur dan Fungsi Neuraminidase virus Influenza A

Neuraminidase (NA) dikode oleh segmen 6 RNA yang juga merupakan glikoprotein permukaan kedua setelah HA. Neuraminidase (sialidase) mengkatalisa ikatan glikosidik yang berbatasan dengan asam *N-acetyl-neuraminic* (Neu5Ac,sialic acid). Asam sialat secara umum memiliki residu gula terminal pada sisi rantai oligosakarida dari glikokonjugat dan hal ini merupakan bagian integral dari reseptor virus influenza. Enzim viral selanjutnya akan menghancurkan reseptor ini. Adanya aktivitas enzim seperti ini dipermukaan virion seperti halnya berlawanan dengan yang dibutuhkan pada saat pengikatan viral

pada sel. Peran biologi enzim ini dipelajari oleh Palese dan Compans (1976), yang mengamati saat virus dikultur dengan penambahan inhibitor enzim yang dibatasi hanya pada replikasi tunggal dengan mengimobilisasi permukaan sel terinfeksi. Hasilnya adalah bahwa enzim tidak berperanan dalam pengikatan, fusi, replikasi, penyusunan atau *budding* dari virus. Penemuan ini merupakan penemuan inhibitor neuraminidase poten (Von Itzstein dkk., 1993). Aktivitas antivirus pada hewan dan manusia lebih bisa menjelaskan peran enzim pada siklus hidup virus dan terutama pada hubungan keseimbangan antara pengikatan selular dan penghilangan reseptor.

Aktivitas enzim *receptor-destroying* NA pada protein viral permukaan sel adalah menghilangkan residu asam sialat terminal. Desialisasi berguna untuk mencegah agregasi anakan virus, yang secara nyata menurunkan infektivitas (Palese dan Young., 1982).

Neuraminidase virus influenza adalah glikoprotein permukaan dengan masa 240 kDa. Pada elektron mikroskop dengan pewarnaan negatif (Wrigley dkk., 1973), protein ini berbentuk seperti jamur. *Stalk* peptida hidrofobik protein ini bertanggung jawab untuk membran *anchoring* dan *globular head* mengandung tempat enzim aktif dan *antigenic site* dari molekul (Lever, 2978).

Pada sekuensing asam amino dan gen (tinjauan Colman, 1989) menunjukkan bahwa membran anchor terletak dekat N-terminus (residu 7-35) dan tempat *protease cleavage* ditemukan terletak dekat residu 80 (Lever, 1978). Neuraminidase mempunyai polipeptida yang terdiri dari 470 asam amino, dan jumlah ini bervariasi tergantung pada strain (Varghese dkk., 1983).

2.1.4. Struktur dan Fungsi Matrix

Gen M virus influenza terdiri dari 1.027 basa dan mengkode dua protein yaitu protein M1 dan M2 diturunkan oleh *splicing* mRNA (Allen dkk., 1980; Lamb., 1989). *Open reading frame* dimulai dari nukleotida ke 26 sampai 740 (gen M1) yang mengkode protein M1, sedangkan nukleotida 26-51 dan 740-1004 memisah dari *reading frame* +1 (gen M) yang mengkode protein M2. M1 internal protein (panjangnya 252 asam amino) adalah komponen mayoritas dari partikel virus yang berfungsi dalam penyusunan dan *budding* virus (Choppin dkk., 1972). M2 mempunyai 97 asam amino adalah protein transmembran dengan peran yang tidak jelas dalam replikasi virus (Lamb dkk., 1985).

2.1.4.1. Protein M1

Protein matrix virus influenza (M1) adalah partikel protein virus yang paling berlimpah, berperan penting dalam beberapa aspek dari replikasi virus dari mulai masuknya virus dan *uncoating* sampai penyusunan dan *budding* dari partikel virus (Lamb dan Krug, 2001; Nayak dan Hui, 2002). Struktur N terminus (aa 2-164) dari M1 telah ditentukan dengan kristalisasi, difraksi X-ray, *circular dichroism* dan *tritium bombardement* (Sha dan Luo, 1997; Shishkov dkk., 1999, Artz dkk., 2001; Harris dkk., 2001). M1 terdiri dari dua domain yang berbeda yaitu N dan M, yang terdiri dari helik dan *loop*. Beberapa domain spesifik pada protein M1 adalah domain *lipid-binding*, domain *RNA-binding*, domain *transcription inhibition*, *nuclear localization signal* (NLS) dan sebuah motif *putative zinc finger-binding* (Wakefield dan Brownlee, 1989). Motif

putative zinc finger-binding motif M1 (¹⁴⁸CATCEQIADSQHRSH¹⁶²) (Wakefield dan Brownlee, 1989) terletak pada C terminus helik 9 (H9) dan diperpanjang sampai loop 9 (L9) (Sha dan Luo, 1997; Arzt dkk., 2001; Harris dkk., 2001). Sekuen asam amino yang terlibat dalam *zinc binding* adalah yang merepresentasikan motif CCHH *zinc finger* yang khas adalah (CX₂₋₄CX₂₋₁₅HX₂₋₆H, dan X adalah residu asam amino apa saja) (tinjauan Iuchi, 2001). Protein CCHH *zinc finger* terdiri dari bermacam-macam famili protein atau RNA *binding* dan berfungsi untuk regulasi transkripsi (tinjauan Takatsuji, 1998; Iuchi, 2001).

Motif *zinc finger-like* ditemukan pada sejumlah protein viral struktural dan telah ditunjukkan mempunyai peran penting dalam siklus hidup virus influenza (Fernandez-Pol dkk., 2001). Beberapa peristiwa yang memperkirakan motif CCHH dalam M1 yang berperan penting dalam replikasi virus adalah pertama analisis penjejeran sekuen asam amino menunjukkan bahwa motif CCHH adalah *conserved* diantara virus influenza A dan B (Wakefield dan Brownlee, 1989). Kedua, ion *zinc* ditemukan dalam kaitannya dengan fraksi dari molekul protein M1 virus influenza (Elster dkk., 1994). Ketiga, Okada dkk (2003) melaporkan perubahan konformasi tergantung pH dalam struktur peptide 28-mer meliputi daerah ini dengan adanya *zinc* dan membuat sebuah model untuk *binding zinc*. Lebih lanjut, telah juga diprediksi bahwa fraksi kecil dari molekul M1 yang terikat pada *zinc* sepertinya juga berperan penting dalam *uncoating* virus pada pH asam. Keempat, peptide 4 adalah peptida sintetik *zinc finger* berdasarkan sekuen M1 ¹⁵²EQIADSQHRSHRQMV¹⁶⁶ dan peptida 6, yang berkaitan dengan sekuen M1 yaitu ¹⁴⁸CATCEQIADSQHRSHRQMV¹⁶⁶ yang ditunjukkan sebagai inhibitor

poten dari transkripsi virus influenza (Judd dkk., 1992). Peptida 6 ditunjukkan juga menghambat CPE pada sel MDCK yang terinfeksi virus (Nasser dkk., 1996) dan patogenisitas mencit yang diinfeksi virus influenza (Judd dkk., 1997). Studi-studi ini berimplikasi bahwa motif CCHH pada 148-162 dan fungsi *zinc-binding* dari motif tersebut berperan penting dalam replikasi virus.

Protein M1 influenza virus berperan penting dalam beberapa aspek dalam replikasi virus dan memiliki domain untuk fungsi yang spesifik dalam siklus infeksi. Beberapa tahun yang lalu, diduga adanya peran domain fungsional dari M1 dalam siklus hidup infeksi virus influenza. Namun, pada beberapa tahun terakhir ini diperlihatkan bahwa NLS dari M1 tidak mempunyai peranan yang penting pada siklus hidup virus tetapi regio ini sepertinya mempunyai sebuah motif *late (L) assembly domain* dan mutasi NLS dapat diselamatkan oleh motif domain L seperti PTAP dan YPDL (Hui dkk., 2003). M1 juga mempunyai CCHH motif pada H9 dan berdekatan dengan *loop* L9 yang berfungsi sebagai motif *putative zinc-binding*. Residu sistein yang terdapat pada sisi yang sama dengan helix dapat terakses dari permukaan (Okada dkk 2003). Fungsi dan peran motif CCHH dalam biologi virus menjadi kontroversial. Motif ini dikatakan sebagai *bind zinc* (Elster dkk., 1994) dan berperan penting dalam siklus hidup virus termasuk penghambatan transkripsi oleh M1 dan juga *uncoating* serta patogenesis virus (Judd dkk., 1992; 1997. Nasser dkk., 1996; Okada dkk., 2003). Pada sisi yang lain, pertimbangan struktural dari region berimplikasi bahwa motif CCHH kemungkinan bukan *bind zinc* atau merupakan *zinc-binding* yang sangat penting untuk *vRNP-binding* atau penghambatan transkripsi yang diperantarai

oleh M1 vRNP virus influenza (Watanabe dkk., 1996; Elster dkk., 1997; Perez and Donis, 1998).

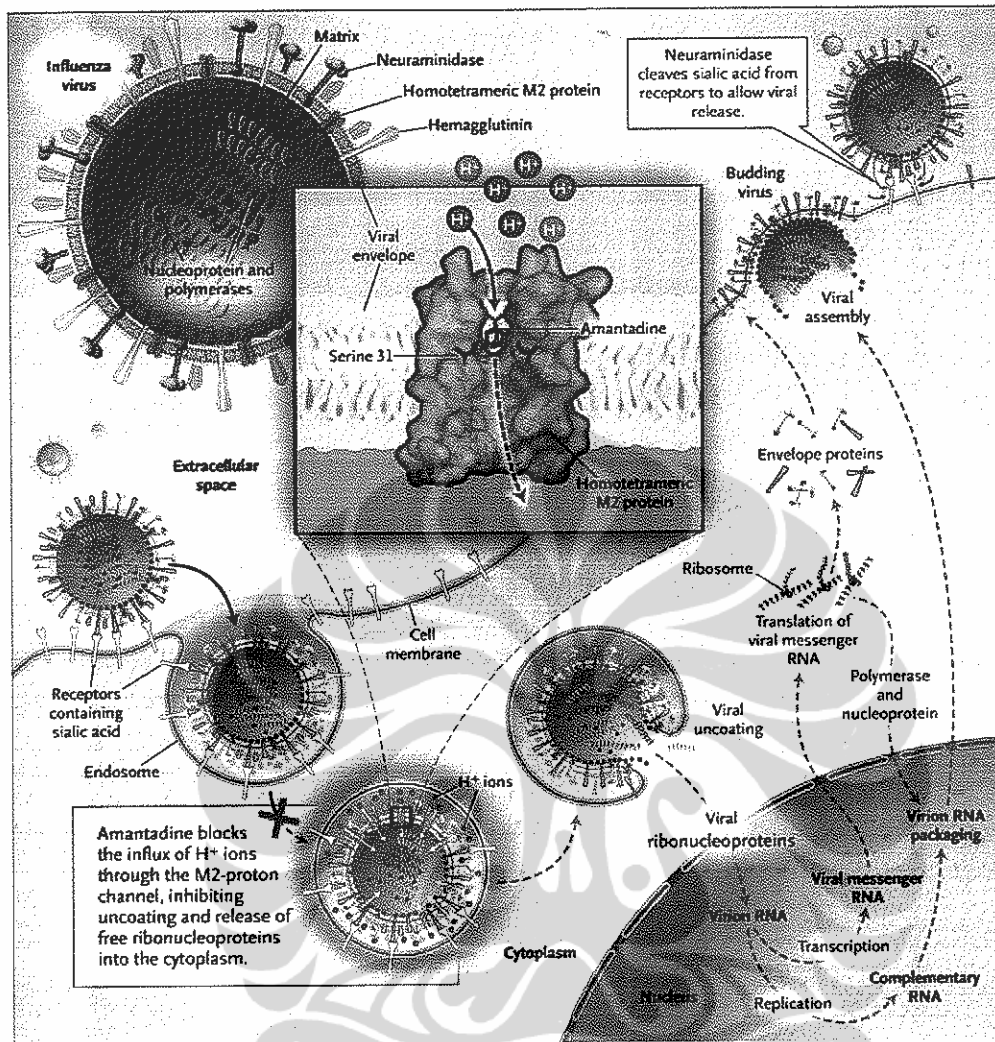
2.1.4.2. Protein M2

Messenger RNA (mRNA) dari protein M2 juga ditranskripsi dari RNA segmen 7 yang diturunkan dari koliner transkrip M1 dengan *splicing*. M2 adalah protein membran protein yang memiliki domain *membran-spanning* yang juga menyediakan sinyal untuk transpor ke permukaan sel. Ditemukannya sejumlah besar tetramer pada permukaan sel terinfeksi dan sejumlah kecil yang ditemukan pada viron membuktikan bahwa peran M2 sebagai *ion proton channel* yang dikontrol oleh pH golgi selama sintesis HA yang diikuti interior asidifikasi virion selama *uncoating* virus (tinjauan Webster dkk., 1992)

Analisis sensitivitas obat antara yang sensitif amantadin dan resisten amantadin pada virus menunjukkan faktor yang menentukan kepekaan terhadap amantadin dan hubungannya dengan inhibitor pada gen M (Belshe dkk., 1988). Sebagian besar mutan resisten yang diseleksi dari pasase virus pada sel kultur dengan keberadaan obat atau resistensi yang telah terjadi pada hewan, unggas atau manusia terhadap amantadin atau rimantadin, diakibatkan perubahan asam amino dalam domain transmembran M2, terutama pada residu 26, 27, 30, 31 atau 34 tergantung pada virus (Hay dkk., 1986; Belshe dkk., 1988). Derivat adamantane seperti amantadin dan rimantadin berhasil digunakan untuk pengobatan dan pencegahan infeksi virus influenza A lebih dari 30 tahun (Belshe dkk., 1988; Dolin dkk., 1982; Tominack dan Hayden., 1987). Obat ini dikenal

sebagai *channel blockers* yang menghambat-replikasi virus influenza A dengan menghambat protein M2 *ion channel* yang mencegah fusi virus dengan membran sel inang untuk melepaskan RNA virus ke sitoplasma sel terinfeksi (Wang dkk., 1993).





Gambar 1. Mekanisme resistensi terhadap inhibitor M2

Keterangan Gambar :

Tidak adanya amantadin, *proton channel* akan memediasi *influx ion H⁺* ke dalam proses awal virion terinfeksi dalam siklus replikasi virus yang memfasilitasi disosiasi ribonukleoprotein dari virion interior dan sampai mereka terlepas ke dalam sitoplasma dan ditransportasi ke dalam nukleus. Pada virus unggas *highly pathogenic* (H5 dan H7), M2-*proton channel* melindungi hemagglutinin dari inaktivasi yang diinduksi asam dalam jaringan trans-Golgi selama transpor ke dalam permukaan sel. Adanya amantadin, *channel* diblok dan replikasi dihambat. Serin pada posisi 31 sebagian dalam protein-protein *interface* dan sebagiannya lagi di dalam *channel*. Penggantian serin dengan asparagin yang lebih besar berperan terhadap hilangnya fungsi binding amantadin dan restorasi dari fungsi *channel*. Tergantung pada asam amino, mutasi lainnya di posisi 26, 27, 30, atau 34 kemungkinan juga menghambat *binding* amantadin. Ilustrasi dibuat oleh Rupert Russell, Phillip Spearpoint, and Alan Hay, *National Institute for Medical Research*, London (Hayden, 2006).

2.1.5. Struktur dan Fungsi Protein NonStruktural (NS)

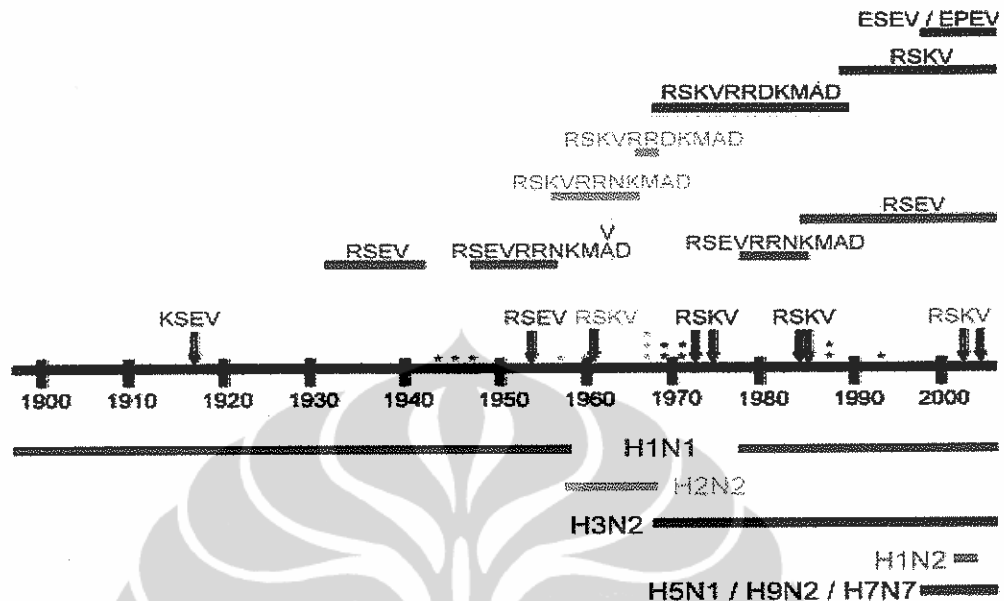
Untuk membatasi penyebaran virus, sel yang terinfeksi oleh virus biasanya mempunyai mekanisme yang kuat dan respon antivirus yang luas (Randall dan Goodbourn, 2008). Oleh karena itu, untuk bertahan hidup di alam, virus influenza mengembangkan beberapa mekanisme untuk mengelak terhadap pertahanan yang telah dibuat inang. Beberapa strategi yang strain-spesifik, seperti misalnya dengan peningkatan kecepatan replikasi (Grimm dkk., 2007; Kurokawa dkk., 1999), atau penurunan sensitivitas efektor antivirus sel inang (Dittmann dkk., 2008). Protein NS1 pada semua influenza A adalah sebagai antagonis respon imun inang. (Egorov dkk., 1998; Garcia-Sastre dkk., 1998; Kochs dkk., 2007). Li dkk (2006b) menyatakan dalam penelitiannya bahwa NS1 berkontribusi terhadap virulensi virus influenza.

Virus influenza mutan yang tidak mengekspresikan NS1, hanya menunjukkan patogenisitas yang tinggi pada mencit yang kekurangan mediator antivirus seperti STAT1 (Garcia-Sastre dkk., 1998), atau protein kinase yang diaktifkan dsRNA, PKR (Bergmann dkk., 2000; Kochs dkk., 2007). NS1 adalah protein multifungsi yang diantaranya adalah melakukan kegiatan regulasi temporal sintesis RNA, mengontrol *splicing* RNA virus, peningkatan translasi mRNA virus, regulasi morfogenesis partikel virus, supresi respon imun dan apoptosis inang, aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan keterlibatan dalam patogenesis yang tergantung strain.

2.1.5.1. Sintesis dan Biokimia NS1

Protein NS1 virus influenza A adalah komponen bukan struktural dari virion, tetapi protein ini diekspresikan pada level yang sangat tinggi pada sel terinfeksi (Krug dan Etkind, 1973; Palese dan Shaw, 2007). Protein NS1 dikode oleh *collinear* mRNA yang berasal dari segmen 8 vRNA, sebagai hasil *splicing* pada sintesis *nuclear export protein* mRNA (NEP, sebelumnya diistilahkan NS2) (Inglis dkk., 1979; Lamb dan Choppin, 1979). Potongan mRNA kedua jenis protein ini menggunakan 56 nukleotida pada ujung 5 secara bersama dan menghasilkan NS1 serta NEP berbagi 10 N-terminal asam amino (Lamb dan Lai, 1980). Pada sel terinfeksi, jumlah potongan NEP mRNA hanya kira-kira 10% dari NS1 mRNA yang belum terpotong (Lamb dkk., 1980). Seperti dijelaskan di bawah ini, regulasi *splicing* dikontrol oleh protein NS1 virus sendiri (Garaigorta dan Ortin, 2007) dan mungkin merupakan mekanisme untuk autoregulasi protein dalam sel terinfeksi.

NS1 memiliki strain-spesifik dengan panjang 230-237 aa, dan diperkirakan mempunyai massa molekul sekitar 26 kDa (Palese dan Shaw, 2007). Secara alami terjadi pemotongan protein NS1 pada C-terminal (~ 15-30 aa) (Suarez dan Perdue, 1998). Pada tahun 1940-an, analisis sekuen menunjukkan bahwa protein NS1 dengan panjang 230 aa dan kemudian meningkat sekitar tujuh asam amino pada virus manusia H1N1 (Gambar 2).



Gambar 2. Sekuen asam amino C-terminal protein NS1 virus influenza manusia

Keterangan Gambar :

Diagram skematik yang menggambarkan asam amino C-terminal residu 227–230/237 protein NS1 protein dari virus influenza pada manusia yang diisolasi sejak tahun 1918. Sirkulasi virus influenza A pada manusia ditunjukkan sesuai dengan waktu. Warna-warna merepresentasikan subtipe yang bersirkulasi : merah, H1N1; hijau, H2N2; biru, H3N2; jingga, H1N2; dan ungu virus H5N1/H9N2/H7N7 pada manusia yang berasal dari unggas. Sekuen C-terminal dari asam amino 227 diperlihatkan diatas sesuai waktu dengan isolat yang pertama kali diisolasi pada tahun 1918 yang menunjukkan sekuen KSEV. Pada akhir 1940, protein NS1 mengalami perpanjangan tujuh asam amino (RRNKMAD) dan perpanjangan ini setelah itu terpelihara pada semua subtipe influenza virus pada manusia dan kemudian hilang pada saat terjadinya ko-sirkulasi antara virus H1N1 dan H3N2 pada akhir 1980. Sepanjang waktu ini sejumlah influenza yang diisolasi memiliki pemendekan C-terminal protein NS1 yang ditunjukkan dengan tanda asterik. Virus yang diturunkan dari spesies unggas memiliki sekuen ESEV dan EPEV pada sekuen konsensus PDZ domain ligand (PL). (Gambar disadur dari Hale dkk., 2008b).

Ekstensi asam amino ini ditemukan pada virus manusia H1N1, H2N2 dan H3N2 sampai tahun 1980-an, dan ketika virus H3N2 dan H1N1 keduanya bersirkulasi bersama, virus kehilangan ekstensi ini melalui mekanisme reversi.

Adanya ekstensi ini dan mengapa ekstensi ini kemudian hilang, tidak sepenuhnya jelas, meskipun secara fungsional diimplikasikan dalam *nuclear* dan *nucleolar localization* dari NS1 (Melen dkk., 2007). Interaksi antara NS1 *C-terminus* dengan berbagai protein selular, seperti *poly (A)-binding* protein I (PABPI) dan protein yang mengandung PDZ domain, sepertinya juga masih belum jelas.

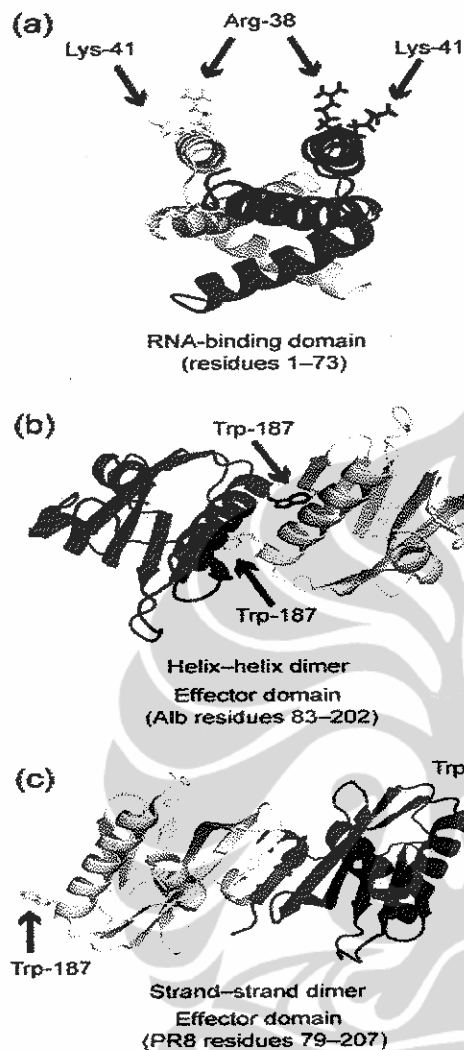
Analisis filogenetik sekuen asam amino NS1 juga menunjukkan bahwa protein NS1 dapat dibagi menjadi dua kelompok besar, awalnya dikenal sebagai alela A dan B (Treanor dkk., 1989; Ludwig dkk., 1991). Sejumlah protein NS1 dari virus avian influenza bersama dengan semua virus influenza dari manusia, babi dan kuda virus influenza disebut sebagai alel A, sedangkan alel B khusus untuk virus unggas. Tingkat homologi didalam alel adalah 93-100%, namun diantara alel sedikitnya sekitar 62%. Ketika virus rekombinan manusia mengandung alel B protein NS1 digunakan untuk menginfeksi *squirrel monkeys*, terdapat penurunan kemampuan virus dalam melakukan replikasi pada saluran pernafasan dibandingkan dengan virus jenis-liar (WT) (Treanor dkk., 1989). Hal ini memperlihatkan bahwa alel A protein NS1 protein memiliki keuntungan jika bereplikasi pada mamalia. Analisis lebih lanjut mengungkapkan bahwa alel A protein NS1 berada terus di bawah tekanan seleksi untuk melakukan mutasi, sedangkan pada alel B tidak mengalami hal demikian (Ludwig dkk., 1991).

Alel B kemungkinan mewakili versi *archaic* dari protein ini dan setelah berada dalam populasi virus influenza manusia dengan melalui *reassortment*, NS1 berada dibawah tekanan seleksi yang kuat untuk bermutasi. Besarnya tingkat evolusi diantara dua alela mungkin menunjukkan bahwa

terdapat hambatan fungsi nyata dari protein NS1 diantara spesies inang. Signifikansi alel NS1 dalam virulensi dan patogenisitas virus influenza belum sepenuhnya jelas, namun sebagian besar virus influenza HPAI yang diisolasi dari manusia memiliki alel A dari protein NS1 (Zohari dkk., 2008).

2.1.5.2. Struktur protein NS1

NS1 terbagi menjadi dua domain fungsional yang berbeda yaitu sebuah N-terminal *RNA-binding domain* (residu 1 -73) (Gambar 3a). Domain ini secara *in vitro* mengikat dengan afinitas rendah ke beberapa spesies RNA secara berurutan secara independen (Chien dkk., 2004; Hatada dan Fukuda, 1992; Qian dkk., 1995), dan *C-terminal 'effector' domain* (residu 74-230) (Fig. 3b, c), yang secara dominan memperantarai interaksi protein sel dengan inang, tetapi juga secara fungsional *menstabilisasi RNA-binding domain* (Wang dkk., 2002).



Gambar 3. Struktur protein NS1

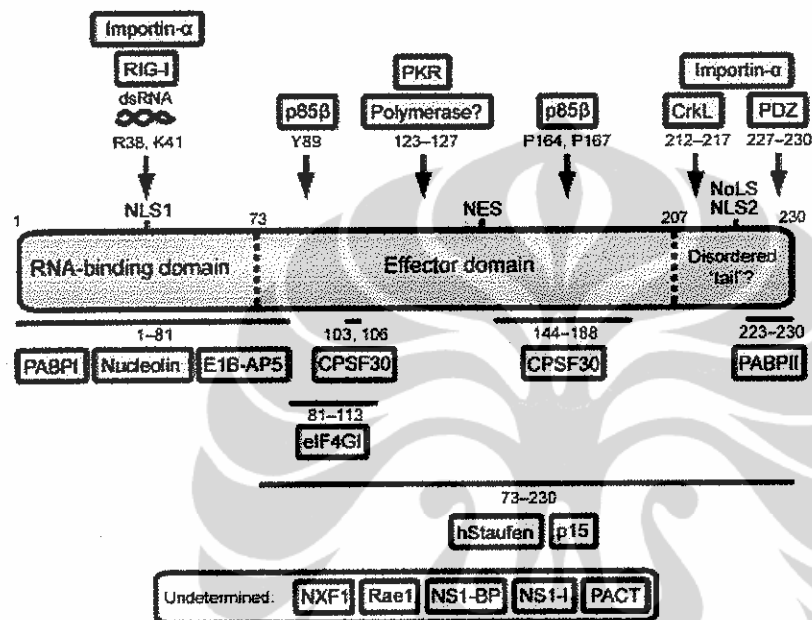
Keterangan Gambar :

(a) Gambar rantai kartun yang merepresentasikan *dimeric RNA-binding domain* (A/Udmn/72 [H3N2]; residu 1-73). Arg-38 and Lys-41, yang merupakan hal penting untuk RNA-binding, ditunjukkan dengan tanda panah (b) dan (c) adalah rantai kartun ribbon yang merepresentasikan konformasi dimerisasi dua *effector domain* (b) Residu 83-202 (*helix-helix dimer*) dari A/Duck/Albany/76 [H12N5] (c) Residu 79-207 (*strand-strand dimer*) A/Puerto Rico/8/34 [H1N1]. Trp-187, ditunjukkan secara ekperimental esensial untuk dimerisasi avian NS1 protein *effector domain*, yang ditunjukkan dengan tanda panah. Untuk semua struktur, (a-c), monomer diwarnai dengan biru dan kuning. Gambar diatas dibuat dengan menggunakan MacPyMol (PDB files: 1NS1, 2GX9, 3D6R) (Gambar disadur dari Hale dkk., 2008b).

RNA-binding domain adalah simetris homodimer dengan masing-masing monomer yang terdiri dari tiga- α helik (Chien dkk., 1997, Liu dkk., 1997). Studi kristalografi menunjukkan bahwa domain *C-terminal effector* pada protein NS1 virus influenza manusia dan unggas (residu 74-230) (Gambar 4) dapat melakukan homodimerisasi secara independen, dengan masing-masing monomer yang terdiri dari tujuh β -strands dan tiga α -helik (Bornholdt dan Prasad, 2006; Hale dkk., 2008a).

Pada Gambar 4 menunjukkan bahwa protein NS1 (berwarna kuning) mempunyai panjang asam amino 230–237 tergantung dari strain. Tujuh puluh tiga asam amino N-terminal membentuk sebuah *RNA-binding domain* fungsional, sedangkan *effector domain* secara predominan memediasi interaksi protein sel dengan inang. Dua puluh asam amino pada asam amino C-terminal ~20 merupakan protein non struktural. NS1 terdiri dari dua *nuclear localization sequences* (NLS1 dan NLS2), dan sebuah *nuclear export sequence* (NES). Residu yang terlibat dalam *RNA-binding* (Arg-38 [R38] dan Lys-41[K41]) diimplikasikan dalam penghambatan OAS/RNase L, Jun N terminal kinase, dan RIG-I. Lebih lanjut, NS1 mengandung *binding sites* untuk poly(A)-*binding protein* I (PABPI), p85b, *importin-a*, *nucleolin*, NS1-BP, eIF4GI, hStaufen, NS1-I, PKR, PACT, CPSF30, poly(A)-*binding protein* II (PABPII), Crk/CrkL, domain PDZ, viral polimerase, dan komponen seluler mRNA *nuclear export machinery* (E1B-AP5, p15, NXF1, dan Rae1). Interaksi NS1 dengan *nucleolin*, dan NS1-I

(17 β -oestradiol dehydrogenase precursor protein) (Wolff dkk., 1996) sejauh ini belum banyak dikarakterisasi.



Gambar 4. Representasi skematik protein NS1 dan protein yang berinteraksi dengannya. (Gambar disadur dari Hale dkk., 2008b).

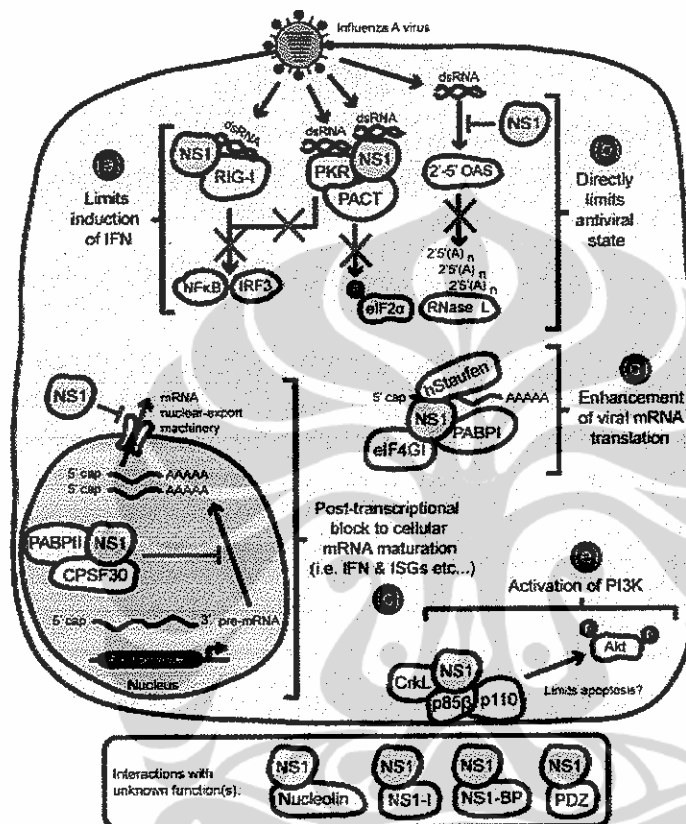
2.1.5.3. NS1 membatasi aktivitas PKR dan OAS

NS1 dapat secara langsung menghambat fungsi dua protein antivirus sitoplasma yaitu 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) (Min dan Krug, 2006), dan *dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase R* (PKR) (Min dkk., 2007) (Gambar 5). OAS / Rnase L dan PKR merupakan kunci regulator dari proses transkripsi dan translasi virus, tetapi berperan juga dalam pertahanan awal seperti induksi IFN- β dan respon apoptosis inang (Garcia dkk., 2006; Silverman,

2007). OAS diaktifkan oleh dsRNA, diduga merupakan produk dari replikasi virus, dan polimerisasi ATP menjadi rantai 2'-5' *oligoadenylate*. Rantai ini menyebabkan dimerisasi dan aktivasi laten RNase, RNase L, yang menghambat replikasi virus dengan degradasi RNA (Silverman, 2007). Data menunjukkan bahwa fungsi utama NS1 *RNA-binding domain* adalah keluarnya OAS untuk berinteraksi dengan dsRNA, sehingga penghambatan ini merupakan strategi antivirus inang (Min dan Krug, 2006). Peran RNase L dalam menambah produksi IFN- β (Silverman, 2007), kemungkinan inaktivasi OAS yang diperantarai NS1 juga berkontribusi terhadap supresi sintesis IFN- β (Donelan dkk., 2003; Talon dkk., 2000).

Double strand ribonucleic acid (dsRNA) juga terikat dan mengaktifasi PKR, melepaskan *PKR auto-inhibition* yang merupakan substrat utama untuk mengaktifkan PKR adalah *eukaryotic translation initiation factor 2a* (α IF2 α), fosforilasi yang berperan terhadap pengurangan sintesis protein selular dan protein virus (Garcia dkk., 2006). Dalam percobaan *in vitro*, menunjukkan bahwa pada awalnya mungkin juga NS1 berkompetisi dengan PKR untuk mengikat dsRNA (Hatada dkk., 1999; Lu dkk., 1995). Namun, *RNA-binding* yang defek pada protein NS1 secara efisien membatasi aktivasi PKR dalam merespon dsRNA atau PACT yang merupakan sebuah pengaktif protein dari PKR (Li dkk., 2006a). Selain itu, NS1 juga berinteraksi dengan PKR, yang memerlukan residu 123-127 dari NS1 (Li dkk., 2006a; Min dkk., 2007). Berdasarkan studi pemetaan domain, diperkirakan NS1 terikat pada daerah penghubung dalam PKR dan dengan

demikian mencegah perubahan konformasi- yang biasanya diperlukan untuk melepaskan *PKR auto-inhibition* (Li dkk., 2006a).



Gambar 5. Diagram skematik dari multifungsi NS1 dalam sel terinfeksi (Hale dkk., 2008b)

Keterangan gambar :

a) terbatasnya pre-transkripsi dari induksi IFN β b) Inhibisi kemampuan antiviral dari PKR c) penghambatan pos-transkripsi untuk memproses dan ekspor nuklear dari semua mRNA seluler, d) Penguatan translasi viral mRNA, e) Aktivasi PI3K. Interaksi dengan sesuatu yang tidak diketahui akibatnya secara detail berada dalam kotak bawah (Gambar disadur dari Hale dkk., 2008b).

2.1.5.4. NS1 dan Respon apoptosis inang

Fungsi biologis apoptosis selama infeksi virus influenza A tidak begitu jelas, meskipun sering dianggap sebagai mekanisme antiviral selular yang akan membatasi replikasi virus. Virus influenza telah mengembangkan berbagai cara untuk menunda ini, sebagai strategi pertahanan inang (Ehrhardt dkk., 2007; Kurokawa dkk., 1999; Zhirnov dan Klenk, 2007; Zhirnov dkk., 2002).

Faktor proapoptosis selular juga menginduksi efisiensi propagasi virus influenza dan protein virus tertentu, seperti NA dan PB1-F2, yang juga mempunyai fungsi pro-apoptosis (Palese dan Shaw, 2007). Secara keseluruhan regulasi temporal antara mekanisme pro-dan anti-apoptosis mungkin menjadi sangat penting untuk virus. Pembatasan apoptosis pada fase awal selama infeksi dapat menginduksi beberapa kejadian seperti replikasi genom, sementara meningkatkan apoptosis nantinya dapat mengakibatkan peningkatan keluarnya anakan virus. Apoptosis yang terjadi setelah virus bereplikasi kemungkinan dapat meningkatkan pembersihan fagositik dari sel terinfeksi, yang mungkin merangsang respon sitotoksik yang diperantarai oleh sel.

Peran NS1 dalam apoptosis belum sepenuhnya jelas, karena NS1 dilaporkan memiliki keduanya yaitu sebagai pro-dan anti-apoptosis (Ehrhardt dkk., 2007; Lam dkk., 2008; Schultz - Cherry dkk., 2001; Shin dkk., 2007b; Stasakova dkk., 2005; Zhirnov dkk., 2002). Sepertinya antagonis fungsi dari NS1 ini mungkin sebagai konsekuensi dari protokol eksperimen yang spesifik, tipe sel atau strain virus yang digunakan. Hipotesa yang menarik adalah NS1

berkontribusi secara temporal terhadap tekanan pada awal apoptosis dan induksi yang lambat dari kematian sel.

Selama infeksi virus, NS1 dengan jelas menampilkan fungsi anti-apoptosis yang terkait dengan kemampuan untuk membatasi produksi dan pengaruh IFN (Zhirnov dkk., 2002). Oleh karena itu, dalam sel MDCK kompeten IFN, virus PR8 delNS1 menginduksi apoptosis lebih tinggi daripada wt PR8 (Zhirnov dkk., 2002). Namun, dalam sel Vero, yang kekurangan gen, kedua virus menginduksi apoptosis dalam tingkat yang serupa, namun lebih lambat daripada yang diamati pada sel MDCK (Zhirnov dkk., 2002). Belum diketahui jika sel Vero yang defek di jalur gen selain IFN α / β , karena itu diduga bahwa antagonis IFN α / β NS1 adalah faktor yang paling penting dalam membatasi apoptosis. Secara katalitik aktif PKR dilaporkan berperan dalam apoptosis selama infeksi virus influenza (Takizawa dkk., 1996). Pengikatan langsung dan penghambatan PKR oleh NS1 juga dapat mengakibatkan tekanan pada kematian sel. Hal yang sama mungkin berlaku untuk inhibisi yang diperantarai NS1 yaitu pro-apoptosis OAS / RNase L (Min dan Krug, 2006), atau jalur JNK / AP-1 (Ludwig dkk., 2002). Seperti yang telah dijelaskan, aktivasi dari jalur sel-inang PI3K digambarkan sebagai metode tambahan dari NS1 yang mungkin membatasi induksi apoptosis (Ehrhardt dkk., 2007; Shin dkk., 2007a; Zhirnov dan Klenk, 2007).

2.1.5.5. Dereglasi Sitokin dan Virulensi

Pertama kali dilaporkan infeksi virus Influenza H5N1 (HPAI) pada tahun 1997 yang menyebabkan infeksi dari 18 individu dengan enam diantaranya meninggal dunia (Subbarao dkk., 1998). Virus yang bertanggung jawab atas kejadian tersebut merupakan pemicu yang kuat dari sitokin pro-inflamatori, terutama TNF- α (Cheung dkk., 2002), dan infeksi virus yang dicirikan dengan *hypercytokinaemia* dan sindrom reaktif *haemophagocytic* (To dkk., 2001). Berdasarkan pada virus influenza manusia, protein NS1 virus H5N1 dapat menurunkan tingkat induksi sitokin pro-inflamatori, dan spekulasinya adalah datangnya penyakit tergantung pada keseimbangan produksi sitokin pro-inflamatori dan kemampuan NS1 untuk mengatasi hal tersebut (Hyland dkk., 2006). Penelitian Seo dkk (2002) menunjukkan bahwa virus letal H5N1 (HK/97) telah resisten terhadap efek antiviral IFN dan TNF- α (Seo dkk., 2002) dan resistensi ini membutuhkan asam amino asam glutamat pada posisi 92 dari NS1. Introduksi protein NS1 dari virus HK/97 ke dalam virus influenza manusia memungkinkan virus rekombinan melakukan replikasi dengan adanya sitokin, sedangkan virus wt, atau virus rekombinan virus dengan asam aspartat pada posisi 92, virus tidak dapat bereplikasi sama sekali. Virus rekombinan ini juga meningkatkan patogenesis pada babi. Seo dkk (2002) dalam studinya juga menunjukkan bahwa *hypercytokinaemia* yang terkait dengan virus HK/97 kemungkinan disebabkan oleh respon sitokin inang yang sangat besar dalam melawan virus yang sangat tahan terhadap itu. Hal berbeda dengan hasil Hyland dkk (2006), pada mencit yang infeksi dengan PR8 rekombinan yang mengkode

protein NS1 virus HK/97 menyebabkan tingginya tingkat sitokin /kemokin dan menurunkan sitokin inflamatori (IL-10) (Lipatov dkk., 2005).

Ketidakseimbangan sitokin ini memerlukan Glu-92 pada NS1, hal ini konsisten dengan hasil *post mortem* individu yang meninggal pada tahun 1997 akibat wabah H5N1 HPAI. Namun, harus dicatat bahwa, walaupun virus HPAI yang diisolasi pada tahun 1997 mengandung Glu-92 pada NS1, virus H5N1 yang memiliki residu ini tidak dapat diisolasi lagi di alam dan Glu-92 belum pernah ditemukan di protein NS1 virus influenza A yang lain. Pada tahun 2008, penelitian terbaru melaporkan bahwa delasi asam amino pada posisi 80-84 protein NS1 meningkatkan virulensi virus H5N1 (Long dkk., 2008). Namun, karena peningkatan virulensi selalu terkait dengan mutasi Glu-92 dan tidak terjadi pada virus yang mengandung Asp-92 di NS1, efek delesi ini sendiri menjadi tidak jelas. Dalam studi sebelumnya dicatat bahwa beberapa virus dengan delesi residu 191-195 di NS1 juga memiliki delesi residu 80-84 (Zhu dkk., 2008). Mengingat bahwa salah satu virus ini memunculkan sifat tidak patogen, sehingga sangat penting untuk menentukan peranan delesi dari 80-84 sebagai determinan virulensi.

2.1.5.6. Sinyal Sel dan Virulensi

Selain mengatasi respon IFN inang dan dapat melakukan replikasi secara efisien dalam keberadaan sitokin, mekanisme lain yang dapat mempengaruhi virulensi NS1 adalah dengan *binding* dan berinteraksi dengan protein sinyal selular. Dari skala besar analisis sekuensing diamati bahwa C-terminal dari

protein NS1 virus avian influenza memiliki sekuen konsensus dari PDZ *domain ligand* (PL) (Obenauer dkk., 2006). PDZ domain adalah *protein-protein recognition* yang termasuk dalam protein-protein yang mengatur berbagai penyusunan sinyal sel yang luas. Mereka secara khusus mengenali dan mengikat motif peptida pendek C-terminal yang terdiri dari 4-5 asam amino, yang disebut PL. PL dari protein NS1 virus influenza unggas terdiri dari residu 227 -230, dengan sekuen ESEV atau EPEV. Sekuen C-terminal NS1 pada virus influenza manusia yang diisolasi sejak tahun 1918 dapat dilihat pada Gambar 2. Sekuen PL pada unggas tidak teramati pada protein NS1 virus influenza bukan unggas, dan untuk sejumlah besar protein NS1 virus influenza pada manusia diperpanjang dengan tujuh asam amino pada C-terminal.

Obenauer dkk. (2006) menunjukkan bahwa protein NS1 influenza unggas dari virus 1918 mampu untuk mengikat ke hingga 30 protein PDZ *domain* manusia, sedangkan virus pada manusia tidak dapat melakukan hal tersebut. Efek dari sekuen PL NS1 virus unggas pada virulensi virus influenza manusia yang baru-baru ini dilaporkan oleh Jackson dkk., (2008). Introduksi sekuen PL virus 1918 pada protein NS1 dari virus WSN meningkatkan virulensi virus ini pada mencit. Infeksi dengan virus yang berisi *PL-avian like* pada protein NS1 telah ditandai dengan kehilangan bobot badan yang parah, kemampuan hidup yang menurun, menurunkan MLD₅₀, alveolitis parah dan peningkatan penyebaran virus pada paru-paru terinfeksi. Hasil ini mendukung hipotesa yang Obenauer dkk, bahwa protein NS1, ketika berada dalam sel manusia, dapat berinteraksi dengan

protein yang mengandung domain PDZ untuk mengganggu jalur selular dan meningkatkan virulensi.



Universitas Indonesia

2.2. Filogenetika Molekuler

Analisis filogenetik dari keluarga sekuen nukleotida atau asam amino adalah sebuah penentuan bagaimana keluarga diturunkan selama evolusi. Hubungan evolusi diantara sekuen digambarkan dengan menempatkan sekuen sebagai cabang luar dari pohon. Hubungan cabang pada bagian dalam pohon merefleksikan tingkat dimana sekuen yang berbeda saling berhubungan. Dua sekuen yang sangat mirip akan terletak sebagai *neighboring outside* dari cabang-cabang dan berhubungan dalam cabang umum (*Common branch*) (Mount, 2001).

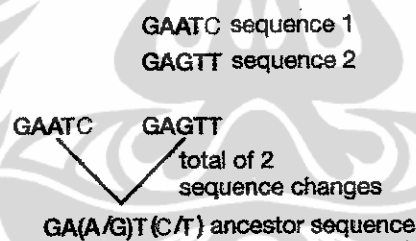
Filogenetik digambarkan sebagai klasifikasi secara taksonomi dari organisme berdasarkan pada sejarah evolusi mereka yaitu filogeni mereka. Filogenetik adalah bagian integral dari ilmu pengetahuan yang sistematis yang mempunyai tujuan untuk menentukan filogeni dari organisme berdasarkan pada karakteristik mereka. Lebih lanjut filogenetik adalah pusat dari evolusi biologi seperti peningkatan keseluruhan paradigma dari bagaimana hidup dan berkembang di alam (Mount, 2001).

Analisis filogenetik sekuen asam amino dan protein biasanya akan menjadi wilayah yang penting dalam analisis sekuen. Selain itu, dalam filogenetik dapat menganalisis perubahan yang terjadi dalam evolusi organisme yang berbeda. Berdasarkan analisis, sekuen yang mempunyai kedekatan dapat diidentifikasi dengan menempati cabang yang bertetangga pada pohon. Ketika keluarga gen ditemukan dalam organisme atau kelompok organisme, hubungan filogenetik diantara gen dapat memprediksikan kemungkinan yang satu mempunyai fungsi yang ekuivalen. Prediksi fungsi ini dapat diuji dengan

eksperimen genetik. Analisis filogenetik juga digunakan untuk mengikuti perubahan yang terjadi yang secara cepat mengubah spesies, seperti virus (McDonald dan Kreitman, 1991; Nielsen dan Yang, 1998).

2. 2.1. Hubungan analisis filogenetik dengan alignment/penjejeran sekuen

Ketika sekuen nukleotida atau protein dari dua organisme yang berbeda adalah mirip, maka mereka diduga diturunkan dari sekuen *common ancestor*. Sekuen penjejeran menyatakan dimana posisi sekuen adalah *conserved* dan dimana merupakan divergen dari *common ancestor* diilustrasikan Mount (2001) pada gambar dibawah ini:



Metode paling umum dalam melakukan *multiple sequence alignment* adalah pertama melakukan penjejeran set sekuen yang mempunyai hubungan dekat dan kemudian secara sekuensial ditambahkan sekuen yang berhubungan namun lebih berbeda. Penjejeran yang diperoleh diakibatkan karena sebagian

besar sekuen yang mirip dalam kelompok sehingga tidak merepresentasikan histori yang sesungguhnya dari perubahan evolusi yang telah terjadi. Sebagian besar metode analisis filogenetik mengasumsikan bahwa masing-masing posisi sekuen protein atau asam nukleat yang berubah secara independen satu sama yang lain (kecuali evolusi sekuen RNA).

Seperti yang telah ditunjukkan diatas, analisis sekuen yang sangat mirip dan mempunyai panjang yang sama adalah sangat jelas. Seringkali hasil penjejeran sekuen memperlihatkan adanya *gap* dalam penjejeran tersebut. *Gap* menunjukkan adanya insersi atau delesi dari satu atau lebih dari karakter sekuen selama evolusi. Protein yang dijejerkan semestinya mempunyai struktur tiga dimensi yang sama. Umumnya, sekuen dalam struktur *core* seperti protein tidak mengalami insersi atau delesi dikarenakan substitusi asam amino harus cocok dengan lingkungan paket hidrofobik dari *core*. *Gap* sangat jarang ditemukan pada *multiple sequence alignment* yang menunjukkan sekuen *core*. Sebaliknya, beberapa variasi termasuk insersi, delesi sangat mungkin ditemukan di daerah *loop* pada bagian luar struktur tiga dimensi, sebab pada bagian ini tidak berpengaruh banyak terhadap struktur *core*. Daerah *loop* berinteraksi dengan molekul kecil, membran dan protein lain di lingkungan (Mount, 2001).

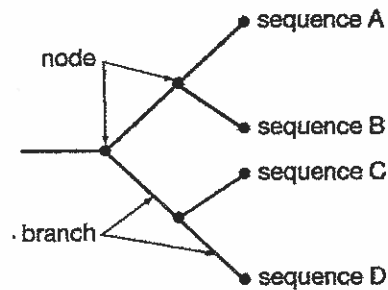
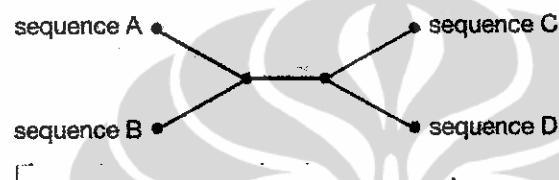
Gap dalam penjejeran merepresentasikan perubahan mutasi dalam sekuen termasuk insersi, delesi atau penyusunan ulang materi genetik. Ekspektasi bahwa panjang *gap* dapat terjadi sebagai kejadian introduksi tunggal yang memutuskan berapa banyak perubahan individu telah terjadi dan apa perintahnya. *Gap* diberi perlakuan (*treated*) dalam beberapa program filogenetik, tetapi tidak ada *clear-cut*

model seperti bagaimana seharusnya mereka di perlakukan. Beberapa metode mengabaikan *gap* yang terjadi atau hanya memfokuskan dalam penjejeran yang tidak mempunyai *gap*. Meskipun *gap* dapat berguna sebagai petanda filogenetik di beberapa situasi.

Pendekatan lainnya untuk menangani *gap* adalah mencegah analisis situs individu dalam *sequence alignment*, dan menggantinya dengan menggunakan *similarity score* sebagai basis dari analisis filogenetika.

2.2.2. Konsep Pohon Evolusi

Pohon evolusi adalah sebuah grafik dua dimensi yang menunjukkan hubungan diantara organisme atau lebih spesifik lagi adalah sekuen gen dari organisme. Pemisahan sekuen disebut *taxa* (atau *taxon* jika tunggal) yang didefinisikan sebagai jarak filogenetik unit pada sebuah pohon. Pohon terdiri dari cabang-cabang luar (*outer branches*) atau daun-daun (*leaves*) yang merepresentasikan *taxa* dan titik-titik (*nodes*) dan cabang merepresentasikan hubungan diantara *taxa*, yang dilustrasikan sebagai A-D pada Gambar 6.

A. Rooted tree**B. Unrooted tree**

Gambar 6. Struktur pohon evolusi. Mount (2001)

Oleh karena itu, sekuen A dan B dipisahkan dari sekuen *common ancestor* yang direpresentasikan dengan titik-titik dibawahnya; C dan D adalah mempunyai kemiripan. Pada Gambar 6 menunjukkan A/B dan C/D memiliki *common ancestor* yang sama yang ditunjukkan dengan sebuah titik pada bagian paling rendah dari pohon. Hal ini sangat penting untuk mengenali bahwa masing-masing titik dalam pohon direpresentasikan sebuah pemisahan garis evolusi gen ke dalam dua spesies yang berbeda. Panjang masing-masing cabang pada titik berikutnya menunjukkan jumlah sekuen yang berubah yang terjadi sebelum level pemisahannya. Contohnya, panjang cabang antara titik A/B dan B menunjukkan spesies mempunyai rata-rata evolusi yang sama.

Total panjang semua cabang dalam pohon disebut sebagai panjang pohon.

Pohon yang juga bercabang dua atau *binary tree*, mempunyai dua cabang yang

berasal dari masing-masing titik. Situasi ini adalah satu dari yang diperkirakan selama evolusi, dan hanya memisahkan spesies baru pada waktu itu. Pohon dapat mempunyai lebih dari satu cabang yang berasal dari sebuah titik jika pemisahan *taxa* juga sedemikian dekat sehingga mereka tidak dapat dipecahkan atau menjadi pohon yang sederhana.

Representasi alternatif dari hubungan sekuen diantara A-D pada Gambar 6A ditunjukkan pada Gambar 6B. Perbedaan diantara pohon A dan B adalah pohon B adalah *unrooted tree*. *Unrooted tree* juga menunjukkan hubungan evolusi diantara sekuen A-D, tetapi tidak menyatakan lokasi dari moyang yang tertua/*oldest ancestry*. Sebagai contoh, B dapat diubah menjadi A dengan menempatkan titik yang lain dan menghubungkan *root* pada garis hitam. *Root* dapat juga ditempatkan dimana saja dalam pohon, Jadi terdapat beberapa besar kemungkinan untuk *rooted* daripada *unrooted* untuk memberikan sejumlah *taxa* atau sekuen. Terdapat tiga metode yaitu : 1) *Maximum parsimony*, 2) *Distance* dan 3) *Maximum likelihood* yang secara umum digunakan untuk membentuk pohon evolusi atau pohon terbaik untuk mengamati variasi sekuen dalam kelompok. Masing-masing metode ini digunakan untuk tipe analisis yang berbeda.

1. Maximum Parsimony Method

Metode ini memprediksikan pohon evolusi/*evolutionary tree* yang meminimalkan jumlah langkah yang dibutuhkan untuk menghasilkan variasi yang diamati dalam sekuen. Untuk alasan ini, metode ini juga sering disebut sebagai

metode evolusi minimum/*minimum evolution method*. Sebuah *multiple sequence alignment* dibutuhkan untuk memprediksi posisi sekuen yang sepertinya berhubungan. Posisi ini akan menampilkan kolom vertikal dalam *multiple sequence alignment*. Untuk masing-masing posisi yang disejajarkan, pohon filogenetik membutuhkan perubahan evolusi dalam jumlah terkecil untuk menghasilkan pengamatan perubahan sekuen yang diidentifikasi. Analisis ini terus menerus dilakukan terhadap masing-masing posisi dalam penjejeran sekuen. Akhirnya, pohon yang menghasilkan jumlah perubahan terkecil secara keseluruhan dihasilkan untuk semua posisi sekuen yang diidentifikasi. Metode ini berguna untuk sekuen yang mirip dan dalam jumlah yang sedikit. Algoritma yang digunakan tidak rumit tetapi dijamin untuk dapat menemukan pohon yang terbaik, sebab semua kemungkinan pohon yang dibentuk berhubungan dengan kelompok sekuen yang diperiksa. Untuk alasan ini, metode ini cukup membutuhkan banyak waktu dan tidak berguna untuk data sekuen dalam jumlah besar dan asumsi lain harus dibuat untuk *root* pohon yang diprediksikan.

PAUP adalah sejumlah tawaran dan *setting parameter* untuk analisis *parsimony* dengan menggunakan *Macintosh*. Program utama analisis *maximum parsimony* dalam *PHYLIP package* (Felsenstein, 1996) dapat dilihat dibawah ini:

- DNAPARS, memberi perlakuan *gap* setiap 5 nukleotida
- DNAPENNY, membentuk filogenetik *parsimony* dengan pencarian *branch-and-bound* yang dapat menganalisa sekuen lebih banyak (lebih dari 11 atau 12)

- DNACOMP, yang membentuk analisis filogenetik menggunakan kriteria komparabilitas, sehingga mencari kepada keseluruhan *parsimony* pada semua situs dalam *multiple sequence alignment*. Metode ini menemukan pohon yang mendukung jumlah situs terbesar. Metode ini direkomendasikan ketika rata-rata evolusi bervariasi diantara situs
- DNAMOVE, membentuk *parsimony* dan analisis kompatibilitas secara interaktif untuk analisis sekuen protein, programnya yaitu : PROTPARS, yang menghitung jumlah mutasi yang mengubah kodon pada asam amino pertama dalam kodon tetapi hanya skor dari mutasi dalam jalur mutasi yang mengubah asam amino. *Silent mutation* yang tidak mengubah asam amino tidak diskor karena mereka hanya menyebabkan pengaruh yang sedikit pada evolusi.

2. *Distance Methods*

Distance method bekerja pada jumlah perubahan diantara masing-masing pasangan dalam kelompok untuk menciptakan pohon filogenetik dalam kelompok. Pasangan sekuen yang mempunyai jumlah perubahan terkecil diantara mereka disebut '*neighbors*'. Pada pohon, sekuen-sekuen ini menggunakan secara bersama-sama satu titik atau posisi *common ancestor* dan masing-masing dihubungkan titik oleh sebuah cabang. Tujuan dari *distance method* adalah metode untuk mengidentifikasi pohon pada posisi *neighbors* dengan benar, dan juga mempunyai cabang yang menghasilkan data orisinal sedekat mungkin. Penemuan *neighbors* terdekat diantara kelompok sekuen dengan *distance method*

biasanya langkah pertama dalam memproduksi sebuah *multiple sequence alignment*.

Distance method pertama kali ditemukan oleh Feng dan Doolittle; pengelompokan program oleh penulis tersebut menghasilkan sebuah penjejeran dan pohon dari set sekuen protein (Feng dan Doolittle, 1996). Program CLUSTALW, digunakan untuk *neighbor-joining distance method* sebagai panduan untuk *multiple sequence alignment*. Program PAUP versi 4 merupakan pilihan untuk membentuk sebuah analisis filogenetik dengan *distance method*. Program PHYLIP *package* yang membentuk analisis *distance* termasuk program yang secara otomatis dibaca dalam sekuen dalam PHYLIP *infile format* dan secara otomatis menghasilkan *file* yang disebut dengan tabel *distance*.

1. DNADIST menghitung dengan tepat jarak diantara sekuen asam nukleat yang dimasukkan. Terdapat pilihan yang diberikan untuk berbagai model evolusi dan pilihan rasio perkiraan transisi terhadap transversasi.
2. PROTDIST menghitung dengan tepat sebuah jarak yang mengukur sekuen protein berdasarkan model Dayhoff PAM atau model evolusi yang lain dalam protein (Felsenstein, 1996).

Pada jarak matrik (*distance matrices*) yang dihasilkan, mereka mungkin digunakan sebagai input yang mengikuti program *distance analysis* dalam PHYLIP. Program PHYLIP semua secara otomatis membaca *input file* yang disebut *infile* dan menghasilkan sebuah *outfile*. Jadi, nama *file* harus diedit ketika menggunakan program ini. Sebagai contoh, *distance outfile* harus diedit untuk

memasukkan hanya tabel *distance* dan jumlah taxa, dan ketika *file* disimpan dengan nama sekuen *infile*. Analisis *distance* dalam program PHYLIP adalah sebagai berikut :

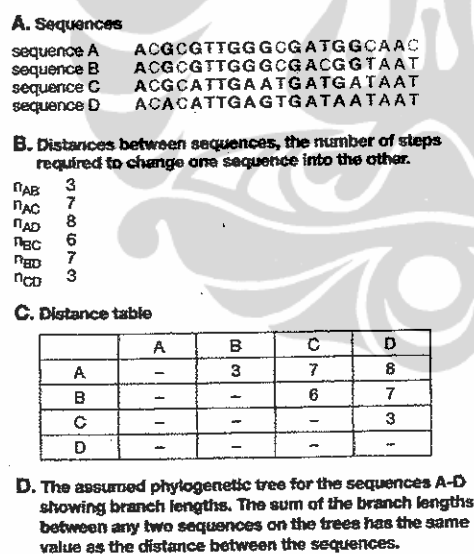
1. FITCH mengestimasi sebuah pohon filogenetik yang mengasumsikan penambahan panjang cabang menggunakan metode Fitch-Margoliash dan tidak mengasumsikan sebuah *molecular clock* (mengikuti rata-rata evolusi sepanjang cabang yang bervariasi)
2. KITCH mengestimasi sebuah pohon filogenetik tetapi dengan mengasumsikan *molecular clock*
3. NEIGHBOR mengestimasi pohon filogenetik menggunakan *neighbor joining* atau metode *unweighted pair group* dengan rata-rata aritmatika (UPGMA). Metode *neighbor joining* tidak mengasumsikan *molecular clock* dan menghasilkan *unrooted tree*. Sedangkan metode UPGMA mengasumsikan sebuah *molecular clock* dan *rooted tree*.

Metode ini secara normal menghitung skor similaritas yang didefinisikan sebagai jumlah total dari jumlah sekuen yang identik dan jumlah substitusi konservatif dalam penjejeran dua sekuen dengan gap yang diabaikan. Skor identitas antara sekuen menunjukkan hanya identitas yang mungkin ditemukan dalam penjejeran. Untuk analisis filogenetik digunakan skor jarak antara dua sekuen. Skor diantara dua sekuen adalah jumlah posisi yang tidak cocok/*mismatch* dalam penjejeran atau jumlah posisi sekuen yang harus diubah untuk menghasilkan sekuen yang lain. Gap mungkin diabaikan dalam kalkulasi atau diberi perlakuan seperti

sustitusi. Ketika sebuah skoring atau matrik substitusi digunakan, kalkulasi lebih kompleks tetapi secara prinsip tetap sama.

Metode Fitch dan Margoliash

Metode Fitch dan Margoliash (1987) menggunakan tabel yang diilustrasikan seperti pada Gambar 7C. Sekuen-sekuen dikombinasi dalam tiga untuk mendefinisikan cabang-cabang pohon yang diprediksikan dan untuk menghitung panjang-panjang cabang dari pohon. Ini adalah metode *averaging distance* merupakan metode yang paling akurat untuk pohon dengan cabang yang pendek. Adanya cabang yang panjang bertendensi menurunkan tingkat kepercayaan dari prediksi (Swofford dkk., 1996).



Gambar 7. Set sekuen yang ideal yang mana panjang cabang pohon yang diasumsikan (Mount, 2001).

Metode *neighbor-joining* (NJ)

Metode *neighbor-joining* sangat mirip dengan metode Fitch dan Margoliash kecuali tentang pemilihan sekuen untuk berpasangan ditentukan oleh perbedaan algoritma. Metode *neighbor-joining* sangat cocok ketika rata-rata evolusi dari pemisahan *lineage* adalah dibawah pertimbangan yang berbeda-beda. Ketika panjang cabang dari pohon yang diketahui topologinya diikuti untuk berubah dalam sebuah cara yang menstimulasi level yang bervariasi dari perubahan evolusi, metode *neighbor-joining* adalah yang paling cocok untuk memprediksi pohon dengan benar (Saitou dan Nei, 1987).

Neighbor-joining memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen.

Metode *Unweighted pair group* dengan rata-rata aritmetika (UPGMA)

Distance methods yang telah diuraikan diatas memberikan sebuah estimasi yang baik dari sebuah pohon evolusi dan tidak terpengaruh oleh variasi dalam rata-rata perubahan sepanjang cabang dari pohon. Metode UPGMA adalah metode sederhana untuk konstruksi pohon yang mengasumsikan rata-rata perubahan sepanjang pohon adalah konstan dan jaraknya kira-kira *ultrameric*. Metode UPGMA dimulai dengan kalkulasi panjang cabang diantara sekuen paling dekat yang saling berhubungan, kemudian rata-rata jarak antara sekuen ini atau kelompok sekuen dan sekuen berikutnya atau kelompok sekuen dan berlanjut

sampai semua sekuen yang termasuk dalam pohon. Akhirnya metode ini memprediksi posisi *root* dari pohon.

Pemilihan *Outgroup*

Jika kita ingin secara independen mendapatkan informasi yang meyakinkan dari sekuen lebih berhubungan, sebuah prosedur dapat diikuti dengan menambahkan sekuen pada pohon dan yang paling dekat dengan *root*. Modifikasi dapat meningkatkan prediksi dari pohon dengan metode di atas yaitu dengan menambahkan *outgroup* pada langkah akhir dari prosedur. Satu atau lebih sekuen jenis ini disebut sebagai *outgroup*. Sebagai contoh, sekuen A dan B berasal dari spesies yang telah diketahui terpisah satu dengan yang lain pada awal evolusi berdasarkan catatan fosil. A dan B kemudian diperlakukan sebagai *outgroup*. Pemilihan satu atau lebih *outgroup* dengan *distance method* dapat juga membantu dengan lokalisasi *root* dari pohon (Swofford dkk., 1996). *Root* akan ditempatkan diantara *outgroup* dan titik yang menghubungkan sekuen. Sekuen dari *outgroup* semestinya berkorelasi dekat dengan sekuen-sekuen yang dianalisa, tetapi juga mempunyai perbedaan yang signifikan antara *outgroup* dengan sekuen yang lain daripada diantara sekuen itu sendiri. Pemilihan sekuen *outgroup* yang terlalu jauh kemungkinan akan berperan terhadap prediksi pohon menjadi salah akibat terdapat perbedaan yang secara random yang lebih banyak diantara sekuen *outgroup* dengan sekuen lainnya (Li dan Graur, 1991 dalam Mount, 2001). Perubahan *multiple sequence* pada masing-masing situs menjadi lebih mungkin dan akan lebih kompleks untuk *genetic rearrangements* yang kompleks. Untuk

alasan yang sama, menggunakan sekuen yang terlalu berbeda dalam *distance method* dari prediksi filogenetik dapat berperan terhadap kesalahan yang terjadi (Swofford dkk., 1996). Jumlah perbedaan yang meningkat, perubahan histori sekuen pada masing-masing situs menjadi lebih kompleks dan menjadi sulit untuk memprediksi.

3. Pendekatan *Maximum Likelihood*

Metode ini menggunakan kalkulasi untuk menemukan pohon yang mempunyai hitungan variasi terbaik dalam set sekuen. Metode ini mirip dengan metode *maximum parsimony* dalam analisis yang dibentuk pada masing-masing kolom dalam *multiple sequence alignment*. Semua kemungkinan pohon yang terbentuk dipertimbangkan, sehingga metode ini hanya cocok untuk sekuen dalam jumlah kecil. Metode ini mempertimbangkan untuk masing-masing pohon, jumlah perubahan sekuen atau mutasi yang terjadi yang memberikan variasi sekuen. Metode *maximum likelihood* menampilkan kesempatan penambahan untuk mengevaluasi pohon dengan variasi dalam rata-rata mutasi dalam *lineage* yang berbeda. Metode ini dapat digunakan untuk mengeksplorasi hubungan antara sekuen yang lebih beragam, dimana kondisi ini tidak dapat dilakukan dengan baik jika menggunakan metode *maximum parsimony*. Kekurangan metode *maximum likelihood* adalah membutuhkan pekerjaan komputer yang sangat intensif. Jika menggunakan komputer yang lebih cepat, metode *maximum likelihood* dapat digunakan untuk model evolusi yang lebih kompleks. Metode ini juga dapat

digunakan untuk menganalisa mutasi pada *overlapping reading frame* pada virus (Schadt, 1998).

2.2.3. Prediksi filogenetik yang dipercaya

Analisis filogenetika set sekuen yang menjejerkan dengan baik adalah jelas sebab posisi yang bertanggung jawab dalam sekuen dapat diidentifikasi dalam *multiple sequence alignment* dari sekuen. Tipe perubahan dalam penjejeran posisi atau jumlah yang berubah dalam penjejeran antara pasangan sekuen menyediakan dasar untuk menentukan hubungan filogenetika diantara sekuen berdasarkan metode analisis filogenetika. Penentuan perubahan sekuen yang telah terjadi menjadi sulit sebab *multiple sequence alignment* mungkin tidak optimal dan sebab perubahan yang banyak terjadi pada penjejeran posisi sekuen. Pilihan metode *multiple sequence alignment* tergantung pada tingkat variasi diantara sekuen. Jika penjejeran yang cocok telah ditemukan, pertanyaannya adalah bagaimana prediksi filogenetika didukung oleh data dalam *multiple sequence alignment*.

Dalam metode *bootstrap*, data dilakukan *resampled*, dengan secara random memilih kolom vertikal dari sekuen yang dijejerkan untuk menghasilkan, dan dalam pengaruh sebuah penjejeran baru dengan panjang yang sama. Masing-masing kolom digunakan lebih dari satu kali dan beberapa kolom mungkin tidak digunakan pada semua penjejeran yang baru. Pohon-pohon kemudian diprediksi dari beberapa penjejeran ini dari *resampled* sekuen (Felsenstein, 1988). Untuk cabang-cabang dalam topologi filogenetika yang diprediksi menjadi signifikan jika

set data *resampled* seharusnya berulang kali (sebagai contoh >70%) memprediksi cabang-cabang yang sama.

Analisis *bootstrap* adalah metode yang menguji seberapa baik set data model. Sebagai contoh validitas penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik dapat diuji dengan resampling dari kolom dalam *multiple sequence alignment* untuk membentuk beberapa penjejeran baru. Penampakan cabang dalam pohon dari sekuen *resampled* ini dapat diukur. Alternatifnya, sekuen kemungkinan harus dikeluarkan dari analisis untuk menentukan berapa banyak sekuen yang mempengaruhi hasil dari analisis. *Bootstrap analysis* didukung oleh sebagian besar paket *software* filogenetika dan secara umum digunakan untuk menguji cabang-cabang yang dapat dipercaya.

2.3. Virus Avian Influenza subtipe H5N1 di Indonesia

Pada tahun 1997 dilaporkan bahwa virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) H5N1 untuk pertama kali dapat menginfeksi manusia dan ditransmisikan secara langsung dari unggas ke manusia di Hong Kong. Virus ini menyebabkan 6 meninggal dari 18 orang yang terinfeksi penyakit ini (Bender dkk., 1994; Katz dkk., 2000; Class dkk., 1998; Suarez dkk., 1998; Subbarao dkk., 1998; Shortridge dkk., 1998). Pada tahun 1999, dua kasus infeksi virus influenza H9N2 pada manusia dilaporkan di Hong Kong (Peiris dkk., 1999). Di Belanda pada tahun 2003, dilaporkan 349 orang menderita konjungtivitis dan kematian seorang dokter hewan akibat wabah avian influenza *highly pathogenic* H7N7 (Koopmans

dkk, 2004), dan Pada bulan Februari 2004, virus H7N3 dilaporkan menginfeksi manusia di Kanada (Tweed dkk., 2004).

Pada awal tahun 2003 sebanyak dua kasus infeksi virus H5N1 diidentifikasi di Hong Kong (Peiris dkk., 2004). Sejak akhir 2003, virus HPAI H5N1 telah menyebar ke Asia sampai Asia Tengah, Eropa dan Afrika, menyebabkan wabah penyakit dan kematian pada unggas domestik dan burung liar. Pada bulan September 2006 sekitar 40 laboratorium mengkonfirmasi kasus pada manusia akibat infeksi virus H5N1 yang telah dilaporkan pada *World Health Organization* (WHO). Lebih dari 50% infeksi pada manusia adalah fatal (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2004).

Di Indonesia, wabah AI pertama kali dilaporkan pada bulan Agustus 2003 di kabupaten Tangerang dan Pekalongan. Wabah ini menyerang ayam ras petelur, ayam ras pedaging, ayam kampung dan itik. Berdasarkan hasil pemeriksaan lapang, gejala klinis dan patologik (Damayanti dkk., 2004a) dan imunohistokimia (Damayanti dkk., 2004b) wabah tersebut didiagnosa sebagai wabah avian influenza subtipe H5. Spesimen dari wabah tersebut telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dengan menggunakan serum positif avian influenza sebagai virus avian influenza subtipe H5 (Wiyono dkk., 2004). Dharmayanti dkk (2004) juga telah mengidentifikasi wabah ini yang ternyata disebabkan oleh virus AI subtipe H5 dengan teknik RT-PCR. Konfirmasi wabah penyakit avian influenza dilakukan oleh Dharmayanti dkk (2005a; 2005b). Analisis genetik menunjukkan bahwa sebagian besar virus influenza H5N1 dari unggas dan manusia di Asia termasuk dalam genotipe Z, serupa dengan virus

yang pertama kali diidentifikasi pada unggas di Cina Selatan (Guan dkk., 2004; Li dkk, 2004; Puthavathana dkk., 2005; WHO, 2005a).

Pedoman-pedoman untuk pencegahan, pengendalian dan pemberantasan AI secara lengkap telah ditetapkan oleh *World Health Organization for Animal Health (OIE)* dan *World Health Organization (WHO)* yang digunakan sebagai acuan program pencegahan, pengendalian dan pemberantasan AI di seluruh dunia. Pemerintah Indonesia melalui Dirjen Bina Produksi Peternakan no. 17/Kpts/PD.640/F/02.04 juga telah menetapkan langkah-langkah strategis untuk pencegahan, pengendalian dan pemberantasan AI di Indonesia. (Syukur, 2006).

Dalam rangka mengeradikasi dan menurunkan penyebaran virus HPAI di Indonesia, pemerintah melalui Direktorat Kesehatan Hewan, Departemen pertanian menetapkan sembilan langkah strategis pengendalian penyakit AI yaitu 1) biosekuriti; 2) vaksinasi; 3) depopulasi selektif; 4) pengendalian lalu lintas unggas, produk serta limbahnya; 5) surveilans dan penelusuran; 6) pengisian kandang kembali; 7) *stamping out* di daerah tertular baru; 8) peningkatan kesadaran masyarakat serta 9) monitoring dan evaluasi. Vaksinasi sebagai salah satu alat untuk mengendalikan penyakit AI telah dilakukan pemerintah sejak bulan Agustus 2004 yaitu dengan melakukan vaksinasi masal terhadap beberapa jenis unggas seperti ayam ras, buras, puyuh, itik dan lain-lain dengan menggunakan autogenus vaksin.

Pada bulan Juli 2005, dilaporkan kematian manusia yang pertama kali terinfeksi virus AI subtipe H5N1 di Indonesia (DW, 2005; Sedyaningsih dkk., 2006). Data setiap tahun menunjukkan bahwa terjadi penambahan jumlah kasus

kematian pada manusia yang disebabkan oleh AI di Indonesia. Di Indonesia, AI masih merupakan masalah serius yang perlu mendapatkan perhatian mengingat korban meninggal akibat infeksi virus ini masih terus bertambah, setidaknya sampai 27 Januari 2009, terdapat 115 orang meninggal dunia akibat infeksi virus ini (WHO, 2009).



BAB 3

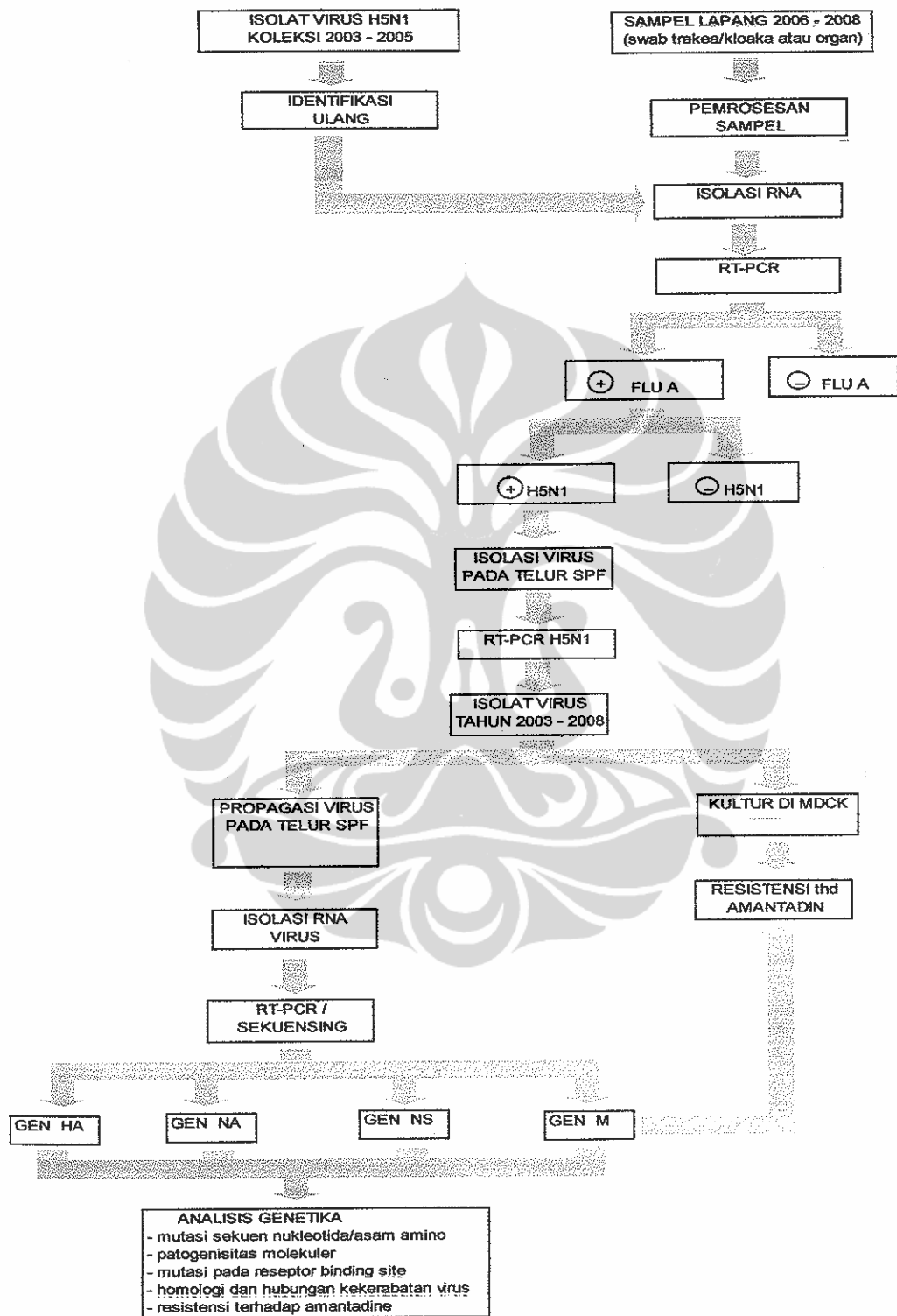
METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini menganalisis genetika dan karakter dari virus avian influenza subtipe H5N1 yang berasal dari unggas di Indonesia. Metode yang digunakan adalah metode secara virologi dan biologi molekuler. Metode virologi dalam penelitian ini meliputi pengambilan dan pemrosesan sampel, perbanyakan virus, pengukuran titer virus, pengujian HA, dan uji *in vitro* sensitivitas amantadin. Metode biologi molekuler pada penelitian ini adalah sekuensing fragmen gen yang meliputi gen HA, NA, M dan NS serta analisis bioinformatika termasuk prediksi struktur tiga dimensi protein HA, NA, M dan NS dari masing-masing virus.

Tahapan penelitian meliputi :

1. Koleksi sampel dari kasus lapang
2. Identifikasi virus dengan metode RT-PCR
3. Isolasi virus dan propagasi dengan menumbuhkan sampel yang positif AI subtipe H5N1 pada telur ayam bertunas *specific pathogen free*
4. Isolasi dan amplifikasi gen
5. Sekuensing setiap fragmen gen sehingga mendapatkan sekuen gen utuh
6. Analisis bioinformatik
7. Uji sensitivitas amantadin berdasarkan informasi genetika protein M2 yang diperoleh dari hasil sekuensing

Rancangan alur penelitian



Gambar 8. Diagram Alur Penelitian

3.1.Lokasi dan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium virologi dan biologi molekuler milik Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian, Jl. RE Martadinata 30, Bogor, Jawa Barat. Waktu penelitian adalah September 2006 - Mei 2009.

3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa virus AI subtipe H5N1 telah diidentifikasi pada penelitian sebelumnya yaitu sebanyak tujuh virus AI tahun 2003-2005 yang dipilih secara random pada setiap tahunnya (Lampiran 1) dan spesimen yang dikoleksi dari wabah AI pada unggas sepanjang tahun 2006-2008 (Lampiran 1).

3.3.Bahan dan Cara Kerja

3.3.1. Wilayah Pengambilan sampel

Wilayah pengambilan sampel adalah di kabupaten Sukabumi, Bogor, Pandeglang, Jakarta, Blitar, Bekasi dan Serang. Sektor peternakan yang diambil sampelnya adalah peternakan sektor 4 (peternakan rakyat), sektor 3 (skala kecil) dan sektor 1 (*breeding farm*). Pengambilan sampel dikoordinasikan dengan Dinas Peternakan setempat.

3.3.2. Penanganan spesimen

Spesimen yang diperoleh dari lapang diproses dilaboratorium secepatnya. Spesimen yang tidak dapat diproses dalam waktu dekat disimpan dalam freezer -70°C. Spesimen berupa swab kloaka, trakea atau feses dapat langsung diproses menjadi inokulum, dan spesimen berupa organ maka dilakukan penggerusan terhadap organ tersebut (WHO, 2002).

3.3.2.1. Sampel Organ

Sampel organ dapat berupa paru-paru, trakea, proventrikulus, usus, ginjal dan hati digerus sampai halus dan dibuat suspensi 10%. Suspensi organ kemudian disentrifugasi sesaat dan supernatannya selanjutnya digunakan sebagai sampel untuk diproses lebih lanjut (WHO, 2002). Pada saat pengambilan sampel dilapangan, spesimen yang dikoleksi disimpan dalam medium transpor virus yaitu DMEM yang mengandung 2000 IU/ml Penisilin dan 50 µg/ml Streptomisin dalam keadaan dingin pada suhu 4°C (OIE, 2000; WHO, 2002)

3.3.2.2. Sampel swab kloaka, swab trakea atau feses

Swab kloaka/trakea/feses dalam tabung yang berisi media transpor divortex (MaxiMix II) selama 15 detik. Swab selanjutnya dibuang dan sampel dalam medium transpor dihomogenisasi dengan vortek serta disentrifugasi dengan kecepatan 2500-3000 rpm (Microfuge 16 Centrifuge, Beckman Coulter) selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dapat digunakan untuk ekstraksi RNA atau

dapat diinokulasikan pada telur *Specific Pathogenic Free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari (WHO, 2002).

3.3.3. Inokulasi pada Telur Berembrio *Specific Pathogen Free*

Telur diletakkan dengan posisi ujung tumpul pada bagian atas pada rak telur dan dilabel sesuai dengan nomor spesimen (3 telur per spesimen). Telur pada bagian tumpul diulas dengan alkohol 70%, lokasi penyuntikan ditandai pada kerabang telur yang terletak tepat pada perbatasan antara ruang hawa dengan membran alantois dengan bantuan teropong telur. Kerabang telur yang telah ditandai tersebut dilubangi dengan pelubang telur, spesimen sebanyak 0,1 ml diaspirasi dan diinokulasikan pada ruang alantois melalui lubang tersebut dengan menggunakan spuit. Selanjutnya lubang pada telur ditutup dengan parafin atau lem, dan telur diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 35-37°C dan dilakukan pengamatan kehidupan embrionya setiap hari (WHO, 2002).

3.3.4. Panen Cairan alantois

Telur berembrio yang telah diinfeksi dimasukkan ke dalam ruang pendingin atau refrigerator bersuhu 4 °C selama 24 jam atau 4 jam sebelum panen. Tabung 15 ml ditandai sesuai dengan tanda pada masing-masing telur yang akan dipanen. Kerabang telur bagian atas dipecahkan dengan menggunakan forsep steril. Untuk mengaspirasi cairan alantois, membran alantois disingkapkan dan cairan alantois diaspirasi dengan hati-hati untuk menghindari tertusuknya kuning telur dengan spuit yang digunakan. Cairan alantois yang telah dipanen

dimasukkan kedalam tabung yang telah ditandai sesuai dengan tanda pada telur. Oleh karena sedikitnya cairan alantois yang dipanen, cairan alantois yang dipanen pada masing-masing telur digabungkan bersama sesuai dengan kode per spesimen. Cairan alantois kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan darah dan sel yang terambil sewaktu panen. Setelah disentrifugasi cairan alantois diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C. Cairan alantois kemudian dilakukan *spot test* untuk mendeteksi adanya *hemagglutinating virus*. Uji dapat dilakukan dengan plat kaca mikroskop atau plat keramik putih untuk menyediakan latar belakang yang kontras. Cairan alantois sebanyak sekitar 20µl ditempatkan di atas plat keramik putih dan sel darah merah ayam 10% dengan volume yang sama dicampur dengan cairan alantois tersebut. Hemaglutinasi dapat diamati setelah 15 detik. Jika uji *spot* negatif maka cairan alantois diinokulasi ulang sebanyak 2 kali sebelum diputuskan bahwa tidak ada pertumbuhan virus pada telur. Cairan alantois yang telah diuji *spot* kemudian diidentifikasi dengan uji RT-PCR. Uji *spot* positif ditandai dengan terbentuknya endapan seperti butiran pasir. Cairan alantois yang telah diidentifikasi sebagai isolat avian influenza A subtype H5N1 disimpan pada -70°C (Shortridge dkk., 1982; WHO, 2002).

3.3.5. Titrasi virus avian influenza (AI) subtype H5N1

Titer virus AI ditentukan dengan menggunakan telur sebagai indikator sistem yang disebut dengan *egg infectious dose 50* (EID₅₀). Titer virus didefinisikan sebagai jumlah dari unit virus infeksius per unit volume dan unit

infeksius adalah jumlah virus terkecil yang menghasilkan efek pada inang bersangkutan. Penentuan titer virus diawali dengan melakukan titrasi virus dari stok virus AI. Telur SPF berembrio yang digunakan adalah yang berumur 11 hari. Umur 11 hari digunakan berdasarkan pengalaman bahwa embrio telur sudah cukup kuat dan cairan alantois yang terbentuk cukup banyak. Inokulasi pada dalam cairan alantois dengan pengenceran $10^{-1} - 10^{-10}$ dengan 5 kali ulangan pada masing-masing pengenceran (WHO, 2002).

Pengenceran virus dilakukan dengan menyediakan sepuluh tabung steril yang berisi 0,9 ml PBS steril yang telah diberi antibiotik. Tabung pertama kemudian ditambahkan dengan 0,1 ml larutan stok virus AI dan dicampur sampai homogen. Selanjutnya dari tabung satu diambil sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung kedua, dan seterusnya hingga pada tabung kesepuluh. Semua peralatan dipersiapkan secara steril. Setiap pengenceran diambil sebanyak 0,1 ml untuk diinokulasikan ke dalam cairan alantois telur. Lubang bekas inokulasi ditutup dengan parafin dan telur kemudian diinkubasi selama 4 hari dalam inkubator pada suhu 37°C dengan kelembaban yang cukup dan diamati setiap hari (WHO, 2002).

Embrio yang diinfeksi oleh virus AI H5N1 akan mati sebelum 48 jam. Embrio yang mati langsung disimpan pada suhu 4°C , sedangkan embrio yang belum mati diamati sampai 2 hari berikutnya dan kemudian embrio tersebut dimatikan pada suhu 4°C . Pengamatan embrio pada setiap pengenceran diamati setiap hari sebanyak dua kali yaitu pagi dan sore untuk mencegah pembusukan cairan alantois pada embrio yang mati. Cairan alantois dari masing-masing

pengenceran diuji aglutinasi dengan menggunakan uji *spot* dan dilakukan pemeriksaan terhadap embrio (Shortridge dkk., 1982; WHO, 2002). Embrio yang hidup dan mati kemudian dihitung dengan metode Reed and Muench (1938) (Lampiran 4).

3.3.6. Ekstraksi RNA virus

Ekstraksi RNA virus dilakukan dengan menggunakan *QIAamp viral RNA mini kit* (Qiagen). Sebanyak 560 µl *buffer* AVL diambil dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml. Setelah itu ditambahkan 140 µl kultur virus/cairan alantois/spesimen dan divortek selama lima belas detik serta diinkubasi selama 10-15 menit pada temperatur ruang. Setelah inkubasi, larutan sampel tersebut disentrifugasi selama 5 detik kemudian ditambahkan etanol sebanyak 560 µl dan divortex selama 15 detik, serta dilanjutkan dengan disentrifugasi selama 5 detik. Sebanyak 630 larutan tersebut dimasukkan ke dalam kolom QIAamp dan disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya kolom diletakkan ke dalam tabung penampung yang baru dan ditambahkan 500 µl *buffer* AW1 ke dalam kolom dan disentrifugasi selama 1 menit. Selanjutnya kolom diletakkan ke dalam tabung penampung yang baru dan ditambahkan 500 µl *buffer* AW2 ke dalam kolom dan disentrifugasi 8000 rpm selama 3 menit. Kolom diletakkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml baru dan ditambahkan 60 µl *buffer* AVE serta diinkubasi pada temperatur ruang selama 1 menit dan kemudian disentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Elusi RNA disimpan pada temperatur -20°C.

3.3.7. Identifikasi Virus avian influenza sub tipe H5N1 dengan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Identifikasi virus AI sub tipe H5N1 dilakukan dengan teknik RT-PCR dengan menggunakan kit *Superscript III one step RT-PCR system* (Invitrogen) sebanyak 25µl/reaksi. Setiap reaksi terdiri dari larutan *2x reaction mix* sebanyak 12,5 µl, kemudian ditambahkan sebanyak 1 µl untuk masing-masing primer *reverse* dan *forward* dengan konsentrasi 20 pmol/ µl, cetakan RNA sebanyak 5 µl, enzim Taq/RT sebanyak 0,5 µl dan *RNase free water* sebanyak 5 µl.

Primer dan program RT-PCR untuk mengidentifikasi virus influenza (gen Matrix) sesuai dengan Fouchier dkk (2000) dan identifikasi gen HA (sub tipe H5) sesuai dengan Lee dkk., 2001. Primer yang digunakan untuk mengidentifikasi gen NA (sub tipe N1), sesuai dengan Wright dkk (1995) dan Poon (2005, komunikasi pribadi). Jika hasil identifikasi dengan gen Matrix positif maka identifikasi akan dilanjutkan dengan menggunakan primer H5 dan N1. Susunan sekuen primer M, sub tipe HA dan N1 dapat dilihat pada Tabel 2. Reaksi RT-PCR untuk identifikasi virus influenza dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Susunan sekuen primer untuk mengidentifikasi virus avian influenza sub tipe H5N1

Gen/Fragmen	Primer	Sekuen Nukleotida	Didisain oleh
Matrix (M)	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	M52C : CTTCTAACCGAGGTCGAAACG M253R : AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	Fouchier dkk., 2000
HA (H5)	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	H5-155f : ACACATGCYCARGACATACT H5-699r : CTYTGRITTYAGTGTGATGT	Lee dkk., 2001
NA (N1)	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	N1-1 : TTGCTTGGTCGGCAAGTGC N1-2 : CCAGTCCACCCATTTGGATCC	Wright dkk., 1995; Poon, 2005

Tabel 3. Primer dan kondisi amplifikasi RT-PCR yang digunakan untuk identifikasi virus AI dan subtype H5N1 serta untuk mengamplifikasi gen lengkap HA, NA, M dan NS

Jenis Primer	Kondisi Amplifikasi	Keterangan
M52C-M253R	Reaksi Reverse Transcriptase : 42°C - 30 menit 95°C - 4 menit Reaksi PCR Denaturasi : 95°C - 1 menit Annealing : 45°C - 1 menit Ekstensi : 72°C - 3 menit Jumlah siklus : 40 Final ekstensi : -	Identifikasi Influenza A
H5-155F-H5-699R	Reaksi Reverse Transcriptase : 42°C - 45 menit 95°C - 3 menit Reaksi PCR Denaturasi : 95°C - 30 detik Annealing : 50°C - 40 detik Ekstensi : 72°C - 40 detik Jumlah siklus : 35 Final ekstensi : 72°C - 10 menit	Identifikasi subtype H5
N1_1-N1_2	Reaksi Reverse Transcriptase : 50°C - 30 menit 94°C - 2 menit Reaksi PCR Denaturasi : 94°C - 30 detik Annealing : 55°C - 40 detik Ekstensi : 68°C - 40 detik Jumlah siklus : 40 Final ekstensi : 68°C - 5 menit	Identifikasi N1
H1-H1111	Reaksi Reverse Transcriptase: 42°C - 45 menit 94°C - 3 menit Reaksi PCR Denaturasi : 94°C - 1 menit Annealing : 50°C - 1 menit Ekstensi : 72°C - 3 menit Jumlah siklus : 34 Final ekstensi : -	Sekuensing fragmen HA1
H5N1-F - H5N1R-860; H5N1F-620 - H5N1- NR1428	Reaksi Reverse Transcriptase : 50°C - 30 menit 94°C - 2 menit Reaksi PCR Denaturasi : 94°C - 30 detik	Sekuensing fragmen NA

	Annealing : 55°C - 30 detik Ekstensi : 68°C - 1 menit Jumlah siklus : 35 Final ekstensi : 68°C - 1 menit	
H155F-Bm-NS-890R Bm-M-1 - Bm-M-2 ; Bm-NS-1-Bm-NS-890R;	Reaksi Reverse Transcriptase: 42°C - 45 menit 94°C - 3 menit Reaksi PCR Denaturasi : 94°C - 1 menit Annealing : 50°C - 1 menit Ekstensi : 72°C - 3 menit Jumlah siklus : 34 Final ekstensi : 72°C - 10 menit	Sekuensing fragmen HA2, M dan NS; Dioptimasi oleh Dharmayanti (2008)

3.3.8. Visualisasi Fragmen DNA/Amplikon

3.3.8.1. Pembuatan gel agarosa 2%

Gel agarosa (Invitrogen) 2% dibuat dengan menimbang 1 gram agarosa dan dilarutkan dalam 50 ml 1X bufer TBE (Invitrogen) pada labu erlemeyer, kemudian dicampur sampai merata. Larutan agarosa kemudian dipanaskan dalam *microwave* sampai mendidih hingga larutan menjadi jernih. Selanjutnya larutan agarosa didinginkan sampai mencapai suhu 55°C. Setelah itu larutan agarosa ditambahkan 2 µl (10µg/ml) ethidium bromida dan dicampur hingga merata. Larutan kemudian dituang ke dalam lempeng cetakan gel dengan sisir pembentuk sumur. Larutan agarosa dibiarkan mengeras. Bila gel telah mengeras sisir pembentuk sumur dilepas secara perlahan-lahan dan gel agarosa siap digunakan untuk elektroforesis (GL XL ultra V-2, Labnet).

3.3.8.2. Elektroforesis

Lempeng cetakan yang berisi gel agarosa diletakkan di dalam bak elektroforesis dan dimasukkan larutan 1X buffer TBE ke dalam bak elektroforesis

tersebut hingga sekitar 1 mm di atas permukaan gel. Kemudian sebanyak 2 μ l *loading dye buffer* (TrackIt Orange, Invitrogen) diletakkan di atas parafilm. Selanjutnya kedalam *loading dye buffer* ditambahkan sampel (hasil RT-PCR) sebanyak 4-5 μ l dan disuspensikan hingga merata. Larutan sampel dan *loading dye buffer* yang telah tercampur merata dimasukkan dalam sumur yang terdapat pada gel sesuai dengan nomor sampel. Salah satu sumur kosong diisi dengan penanda/marka DNA yang telah diketahui ukurannya (dalam penelitian ini digunakan 100 pb DNA Ladder, Invitrogen). Bak elektroforesis kemudian ditutup dan dihubungkan arus listrik sebesar 100 volt selama 30 menit. Bila proses elektroforesis selesai, arus listrik dimatikan dan baki elektroforesis diambil dengan menggunakan sarung tangan. Gel hasil elektroforesis diletakkan pada UV transilluminator. Hasil elektroforesis didokumentasikan dengan Bioprint.

3.3.9. Amplifikasi gen lengkap HA, NA, NS dan M

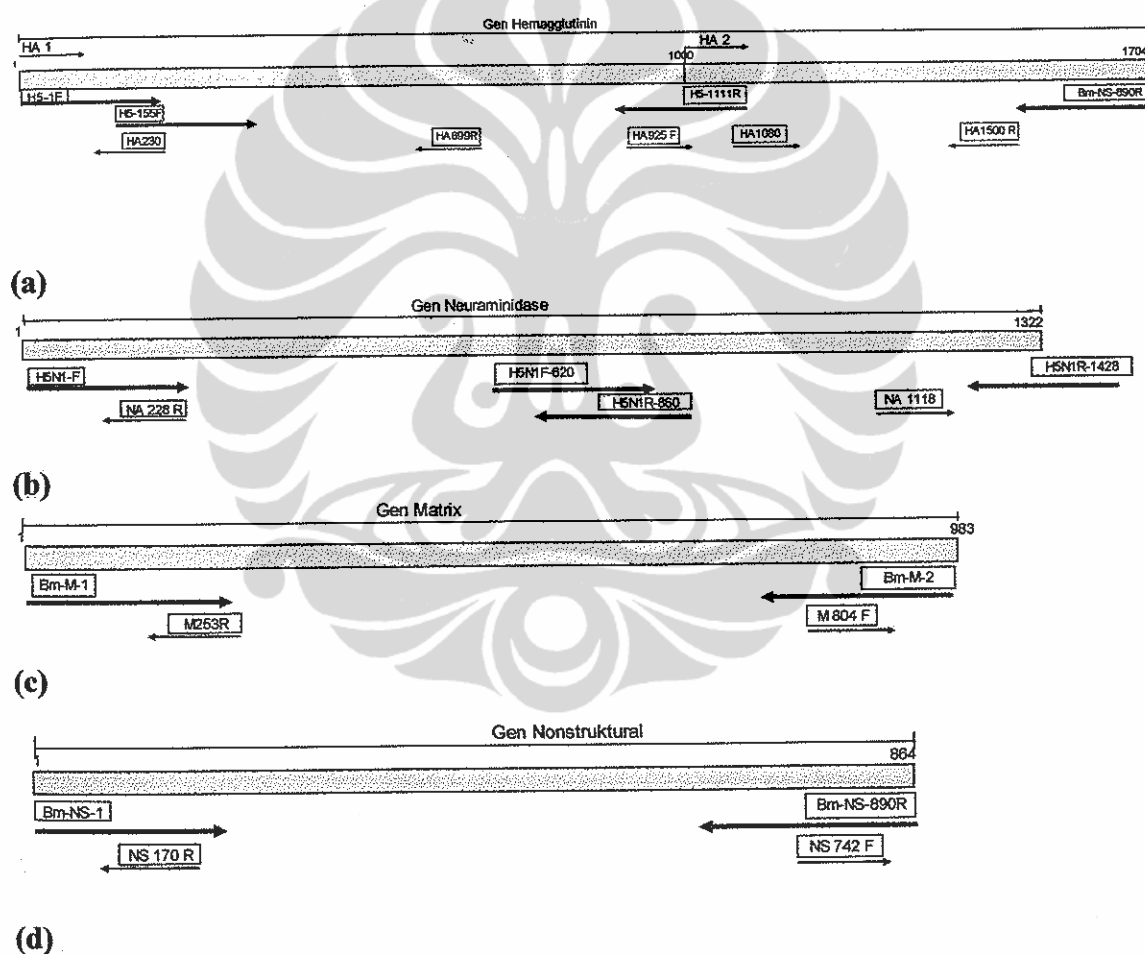
Ribonucleic acid (RNA) yang diperoleh digunakan sebagai cetakan reaksi RT-PCR untuk mengamplifikasi gen lengkap HA, NA, NS dan M dengan menggunakan kit *Superscript III One Step RT-PCR system* (Invitrogen). Susunan sekuen primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen HA, NA, NS dan M dapat dilihat pada Tabel 4. Strategi untuk mengamplifikasi *full length* HA adalah dengan menggunakan primer Senne dkk (1996) untuk mengamplifikasi daerah HA1 dan untuk mengamplifikasi daerah HA2 dilakukan dengan memodifikasi primer H5-155F (Lee dkk., 2001) dan primer Bm-NS-890R yang telah dipublikasi Hoffman dkk., (2001). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen NA

sesuai dengan Komadina (2006, komunikasi pribadi) sedangkan untuk mengamplifikasi gen M dan NS dengan menggunakan primer Hoffman dkk (2001). Primer yang dipergunakan untuk mendapatkan sekuen lengkap masing-masing gen dapat dilihat pada Tabel 5. Program RT-PCR yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3. Gambaran strategi sekuensing dari masing-masing gen dapat dilihat pada Gambar 9.

Tabel 4. Susunan nukleotida primer untuk mengamplifikasi gen lengkap HA, NA, M dan NS virus AI subtipe H5N1

Gen	Sekuen Nukleotida Primer	Didesain oleh
HA	H5-1 F : AGCAAAGCAGGGGT(AC)TAAT H5-1111 R : CCATACCA(AT)CC(GA)TCTACCATTC H5-155F : AGCAAAGCAGGGGT(AC)TAAT H5-699 R : CTYTGRITTYAGTGTGATGF Bm-NS-890R : ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT HA 925F : AACATACACCCTCTCACCATC HA 230 R : AGCCATCCAGCTACACTACA HA 1080 F : GCAGGGAATGGTAGATGGTT HA 1500 R : TTTCTTATACTTTCCATACA	Senne dkk., 1996 Senne dkk., 1996 Lee dkk., 2001 Lee dkk., 2001 Hoffman dkk., 2001 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008
NA	H5N1-F : AGCAAAAGCAGGAGATTA H5N1F-620 : GGGGCTGTGGCTGTATTGAA H5N1R-860 : GGAGCACTCCTCATAGTGAT H5N1-NR1428 : ACTTGTCATGGTGAATGGC NA 1230 F : CCCAAAGAGAGCACAATTTG NA 228R : CCCAAAGAGAGCACAATTTG NA 1118 F : AGTAGCAATAACTGATTGGTCAGG	Komadina, 2006 Komadina, 2006 Komadina, 2006 Komadina, 2006 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008
M	M253R : AGGGCATTTTGGACAAKCGTCTA Bm-M-1 : TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAG Bm-M-2 : ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTT	Hoffmann dkk., 2001 Hoffmann dkk., 2001 Dharmayanti, 2008

	M 865 F : TTTGAAAAGAGGGCCTTCTA M 804 F : ATTGTTGGATTCTTGATCGTC	Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008
NS	Bm-NS-1 :TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTG Bm-NS-890R : ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT NS 170 R : CTGTCTCGATGTCCAGACCA NS 763 F : AACATTTATGCAAGCCTTAC NS 742 F : CAGATAACATTTATGCCAAGCC	Hoffmann dkk., 2001 Hoffmann dkk., 2001 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008 Dharmayanti, 2008



Gambar 9. Strategi amplifikasi gen lengkap (a) Hemagglutinin, HA; (b) Neuraminidase, NA ; (c) Matrix, M dan (d) Non Struktural, NS.

3.3.10. Sekuensing DNA

3.3.10.1. Purifikasi produk RT-PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan kit *QIAQuick Gel Extraction* (Qiagen). Hasil RT-PCR setiap fragmen gen di elektroforesis dalam agarosa 1% selama kurang lebih 30 menit dengan 100 volt. Fragmen DNA hasil elektroforesis di potong tepat pada posisinya pada gel agarosa secara bersih dan potongan gel ditimbang dalam tabung mikrosentrifugasi. Berat gel merupakan selisih antara gel ditambah tabung dengan tabung kosong (misal 1,800 - 1200 mg = 400 mg). Dalam 1 volume gel ditambahkan 3 volume bufer QG (Misal gel 400 mg ditambah dengan 1200 μ l bufer QG), kemudian larutan diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Setiap 3 menit dilakukan vortek untuk membantu melarutkan gel.

Gel yang telah larut sempurna akan berwarna kuning (warna bufer QG). Langkah selanjutnya adalah menambahkan 1 volume gel dengan 1 volume isopropanol (misal 400 mg dengan 400 μ l isopropanol), lalu sampel dalam larutan tersebut (maksimal 800 μ l), dimasukkan pada tabung *QIAquick spin column* dan disentrifugasi selama 1 menit. Larutan kemudian dibuang dan sisa sampel diaplikasikan kembali ke *QIAquick spin column*, selanjutnya disentrifugasi kembali selama 1 menit. Setelah sentrifugasi, sebanyak 0,5 ml buffer QG ditambahkan pada *QIAquick spin column* dan disentrifugasi kembali selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,75 ml buffer PE ke *QIAquick column* lalu disentrifugasi selama 1 menit. *QIAquick column* ditempatkan ke tabung penampung baru dan kemudian disentrifugasi selama 1 menit, kemudian

QIAquick spin column dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Elusi DNA dilakukan dengan mengaplikasikan 50 μ l buffer EB pada bagian tengah membran *QIAquick spin column* dan disentrifugasi selama 1 menit. Jika DNA hasil purifikasi akan dianalisa dalam gel, ditambahkan 1 volume *loading dye* ke dalam 5 volume DNA. Konsentrasi DNA yang diperoleh diukur konsentrasinya dengan menggunakan mesin Spektrofotometer (NanoDrop). *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) yang telah diukur konsentrasinya dapat disimpan pada suhu 20°C

3.3.10.2. Reaksi PCR Sekuensing

Larutan DNA yang telah diukur konsentrasinya digunakan sebagai cetakan untuk reaksi PCR sekuensing dengan menggunakan kit BigDye v 3.1 (Applied Biosystem). Reaksi PCR sekuensing dilakukan dengan menggunakan campuran yang terdiri dari reagen *Big Dye terminator mix* (Applied Biosystem) sebanyak 4 μ l, primer dengan konsentrasi 4 pmol, sedangkan konsentrasi cetakan DNA dan larutan bufer sekuensing Big Dye (Applied Biosystem) yang digunakan adalah sesuai dengan hitungan pada Lampiran 2.

Larutan dalam tabung disentrifugasi beberapa saat untuk menurunkan larutan pada dinding tabung dan dimasukkan ke mesin *thermal cycler* (Applied Biosystem 2700; 9700) sesuai dengan program yaitu denaturasi awal pada suhu 96°C selama 1 menit kemudian siklus PCR dilakukan sebanyak 25 kali dengan denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 96°C selama 5

detik dan polimerisasi pada suhu 60°C selama 4 menit. Setelah reaksi PCR selesai, dilakukan purifikasi hasil sekuensing

3.3.10.3. Purifikasi hasil sekuensing

Purifikasi hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan BDX Terminator (Applied Biosystem). Setiap 10 µl sampel ditambahkan larutan SAM sebanyak 45 µl dan BDX sebanyak 10 µl, setelah itu divortek dengan kecepatan penuh selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi beberapa saat dan sampel siap untuk disekuensing. Mesin sekuensing yang digunakan adalah *Genetix Analyzer 3130* (Applied Biosystem).

3.3.11. Analisis Sekuen

Hasil sekuensing berupa data elektroferogram dari mesin *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystem) diverikasi ulang dan dibandingkan dengan data sekuen nukleotida fragmen gen virus referensi dari NCBI sesuai dengan gen target yang tersedia. Sekuen nukleotida fragmen gen yang memiliki data elektroferogram bagus yang akan dianalisis, jika data elektroferogram kurang bagus, maka akan dilakukan sekuensing ulang atau bahkan PCR ulang sampai dihasilkan data elektroferogram yang bagus. Fragmen sekuen yang telah diperiksa, diperbaiki dan digabungkan dengan fragmen yang lain, sesuai dengan strategi sekuensing yang dilakukan untuk gen tersebut. Hal ini dilakukan dengan bantuan *software* Bioedit. Data sekuen nukleotida lengkap dari masing-masing gen yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis bersama dengan data sekuen yang tersedia pada *avian*

influenza database dan NCBI. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan *software* ABI *Sequence Analysis*, Finch TV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) serta BioEdit versi 7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Pembuatan *multiple alignment* dengan menggunakan BioEdit, versi 7. Pohon filogenetik dihasilkan dengan menggunakan *neighbor-joining bootstrap analysis* (1,000 *replicates*) dengan menggunakan *Tamura-Nei algorithm* dalam MEGA, versi 4 (<http://www.megasoftware.net>).

3.3.12. Analisis Bioinformatika

Analisis bioinformatika gen HA, NA, M dan NS virus influenza dilakukan untuk verifikasi kebenaran hasil sekuensing. Penelusuran melalui NCBI untuk mengetahui informasi gen dan analisis protein melalui www.expasy.org. Analisa komposisi dari protein yang bersangkutan, misalnya MW, pI, *charge* pada pH normal, dan lain-lain menggunakan ProtParam dalam situs www.expasy.org. Prediksi topologi protein (apabila protein tersebut merupakan protein transmembran) dengan menggunakan situs TMHMM. Prediksi struktur 3D dari protein yang bersangkutan dan visualisasi model dengan menggunakan Accelrys Discovery Studio versi 2.1

3.3.13. Prediksi dan Visualisasi Struktur Tiga Dimensi Protein

Visualisasi prediksi protein 3D dilakukan dengan menggunakan sekuen hasil translasi asam amino pada protein HA1, NA, M1 dan NS1 dari virus tahun

2003 sebagai representasi virus yang belum bermutasi dan virus tahun 2007-2008 sebagai representasi virus baru yang bermutasi. Cetakan dengan homologi tertinggi diperoleh dengan menggunakan BLAST search (DS *server*). Penjejeran sekuen dengan cetakan dibuat model 3D dengan menggunakan *DS Modeller* dan *DS Standalone* dari *Discovery Studio for Modeling and Simulation* (Accelrys Discovery Studio versi 2.1).

3.3.13.1. Penggunaan Discovery Studio untuk prediksi dan visualisasi 3D

Sekuen dalam *file text format* (txt) diubah menjadi fasta format dengan program Bioedit. Setelah sekuen berubah menjadi fasta, selanjutnya dalam menu ADS, dipilih homologi struktur dan menggunakan BLAST *search* untuk melakukan homologi protein yang akan dijadikan cetakan (dalam hal ini HA, NA, M dan NS) dengan Protein Data Bank (*PDB file*) yang mempunyai homologi tertinggi,. Setelah itu dilakukan analisis BLAST dan melakukan penjejeran sekuen menggunakan *Align Multiple Sequences Protocols* yang telah tersedia pada program Accelrys 2.1. Data yang diperoleh pada tahap ini adalah data animasi kartun struktur sekunder protein (garis merah menunjukkan *alpha helices* dan panah biru menunjukkan *beta strand*). Selanjutnya dipilih menu *Building 3D model* dan model akan dilakukan sesuai cetakan protein yang diperoleh. Selanjutnya dilakukan evaluasi model dan verifikasi protein sesuai dengan prosedur dalam program Accelrys.

3.3.14. Uji Resistensi Amantadin pada kultur sel *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK)

3.3.14.1. Penyiapan Sel MDCK

Sel MDCK yang digunakan adalah pemberian Prof. Malik Peiris, Laboratorium referens influenza WHO-Hong Kong *University* pada tahun 2005. Sel tersebut tersimpan dalam nitrogen (N₂) cair. Sel diambil sebanyak 1-2 ampul dengan volume sekitar 1 ml dari tangki N₂ cair. Sel kemudian dicairkan pada suhu 37°C. Sebanyak 1 ml sel dimasukkan ke dalam 50 ml media DMEM (yang mengandung 10% FBS) dan disentrifugasi dengan kecepatan 1000-1500 rpm selama 5 menit. Endapan yang terbentuk kemudian dilarutkan dengan media penumbuh DMEM (10% FBS) dan dimasukkan ke dalam botol biakan jaringan atau dibiakkan dalam *flask* dengan menginkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan kandungan 5% CO₂. Perkembangan sel MDCK diamati setiap hari sampai membentuk monolayer yang siap dipasase kembali atau digunakan untuk inokulasi virus (WHO, 2002).

Komposisi media penumbuh biakan sel yang dipergunakan yaitu *Dulbelco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) yang ditambah dengan 10% *Foetal Bovine Serum* (FBS). Antibiotik yang digunakan adalah Penicillin 100 IU dan Streptomycin 100 mg, HEPES 1 mM, Sodium bicarbonat 3,7 gram perliter dan L. Glutamin 1%. Media pemelihara yang digunakan adalah DMEM dengan komposisi yang sama dengan media penumbuh tetapi dengan konsentrasi FBS sebesar 2% (WHO, 2002).

3.3.14.2. Inokulasi Virus pada sel MDCK

Sel MDCK dipastikan dalam keadaan konfluen sebelum inokulasi virus. Sel MDCK dicuci dengan menggunakan media DMEM tanpa FBS sebanyak 2 kali sebelum inokulasi. Sel yang telah dicuci diinkubasi pada suhu 37°C. Ketika melakukan inokulasi virus, media dalam *flask* dibuang kemudian ditambahkan 100 µl larutan virus dan selanjutnya diinkubasi selama 1-2 jam. Setelah inkubasi selama 1-2 jam, ditambahkan 1 ml media DMEM dengan tripsin ke dalam *flask* dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan kandungan 5% CO₂. Hari berikutnya, media dalam *flask* diganti dengan media baru dengan komposisi yang sama dengan media sebelumnya dan kemudian diinkubasi kembali 2 sampai 4 hari. Hari ke-3 inkubasi, dilakukan pengamatan apakah telah terjadi *cytopathic effect* (CPE) dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus M-10). Pembentukan CPE umumnya terjadi pada hari ke 3, dan pada hari ke 4. Sel dengan CPE positif dapat disimpan pada suhu 4°C jika akan dipergunakan langsung maka dilakukan uji HA/*spot* atau perlakuan lainnya atau dapat disimpan pada suhu -20°C. Sel di beku-cairkan sebanyak 3 kali sebelum dipanen (WHO, 2002).

3.3.14.3. Uji Resistensi Amantadin

Uji resistensi amantadin menggunakan *cell-based virus reduction assay* dengan metode yang dikembangkan Cheung dkk (2006) yang telah dimodifikasi oleh Dharmayanti (2008). Sel MDCK ditumbuhkan sampai 90% konfluen pada plat 12 lubang (Nunc) diinfeksi dengan 30 µl per lubang virus sesuai dengan

hasil EID₅₀ (10^7 EID₅₀/ml - 10^9 EID₅₀/ml) dengan adanya *amantadine hydrochloride* (sigma) dari konsentrasi yang terendah sampai yang tertinggi yaitu 0,1; 1; 4 and 8 µg/ml. Setiap pelakuan dilakukan ulangan sebanyak 3 kali. Sel MDCK dan virus serta yang telah diberi perlakuan dengan amantadin diinkubasi selama 3-4 hari pada inkubator CO₂. Supernatan dalam lubang plat diuji HA secara individual dan setiap lubang dilakukan ulangan sebanyak 2 kali sehingga setiap virus dilakukan ulangan uji HA sebanyak 6 kali. Adanya hemaglutinasi sel darah merah menunjukkan adanya virus, sedangkan tidak adanya aktivitas hemaglutinasi memperlihatkan tidak adanya pertumbuhan virus pada sel.

3.3.14. 4.Uji Hemagglutinas (HA)

Microplate 96 lubang dengan bagian bawah berbentuk-V diisi dengan PBS 25 µl pH 7,2 pada semua lubang. Pada lubang pertama ditambahkan larutan virus yang akan diuji sebanyak 25 µl dan dihomogenisasi secara merata dengan pipet mikrotiter. Sebanyak 25 µl suspensi pada lubang pertama dipindahkan ke lubang kedua dan diaduk sehingga bercampur dengan baik begitu seterusnya sehingga lubang terakhir, sehingga diperoleh pengenceran virus kelipatan dua (log₂). Selanjutnya pada setiap lubang pengenceran tersebut ditambahkan 25 µl PBS, sehingga setiap lubang mempunyai volume 50 µl. Langkah berikutnya adalah menambahkan sebanyak 50 µl sel darah merah ayam 0,5%, kemudian *microplate* digoyang dengan menggunakan *mechanical vibrator* atau digoyang secara manual dan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur 22°-25°C. Pembacaan hasil dibaca dilakukan apabila kontrol positif (lubang yang berisi

suspensi virus AI yang telah diketahui) telah menunjukkan aktivitas hemagglutinasi sempurna. Hemagglutinasi ditentukan dengan memiringkan *microplate* dan diamati ada atau tidaknya bentuk air mata yang menetes (*tear-shaped streaming*) dari sel darah merah. Titrasi dibaca yaitu pengenceran tertinggi yang memberikan komplet hemagglutinasi (*no streaming*) (OIE 2000).



BAB 4

HASIL PENELITIAN

Dua puluh isolat virus AI subtipe H5N1 asal unggas yang koleksi tahun 2003 sampai dengan 2008 (Tabel 2) telah digunakan dan dianalisis pada penelitian ini. Empat belas virus diisolasi dari wabah/dugaan AI pada unggas dan enam virus diisolasi dari unggas disekitar kejadian infeksi virus AI subtipe H5N1 pada manusia. Uraian hasil dan pembahasan berdasarkan pada latar belakang dari masing-masing virus dan kepentingan untuk menjawab pertanyaan yang diajukan. Hasil dan pembahasan meliputi :

1. Perubahan karakter molekuler virus AI H5N1 tahun 2003-2008 dan mengidentifikasi virus AI subtipe H5N1 yang mengalami mutasi tertinggi. Hal ini untuk menjawab mutasi virus yang terjadi pada virus AI subtipe H5N1 termasuk mutasi dan karakter molekuler virus yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI.
2. Karakter molekuler virus AI H5N1 disekitar kasus H5N1 pada manusia. Penelitian ini untuk menjawab karakter virus AI asal unggas disekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia.
3. Analisis molekuler dan in vitro berkaitan dengan resistensi virus terhadap amantadin. Mengidentifikasi pengaruh perubahan karakter molekuler virus terhadap sensitivitas virus AI subtipe H5N1 pada obat antivirus amantadin.

4.1. Virus AI

Hasil RT-PCR dengan menggunakan primer matrix untuk mengidentifikasi virus influenza menunjukkan pita dengan ukuran 200-300 pasangan basa (pb) sesuai dengan Fouchier dkk (2000) dapat ditemukan pada duapuluh virus yang digunakan pada penelitian ini. Sampel yang telah positif influenza dilakukan pemeriksaan dengan primer H5 (Lee dkk., 2001) dan N1 (Wright dkk., 1995; Poon, 2005, komunikasi pribadi). Hasil RT-PCR memperlihatkan bahwa semua sampel yang diperoleh pada penelitian ini diidentifikasi dan merupakan virus AI subtipe H5N1. Pada Tabel 5 memperlihatkan jumlah virus yang diperoleh dalam penelitian ini. Data virus yang diperoleh dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabel 5. Jumlah isolat virus AI H5N1 yang diperoleh tahun 2006-2008 dan pada penelitian sebelumnya

Tahun	Jumlah isolat virus AI H5N1	Keterangan
2003	2	Diisolasi pada penelitian sebelumnya
2004	2	Diisolasi pada penelitian sebelumnya
2005	3	Diisolasi pada penelitian sebelumnya
2006	33	Diisolasi pada penelitian ini
2007	25	Diisolasi pada penelitian ini
2008	13	Diisolasi pada penelitian ini

Jumlah virus yang diperoleh pada Tabel 5 kemudian dipilih dan digunakan dalam penelitian ini untuk analisis selanjutnya yaitu sebanyak 20 virus AI subtipe H5N1. Duapuluh virus tersebut terdiri atas tujuh isolat virus subtipe H5N1 yang telah diisolasi pada penelitian penulis sebelumnya (2003-2005) dan tiga belas virus diisolasi dan diidentifikasi pada saat penelitian ini berlangsung (2006-2008). Dua puluh virus yang dipilih pada penelitian ini diharapkan dapat mewakili virus pada setiap tahunnya sepanjang tahun 2003-2008. Gambar hasil elektroforesis dan amplikon dua puluh virus yang dipilih pada penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 3.

Dua puluh virus AI H5N1 ini berasal dari berbagai latar belakang kejadian wabah diantaranya adalah dikoleksi di sekitar wabah unggas, virus yang berhasil diisolasi dari unggas termasuk virus yang diisolasi dari unggas pada peternakan ayam komersil yang melakukan vaksinasi AI subtipe H5 (14 virus) dan virus AI yang diisolasi dari unggas disekitar kasus AI H5N1 pada manusia (6 virus). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6 dan Lampiran 1.

Tabel 6. Virus AI sub tipe H5N1 yang digunakan pada penelitian ini

No	Nama Virus	Asal Kasus	Diisolasi/diidentifikasi /tahun
1	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2003
2	A/Ck/West Java/1074/2003	Wabah unggas	Indriani dkk 2003; Dharmayanti dkk/ 2003
3	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2004
4	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2004
5	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2005
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2005
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2005
8	A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	Dharmayanti dkk/ 2006
9	A/Duck/Jakarta/ Smt306/2006	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	Dharmayanti dkk/ 2006
10	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	Dharmayanti dkk/ 2007
11	A/Ck/West Java/Smi-Hjl8/2007	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	Dharmayanti dkk/ 2007
12	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	Dharmayanti dkk/ 2007
13	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	Dharmayanti dkk/ 2007
14	A/Ck/Pessel/BPPVR-II/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	BPPVR-II/2007; Dharmayanti dkk/ 2007
15	A/Ck/Inhu/BPPVR-II/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	BPPVR-II/2007; Dharmayanti dkk/ 2007
16	A/Ck/West Java/Smi-Acl/2008	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2008
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	Wabah unggas	Dharmayanti dkk/ 2008
18	A/Ck/West Java/Smi-M1/2008	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	Dharmayanti dkk/ 2008
19	A/Ck/West Java/Smi-M6/2008	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	Dharmayanti dkk/ 2008
20	A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	Dharmayanti dkk/ 2008

4.1.1 Pengukuran titer virus

Sebelum dilakukan penelitian, dua puluh virus yang akan dianalisis dilakukan pengukuran titer virus dengan menggunakan telur embrio bertunas sebagai indikator sistem. Telur digunakan sesuai dengan prosedur standar dalam menumbuhkan virus AI (OIE, 2000). Dilusi virus dimana 50% inang yang diinokulasi telah terinfeksi dapat dihitung dengan menggunakan *Reed and Muench method* (Burlison dkk., 1992). Pada penelitian ini penentuan titer yaitu 50% *egg infected dose* (EID₅₀) dilakukan dengan menggunakan embrio ayam sebagai indikator sistem. Hasil perhitungan EID₅₀ dari masing-masing virus dapat dilihat pada Lampiran 4 dan ringkasan hasil EID₅₀ dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil perhitungan EID₅₀ virus AI mempunyai nilai rentang antara 10^{7,17} EID₅₀/ml sampai dengan 10^{9,38} EID₅₀/ml. Nilai EID terendah dimiliki oleh virus

A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006 yaitu $10^{7,17}$ EID₅₀/ml dan virus.

A/Ck/Inhu/BPPVR/07 mempunyai nilai EID tertinggi yaitu $10^{9,63}$ EID₅₀/ml.

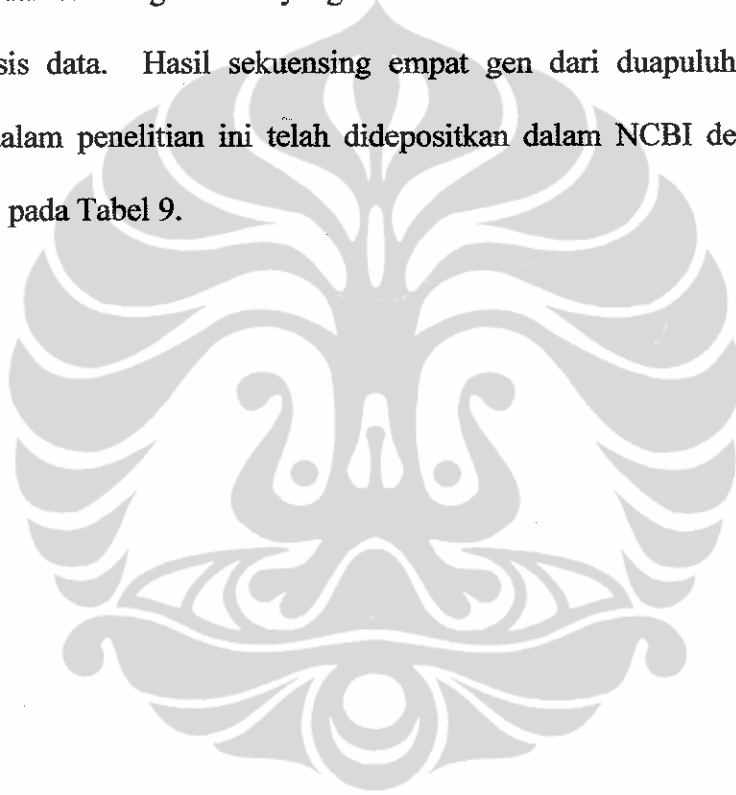


Tabel 7. Hasil perhitungan EID₅₀ virus AI yang digunakan pada penelitian ini

No	Nama Lengkap Virus	Nama Pendek Virus	EID ₅₀ /ml
1	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	EJ/BL-IPA/03	10 ^{8,50}
2	A/Ck/West Java/1074/2003	West Java/1074/03	10 ^{9,38}
3	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	Jakarta/DKI-Uwit/04	10 ^{8,38}
4	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	Jakarta/DKI31/05	10 ^{8,63}
5	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	Pdgl-Kas/04	10 ^{7,20}
6	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	WJ/Smi-Hay/05	10 ^{8,50}
7	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	WJ/Bgr-Cw/05	10 ^{9,63}
8	A/Duck/Jakarta/Simt306/2006	Jakarta/Simt306/06	10 ^{7,17}
9	A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	Jakarta/Sum106/06	10 ^{7,83}
10	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	WJ/Bks3/07	10 ^{7,88}
11	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	DKI-Nurs/07	10 ^{8,83}
12	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	Pessel/BPPVRII/07	10 ^{7,83}
13	A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	Inhu/BPPVRII/07	10 ^{9,63}
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	WJ/Smi-Hj18/07	10 ^{9,17}
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	WJ/Smi-Sud1/07	10 ^{9,10}
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	WJ/Smi-Acul/08	10 ^{9,38}
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	Srg-Fadh/08	10 ^{7,75}
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	SMI-M1/08	10 ^{9,25}
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	SMI-M6/08	10 ^{9,38}
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	SMI-Biot/08	10 ^{8,19}

4.2. Hasil Sekuensing

Jumlah nukleotida hasil sekuensing empat gen yang dianalisis yaitu hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix (M) dan non struktural (NS) dari dua puluh virus masing-masing dapat dilihat pada Tabel 8. Dalam analisis hasil sekuensing, jumlah basa yang diperoleh tidak digunakan secara keseluruhan karena disesuaikan dengan data yang tersedia di dalam NCBI dan kebutuhan dalam analisis data. Hasil sekuensing empat gen dari duapuluh virus yang digunakan dalam penelitian ini telah didepositkan dalam NCBI dengan nomor akses seperti pada Tabel 9.



Tabel 8. Dua puluh virus AI H5N1 dan jumlah nukleotida yang disekuensing pada masing-masing gen serta *reading frame* dan jumlah basa yang dianalisis

No	Nama Virus	Nama Gen					
		HA a(b)	NA a(b)	M a		NS a	
				MI a(b)	M2 a(b)	NS1 a(b)	NS2 a(b)
1	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
2	A/Ck/West Java/1074/2003	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
3	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
4	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
5	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
6	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
7	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
8	A/Duck/Jakarta/Smt306/2006	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
9	A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
10	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
11	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
12	A/Ck/Pessel/BPPVR11/2007	1704(568)	1322(440)	983		864	
				1-756(252)	689-979(97)	1-690(230)	471-835(119)
13	A/Ck/Inhu/BPPVR11/2007	1704(568)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	1701(567)	1322(440)	983		850	
				1-756(252)	689-979(97)	1-675(225)	464-820(119)

Keterangan :

a : Jumlah basa yang disekuensing dan *reading frame* untuk HA dan NA; Untuk M dan NS adalah jumlah basa yang disekuensing

b : Jumlah prediksi asam amino yang ditranslasikan setiap *reading frame*

Tabel 9. Nomer akses gen HA, NA, M dan NS dari dua puluh virus AI yang telah didaftarkan di NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

No	Virus	Nomor akses NCBI			
		HA	NA	M	NS
1	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	GU183447	GU183466	GU183427	GU183407
2	A/Ck/West Java/1074/2003	GU183448	GU183467	GU183428	GU183408
3	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	GU183449	GU183468	GU183429	GU183409
4	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	GU183450	GU183470	GU183430	GU183410
5	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	GU183451	GU183469	GU183431	GU183411
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	GU183452	GU183485	GU183432	GU183412
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	GU189678	GU183471	GU183433	GU183413
8	A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	GU183453	GU183472	GU183434	GU183414
9	A/Duck/Jakarta/Slmt306/2006	GU183454	GU183473	GU183435	GU183415
10	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	GU183455	GU183474	GU183436	GU183416
11	A/Ck/Pesse/BPPVR/2007	GU183456	GU183475	GU183437	GU183417
12	A/Ck/Inhu/BPPVR/2007	GU183457	GU183476	GU183438	GU183418
13	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	GU183458	GU183477	GU183439	GU183419
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	GU183459	GU183478	GU183440	GU183420
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	GU183460	GU183479	GU183441	GU183421
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	GU183465	GU183480	GU183442	GU183422
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	GU183461	GU183481	GU183443	GU183423
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	GU183462	GU183482	GU183444	GU183424
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	GU183463	GU183483	GU183445	GU183425
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	GU183464	GU183484	GU183446	GU183426

4.3. Analisis Bioinformatika

Analisis bioinformatika menggunakan ProtParam dalam situs www.expasy.org dilakukan untuk mengetahui komposisi dari protein yang bersangkutan, berat molekul (MW), pI dan muatan residu. Analisis komposisi protein pada masing-masing virus selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 5. Tabel 10a, 10b, 10c, 10d, 9e dan 10f memuat hasil analisis protein HA, NA, M1, M2, NS1 dan NS2 yang memperlihatkan berat molekul protein serta nilai pI teoritis masing-masing protein pada setiap virus yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 10a. Analisis asam amino protein HA dengan menggunakan ProtParam (www.expasy.org)

Nama Virus	Jumlah asam amino	Berat Molekul	Theoretical pI	Jumlah residu muatan	
				Negatif (Asp + Glu)	Positif (Arg + Lys)
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	568	64346	6,71	65	63
A/Ck/West Java/1074/2003	568	64359,1	6,74	66	64
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	568	64406,1	6,71	64	62
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	568	64353,1	6,71	65	63
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	568	64228	6,91	64	63
A/Ck/Jakarta/DK131/2005	568	64489,3	7,18	65	65
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	568	64334,1	6,91	64	63
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	568	64258,9	6,42	65	61
A/Duck/Jakarta/Smi306/2006	568	64305,9	6,94	64	63
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	568	64373,1	6,42	66	62
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	568	64479,3	6,58	67	64
A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	568	64202,9	6,71	64	62
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	568	64042,7	6,55	64	61
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	567	64295,1	6,71	66	64
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	567	64274	6,58	67	64
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	568	64069,8	6,55	63	60
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	568	64278	6,3	65	60
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	567	64305	6,58	66	63
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	567	64207,8	6,45	66	62
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	567	64300	6,61	66	63

Nilai pI tertinggi pada protein HA (Tabel 10a) dimiliki oleh DKI31/05 dikarenakan proporsi asam amino bermuatan negatif dan positif yang sama, sedangkan Srg-Fadh/08 mempunyai selisih jumlah residu asam amino bermuatan negatif dan positif sebanyak 5 sehingga nilai pI virus ini adalah yang terendah

dibandingkan dengan virus lainnya. Protein NA (Tabel 10b) memiliki nilai pI berkisar antara 6,07-6,78 pada semua isolat dan perbedaan antar asam amino muatan negatif dan positif adalah 3-5 residu.

Tabel 10b. Analisis asam amino protein NA dengan menggunakan ProtParam (www.expasy.org)

Nama Virus	Jumlah asam amino	Berat Molekul	Theoretical pI	Jumlah residu muatan	
				Negatif (Asp + Glu)	Positif (Arg + Lys)
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	440	47996,8	6,36	38	35
A/Ck/West Java/1074/2003	440	48008,9	6,36	38	35
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	440	48008,8	6,07	39	34
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	440	48047,9	6,07	39	34
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	440	47991,8	6,36	38	35
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	440	48060,9	6,21	39	35
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	440	47886,9	6,55	37	35
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	440	48080,9	6,37	39	36
A/Duck/Jakarta/Smt306/2006	440	48139	6,37	39	36
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	440	48278,2	6,59	38	36
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	440	48134	6,78	38	37
A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	440	48146,1	6,78	38	37
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	440	48147,1	6,37	39	36
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	440	48098,9	6,21	39	35
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	440	48292,3	6,55	39	37
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	440	48131	6,78	38	37
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	440	48216,2	6,55	39	37
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	440	48143	6,21	39	35
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	440	48185	6,07	40	35
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	440	48070,9	6,21	39	35

Tabel 10c. Analisis asam amino protein M1 dengan menggunakan ProtParam (www.expasy.org)

Nama Virus	Jumlah asam amino	Berat Molekul	Theoretical pI	Jumlah residu muatan	
				Negatif (Asp + Glu)	Positif (Arg + Lys)
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	252	27933,2	9,42	23	30
A/Ck/West Java/1074/2003	252	27933,2	9,42	23	30
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	252	27995,3	9,3	24	30
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	252	27903,2	9,42	23	30
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	252	27948,3	9,51	23	31
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	252	27933,2	9,42	23	30
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	252	27933,2	9,42	23	30
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	252	27885,2	9,15	24	29
A/Duck/Jakarta/Smt306/2006	252	27939,4	9,51	23	31
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	252	27854,2	9,4	23	30
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	252	27720,9	8,8	26	30
A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	252	27854,2	9,4	23	30
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	252	27877,2	9,4	23	30
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	252	27812,1	9,28	23	29
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	252	27867,2	9,4	23	30
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	252	27854,2	9,4	23	30
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	252	27854,2	9,4	23	30
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	252	27838,1	9,4	23	30
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	252	27800,1	9,4	23	30
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	252	27843,1	9,4	23	30

Pada protein M1 (Tabel 10c), pI cenderung tinggi karena perbandingan residu bermuatan positif lebih tinggi dibandingkan dengan residu bermuatan negatif. Analisis protein M2 (Tabel 10d), dua virus memperlihatkan pI netral yaitu virus WJ/Smi-Hay/05 dan WJ/Bgr-Cw/05, sedangkan virus lainnya sebagian besar mempunyai pI sekitar 5. Pada protein NS1 (Tabel 10e) virus Pessel/BPPVR11/07 menunjukkan pI tertinggi yaitu 6,22 sedangkan pada protein NS2 (Tabel 10f) virus Smi-M1/08 dan BL-IPA/03 mempunyai pI tertinggi yaitu sekitar 6.

Tabel 10d. Analisis asam amino protein M2 dengan menggunakan ProtParam (www.expasy.org)

Nama Virus	Jumlah asam amino	Berat Molekul	Theoretical pI	Jumlah residu muatan	
				Negatif (Asp + Glu)	Positif (Arg + Lys)
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	97	11298	5,7	15	13
A/Ck/West Java/1074/2003	97	11298	5,7	15	13
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	97	11314	5,7	15	13
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	97	11270	5,7	15	13
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	97	11358,1	7	14	14
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	97	11328	5,7	15	13
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	97	11384,1	7	15	15
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	97	11456,3	6,17	15	14
A/Duck/Jakarta/Smt306/2006	97	11401,1	5,7	15	13
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	97	11457,1	5,39	16	13
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	97	11235,9	5,7	15	13
A/Ck/Pessel/BPPVR11/2007	97	11447,1	5,39	16	13
A/Ck/Inhu/BPPVR11/2007	97	11447,1	5,39	16	13
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	97	11512,2	5,41	16	13
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	97	11484,1	5,41	16	13
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	97	11457,1	5,39	16	13
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	97	11457,1	5,39	16	13
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	97	11570,2	5,19	17	13
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	97	11570,2	5,19	17	13
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	97	11570,2	5,19	17	13

Tabel 10e. Analisis asam amino protein NS1 dengan menggunakan ProtParam (www.expasy.org)

Nama Virus	Jumlah asam amino	Berat Molekul	Theoretical pI	Jumlah residu muatan	
				Negatif (Asp + Glu)	Positif (Arg + Lys)
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	225	25544,3	5,29	36	31
A/Ck/West Java/1074/2003	225	25582,4	5,86	34	32
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	225	25396	5,25	36	29
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	225	25542,3	5,29	36	31
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	225	25516,2	5,19	37	31
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	225	25483,3	5,61	34	31
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	225	25542,3	5,29	36	31
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	225	25575,3	5,43	35	31
A/Duck/Jakarta/Simt306/2006	225	25542,3	5,29	36	31
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	225	25528,3	5,86	35	33
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	225	25526,3	5,29	36	31
A/Ck/Pessel/BPPVR11/2007	230	25881,7	6,22	33	32
A/Ck/Inhu/BPPVR11/2007	225	25616,4	5,76	35	32
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	225	25510,2	5,29	36	31
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	225	25496,2	5,28	36	31
A/Ck/West Java/Smi-Acu1/2008	225	25569,3	5,43	36	32
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	225	25516,2	5,19	37	31
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	225	25506,2	5,29	36	31
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	225	25476,2	5,29	36	31
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	225	25504,3	5,29	36	31

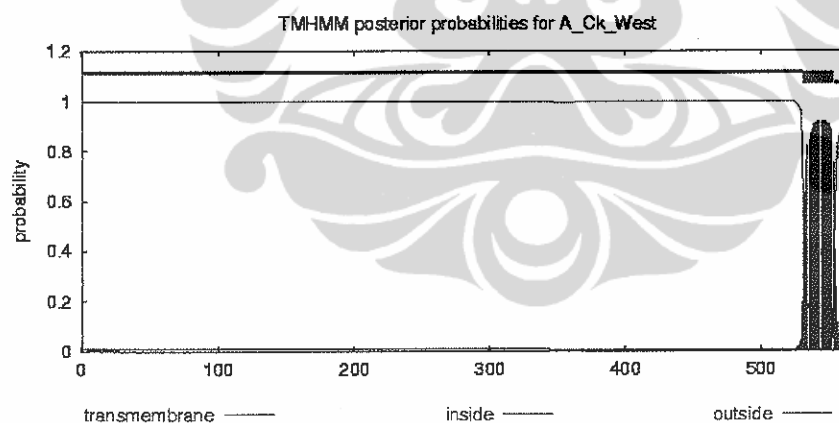
Tabel 10f. Analisis asam amino protein NS2 dengan menggunakan ProtParam (www.expasy.org)

Nama Virus	Jumlah asam amino	Berat Molekul	Theoretical pI	Jumlah residu muatan	
				Negatif (Asp + Glu)	Positif (Arg + Lys)
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	119	14348,5	6,08	17	15
A/Ck/West Java/1074/2003	119	14279,4	5,79	17	14
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	119	14288,4	5,94	17	14
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	119	14263,4	5,79	17	14
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	119	14263,4	5,79	17	14
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	119	14307,4	5,79	17	14
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	119	14263,4	5,79	17	14
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	119	14218,3	5,79	17	14
A/Duck/Jakarta/Simt306/2006	119	14199,3	5,79	17	14
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	119	14233,3	5,79	17	14
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	119	14311,4	5,79	17	14
A/Ck/Pessel/BPPVR11/2007	119	14357,5	5,52	19	14
A/Ck/Inhu/BPPVR11/2007	119	14253,3	5,79	17	14
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	119	14271,4	5,92	17	15
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	119	14271,4	5,92	17	15
A/Ck/West Java/Smi-Acu1/2008	119	14297,4	5,79	17	14
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	119	14229,3	5,79	17	14
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	119	14312,5	6,29	17	16
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	119	14215,3	5,92	17	15
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	119	14305,4	5,92	17	15

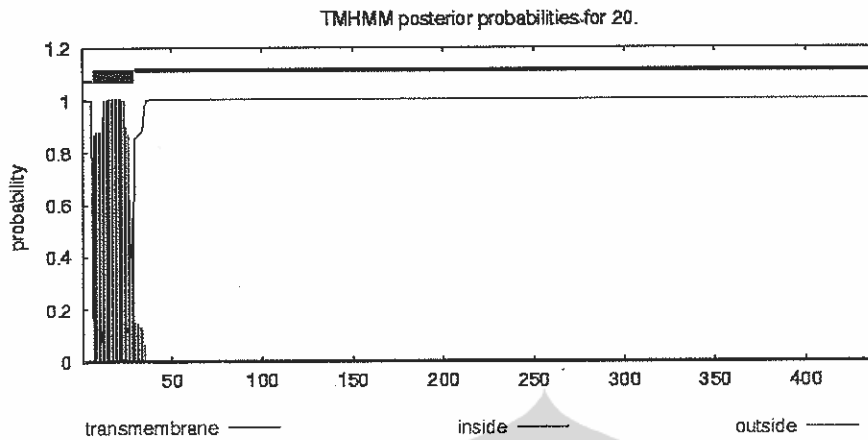
Pada analisis bioinformatika juga dilakukan prediksi topologi protein dengan menggunakan situs TMHMM. Hasil dari prediksi tersebut menunjukkan bahwa protein HA, NA dan M2 adalah protein transmembran, sedangkan protein M1, NS1 dan NS2 bukan merupakan protein transmembran. Pada Gambar 10, 11

dan 12 menunjukkan bahwa protein HA, NA dan M2 dari virus WJ/Smi-Biot/08 adalah protein transmembran sedangkan pada Gambar 13, 14 dan 15 membuktikan bahwa protein NS1, NS2 dan M1 bukan protein transmembran virus. Pada analisis TMHMM, protein HA dan NA adalah protein transmembran, namun pada gambar grafik hasil TMHMM menunjukkan bahwa protein M2 lebih sesuai dengan gambaran protein transmembran jika dibandingkan HA dan NA. Hal ini sesuai dengan literatur bahwa bahwa M2 adalah merupakan protein transmembran yang berfungsi sebagai *ion channel*.

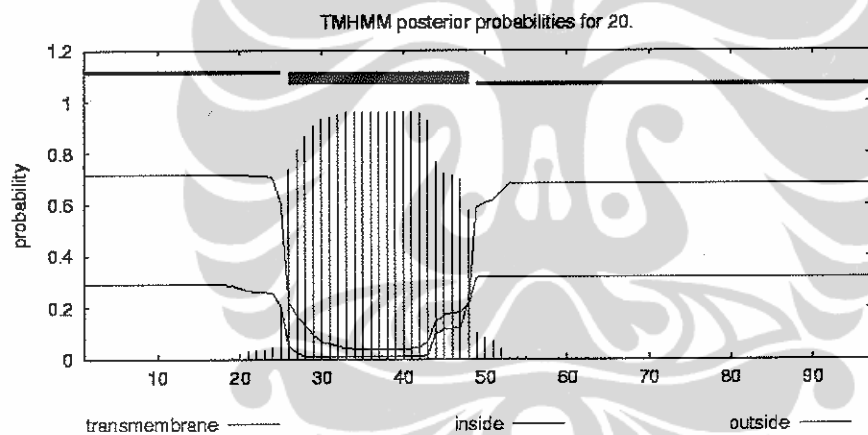
Hasil prediksi TMHMM dari semua virus dapat dilihat pada Lampiran 6. Dari analisis ini menunjukkan bahwa gen penyandi protein yang telah disekuensing adalah benar sehingga hasil sekuensing dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.



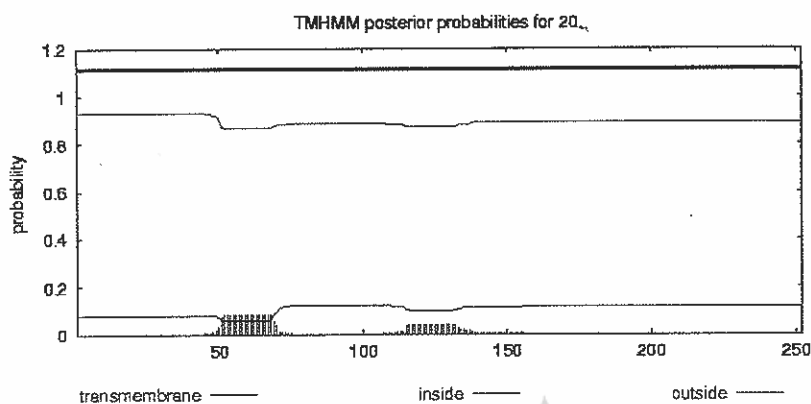
Gambar 10. Prediksi protein transmembran dari protein HA virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM (www.expasy.org)



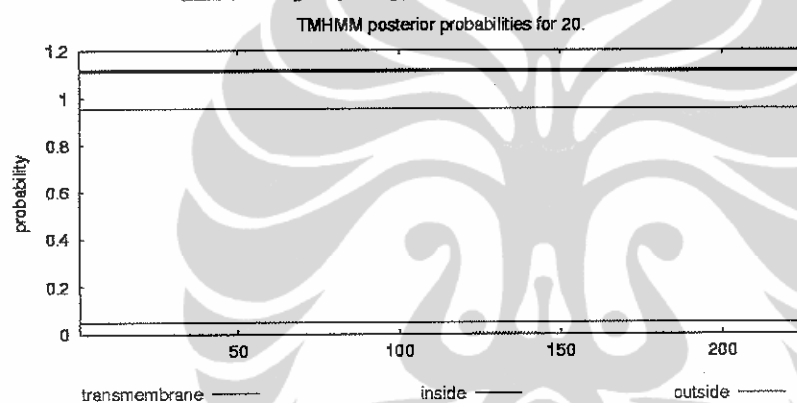
Gambar 11. Prediksi protein transmembran dari protein NA virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM (www.expasy.org)



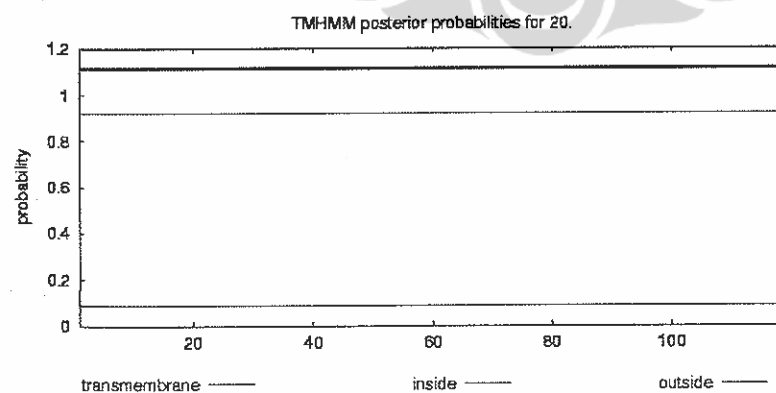
Gambar 12. Prediksi protein transmembran dari protein M2 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM (www.expasy.org)



Gambar 13. Prediksi protein transmembran dari protein M1 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM (www.expasy.org)



Gambar 14. Prediksi protein transmembran dari protein NS1 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM (www.expasy.org)



Gambar 15. Prediksi protein transmembran dari protein NS2 virus A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008 dengan menggunakan situs TMHMM (www.expasy.org)

4.4. Mutasi virus avian influenza sub tipe H5N1

4.4.1. Substitusi Nukleotida

Pada gen HA, substitusi nukleotida yang terjadi biasanya dihubungkan dengan evolusi virus. Hal ini biasanya dilakukan dengan membandingkan rata-rata substitusi non sinonim (K_a) dengan substitusi sinonim (K_s). Nilai $K_a < K_s$ diartikan sebagai akibat seleksi negatif, $K_a > K_s$ diartikan sebagai akibat seleksi positif dan $K_a = K_s$ diartikan sebagai tidak ada seleksi (Li dkk., 1985). Hasil analisis yang dilakukan pada gen HA memperlihatkan bahwa dari duapuluh virus yang digunakan, sebanyak delapan virus yaitu WJ/1074/03, WJ/Bgr-Cw/05, DKI-Nurs/07, WJ/Smi-Hj18/07, WJ/Smi-Sud1/07, WJ/SMI-M1/08, WJ/SMI-M6/08 dan WJ/SMI-Biot/08 mempunyai $K_a > K_s$ (sehingga substitusi yang terjadi kemungkinan akibat seleksi positif), sedangkan duabelas virus lainnya jumlah substitusi sinonim lebih besar dibandingkan substitusi non sinonim.

Selain protein HA pada penelitian ini juga menganalisis substitusi nukleotida pada protein NA, M1, M2, NS1 dan NS2 (Tabel 11 a dan 11 b). Pada protein NA ditemukan hanya dua virus yang mempunyai $K_a > K_s$, yaitu virus Pdgl-Kas/04 dan Smi-Acul/08, selebihnya memiliki $K_a < K_s$. Pada protein M2, lima belas virus mengalami substitusi akibat seleksi positif kecuali dua virus yaitu Pdgl-Kas/04 dan Sum106/06 memiliki $K_a < K_s$; virus WJ/1074/03 dan Fadh/07 tidak mengalami seleksi. Untuk protein M1, enam virus memiliki substitusi non sinonim yang lebih besar yaitu Pdgl-Kas/04, Jakarta/Sum106/06, Jakarta/SImt306/06, DKI-Nurs/07, WJ/Smi-Hj18/07 dan WJ/SMI-M1/08. Empat virus tidak mengalami seleksi atau $K_a = K_s$ yaitu DKI-Uwit/04,

Pessel/BPPVR11/07, Inhu/BPPVR11/07 dan Srg-Fadh/08. Pada protein NS1, tujuh belas virus memiliki substitusi non sinonim lebih banyak dibandingkan substitusi sinonim, dua virus lainnya (Slmt306/06 dan Fadh/08) mempunyai $K_a=K_s$, sedangkan untuk protein NS2, dua virus yaitu WJ/1074/03 dan Pesel/BPPVR11/07 memiliki $K_a < K_s$, dua virus (DKI-Uwit/04 dan Inhu/BPPVR11/07) memiliki $K_a=K_s$ dan lima belas virus sisanya mempunyai $K_a > K_s$.

Tabel 11a. Jumlah substitusi sinonim dan non sinonim gen HA, NA dan NS1 virus avian influenza yang digunakan pada penelitian ini

No	Virus	HA		NA		NS1	
		Non Sinonim	Sinonim	Non Sinonim	Sinonim	Non Sinonim	Sinonim
1	A/Ck/East Java/BI-IPA/2003	0	0	0	0	0	0
2	A/Ck/West Java/1074/2003	8	4	4	6	8	3
3	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	10	17	10	7	7	3
4	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	8	10	8	14	14	4
5	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	8	10	8	10	8	4
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	19	10	9	10	9	4
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	14	15	13	15	6	4
8	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	11	24	8	17	9	7
9	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	24	27	9	18	7	7
10	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	31	19	13	18	9	7
11	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	15	29	10	16	12	9
12	A/Ck/Pesse/BPPVR11/2007	10	25	11	18	50	38
13	A/Ck/Inhu/BPPVR11/2007	22	25	10	17	11	6
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	44	22	9	20	10	7
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	43	24	12	20	10	7
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	14	33	19	18	10	8
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	22	45	17	18	11	11
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	50	27	12	24	12	10
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	50	31	12	23	12	9
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	52	29	13	26	13	9

Tabel 11b. Jumlah substitusi sinonim dan non sinonim gen NS2, M1 dan M2 virus avian influenza yang digunakan pada penelitian ini

No	Virus	NS2		M1		M2	
		Non Sinonim	Sinonim	Non Sinonim	Sinonim	Non Sinonim	Sinonim
1	A/Ck/East Java/BI-IPA/2003	0	0	0	0	0	0
2	A/Ck/West Java/1074/2003	1	4	0	1	0	0
3	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	3	2	3	2	1	2
4	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	3	3	3	3	1	0
5	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	3	1	0	1	1	0
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	3	2	2	4	7	1
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	3	2	0	5	5	1
8	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	5	2	12	9	5	6
9	A/Duck/Jakarta/DKI-Simt306/2006	6	2	10	5	9	2
10	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	5	3	18	5	8	1
11	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	5	2	4	5	7	2
12	A/Ck/Pessel/BPPVR II/2007	16	22	6	6	8	2
13	A/Ck/Inhu/BPPVR II/2007	5	5	8	8	8	2
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	7	3	7	3	8	2
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	7	3	5	6	9	3
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	5	4	4	7	6	5
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	5	2	5	5	6	6
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	10	3	11	6	9	2
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	10	4	7	9	9	2
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	8	3	7	9	9	3

4.4. 2. Karakter molekuler virus AI subtipe H5N1 yang berasal dari unggas tanpa kasus infeksi virus AI subtipe H5N1 pada manusia

4.4.2.1. Latar belakang virus yang dikoleksi

Empat belas virus AI yang diisolasi dari wabah AI pada unggas tanpa kasus infeksi AI pada manusia yaitu berasal dari ayam, entok dan itik digunakan dalam penelitian ini. Dalam melengkapi analisis virus, disertakan juga data sekuen dua virus yaitu virus A/Ck/WestJava/Pwt-Wij/2006 dan Ck/WestJava/Smi-Pat/06. Sekuen nukleotida gen HA dari virus tersebut telah tersedia pada NCBI. Dharmayanti dkk (2006) mengisolasi kedua virus ini dari ayam yang berasal dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI subtipe H5.

Virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006 diperoleh dari swab kloaka ayam pada peternakan pembibitan yang mengalami sedikit penurunan produksi telur pada enam minggu paska vaksinasi menggunakan bibit vaksin H5N2. Selain itu tidak ada gejala klinis yang mengarah ke penyakit AI, karena ayam tampak sehat dan normal. Berbeda dengan virus Ck/WestJava/Smi-Pat/06, yang diperoleh dari peternakan pembibitan ayam yang melakukan vaksinasi menggunakan bibit vaksin H5N2 dan H5N1 namun mendapatkan wabah AI dengan mortalitas sekitar 90%. Kedua virus ini mempunyai karakter yang berbeda dalam menimbulkan gejala klinis pada saat sampel dikoleksi, namun demikian mempunyai karakter genetika dan mutasi yang sama pada gen HA. Dalam penelitian ini tidak dilakukan uji patogenisitas pada hewan coba sehingga patogenisitas pada hewan coba kedua virus tersebut tidak dapat diketahui.

Pada Tabel 12, isolat nomor 1-7 adalah virus AI yang berasal dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI. Sepanjang tahun 2007-2008 berhasil diisolasi 5 isolat virus yang berasal dari peternakan ayam petelur dan peternakan pembibitan ayam pedaging yang rutin melakukan vaksinasi AI. Sebanyak sembilan virus yaitu virus nomor 8-16 dari empat belas virus yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari unggas yang tidak divaksin AI.

Pada tahun 2007, virus Ck/WestJava/Smi-Sud1/07 dan Ck/WestJava/Smi-Hj18/07 berhasil diisolasi dari ayam pada peternakan ayam yang telah melakukan vaksinasi AI dengan bibit vaksin H5N2. Kedua virus ini berasal dari peternakan ayam petelur yang menunjukkan adanya kematian yang cukup tinggi pada saat sampel dikoleksi. Kedua virus ini berasal dari kabupaten yang sama tetapi berbeda lokasi. Selanjutnya pada tahun 2008, berhasil diperoleh tiga virus yang berasal dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI dengan menggunakan bibit vaksin H5N2 yaitu virus A/Ck/West Java/Smi-M1/2008, A/Ck/West Java/Smi-M6/2008 dan A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008. Ketiga virus ini berasal dari kabupaten dan kecamatan yang sama namun berbeda lokasi peternakan dan menimbulkan banyak kematian.

Tabel 12. Virus avian influenza H5N1 dan asal sampel yang berasal dari unggas tanpa kasus infeksi H5N1 pada manusia

No	Nama Virus	Patogenisitas	Asal sampel
1	A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006	Tidak ada gejala klinis AI, penurunan produksi telur	Peternakan pembibitan
2	A/Ck/West Java/Smi-Pat/2006	Mortalitas tinggi	Peternakan pembibitan
3	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	Mortalitas tinggi	Peternakan ayam petelur
4	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	Tidak ada gejala klinis AI, penurunan produksi telur	Peternakan ayam petelur
5	A/Ck/West Java/Smi-M1/2008	Mortalitas tinggi	Peternakan pembibitan
6	A/Ck/West Java/Smi-M6/2008	Mortalitas tinggi	Peternakan pembibitan
7	A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008	Penurunan produksi telur, mortalitas tinggi	Peternakan ayam petelur
8	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	Mortalitas tinggi	Peternakan ayam petelur
9	A/Ck/West Java/1074/2003	Mortalitas tinggi	Peternakan ayam petelur
10	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	Mortalitas tinggi	Entok
11	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	Mortalitas tinggi	Itik
12	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	Mortalitas tinggi	Ayam buras
13	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	Mortalitas tinggi	Entok
14	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	Mortalitas tinggi	Ayam buras
15	A/Ck/West Java/Smi-Acl/2008	Mortalitas tinggi	Ayam buras
16	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	Mortalitas tinggi	Ayam buras

Keterangan :

Virus nomor 1-7 adalah isolat virus AI subtipe H5N1 asal unggas dari peternakan ayam yang divaksinasi AI subtipe H5

4.4.2.2. Analisis sekuen protein Hemagglutinin (HA)

Empat belas virus yang digunakan dalam penelitian ini pada analisis penjejeran asam amino protein hemagglutinin menunjukkan rangkaian asam amino basa pada *cleavage site* gen HA yang sesuai dengan gambaran virus HPAI (Gambar 16). Enam virus yang diisolasi pada tahun 2003-2005, menunjukkan sekuen PQRERRRKKR//G, delapan virus lainnya yang dianalisis pada penelitian ini, menunjukkan motif PQRESRRKKR//G, karena terjadi mutasi pada asam amino Arginin menjadi Serin (R→S) pada posisi -6 HA1 (Gambar 16). Seluruh virus yang dianalisis pada penelitian ini masih mengenal *avian receptor* ($\alpha 2,3$) karena mempunyai residu asam amino glutamat pada posisi 222 (pada H3 pada posisi 226) dan glisin pada posisi 224 (posisi 228 pada virus H3) (Stevens dkk., 2006).

Analisis protein HA dilakukan pada 165 data molekuler virus AI di Indonesia termasuk dua puluh virus AI yang digunakan pada penelitian ini (Lampiran 7). Virus Indonesia telah mengalami mutasi jika dibandingkan dengan virus yang diisolasi pertama kali pada tahun 2003 pada penelitian ini yaitu BL-IPA/03 dan mutasi terbesar terjadi pada virus-virus yang berasal dari unggas yang telah divaksinasi. Virus WJ/Pwt-Wij/06 dan WJ/Smi-Pat/06 mempunyai perbedaan sekitar 4,95 % asam amino dari 545 asam amino protein HA yang dibandingkan. Persentase perbedaan semakin meningkat pada tahun 2007 yaitu virus WJ/Smi-Sud1/07 berbeda sekitar 6,61% dan virus WJ/Smi-Hj18 sebesar 6,79%. Virus WJ/Smi-M1/08, WJ/Smi-M6/08 dan WJ/Smi-Biot/08 memiliki perbedaan 41-43 asam amino atau sekitar 7,52 - 7,89%. Persentase mutasi virus

dari tahun 2003 sampai tahun 2008 dapat dilihat pada Lampiran 7.

Sebagian besar isolat diperoleh dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI dengan menggunakan vaksin heterolog. Penggunaan galur H5N2 dan H5N9 sebagai bibit vaksin mempunyai homologi sekitar 83-89% dengan virus tahun 2003 yaitu BL-IPA/03. Perbandingan tiga virus terbaru pada tahun 2008 yaitu virus (Smi-M1/08, Smi-M6/08 dan Smi-Biot/08) homologinya sebesar 76-77% dengan H5N2 (Mex/232/94) dan Wisconsin/68. Jika dibandingkan dengan N28/73 menunjukkan homologi yang lebih tinggi yaitu sekitar 81% (Tabel 13). Hal ini memperlihatkan bahwa antara virus tahun 2008 dengan vaksin AI yang digunakan mempunyai jarak genetik yang cukup jauh. Jenis asam amino yang berbeda dengan bibit vaksin Mex/232/94, Wisconsin/68 dan N28/73 selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 8.

Tabel 13. Jumlah dan persentase perbedaan dan homologi asam amino bibit vaksin H5N2 dan H5N9 dengan isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian

No	Virus	A/Chicken/Mexico/232/94			A/Turkey/Wisconsin/68			A/Turkey/England/N28/73		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
1	A/Chicken/Mexico/232/94				26	7,78	92,22	35	10,48	89,52
2	A/Turkey/Wisconsin/68	26	7,78	92,22				32	9,58	90,42
3	A/Turkey/England/N28/73	35	10,48	89,52	32	9,58	90,42			
4	A/Ck/West Java/1074/2003	59	17,66	82,34	57	17,07	82,93	36	10,78	89,22
5	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	64	19,16	80,84	60	17,96	82,04	39	11,68	88,32
6	A/Ck/Pessel/BPPVR/2007	60	17,96	82,04	56	16,77	83,23	34	10,18	89,82
7	A/Ck/Inhu/BPPVR/2007	57	17,07	82,93	55	16,47	83,53	34	10,18	89,82
8	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	54	16,17	83,83	53	15,87	84,13	33	9,88	90,12

9	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	60	17,96	82,04	58	17,37	82,63	37	11,08	88,92
10	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	60	17,96	82,04	56	16,77	83,23	35	10,48	89,52
11	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	55	16,47	83,53	54	16,17	83,83	32	9,58	90,42
12	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	55	16,47	83,53	53	15,87	84,13	33	9,88	90,12
13	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	75	22,46	77,54	72	21,56	78,44	53	15,87	84,13
14	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	60	17,96	82,04	56	16,77	83,23	35	10,48	89,52
15	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	56	16,77	83,23	54	16,17	83,83	33	9,88	90,12
16	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	54	16,17	83,83	52	15,57	84,43	32	9,58	90,42
17	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	62	18,56	81,44	58	17,37	82,63	37	11,08	88,92
18	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	59	17,66	82,34	55	16,47	83,53	37	11,08	88,92
19	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	75	22,46	77,54	74	22,16	77,84	55	16,47	83,53
20	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	75	22,46	77,54	74	22,16	77,84	55	16,47	83,53
21	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	78	23,35	76,65	76	22,75	77,25	60	17,96	82,04
22	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	79	23,65	76,35	77	23,05	76,95	61	18,26	81,74
23	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	80	23,95	76,05	77	23,05	76,95	61	18,26	81,74
24	A/Chicken/West Java/PWTWJ/2006	75	22,46	77,54	72	21,56	78,44	53	15,87	84,13
25	A/Chicken/West Java/SMIPAT/2006	75	22,46	77,54	72	21,56	78,44	53	15,87	84,13

Keterangan :

a : Jumlah perbedaan asam amino

b : persentase perbedaan asam amino

c : persentase homologi asam amino

Mutasi yang terjadi pada protein HA memperlihatkan bahwa virus-virus yang berasal dari unggas yang divaksinasi AI mengalami 18 substitusi asam amino yang khas pada posisi N72K, P74Q, N84S, A86T, N109K, Q115R, S121D, N165K, P181S, D183N, A184V, A185E, T195I, N220H, E257D, P235N, I239T dan N273D dibandingkan dengan virus BL-IPA/03. Mutasi ini terlihat secara eksklusif hanya ditemukan pada virus-virus yang diisolasi dari unggas yang berasal dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI, yang selanjutnya disebut virus pav-AI. Mutasi berlanjut kepada virus pav-AI tahun 2007-2008, dan mutasi-mutasi ini tidak ditemukan pada virus pav-AI tahun 2006. Mutasi

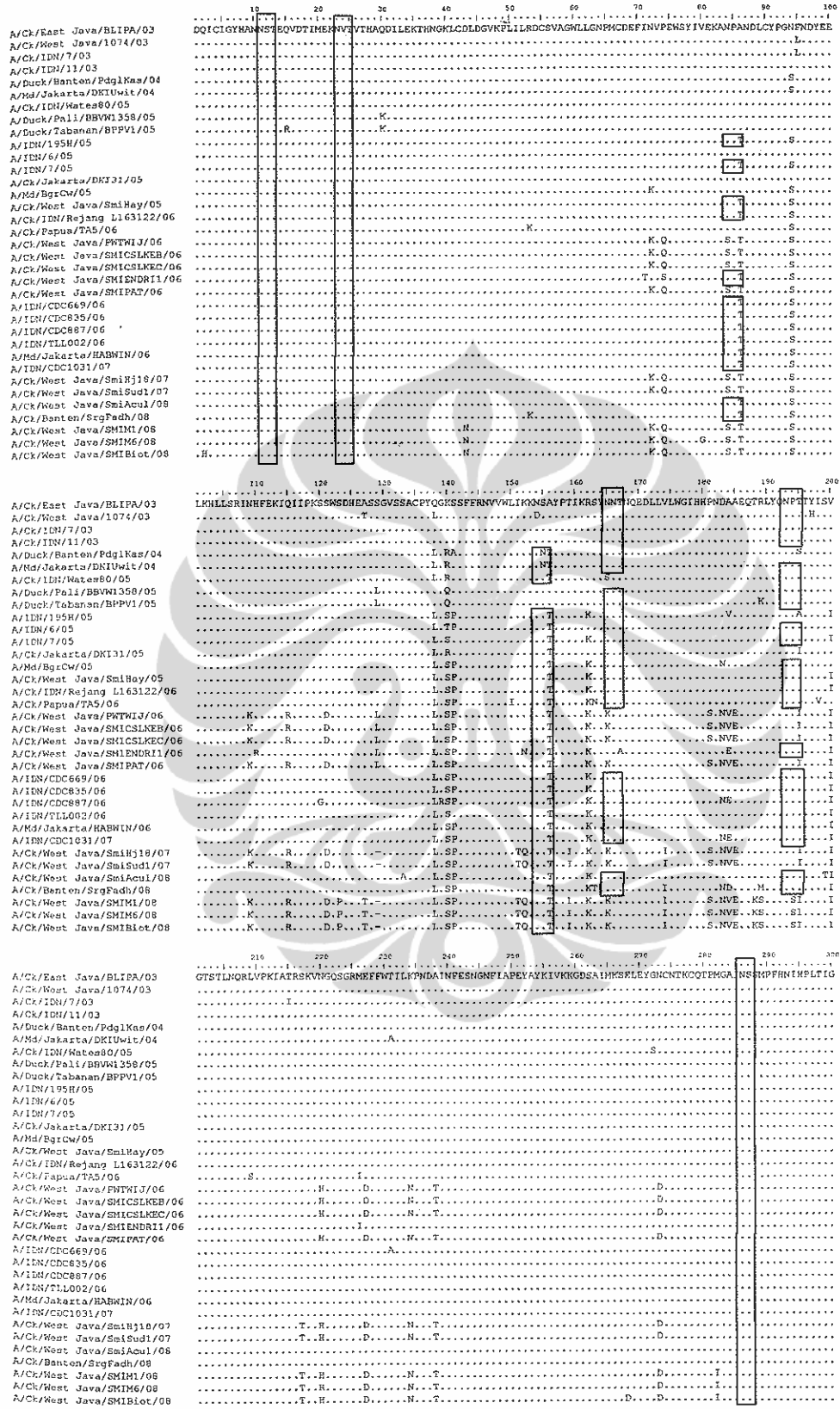
tersebut berupa delesi pada posisi 129 dan substitusi pada posisi I151T, K152Q, T159I, V174I dan S217T. Delapan substitusi asam amino yaitu D43N, S123P, E127T, T188K, R189S, P193S, M282I dan T391A hanya ditemukan pada virus pav-AI tahun 2008.

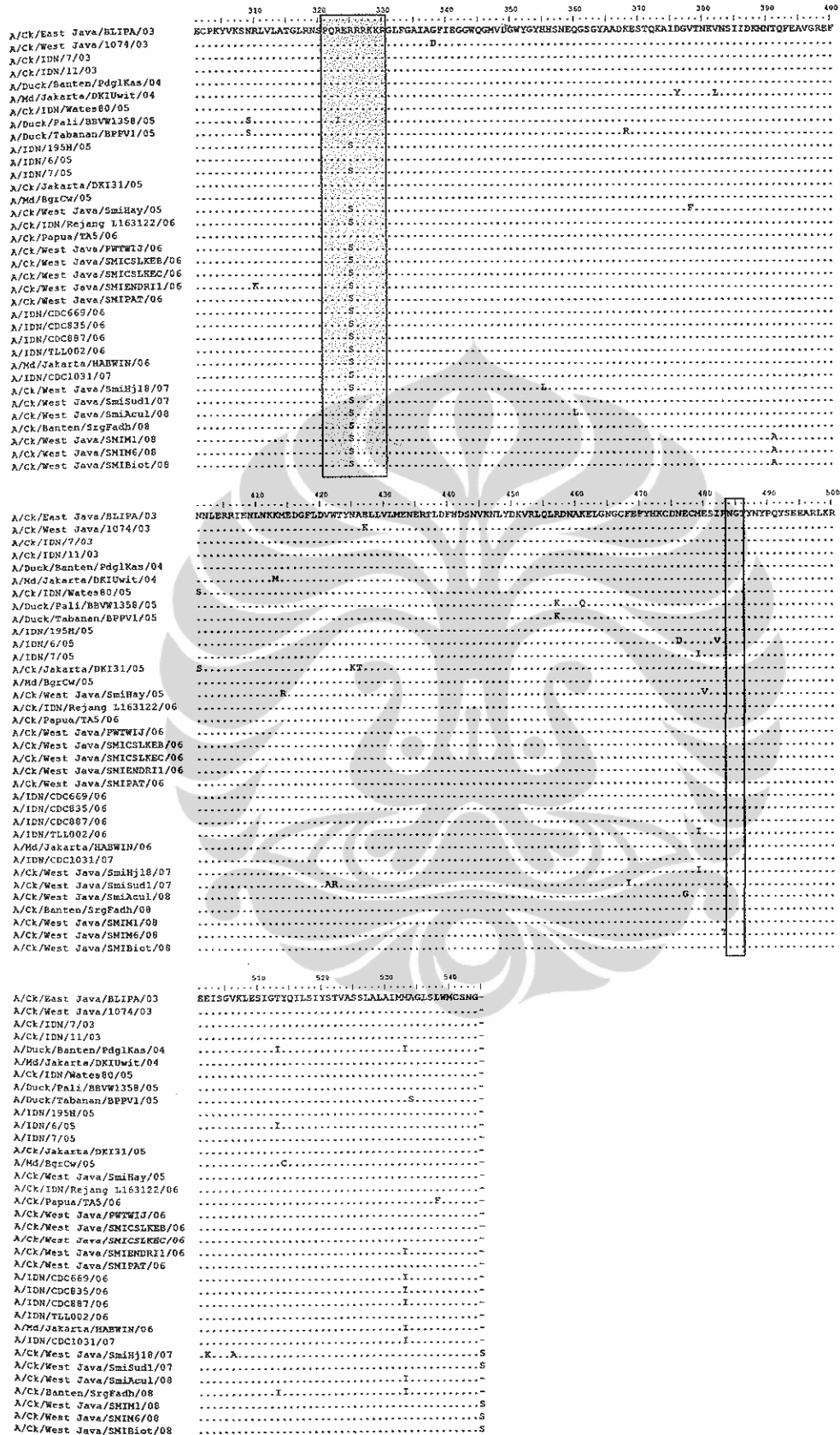
Sejak dideteksi pada tahun 2006 sampai tahun 2008, pada penelitian ini memperlihatkan bahwa diantara isolat virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI secara intensif, telah mengalami peningkatan mutasi pada gen HA. Hal yang berbeda terjadi pada virus AI yang berasal dari unggas yang tidak divaksin, namun demikian virus AI yang diisolasi pada tahun 2008 yaitu WJ/Smi-Acul/2008 dan Srg-Fadh/2008 juga menunjukkan signifikansi peningkatan jumlah mutasi yaitu sekitar 2-3%. Pada Gambar 16 dapat dilihat substitusi asam amino yang telah terjadi terutama pada virus-virus pav-AI.

Analisis pohon filogenetik gen HA (Gambar 17) menunjukkan bahwa virus-virus pav-AI membentuk kelompok yang berbeda dengan virus AI subtipe H5N1 unggas ataupun manusia di Indonesia. Virus-virus pav-AI pada tahun 2007-2008 membentuk kelompok yang berbeda dengan virus pav-AI pada tahun 2006. Virus pav-AI tahun 2006 berkelompok dengan dua virus yang diisolasi Dharmayanti dkk (2006) yaitu virus A/Ck/West Java/SmiCslk-EB/2006 dan A/Ck/west Java/SmiCslk-EC/2006. Kedua virus ini berasal dari wabah ayam buras yang tidak divaksin. Wabah pada ayam buras ini terjadi tidak lama setelah terjadinya wabah pada peternakan komersial dan menyebabkan kematian cukup tinggi pada ayam di peternakan tersebut. Pada periode wabah tersebut diisolasi virus A/Ck/West Java/Smi-Pat/2006, A/Ck/West Java/SmiCslk-EB/2006 dan

A/Ck/west Java/SmiCslk-EC/2006 yang berasal dari kabupaten Sukabumi. Pada tahun 2006, penemuan virus-virus ini menjadi perhatian karena virus-virus tersebut mempunyai mutasi pada protein HA yang cukup signifikan dibandingkan dengan virus yang ditemukan sebelumnya.

Analisis filogenetika gen HA virus AI subtipe H5N1 sepanjang tahun 2003-2008, menghasilkan tiga kelompok besar dalam pohon filogenetik virus AI asal Indonesia 2003-2008. Kelompok 1 terdiri dari virus yang mempunyai karakter genetika relatif masih hampir sama dengan virus progeni tahun 2003. Kelompok 2 adalah virus tahun 2006, sebagai virus yang telah mengalami mutasi yang berasal dari peternakan ayam yang intensif melakukan vaksinasi AI dan turunannya. Kelompok tiga adalah virus yang mengalami mutasi lebih lanjut yaitu virus yang berasal dari peternakan ayam yang intensif melakukan vaksinasi AI tahun 2007-2008 (Gambar 17). Pada kelompok 1 terdapat virus yang diisolasi dari ayam buras pada tahun 2008 yaitu virus Srg-Fadh/2008 dan WJ/Smi-Acul/2008, kedua virus ini pada pohon filogenetika berdekatan dengan virus AI asal manusia.





Gambar 16. Hasil Penjejeran prediksi sekuen pada protein HA. Tempat glikosilasi ditandai dengan kotak tertutup dan residu asam amino didaerah *cleavage site* HA ditunjukkan dengan kotak tertutup dengan warna abu-abu. Penomoran asam amino berdasarkan virus BL-IPA/03



Universitas Indonesia

- 89. A/Turkey/Langka/BBPV/2005
- 94. A/Indonesia/CDC599/2006
- A/Chicken/Langka/BBPV1576/2005
- A/Chicken/Pulau Rempang/BBPV/2006
- 98. A/Chicken/Duma/BBPV/2005
- 99. A/Chicken/Padang/BBPV/2006
- 81. A/Chicken/Tapui/BBPV1576/2005
- 68. A/Chicken/Karo/BBPV/2006
- A/Chicken/Medan/BBPV1571/2005
- 7. A/Chicken/Deli Serdang/BBPV1/2005
- 64. A/Chicken/Pdie/BBPV1/2005
- A/Ck/Jakarta/CKB1/2005
- A/Ck/West Java/1074/2003
- 63. A/Chicken/Indonesia/11/2003
- A/Chicken/West Java/HAMD/2006
- A/Chicken/Indonesia/7/2003
- 62. A/Ck/East Java/BL-IPA/2003
- A/Duck/Buleleng/BBPV1/2005
- A/Duck/Pai/BBVW1358/2005
- 99. A/Duck/Tabanan/BBPV1/2005
- 83. A/Chicken/West Java/GARUTMAY/2006
- 86. A/Chicken/Indonesia/Soppeng163171/2007
- 63. A/Quail/Central Java/SMRG/2006
- 87. A/Chicken/Indonesia/Kulon163147/2006
- 81. A/Chicken/Indonesia/Magelang163157/2007
- A/Chicken/Gunung Kidul/BBVW2006
- A/Chicken/Madun/BBVW1420/2005
- 65. A/Indonesia/6/2005
- A/Muscovy duck/Jakarta/DK-Uw/2004
- A/Duck/Banten/Pdgt-Kas/2004
- A/Muscovy duck/Bgr-Dw/2005
- A/Chicken/Papua/TA5/2006
- 100. A/Chicken/Papua/TB15/2006
- 74. A/Chicken/Papua/TB1/2006
- 83. A/Chicken/Indonesia/CDC24/2005
- 61. A/Chicken/Indonesia/CDC25/2005
- 68. A/Chicken/Way Kanan/BBPV/2005
- A/Chicken/Palembang/BBPV/2005
- 64. A/Chicken/Bandar Lampung/BBPV/2006
- A/Indonesia/7/2005
- 94. A/Duck/Indramayu/BBPV109/2006
- A/Ck/West Java/Sm-Hay/2005
- A/Chicken/Indonesia/Rejang Lebong163122/
- A/Indonesia/5/2005
- A/Chicken/Murao Jamb/BBPV/2005
- 93. A/Chicken/Pakun Baru/BBPV/2005
- 63. A/Chicken/West Java/SMENDR1/2006
- A/Indonesia/CDC390/2005
- A/Indonesia/CDC370/2006
- 98. A/Indonesia/CDC1046/2007
- 98. A/Indonesia/CDC1047/2007
- 88. A/Indonesia/CDC1032/2007
- 96. A/Indonesia/CDC938/2006
- A/Indonesia/CDC887/2006
- A/Indonesia/CDC1031/2007
- 81. A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008
- A/Indonesia/CDC699/2006
- 83. A/Chicken/Indonesia/Semarang163162/2007
- 73. A/Swan/Indonesia/Melang163161/2007
- A/Chicken/Indonesia/Lampung163123/2006
- A/Indonesia/CDC582/2006
- A/Indonesia/CDC644/2006
- A/Indonesia/CDC634/2006
- 74. A/Quail/Jakarta/JU1/2006
- A/Chicken/West Java/TASIKSOL/2006
- A/Chicken/Indonesia/Garut163151/2006
- 83. A/Indonesia/CDC610/2006
- A/Indonesia/CDC835/2006
- A/Indonesia/CDC836/2006
- 67. A/Muscovy Duck/Jakarta/HABW/2006
- A/Chicken/Indonesia/Bandung163149/2006
- 81. A/Ck/West Java/Sm-Acul/2008
- 95. A/Muscovy Duck/Indonesia/Kedri163124/2006
- A/Chicken/Indonesia/Gunung Kidul163133/2
- A/Indonesia/CDC624/2006
- 67. A/Chicken/Indonesia/Pekenbaru163111/2006
- 95. A/Chicken/Indonesia/Agam16313/2006
- 94. A/Chicken/Indonesia/Padang16311/2006
- 88. A/Pigeon/Indonesia/Rohit16316/2006
- 69. A/Chicken/Indonesia/Sak16312/2006
- A/Indonesia/CDC742/2006
- A/Indonesia/CDC357/2006
- A/Chicken/Indonesia/Belitung Timor163118
- 86. A/Chicken/West Java/TASKOB/2006
- 97. A/Chicken/West Java/TASK1/2006
- A/Chicken/West Java/TASK2/2006
- A/teina/Indonesia/CDC1/2006
- 95. A/Indonesia/CDC326/2006
- 74. A/Indonesia/CDC329/2006
- A/Chicken/West Java/SMFA/2006
- A/Chicken/West Java/PNTVU/2006
- A/Chicken/West Java/SMCSLKEB/2006
- A/Chicken/West Java/SMCSLKEC/2006
- A/Ck/West Java/Smt-Sud1/2007
- 100. A/Ck/West Java/Smt-H/18/2007
- A/Ck/West Java/SM-Biot/2008
- A/Ck/West Java/SM-M1/2008
- 97. A/Ck/West Java/SM-M6/2008

Grup 1

Grup 2

Grup 3

0.1

Gambar 17. Pohon filogenetik berdasarkan gen hemagglutinin (HA) virus avian influenza di Indonesia tahun 2003-2008. Sekuen nukleotida pada regio HA yang digunakan adalah nomor 49 – 1648. Warna merah adalah empat belas virus yang digunakan pada penelitian ini. Terdapat tiga kelompok besar virus Indonesia sepanjang 2003-2008. Pohon filogenetik dihasilkan dengan program MEGA versi 4, dengan menggunakan *neighbor-joining bootstrap analysis* (1,000 replicates) pada model Kimura-Nei.

Protein HA virus influenza mempunyai glikoprotein trimerik yang mempunyai 3-9 *N-linked glycosylation sequons* perunit, tergantung pada galur virus (Schulze, 1997). Pada penelitian ini virus mempunyai sebanyak 5-8 tempat glikosilasi pada protein HA (Gambar 16). Tiga virus mempunyai sebanyak 8 tempat glikosilasi yaitu WJ/Smi-Hay/05, WJ/Smi-Acul/08 dan Srg-Fadh/08. Sebelas dari empat belas virus yang digunakan dalam penelitian ini tidak mempunyai tempat glikosilasi pada asam amino urutan ke 84 (Gambar 16). Virus asal unggas yang divaksinasi (Smi-Hj18/07, Smi-Sud1/07, SMI-M1/08, SMI-M6/08, SMI-Biot/08 termasuk virus Pwt-Wij/06 dan Smi-Pat/06) hanya memiliki sebanyak 5 tempat glikosilasi karena tidak mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 84, 165 dan 193 (Gambar 16). Ringkasan total jumlah tempat glikosilasi dapat dilihat pada Lampiran 9.

4.4.2.3. Prediksi struktur tiga dimensi (3D) protein

Cetakan dengan homologi tertinggi diperoleh dengan menggunakan BLAST search (DS server). Cetakan HA1 dari *Protein Data Bank* (PDB) yang mempunyai homologi tertinggi dengan virus AI sub tipe H5N1 pada penelitian ini adalah 21BX_A yaitu sebesar 96%, sedangkan untuk NA homologi tertinggi

dengan 2HTY_A sebesar 97%. Homologi cetakan NS1 adalah dengan 2GX9_A sebesar 85%. Protein M1 dengan 1AA7_A mempunyai homologi sebesar 94%.

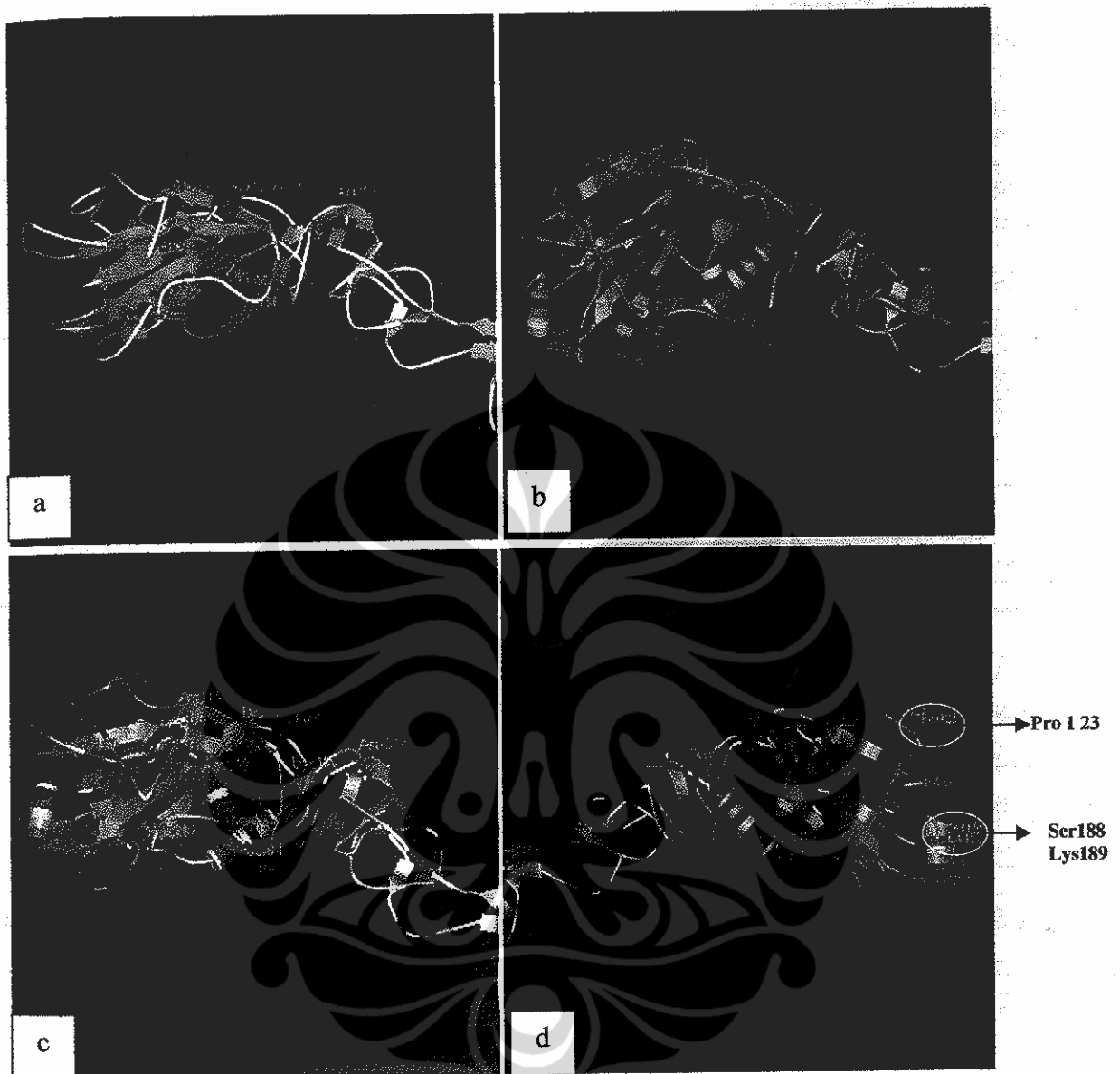
Model 3D protein hemagglutinin dua puluh virus AI yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 10. Pada hasil visualisasi prediksi 3D protein HA, dapat dilihat bahwa mutasi pada virus asal pav-AI sebagian besar berada pada permukaan (*surface*) molekul HA (Gambar 18a, 18b, 18c dan 18d) yang merupakan target dari antibodi inang.

Gambaran prediksi 3D protein HA virus tahun 2003 dapat dilihat pada Gambar 18. Cetakan protein 3 dimensi yang digunakan untuk protein HA adalah asam amino urutan 17-337. Prediksi struktur 3D protein HA virus A/Ck/East Java/BL-IPA/03 sebagai representasi virus yang berasal dari wabah AI pertama di Indonesia dapat dilihat pada Gambar 18a. Gambar 18b menunjukkan prediksi struktur 3D protein HA virus pav-AI yang pertama kali dilaporkan di Indonesia yaitu A/Ck/West Java/Pwt-ij/06. Prediksi 3D protein HA virus A/Ck/West Java/Smi-Sud1/07 sebagai representasi virus pav-AI tahun 2007 digambarkan pada Gambar 18c dan Gambar 18d adalah prediksi 3D protein HA virus pav-AI tahun 2008 (A/Ck/West Java/Smi-M6/08).

Sebelas asam amino yang berasal dari virus asal flock vaksinasi AI tahun 2006-2008 yang terdapat pada permukaan molekul HA1 yaitu Lys72, Glu74, Ser84, Thr86, Asp112, Asn183-Val184-Glu185, Ile195, His220 dan Asp273. Visualisasi prediksi 3D protein HA virus asal pav-AI tahun 2007 menunjukkan perbedaan substitusi asam amino dengan virus pav-AI tahun 2006 (Pwt-Wij/2006) dan virus pav-AI tahun 2007 (Smi-Sud1/2007). Perbedaan ini dikarenakan isolat

virus AI dari unggas yang divaksinasi AI pada tahun 2008 mempunyai mutasi asam amino yang hanya dimiliki virus pav-AI tahun 2008 yaitu substitusi tiga asam amino pada permukaan molekul yaitu asam amino Prolin pada posisi 123, Lisin pada urutan ke 188 dan Serin pada posisi 189 (Gambar 18d).





Gambar 18. Lokasi substitusi asam amino pada monomer protein HA1. Visualisasi a) Prediksi struktur 3D protein HA virus A/Ck/East Java/BL-IPA/03. b) virus A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06, c) virus A/Ck/West Java/Smi-Sud1/07 dan d) virus A/Ck/West Java/Smi-M6/08). Visualisasi 3D protein HA dilakukan dengan Accelrys DS Visualizer 2.1.

4.4.2.4. Analisis Sekuen pada protein Neuraminidase (NA)

Pada protein NA, seluruh virus Indonesia yang dianalisa pada penelitian ini mempunyai 20 delesi asam amino pada posisi 48-67, sehingga hanya memiliki 3 tempat glikosilasi yaitu pada posisi 88, 146 dan 235. Virus pav-AI (2007-2008) memiliki perbedaan dengan virus BL-IPA/03 sekitar 1,3 - 2% dari total 385 asam amino pada protein NA yang dibandingkan. Persentase homologi protein NA dari virus yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 7.

Virus pav-AI 2007-2008 mempunyai substitusi asam amino pada posisi T76N pada protein NA dibandingkan dengan virus BL-IPA/03 (Gambar 19). Substitusi P74S dan T289I merupakan mutasi pada virus pav-AI 2008 yang tidak dimiliki oleh virus Pav-AI tahun 2007. Perbedaan asam amino tersebut juga diperlihatkan dengan jelas pada prediksi struktur 3 dimensi protein NA (Lampiran 10). Cetakan protein 3 dimensi protein NA yang digunakan adalah asam amino urutan 63-440.

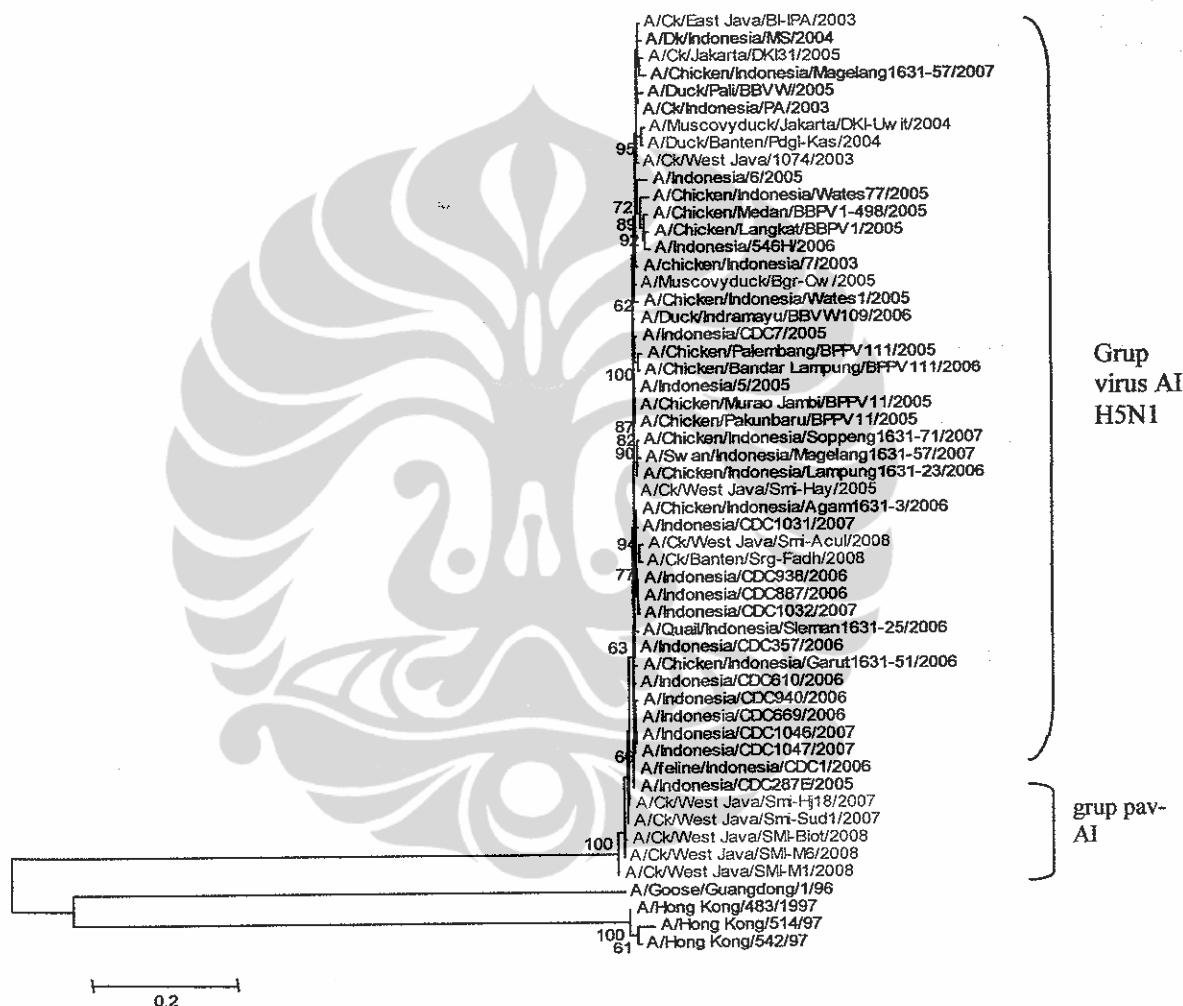
Pohon filogenetik gen NA virus asal Indonesia berada dalam satu kelompok besar dan virus asal China atau Hong Kong berada di luar kelompok virus Indonesia. Analisis ini memperlihatkan virus pav-AI berada dalam subkelompok virus Indonesia (Gambar 20).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
N/Goose/Guangdong/1/96	M	N	P	N	P	N	P	N	P	N
N/Ck/West Java/BL-IPA/03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/1074/03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Dk/IDN/MS/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Md/Jakarta/DKI-Uwit/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Duck/Banten/Pdgl-Kas/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Jakarta/DKI31/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Md/Bgr-Cw/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/6/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC292T/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/175H/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Hay/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Wates130/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Wates80/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Siak/BPPV11/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Pekenbaru163111/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/D/Indramayu/BBVW109/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC329/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC887/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC938/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Semerang1631-62/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC1031/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC1047/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Swan/IDN/Maglang163157/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Hj18/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Sud1/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Acul/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Banten/Srg-Fadh/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-M1/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-M6/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-Biot/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
N/Goose/Guangdong/1/96	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/BL-IPA/03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/1074/03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Dk/IDN/MS/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Md/Jakarta/DKI-Uwit/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Duck/Banten/Pdgl-Kas/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Jakarta/DKI31/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Md/Bgr-Cw/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/6/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC292T/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/175H/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Hay/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Wates130/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Wates80/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Siak/BPPV11/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Pekenbaru163111/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/D/Indramayu/BBVW109/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC329/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC887/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC938/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Semerang1631-62/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC1031/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC1047/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Swan/IDN/Maglang163157/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Hj18/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Sud1/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Acul/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Banten/Srg-Fadh/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-M1/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-M6/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-Biot/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
N/Goose/Guangdong/1/96	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/BL-IPA/03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/1074/03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Dk/IDN/MS/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Md/Jakarta/DKI-Uwit/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Duck/Banten/Pdgl-Kas/04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Jakarta/DKI31/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Md/Bgr-Cw/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/6/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC292T/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/175H/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Hay/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Wates130/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Wates80/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Siak/BPPV11/05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Pekenbaru163111/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/D/Indramayu/BBVW109/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC329/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC887/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC938/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/IDN/Semerang1631-62/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC1031/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/IDN/CDC1047/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Swan/IDN/Maglang163157/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Hj18/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Sud1/07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/Smi-Acul/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/Banten/Srg-Fadh/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-M1/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-M6/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
N/Ck/West Java/SMI-Biot/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Gambar 19. Penjejeran sekuen asam amino protein NA. Glikosilasi ditandai dengan kotak tertutup. Delesi 20 asam amino ditunjukkan dengan kotak tertutup warna abu-abu. Substitusi asam amino yang hanya dimiliki virus pav-AI tahun 2008 ditunjukkan dengan tanda panah. Penomoran asam amino berdasarkan virus Gs/Guangdong/1/96.



Gambar 20. Pohon filogenetik gen NA virus asal Indonesia. Virus dengan warna merah adalah empat belas virus yang digunakan dalam penelitian ini. Gen NA yang dianalisa adalah posisi 1-1157.

4.4. 2.5. Analisis sekuen protein Matrix (M) dan Non Struktural (NS)

Hasil penjejeran asam amino protein M1 memperlihatkan virus pav-AI mempunyai substitusi asam amino yang sama dengan beberapa virus asal manusia tahun 2006-2007 yaitu pada posisi T37A, R95K, T137A, Q249H. Perbedaan antara virus pav-AI dengan virus Indonesia lainnya adalah adanya substitusi T167N (Gambar 21). Persentase mutasi pada aras protein M1 dibandingkan dengan virus Indonesia lainnya, virus pav-AI memiliki persentase mutasi yang lebih besar yaitu sekitar 2 - 3,7% (Lampiran 7).

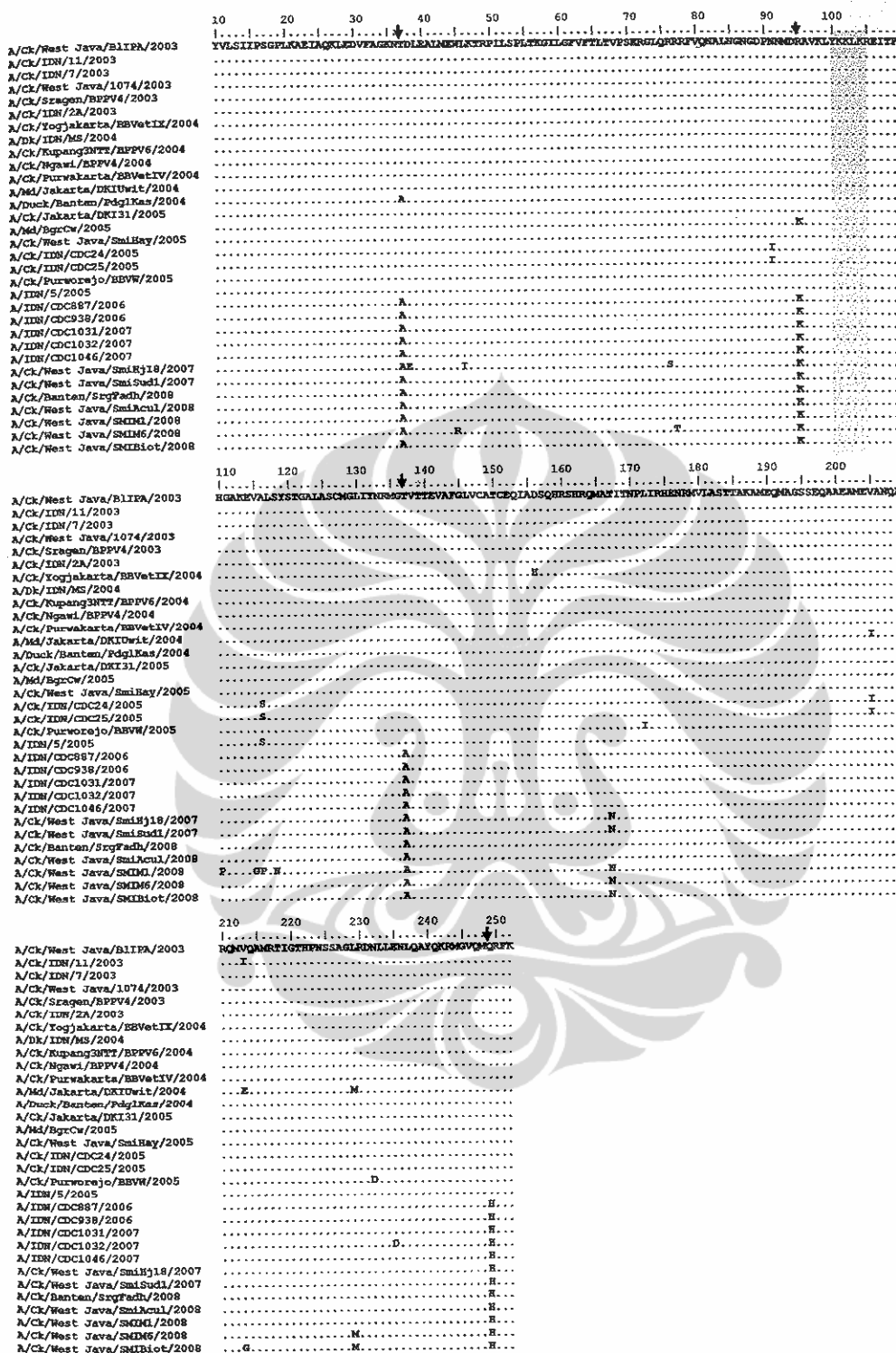
Pada analisis pohon filogenetik gen M1 menunjukkan virus pav-AI dan virus tahun 2008, berada dalam satu kelompok dengan virus H5N1 asal manusia di Indonesia. Analisis ini menunjukkan bahwa virus Indonesia berbeda kelompok dengan virus asal China, Thailand dan Viet Nam (Gambar 22). Cetakan model tiga dimensi yang yang diperoleh dan digunakan untuk protein M1 adalah asam amino urutan 1-158, sehingga mutasi yang terjadi pada virus pav-AI tidak dapat divisualisasikan, dikarenakan mutasi terjadi pada posisi 167.

Pada protein NS1, empat dari lima virus pav-AI (2007-2008) mempunyai tiga substitusi asam amino yaitu V136L dan L212P dan T197A. Satu virus lainnya yaitu WJ/SMI-M1/08 tidak memiliki substitusi pada posisi T197A. Protein NS1 virus pav-AI 2008 memiliki substitusi yang hanya eksklusif dimiliki oleh virus tersebut yaitu pada substitusi asam amino F22L (Gambar 23). Cetakan model 3 dimensi yang yang diperoleh dan digunakan untuk protein NS1 adalah asam amino urutan 74-200, sehingga substitusi F22L dan 212 tidak dapat diperlihatkan pada model 3 dimensi (Lampiran 10).

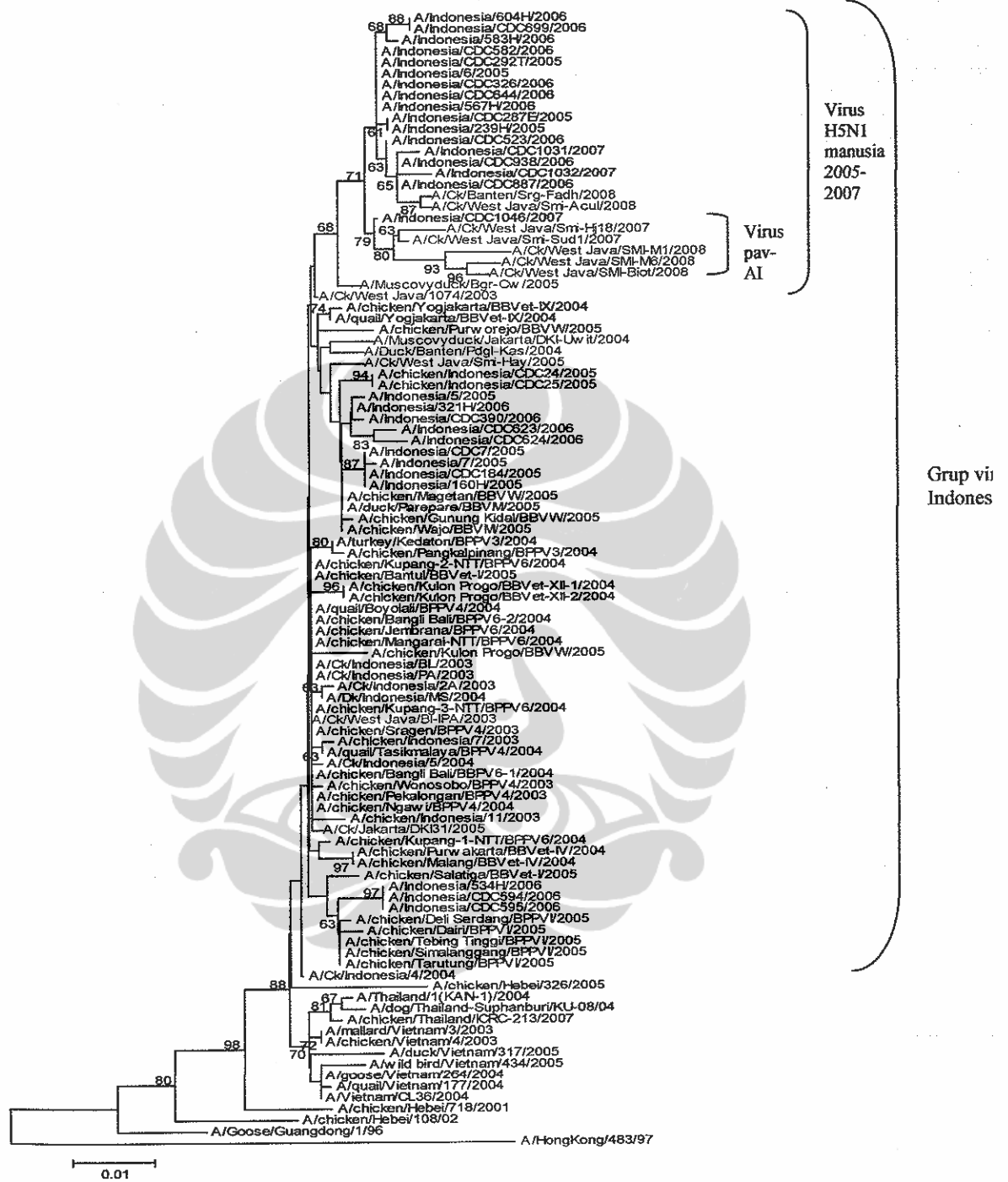
Virus AI asal Indonesia termasuk virus pav-AI relatif mempunyai rentang persentase mutasi protein NS1 0,9 – 4,61%. Virus AI sub tipe H5N1 pada manusia, virus Srg-Fadh/08 dan WJ/Smi-Acul/08 serta lima virus pav-AI (WJ/Smi-Hj18/07, WJ/Smi-Sud1/07, SMI-M1/08, SMI-M6/08; SMI-Biot/08) mempunyai persentase mutasi yang lebih besar dibandingkan virus lainnya (Lampiran 7).

Pada Gambar 24, analisis filogenetika gen NS1 menunjukkan bahwa virus pav-AI berkelompok dengan virus AI asal Indonesia lainnya dan berbeda kelompok dengan virus asal China, Thailand, Hong Kong dan Vietnam.

Sekuen C-terminal NS1 mempunyai peptida pendek yang terdiri dari 4-5 asam amino dan memiliki motif (X-S/T-X-V) pada posisi 227-230. Motif ini disebut dengan *PDZ ligand binding motif* (Obenauer dkk., 2006). Empat belas virus yang digunakan pada analisis ini menunjukkan motif ESEV yang menunjukkan bahwa virus berasal dari unggas (*avian origin*), kecuali virus BL-IPA/03, virus ini mengalami sedikit modifikasi *PDZ ligand binding motif* yaitu mempunyai motif ETEI. (Gambar 23).



Gambar 21. Penjejeran prediksi asam amino protein M1. Substitusi asam amino ditunjukkan dengan tanda panah. Warna bayang abu-abu menunjukkan domain NLS. Penomoran asam amino berdasarkan BL-IPA/03.



Gambar 22. Pohon filogenetik gen M1 virus AI di Indonesia. Urutan basa gen M1 yang digunakan adalah mulai nomor 1-759. Virus dengan warna merah adalah virus yang digunakan dalam penelitian ini.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MDSNTVSSFOVCCFLMHWYRQFADQELGADPFLDRRLRDOKSLGRSGTIGLDITRTATREGGHIUVERILBESDEALMGTIASVPAPRYLAENTLESMSR
 N.....T.....
 A/HK/463/97.....S..T..D.....
 A/HK/514/97.....S..T..D.....
 A/HK/156/97.....S..T..D.....
 A/Ck/East Java/B1-Ipa/2003.....N..E..A..Q..A.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/1074/2003.....N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003.....N..E..A..Q.....TS..D.....
 A/Ck/Indonesia/PA/2003.....N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004.....N..E..HA..Q.....VS..D.....
 A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit.....H..N..B..HA..Q..G.....S..S..T..D.....
 A/Ck/Indonesia/4/2004.....N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/Indonesia/5/2004.....N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/Jakarta/DKI31/2005.....L..N..G..E..A..Q..G.....S..T..D.....
 A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005.....L..N..E..A..Q..G.....S..T..D.....
 A/chicken/Salatiga/BBVet-1/200.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/chicken/Majo/BBVM/2005.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/IDN/175H/05.....L..N..E..A..Q..Q.....S..T..D.....
 A/Indonesia/195H/2005.....N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Indonesia/6/2005.....L..N..E..A..O.....T.....S..T..D.....
 A/Indonesia/7/2005.....N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Indonesia/CDC523/2006.....L..K..N..E..A..Q..G.....K.....S..T..D.....
 A/Indonesia/CDC624/2006.....L..N..E..A..O..V.....S..T..D.....
 A/Indonesia/CDC634/2006.....L..N..E..A..Q.....K.....S..T..D.....
 A/IDN/CDC887/06.....L..K..N..E..A..RO.....K.....S..T..D.....
 A/IDN/CDC1031/07.....L..K..N..E..A..Q.....K.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/chicken/Yogyakarta/BBVet-IX/.....L..N..E..HA..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008.....L..N..E..A..Q..K.....S..T..D.....
 A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008.....L..A..K..N..G..A..Q..K.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/SMI-M1/2008.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/SMI-M6/2008.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....
 A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008.....L..N..E..A..Q.....S..T..D.....

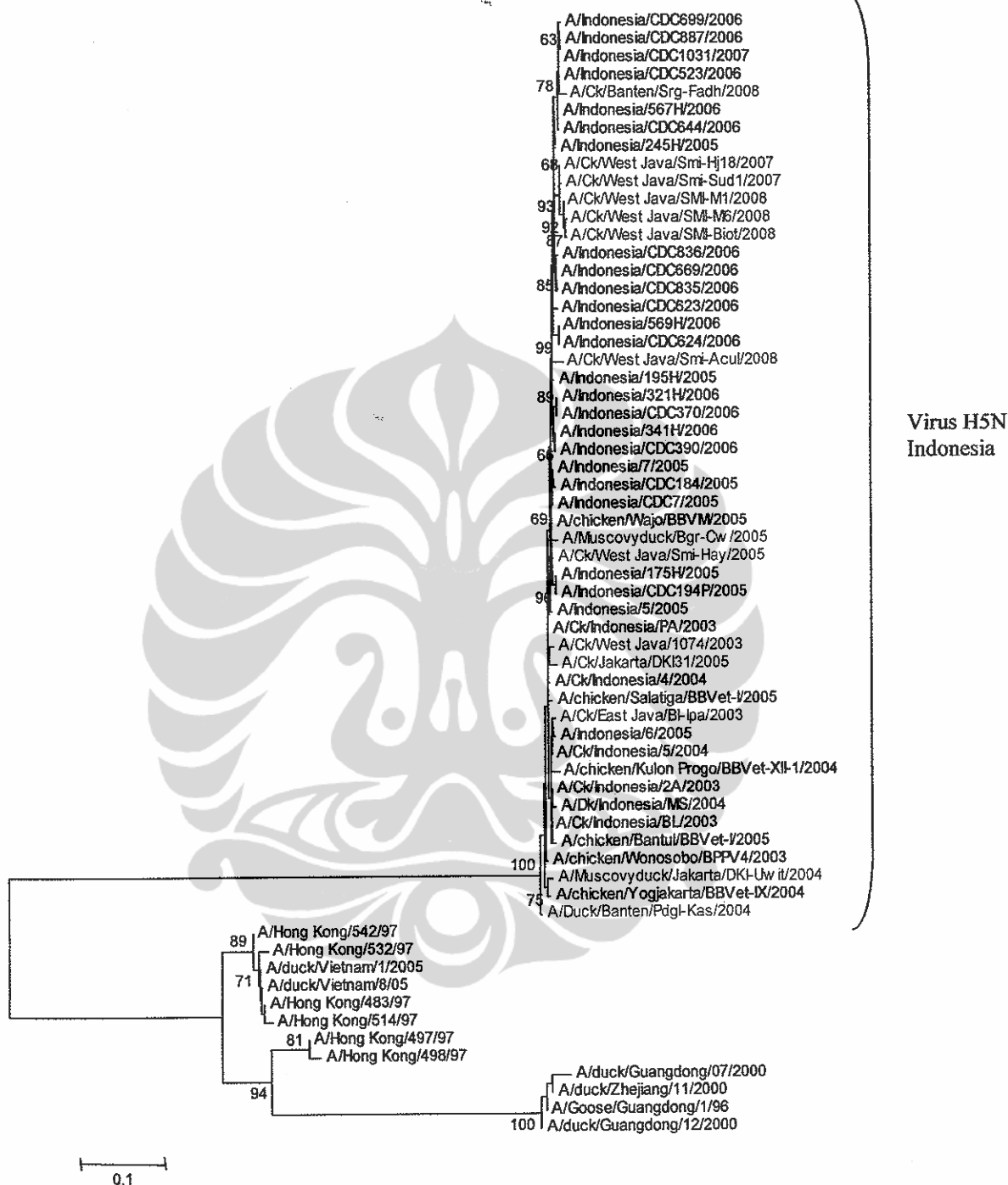
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 DWLMLIPKQKVTGSLCIRMDOAIMDKIIKANESVIFNRLAELLRLRAFTDEGATVGEISFLPSLPGHTEEDVKNAIQVLIQGLENNNTVRVSENLQR
 N.....T.....
 A/HK/463/97.....D..T..D.....
 A/HK/514/97.....D..T..D.....
 A/HK/156/97.....D..T..D.....
 A/Ck/East Java/B1-Ipa/2003.....P..M..A..A..K..TV.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/1074/2003.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....K..D.....TI..
 A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/Indonesia/PA/2003.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004.....P..M..MA..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit.....P..M..A..A..K..T.....DQ..T..E.....G.....D..L.....TI..
 A/Ck/Indonesia/4/2004.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/Indonesia/5/2004.....F..M..A..A..K..TV.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/Jakarta/DKI31/2005.....F..M..A..A..K..A.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005.....F..M..G..A..K..E.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/chicken/Salatiga/BBVet-1/200.....F..M..A..A..K.....F.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/chicken/Majo/BBVM/2005.....F..M..A..A..K.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/IDN/175H/05.....F..M..A..A..K.....A..D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Indonesia/195H/2005.....F..M..A..A..K.....D..T..E.....S.....G.....D..D.....TI..
 A/Indonesia/6/2005.....S..M..A..A..K..TV.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Indonesia/7/2005.....F..M..A..A..K.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Indonesia/CDC523/2006.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Indonesia/CDC624/2006.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Indonesia/CDC634/2006.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/IDN/CDC887/06.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/IDN/CDC1031/07.....F..M..A..A..K..T.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007.....F..M..A..A..K.....L..D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007.....F..M..A..A..K..T.....L..D..T..ED.....G.....D..D.....TI..
 A/chicken/Yogyakarta/BBVet-IX/.....F..M..A..A..K.....D..T..E.....G.....D..I.....TI..
 A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008.....F..M..A..A..K.....A.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008.....F..M..A..A..K.....D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/SMI-M1/2008.....F..M..A..A..K.....L..D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/SMI-M6/2008.....F..M..A..A..K.....L..D..T..E.....G.....D..D.....TI..
 A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008.....F..M..A..A..K.....L..D..T..E.....G.....D..D.....TI..

210 220 230
 FTWRSSDENGSRLLPPKQKRKHRTIPEV
 N.....T.....
 A/HK/463/97.....P.....
 A/HK/514/97.....A..G..D..LFP..N..A..T..I..
 A/HK/156/97.....A..G..N..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/East Java/B1-Ipa/2003.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/1074/2003.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/Indonesia/PA/2003.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/Indonesia/4/2004.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/Indonesia/5/2004.....A..G..N..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/Jakarta/DKI31/2005.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/chicken/Salatiga/BBVet-1/200.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/chicken/Majo/BBVM/2005.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/IDN/175H/05.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Indonesia/195H/2005.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Indonesia/6/2005.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Indonesia/7/2005.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Indonesia/CDC523/2006.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Indonesia/CDC624/2006.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Indonesia/CDC634/2006.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/IDN/CDC887/06.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/IDN/CDC1031/07.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/chicken/Yogyakarta/BBVet-IX/.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008.....A..G..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/SMI-M1/2008.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/SMI-M6/2008.....A..GG..D..LFP..N..A..S..I..
 A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008.....V..GG..D..LFP..N..A..S..I..

Gambar 23. Penjejeran prediksi sekuen asam amino protein NS1. PDZ ligand motif ditandai dengan kotak warna abu-abu. Tanda panah menunjukkan substitusi yang terjadi pada virus pav-AI tahun 2007-2008. Penomoran asam amino sesuai dengan A/Hk/483/97



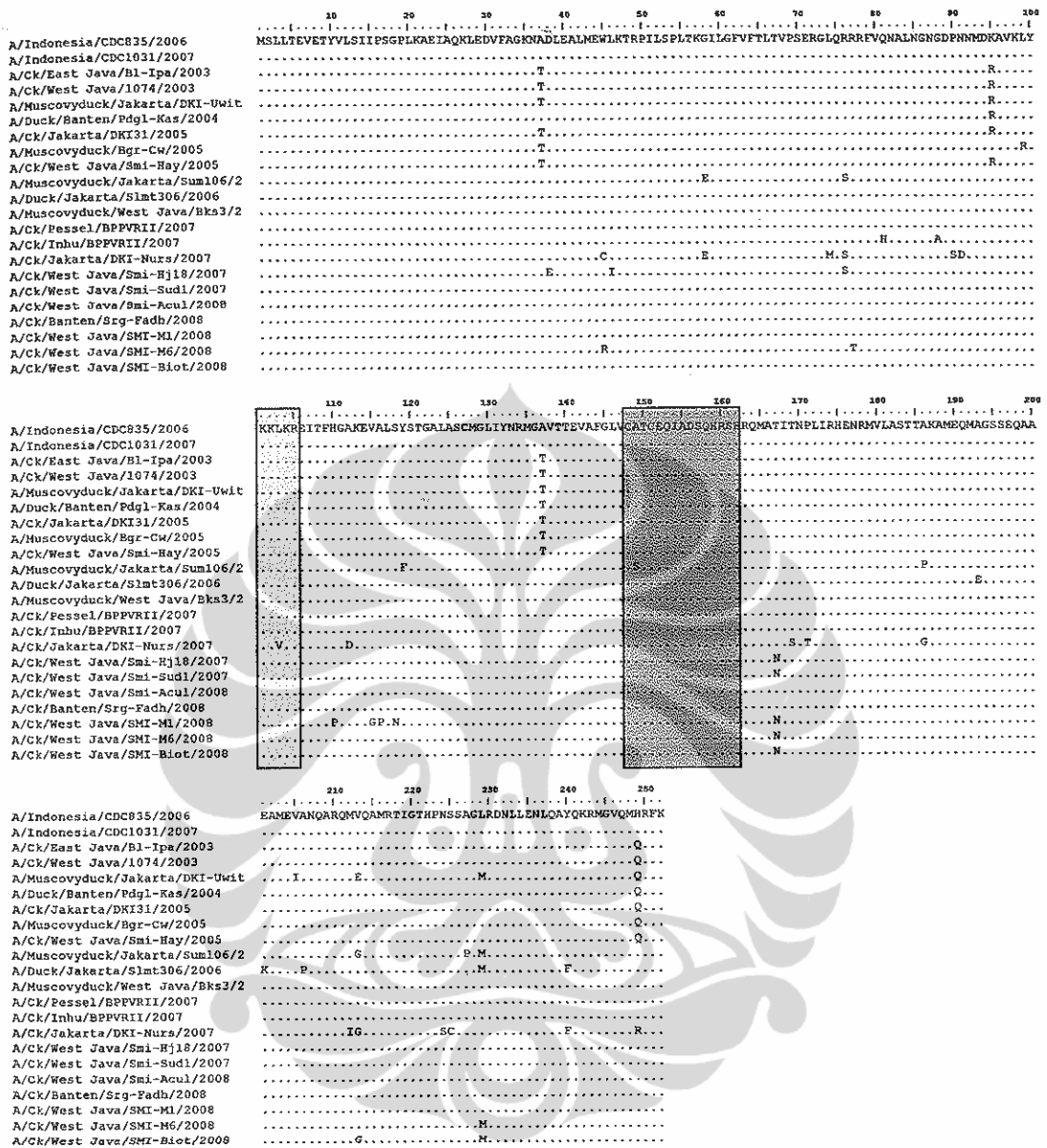
Universitas Indonesia



Gambar 24. Pohon filogenetik gen NS1. Urutan basa gen NS1 yang dianalisa adalah urutan nomor 1-690. Warna merah adalah virus AI yang digunakan pada penelitian ini.

Dua domain dalam M1 disebutkan mempengaruhi asosiasi dengan RNA (Ye dkk., 1999; Ye dkk., 1987). Domain pertama adalah *RNA binding domain* yang mengandung sebuah motif *zinc finger* (C-148C --- HH162 (Elster dkk., 1997; Nasser dkk., 1996). Domain yang lain yaitu mempunyai palindrom asam amino basa yaitu (101-RKLKR-105), yang diketahui berikatan dengan RNA virus (Elster dkk., 1997; Wakefield dan Brownlee, 1989; Ye dkk., 1987). Domain ini juga berfungsi sebagai sinyal inti lokalisasi (*nuclear localization signal*, NLS) untuk M1 (Ye dkk., 1989; Ye dkk., 1995),

Pada penelitian ini 20 isolat yang digunakan menunjukkan motif *zinc finger* yaitu 148CATCEQIADSQHRSH162 dan satu virus yaitu virus Jakarta/Sum106/06 mempunyai motif 148CSTCEQIADSQHRSH162 (Gambar 25). Semua asam amino pada nomor 101 sampai dengan 105 diisi oleh KKLKR sebagai NLS yang dimiliki oleh semua isolat kecuali virus DKI-Nurs/07 mempunyai V menggantikan L sehingga memiliki motif KKVKR (Gambar 25).



Gambar 25. Penjejeran prediksi sekuen asam amino protein M1 dua puluh virus yang digunakan dalam penelitian ini. NLS ditandai dengan kotak warna hijau muda, zinc finger motif ditunjukkan dengan kotak tertutup warna ungu. Penomoran asam amino sesuai dengan virus CDC835/06.

4.5. Karakter Molekuler Virus AI subtipe H5N1 asal unggas disekitar kasus infeksi AI subtipe H5N1 pada manusia

Tahun 2006-2008 telah diisolasi enam virus AI asal unggas disekitar kasus manusia yang terinfeksi virus AI subtipe H5N1. Data lengkap pengambilan sampel AI pada unggas disekitar rumah orang tersangka/konfirm terinfeksi virus H5N1 dapat dilihat pada Lampiran 11. Virus yang digunakan pada penelitian ini berasal dari daerah Jakarta, Bekasi dan Riau yang merupakan daerah dengan sirkulasi virus AI yang tinggi. Ringkasan data informasi virus dapat dilihat pada Tabel 14.

Sekuen dari empat segmen genom virus AI yaitu gen HA, NA, M dan NS dari enam virus AI asal unggas yang dikoleksi disekitar kasus manusia terinfeksi AI pada tahun 2006-2007 dibandingkan dengan data sekuen virus H5N1 terutama yang berasal dari manusia yang tersedia pada NCBI.

Tabel 14. Isolat virus dari unggas yang diisolasi disekitar kasus manusia yang terinfeksi AI sub tipe H5N1

Virus	Tanggal Pengambilan Sampel	Lokasi	Kasus infeksi H5N1 pada manusia
A/Muscovy Duck/Jakarta/Sum106/2006	25 September 2006	Jakarta	Tidak ada wabah AI pada ayam, F (9 tahun) konfirm AI
A/Duck/Jakarta/Slmt306/2006			
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	8 Januari 2007	Jakarta	Tidak ada wabah AI pada ayam, R (14 tahun) konfirm AI
A/Muscovy Duck/West Java/Bks3/2007	12 Januari 2007	Bekasi	Wabah AI pada ayam, Mortalitas 95%, N (12 tahun), konfirm AI
A/Ck/Pessel/BPPVR II/2007	7 Maret 2007	Pasir Selatan	Wabah AI pada ayam, Mortalitas 60%, D (14 tahun), konfirm AI
A/Ck/Inhu/BPPVR II/2007	18 Juni 2007	Indragiri Hilir	Wabah AI pada ayam, Mortalitas 60%, Y(29 tahun), konfirm AI

4.5.1. Analisis pada protein Hemagglutinin (HA)

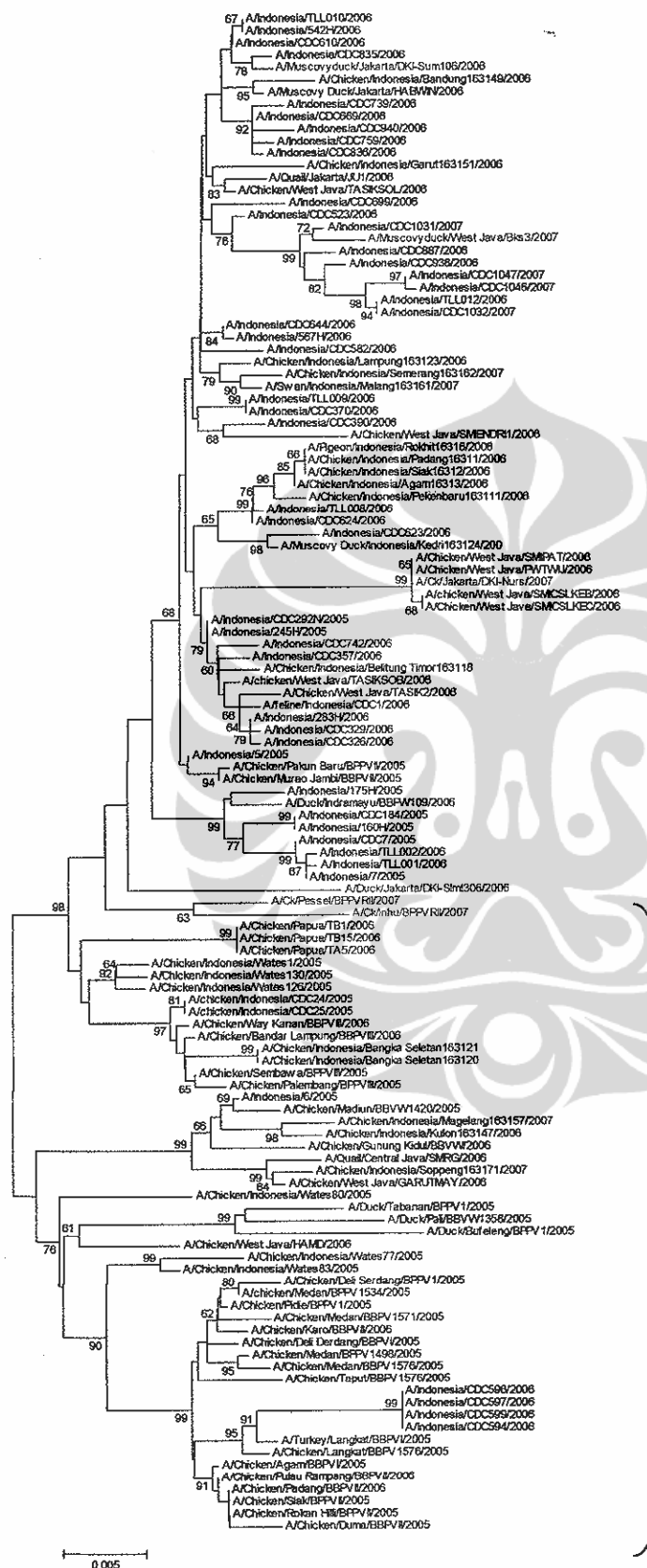
Analisis pohon filogenetik virus AI Indonesia memperlihatkan bahwa kelompok virus H5N1 asal Indonesia berada dalam satu kelompok besar yang berbeda dengan virus Asia lainnya (Gambar 26).

Data enam virus yang berasal dari unggas yang diisolasi disekitar kasus AI sub tipe H5N1 pada manusia yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 14. Analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa dua dari enam virus berkelompok dengan virus H5N1 asal manusia yaitu virus A/Muscovy duck/West Java/Bks3/2007 dan A/Muscovy duck/Jakarta/Sum106/2006 (Gambar 26).

Pada gen HA, enam virus yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam satu kelompok dengan virus H5N1 asal manusia; dua dari enam virus yang digunakan memiliki kedekatan dengan virus H5N1 asal manusia yaitu virus

A/Muscovy duck/West Java/Bks3/2007 mempunyai kedekatan genetik dengan CDC1031/2007 dan virus A/Muscovy duck/Jakarta/Sum106/2006 dengan CDC835/2006 (Gambar 26). Virus Jakarta/Slmt306/2006 merupakan virus yang diisolasi dari itik peliharaan tetangga dekat dari korban konfirm F (9 tahun) yang dikoleksi dalam waktu yang sama dengan virus Jakarta/Sum106/2006 yang merupakan unggas peliharaan ibu korban F. Pada analisis menunjukkan bahwa kedua virus ini (Jakarta/Sum106/2006 dan Jakarta/Slmt306/2006) tidak menunjukkan kedekatan genetik pada aras gen HA.



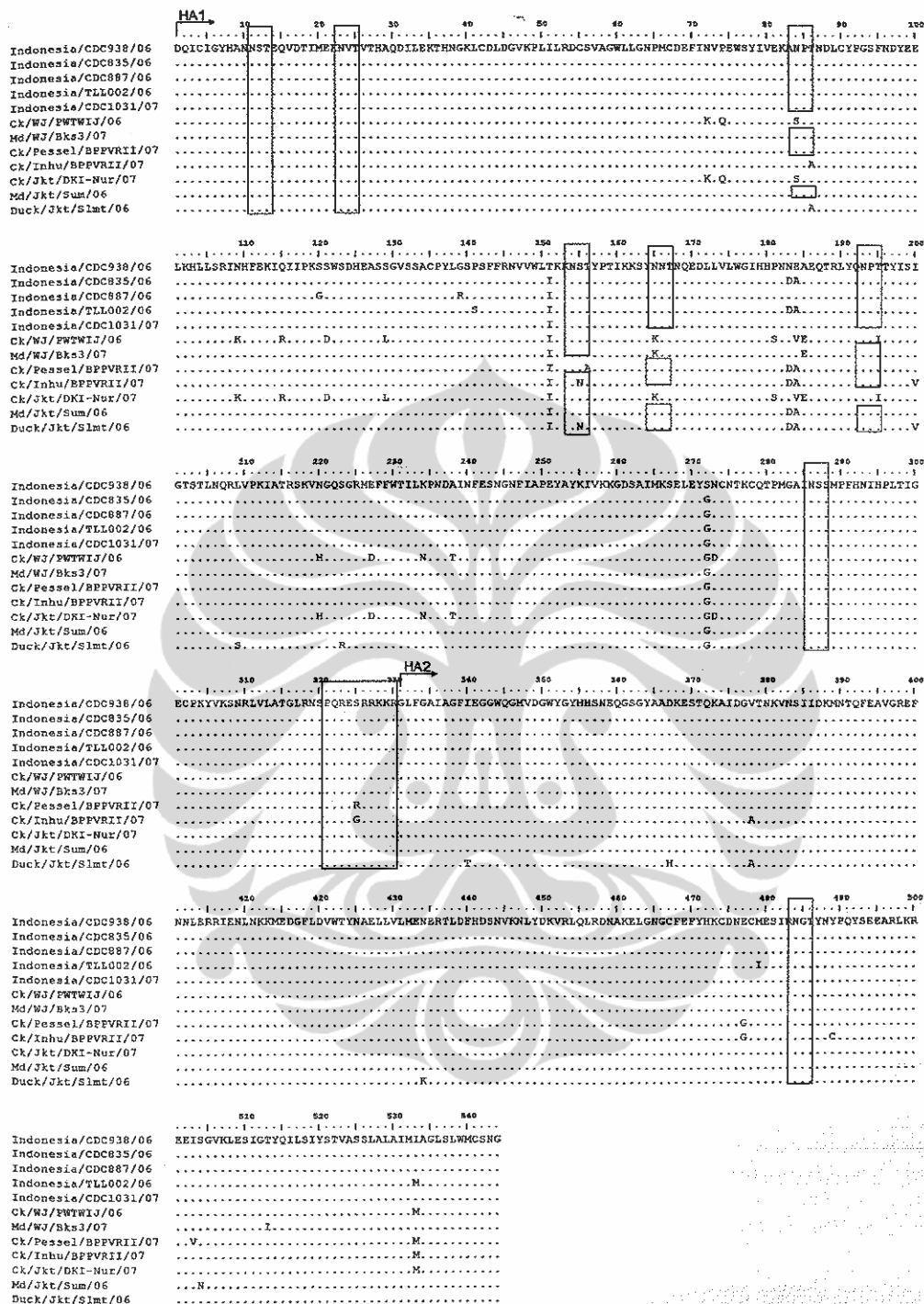


Grup virus H5N1 asal manusia 2006-2007

Grup virus H5N1 asal unggas di Indonesia

Gambar 26. Pohon filogenetik gen hemagglutinin (HA) enam virus avian influenza asal unggas yang dikoleksi disekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia di Indonesia. Sekuen nukloetida pada regio HA yang digunakan adalah nomor 49 – 1648. Warna biru adalah enam virus yang digunakan pada penelitian ini.





Gambar 27. Hasil penjejeran prediksi asam amino protein HA enam virus AI asal unggas yang dikoleksi disekitar kasus AI H5N1 pada manusia. Tempat glikosilasi ditandai dengan kotak tertutup biru. Daerah *cleavage site* HA ditunjukkan dengan kotak warna hitam. Penomoran asam amino sesuai dengan virus CDC938/06.

Pada analisis penjejeran asam amino protein hemagglutinin, enam isolat yang digunakan menunjukkan *multiple basic* asam amino pada *cleavage site* gen HA yang sesuai dengan gambaran virus HPAI (Gambar 27). Satu isolat virus yaitu Pessel/BPPVR11/07 menunjukkan motif PQRERRRKKR//G. Empat isolat virus menunjukkan perubahan asam amino Arginin menjadi Serin (R→S) pada posisi -6 HA1 (PQRESRRKKR//G) dan satu isolat yaitu Inhu/BPPVR11/07 menunjukkan perubahan asam amino R→G (PQREGRRKKR/G) (Gambar 27).

Semua virus yang dianalisis pada penelitian ini masih mengenal *avian receptor* ($\alpha 2,3$) karena mempunyai residu asam amino glutamat pada posisi 222 (pada H3 pada posisi 226) dan glisin pada posisi 224 (posisi 228 pada virus H3) (Stevens dkk., 2006).

Sekuen N-X-S/T digambarkan sebagai tempat glikosilasi dan kotak tertutup pada Gambar 27 menunjukkan tempat glikosilasi pada virus yang dianalisis pada penelitian ini. Isolat virus AI yang berasal dari unggas dan manusia mempunyai delapan potensi tempat glikosilasi yaitu pada posisi 11, 23, 84, 154, 165, 193, 286 dan 484. Lima dari enam virus mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 154. Virus Pessel/BPPVR11/07 tidak mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 154-156 karena terjadi mutasi pada T156A. Pada penelitian ini, virus Jakarta/DKI-Nurs/07 tidak mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 84, 165 dan 193, sehingga virus Jakarta/DKI-Nurs/07 hanya memiliki sebanyak lima tempat glikosilasi. Virus Sum106/06 mempunyai 8 tempat glikosilasi dan empat virus yaitu WJ/Bks3/07, Slmt306/06, Inhu/BPPVR11/07 dan Pessel/BPPVR11/06 mempunyai tujuh tempat glikosilasi. (Gambar 27 dan

Lampiran 9). Pada tabel 15 ditunjukkan karakter genetik virus H5N1 asal unggas dari lingkungan sekitar kasus H5N1 pada manusia di Indonesia.

Tabel 15. Karakter genetik virus H5N1 asal unggas dari lingkungan sekitar kasus H5N1 pada manusia di Indonesia yang mempunyai kekerabatan terdekat dengan virus H5N1 asal manusia

Virus	Sekuen asam amino HA			Sekuen NS		Sekuen asam amino M2	
	222	224	Cleavage site	Delesi asam amino 80- 84	PDZ-binding ligand	27	31
CDC938/2006*	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
CDC835/2006*	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
CDC887/2006*	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
CDC1031/2007*	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
Bks3/2007 **	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
Pessel/BPPVRII/2007**	Q	G	PQRERRRKKR	TIDAK	RSEV	A	S
Inhu/BPPVRII/2007**	Q	G	PQREGRRKKR	YA	KSEV	A	S
DKI-Nurs/2007**	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
Sum106/2006**	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S
Slmt306/2006**	Q	G	PQRESRRKKR	YA	ESEV	A	S

Keterangan :

* = virus H5N1 asal manusia

** = virus asal unggas yang diisolasi disekitar kasus H5N1 pada manusia

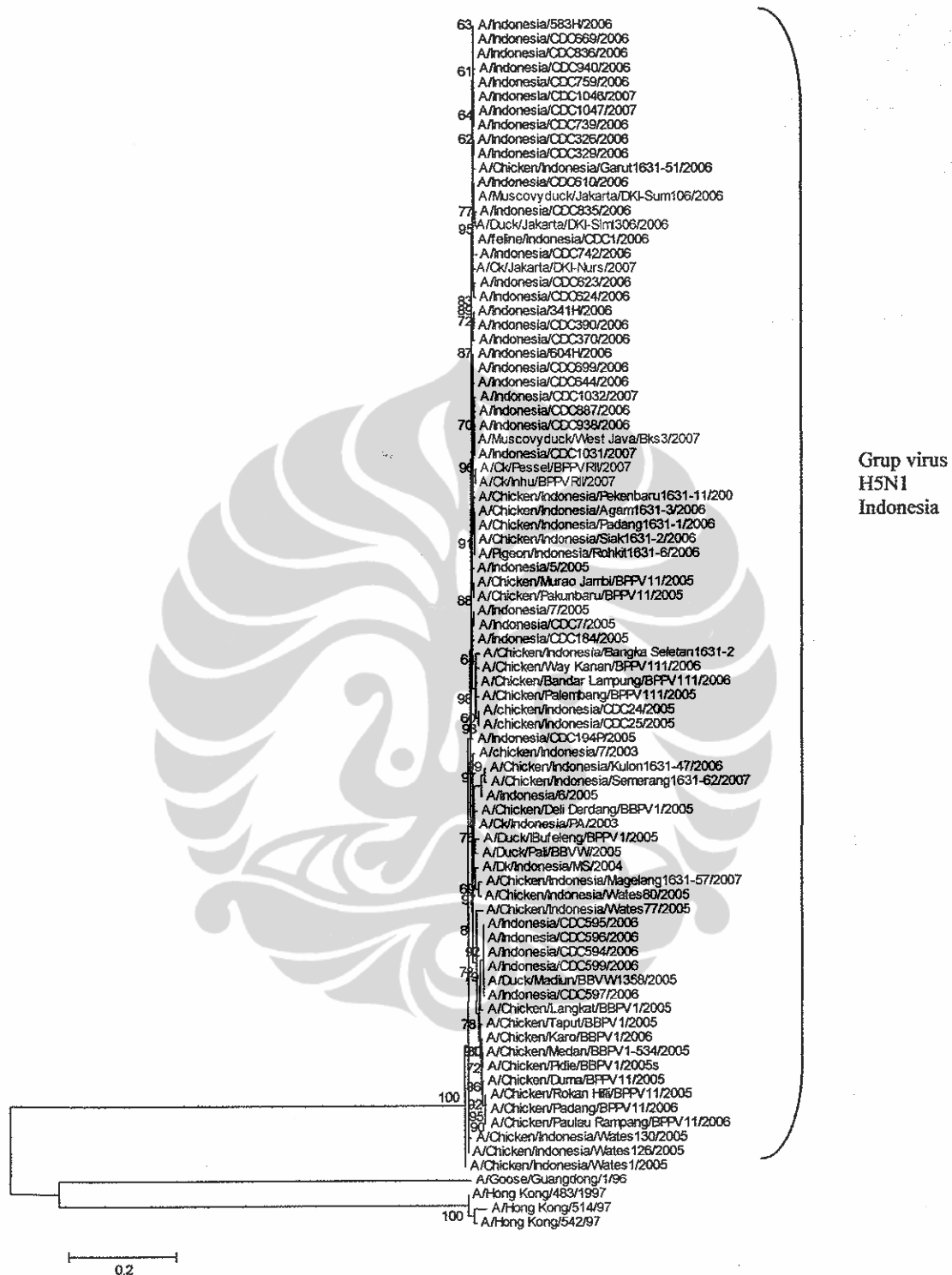
4.5.2. Analisis pada protein Neuraminidase (NA)

Pada gen NA, kelompok virus Indonesia menunjukkan berada dalam satu kelompok besar yang berbeda kelompok dengan virus asal China dan Hong Kong. Enam virus yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kekerabatan genetik yang dekat dengan virus H5N1 asal manusia. Virus Jakarta/Sum106/06 dan Jakarta/Slmt306/06 berdekatan dengan virus CDC835/06. Ketiga virus ini mempunyai substitusi yang sama yaitu pada posisi 188 (T→N). Selain itu, virus

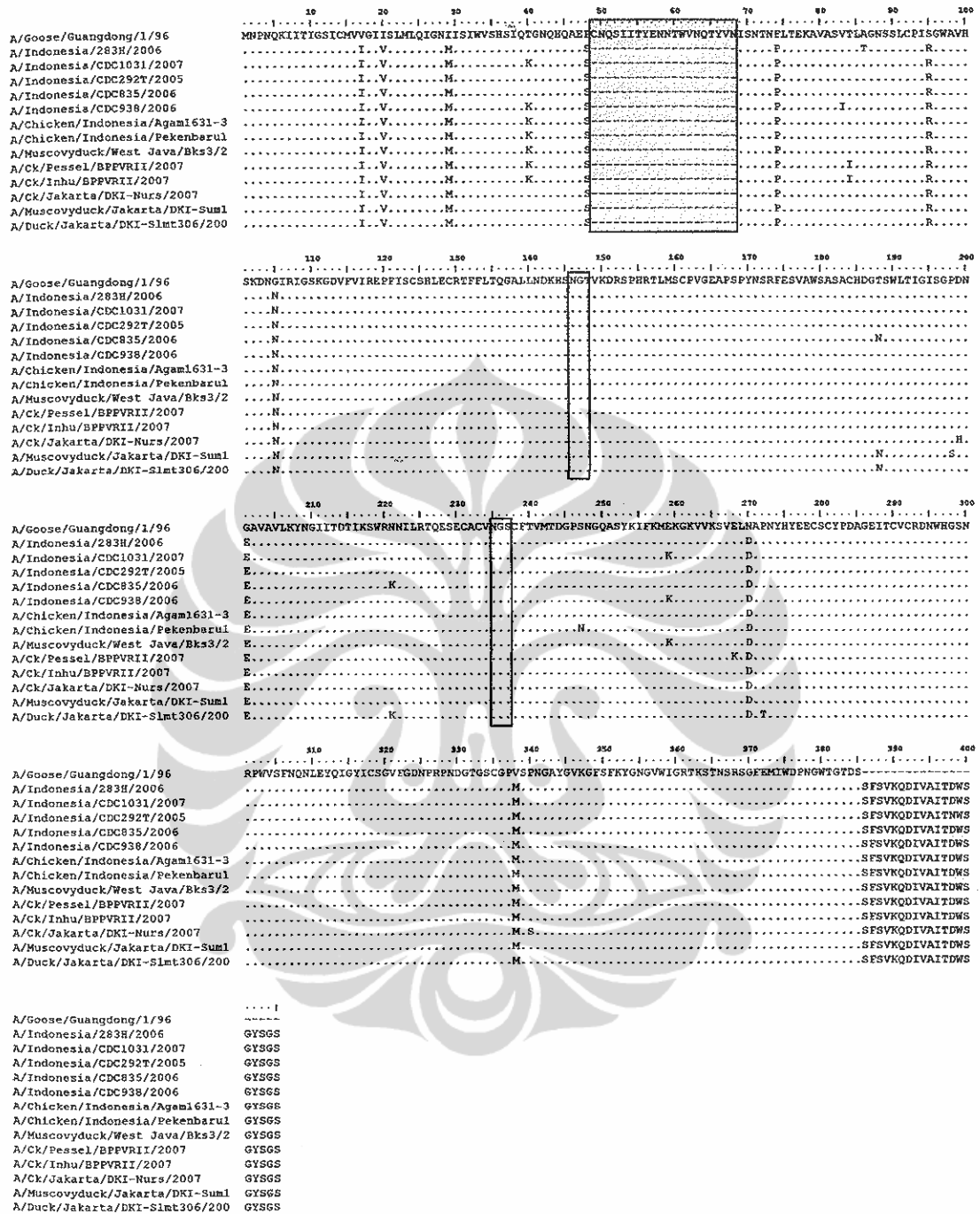
Universitas Indonesia

Jakarta/Slmt306 juga mempunyai jenis asam amino yang sama dengan virus CDC835/06 yaitu pada posisi 222, asam amino K menggantikan N. Virus WJ/Bks3/07 seperti halnya pada analisis gen HA menunjukkan kedekatan genetika dengan virus CDC1031/07. Dua virus asal pulau Sumatra yaitu A/Ck/Pessel/BPPVR11/07 dan A/Inhu/BPPVII/2007 tepatnya daerah Riau dan Sumatra Barat mempunyai kedekatan genetik dengan virus H5N1 unggas asal Riau dan Sumatra Barat lainnya seperti A/Ck/IDN/PekenBaru161-11/06, A/Ck/Agam1631-2/06 dan A/Ck/IDN/Padang1631-1/06. Virus Bks3/07 seperti halnya virus CDC1031/07 dan CDC938/07 mempunyai asam amino K menggantikan asam amino E pada posisi 259, sedangkan virus Jakarta/DKI-Nurs/07 mempunyai kedekatan dengan CDC623/06, CDC623/06 dan CDC742/06. (Gambar 28)

Virus Indonesia termasuk enam virus pada penelitian ini mempunyai 20 delesi asam amino pada *stalk region* yaitu pada posisi 48-67 (Gambar 29), sehingga semua virus Indonesia tidak mempunyai tempat glikosilasi pada *stalk region* dari protein NA akibat dari delesi pada daerah ini. Akibat dari delesi pada posisi ini, isolat virus Indonesia memiliki tiga tempat glikosilasi yaitu pada posisi 88, 146 dan 235 dari empat tempat glikosilasi pada protein NA.



Gambar 28. Pohon filogenetik gen NA di Indonesia termasuk enam virus AI asal unggas (warna biru) di sekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia di Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini. Gen NA yang dianalisa adalah posisi 1-1157.



Gambar 29. Penjejeran prediksi asam amino protein NA virus AI asal unggas disekitar kasus H5N1 pada manusia. Glikosilasi ditandai dengan kotak tertutup, dan 20 delesi asam amino ditunjukkan dalam kotak warna abu-abu. Penomoran asam amino berdasarkan Gs/Guangdong/1/1996.

4.5.3. Analisis pada protein Matrix (M)

Pada analisis filogenetika, berdasarkan pada pengkode protein Matrix, enam virus yang digunakan dalam penelitian ini berkelompok dengan virus AI asal manusia yang diisolasi pada tahun 2006-2007. Virus Jakarta/Sum106/2006 dan Jakarta/Slmt306/2006 pada level gen M mempunyai kedekatan genetika dengan virus asal manusia CDC835/06, sedangkan virus Bks3/2007 selain mempunyai kedekatan genetika CDC1031/07 pada gen M juga mempunyai kedekatan genetika dengan CDC887/06, CDC938/06, CDC523/06, CDC1032/07, virus Pessel/BPPVR11/2007 dan Inhu/BPPVR11/2007 (Gambar 30).

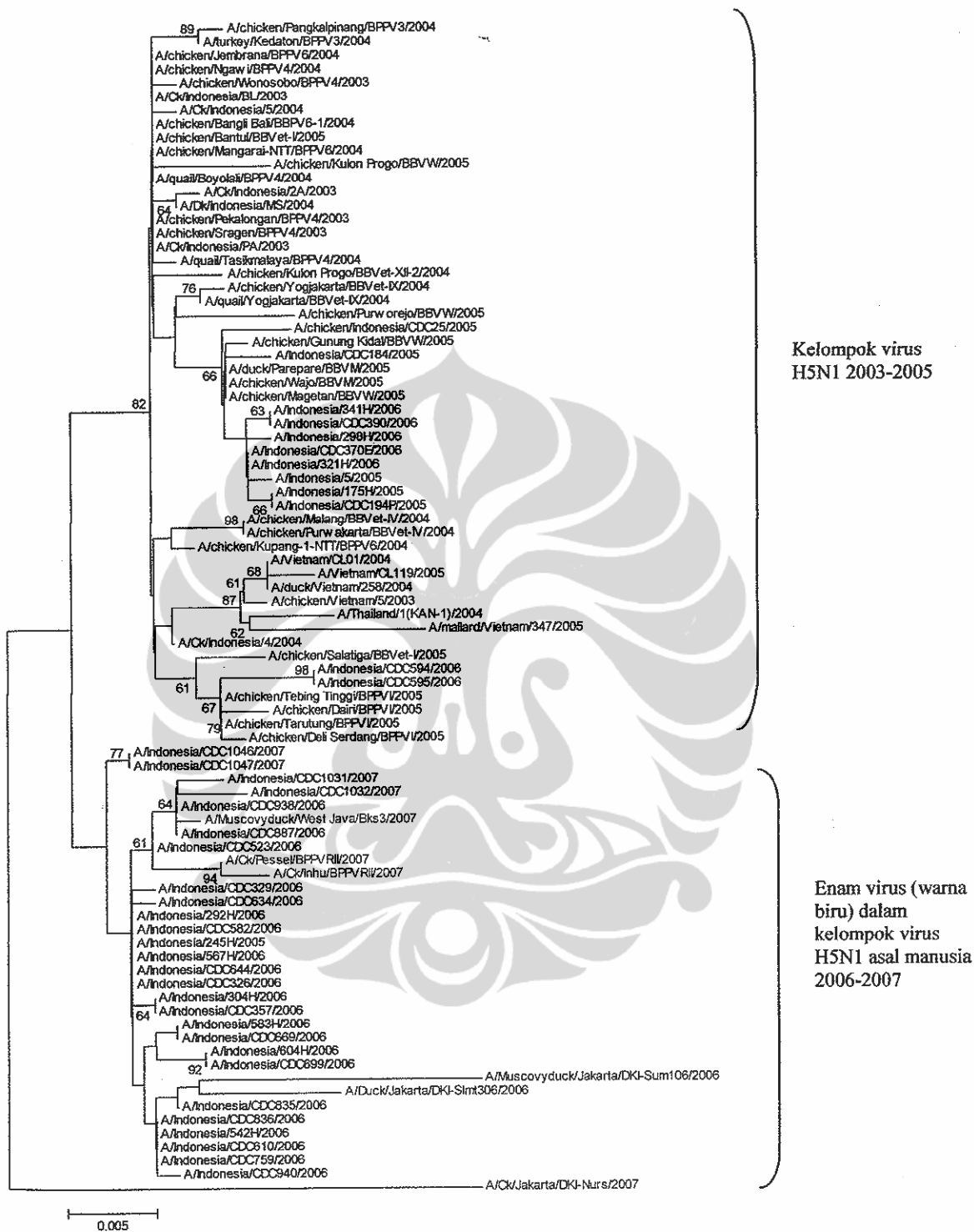
Pada analisis sekuen asam amino protein M1 (Tabel 16) virus asal unggas yang berasal dari sekitar kasus infeksi AI pada manusia mempunyai 4 asam amino yang spesifik yaitu asam amino Ala/A, Lys/K, Ala/A dan His/H pada posisi 37, 95, 137 dan 249. Diantara enam virus yang diperoleh dari unggas disekitar kasus manusia ini hanya virus Jakarta/DKI-Nurs/07 mempunyai asam amino Arg/R pada posisi 249 menggantikan H. Empat asam amino spesifik pada protein M1 ini tidak ditemukan pada virus unggas yang hanya menginfeksi unggas saja. Virus yang hanya menginfeksi unggas mempunyai asam amino Thr/T, Arg/R, Thr/T dan Gln/Q pada posisi tersebut di atas. Hasil penjejeran asam amino M1 dapat dilihat pada Lampiran 12. Namun demikian yang menarik adalah virus pav-AI mempunyai motif asam amino seperti halnya virus yang diisolasi di sekitar kasus H5N1 pada manusia.

Pada protein M2, walaupun tidak spesifik seperti pada protein M1, beberapa asam amino dimiliki secara eksklusif oleh virus unggas disekitar kasus AI

pada manusia yaitu asam amino Tyr/Y (posisi nomor 8), Lys/K (posisi nomor 18), Ile/I (posisi nomor 20), Ala/A (posisi nomor 27) dan Phe/F (posisi nomor 50) kecuali virus DKI-Nurs/07 yang hanya memiliki 2 asam amino dari motif diatas yaitu asam amino A dan F. Sebagian besar virus asal manusia mempunyai lima motif asam amino diatas, selebihnya mempunyai setidaknya dua dari asam amino tersebut diatas.

Tabel 16. Prediksi asam amino protein M virus H5N1 virus dari spesies unggas yang dihubungkan dengan kasus infeksi H5N1 pada manusia di Indonesia

Virus	Posisi asam amino M1				Posisi asam amino M2				
	37	95	137	249	8	18	20	27	50
Sum106/2006	A	K	A	H	Y	K	I	A	F
Slmt306/2006	A	K	A	H	Y	K	I	A	F
DKI-Nurs/2007	A	K	A	R	C	R	S	A	F
Bks3/2007	A	K	A	H	Y	K	I	A	F
Pessel/BPPVR/2007	A	K	A	H	Y	K	I	A	F
Inhu/BPPVR/2007	A	K	A	H	Y	K	I	A	F
Virus H5N1 Indonesia berasal dari unggas	T	R	T	Q	C	R	S	V	C
27 dari 44 virus H5N1 pada manusia di Indonesia 2006-2007	A	K	A	H	Y	K	I	A	F
Virus pav-AI 2007-2008	A	K	A	H	Y	R	I	A	F



Gambar 30. Pohon filogenetik gen M1 dari enam virus AI di Indonesia yang diisolasi dari unggas disekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia. Gen M1 yang digunakan adalah mulai nomor 1-759. Virus dengan warna biru adalah enam virus yang digunakan dalam penelitian ini.

4.5.4. Analisis protein non struktural (NS)

Analisis pohon filogenetik gen NS menunjukkan bahwa virus Jakarta/Sum106/06 mempunyai kedekatan genetika dengan virus CDC835/2006 dan WJ/Bks3/07 dengan CDC1031/07 seperti halnya pada analisis gen HA, NA dan M. Virus Inhu/BPPVR11/07 berdekatan dengan CDC24/05 dan CDC25/05. Pada gen NS, hal yang menarik adalah virus Pessel/BPPVR11/07 tidak berkelompok dengan virus H5N1 Indonesia, tetapi berkelompok dengan virus manusia yang berasal dari Hong Kong, yaitu HK/497/97 dan HK/498/97 dan kelompok virus asal China (Gambar 31).

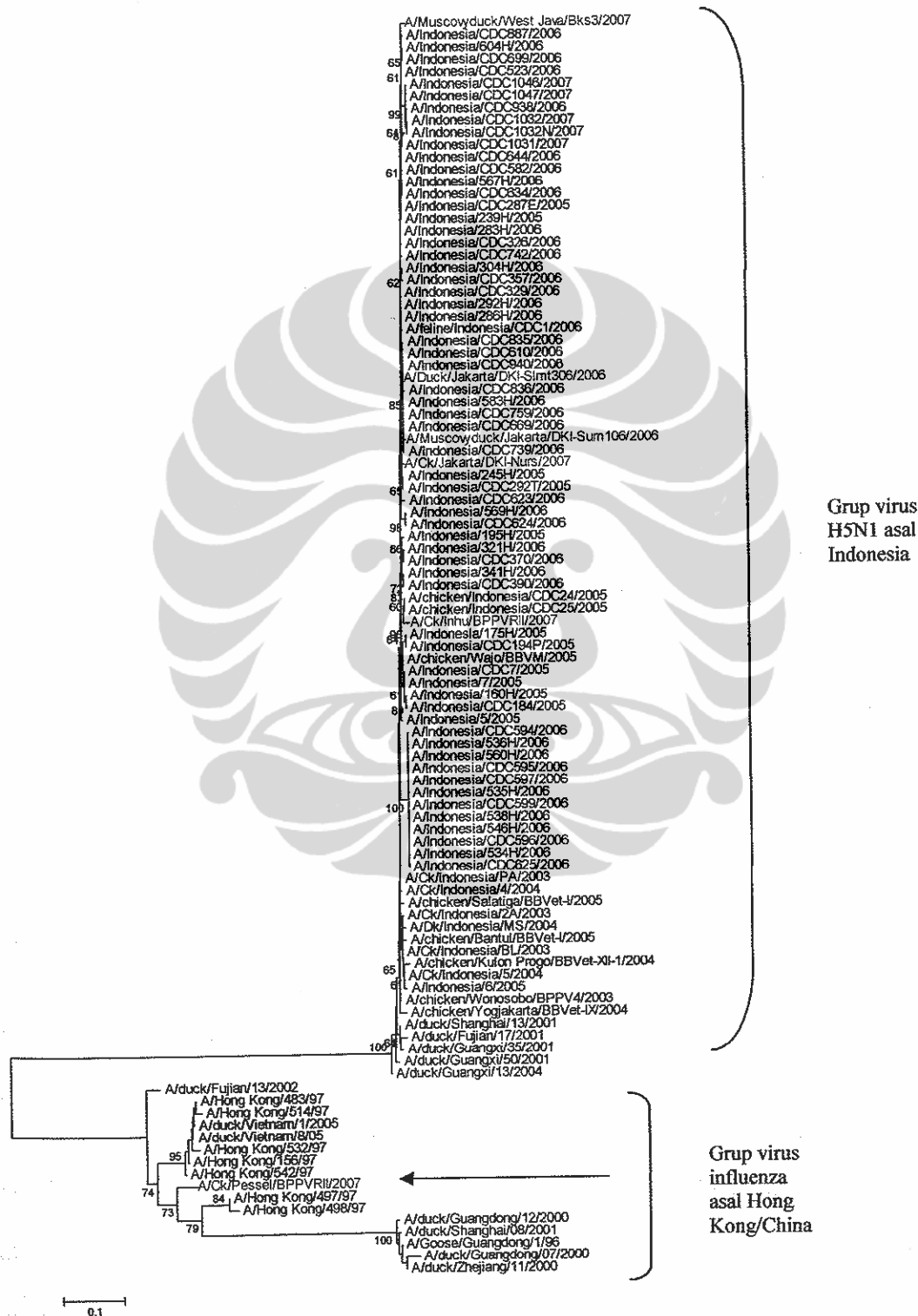
Domain PDZ pada protein NS1 adalah protein-protein yang mengenal modul dalam beberapa protein yang terlibat dalam pengaturan dan penyusunan sinyal sel. Pada analisis protein NS1, PDZ mengenal dan menempel pada peptida pendek pada C-terminal dengan motif 4-5 asam amino yaitu X-S/T-X-V pada posisi 227-230 (Obenauer dkk., 2006). *PDZ ligand binding motif* dengan sekuen ESEV atau EPEV ditemukan pada NS1 dari virus HPAI H5N1, H9N2 dan H7N7 (Hale dkk., 2008b). Virus influenza manusia mempunyai motif yang berbeda yaitu RSKV or RSEV. Pada penelitian ini, empat dari enam virus memiliki motif ESEV yang menunjukkan virus berasal dari unggas. Dua virus lainnya mempunyai motif yang berbeda yaitu virus Inhu/BPPVR11/07 menunjukkan motif KSEV, motif ini seperti motif *PDZ-binding* pada virus H1N1 tahun 1918, yang bukan golongan dari motif *PDZ-binding* pada unggas. Virus Pessel/BPPVR11/07 juga mempunyai motif virus influenza manusia, yaitu RSEV.

Lima isolat virus pada analisis penjejeran asam amino protein NS1 menunjukkan adanya delesi asam amino pada posisi 80-84 (Tabel 14, Gambar 32), sedangkan virus Pessel/BPPVR11/07 tidak mempunyai delesi tersebut. Virus genotipe the Z+, Z, Y, A, B and C termasuk virus influenza Indonesia mempunyai delesi 5 asam amino tersebut yang berkontribusi terhadap peningkatan virulensi virus. Enam virus yang dianalisis dalam penelitian ini seperti virus influenza Indonesia lainnya mempunyai Asp/D pada posisi 92, bukan Glu/E. Mutasi D92E merupakan salah satu marker resistensi terhadap sitokin.

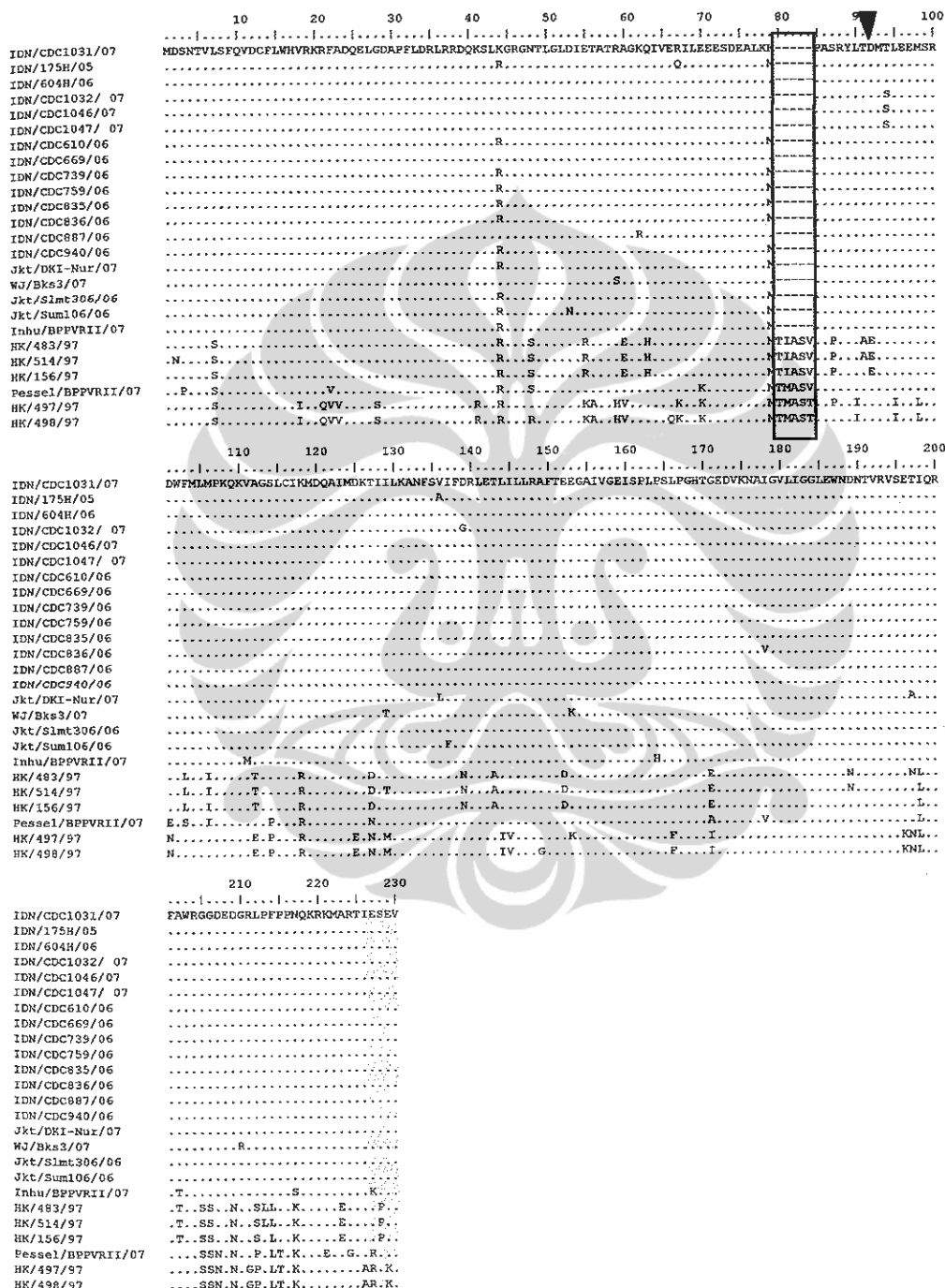
Virus Pessel/BPPVR11/07 dan Hong Kong serta lima virus Indonesia yang digunakan pada penelitian ini, dengan menggunakan penjejeran berpasangan mempunyai homologi nukleotida sebesar 86-88% dan asam amino sebesar 84-88%. Analisis lima virus Indonesia lainnya, satu dengan lainnya mempunyai homologi nukleotida yang cukup tinggi yaitu 97-99% dan 95-99% untuk sekuen asam amino.

Virus Pessel/BPPVR11/07 berada dalam kelompok virus H5N1 Indonesia pada gen HA, NA dan M, namun pada gen NS1, virus Pessel/BPPVR11/07 berkelompok dengan virus asal China/Hong Kong dan terutama berada dalam subkelompok dengan virus Hong Kong yaitu HK/497/97 dan HK/498/97. Dua virus Hong Kong ini merupakan virus H3N2. Virus Pessel/BPPVR11/07 dan virus H3N2 Hong Kong mempunyai 8 asam amino yang sama pada posisi 22, 70, 81, 114, 127, 207, 215 dan 227 (Gambar 32). Asam amino tersebut hanya ditemukan pada virus Pessel/BPPVR11/07 dan virus H3N2 Hong Kong. Hasil ini

menunjukkan bahwa virus Pessel/BPPVR/07 kemungkinan adalah virus reassortant.



Gambar 31. Pohon filogenetik gen NS1 enam virus asal unggas yang diisolasi disekitar kasus manusia terinfeksi virus H5N1. Gen NS1 yang dianalisa adalah urutan nomor 1-690.



Gambar 32. Penjejeran prediksi asam amino protein NS1 virus AI asal unggas disekitar kasus H5N1 pada manusia. Delesi pada posisi 80-84 ditandai dengan kotak tertutup. Semua virus Indonesia mempunyai D (asam Aspartat) pada posisi 92. Asam amino pada posisi 92 ditunjukkan dengan tanda segitiga. Sekuen PDZ-binding domain ditandai dengan warna bayang abu-abu. Penomoran asam amino berdasarkan CDC1031/07.

4.6. Resistensi Virus Terhadap Amantadin

Hasil sekuensing dan translasi dari protein M2 dari 20 isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 97 asam amino. Sebanyak 147 termasuk duapuluh isolat yang digunakan dalam penelitian ini data sekuen asam amino M2 virus influenza asal Indonesia yang dianalisis dari penelitian ini. Hasil analisis diketahui bahwa sebanyak 62,58% atau 92 isolat virus influenza H5N1 di Indonesia yang dianalisis pada penelitian ini telah mengalami resistensi terhadap amantadin (Tabel 17). Substitusi asam amino tunggal pada asam amino 26 (Leu→Phe), 27 (Val→Ala atau Thr), 30 (Ala→Thr atau Val), 31 (Ser→Asn atau Arg) dan 34 (G→E) dalam domain transmembran M2 diimplikasikan dengan hilangnya sensitivitas bloker M2 yang mengakibatkan resisten terhadap amantadin (Hay dkk., 1985; Pinto dkk., 1992) dan (Suzuki dkk., 2003). Dari 92 isolat yang mengalami mutasi, sebanyak 58 isolat mempunyai mutasi pada posisi 27 (Val→Ala/Thr; V27A), sebanyak 24 isolat mempunyai mutasi pada posisi 31 (Ser→Asn/Arg; S31N) dan sebanyak 10 isolat menunjukkan mutasi ganda (V27A dan S31N).

Tabel 17. Prediksi asam amino yang bertanggung jawab terhadap sensitivitas amantadin pada protein M2

No	No akses	Virus	Posisi asam amino				
			26	27	30	31	34
1	AY651374	A/Ck/Indonesia/BL/2003	L	V	A	S	G
2	AY651376	A/Ck/Indonesia/PA/2003	L	V	A	S	G
3	AY651377	A/Ck/Indonesia/2A/2003	L	V	A	N	G
4	DQ320995	A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003	L	V	A	S	G
5	DQ492906	A/chicken/Pekalongan/BPPV4/2003	L	V	A	S	G
6	DQ492907	A/chicken/Sragen/BPPV4/2003	L	V	A	S	G
7	EF473084	A/chicken/Indonesia/11/2003	L	V	S	S	G
8	GU183428	A/Ck/West Java/1074/2003	L	V	A	S	G
9	GU183427	A/Ck/West Java/BL-IPA/2003	L	V	A	S	G
10	AY651375	A/Dk/Indonesia/MS/2004	L	V	A	S	G
11	AY651378	A/Ck/Indonesia/4/2004	L	V	A	S	G
12	AY651379	A/Ck/Indonesia/5/2004	L	V	A	S	G
13	DQ320996	A/chicken/Yogyakarta/BBVetIX/2004	L	V	A	S	G
14	DQ320997	A/chicken/Kulon Progo/BBVetXIII/2004	L	V	A	S	G
15	DQ492903	A/chicken/Malang/BBVetIV/2004	L	V	A	S	G
16	DQ492905	A/chicken/Ngawi/BPPV4/2004	L	V	A	S	G
17	DQ492908	A/quail/Boyolali/BPPV4/2004	L	V	A	S	G
18	DQ492910	A/quail/Yogyakarta/BBVetIX/2004	L	V	A	S	G
19	DQ492913	A/chicken/Purwakarta/BBVetIV/2004	L	V	A	S	G
20	DQ492914	A/quail/Tasikmalaya/BPPV4/2004	L	V	A	S	G
21	DQ492915	A/chicken/Bangli Bali/BPPV62/2004	L	V	A	S	G
22	DQ492916	A/chicken/Bangli Bali/BBPV61/2004	L	V	A	S	G
23	DQ492917	A/chicken/Jembrana/BPPV6/2004	L	V	A	S	G
24	DQ492918	A/chicken/MangaraiNTT/BPPV6/2004	L	V	A	S	G
25	DQ492921	A/chicken/Kupang2NTT/BPPV6/2004	L	V	A	S	G
26	DQ492922	A/chicken/Kupang1NTT/BPPV6/2004	L	V	A	S	G
27	DQ492923	A/chicken/Pangkalpinang/BPPV3/2004	L	V	A	S	G
28	DQ492924	A/turkey/Kedaton/BPPV3/2004	L	V	A	S	G
29	DQ492930	A/chicken/Kulon Progo/BBVetXII2/2004	L	V	A	S	G
30	GU183429	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	L	V	A	S	G
31	GU183430	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	L	V	A	S	G
32	DQ320994	A/chicken/Salatiga/BBVetI/2005	L	V	A	N	G
33	DQ320998	A/chicken/Bantul/BBVetI/2005	L	V	A	S	G
34	DQ320999	A/chicken/Wajo/BBVM/2005	L	V	A	S	G
35	DQ492904	A/chicken/Magetan/BBVW/2005	L	V	A	S	G
36	DQ492909	A/chicken/Purworejo/BBVW/2005	L	V	A	S	G
37	DQ492911	A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/2005	L	V	A	S	G
38	DQ492912	A/chicken/Kulon Progo/BBVW/2005	L	V	A	S	G
39	DQ492919	A/duck/Parepare/BBVM/2005	L	V	A	S	G
40	DQ492925	A/chicken/Simalanggang/BPPVI/2005	L	V	A	N	G
41	DQ492926	A/chicken/Tebing Tinggi/BPPVI/2005	L	V	A	N	G
42	DQ492927	A/chicken/Dairi/BPPVI/2005	L	V	A	N	G
43	DQ492928	A/chicken/Deli Serdang/BPPVI/2005	L	V	A	N	G
44	DQ492929	A/chicken/Tarutung/BPPVI/2005	L	V	A	N	G
45	CY014173	A/Indonesia/5/2005	L	V	A	S	G
46	CY014180	A/Indonesia/CDC7/2005	L	V	A	S	G
47	CY014188	A/chicken/Indonesia/CDC25/2005	L	A	A	S	G
48	CY014195	A/chicken/Indonesia/CDC24/2005	L	A	A	S	G
49	CY014214	A/Indonesia/CDC184/2005	L	V	A	N	G
50	CY014225	A/Indonesia/CDC194P/2005	L	V	A	S	G
51	CY014226	A/Indonesia/CDC287E/2005	L	A	A	S	G
52	EU146673	A/Indonesia/245H/2005	L	A	A	S	G
53	EU146665	A/Indonesia/239H/2005	L	A	A	S	G
54	EU146649	A/Indonesia/160H/2005	L	V	A	N	G
55	EU146641	A/Indonesia/175H/2005	L	V	A	S	G
56	EU146638	A/Indonesia/7/2005	L	V	A	S	G
57	EU146621	A/Indonesia/6/2005	L	A	A	S	G
58	CY014215	A/Indonesia/CDC292T/2005	L	A	A	S	G
59	GU183431	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	L	V	A	S	G
60	GU183433	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	L	V	A	S	G
61	GU183432	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	L	A	A	S	G
62	CY014216	A/Indonesia/CDC326/2006	L	A	A	S	G
63	CY014217	A/Indonesia/CDC326T/2006	L	A	A	S	G

64	CY014218	A/Indonesia/CDC326N/2006	L	A	A	S	G
65	CY014219	A/Indonesia/CDC329/2006	L	A	A	S	G
66	CY014220	A/Indonesia/CDC357/2006	L	A	A	N	G
67	CY014221	A/feline/Indonesia/CDC1/2006	L	A	A	S	G
68	CY014222	A/Indonesia/CDC370/2006	L	V	A	S	G
69	CY014223	A/Indonesia/CDC370E/2006	L	V	A	S	G
70	CY014224	A/Indonesia/CDC390/2006	L	V	A	S	G
71	CY014275	A/Indonesia/CDC595/2006	L	V	A	N	G
72	CY014283	A/Indonesia/CDC594/2006	L	V	A	N	G
73	CY014291	A/Indonesia/CDC596/2006	L	V	A	N	G
74	CY014299	A/Indonesia/CDC597/2006	L	V	A	N	G
75	CY014306	A/Indonesia/CDC599/2006	L	V	A	N	G
76	CY014314	A/Indonesia/CDC523/2006	L	A	A	S	G
77	CY014369	A/Indonesia/CDC523E/2006	L	A	A	S	G
78	CY014385	A/Indonesia/CDC582/2006	L	A	A	S	G
79	CY014397	A/Indonesia/CDC610/2006	L	A	A	S	G
80	CY014405	A/Indonesia/CDC623/2006	L	V	A	S	G
81	CY014413	A/Indonesia/CDC623E/2006	L	V	A	S	G
82	CY014421	A/Indonesia/CDC624/2006	L	V	A	S	G
83	CY014429	A/Indonesia/CDC624E/2006	L	V	A	S	G
84	CY014437	A/Indonesia/CDC625/2006	L	V	A	N	G
85	CY014445	A/Indonesia/CDC634/2006	L	A	A	S	G
86	CY014453	A/Indonesia/CDC634P/2006	L	A	A	S	G
87	CY014461	A/Indonesia/CDC634T/2006	L	A	A	S	G
88	CY014469	A/Indonesia/CDC599N/2006	L	V	A	N	G
89	CY014478	A/Indonesia/CDC625L/2006	L	V	A	N	G
90	CY014485	A/Indonesia/CDC699/2006	L	A	A	S	G
91	CY014493	A/Indonesia/CDC669P/2006	L	A	A	S	G
92	CY014501	A/Indonesia/CDC669/2006	L	A	A	S	G
93	CY014506	A/Indonesia/CDC644T/2006	L	A	A	S	G
94	CY014514	A/Indonesia/CDC644/2006	L	A	A	S	G
95	CY014377	A/Indonesia/CDC523T/2006	L	A	A	S	G
96	CY017641	A/Indonesia/CDC938/2006	L	A	A	S	G
97	CY017649	A/Indonesia/CDC938E/2006	L	A	A	S	G
98	CY017657	A/Indonesia/CDC940/2006	L	A	A	S	G
99	CY017665	A/Indonesia/CDC836/2006	L	A	A	S	G
100	CY017673	A/Indonesia/CDC836F/2006	L	A	A	S	G
101	CY017681	A/Indonesia/CDC835/2006	L	A	A	S	G
102	CY014532	A/Indonesia/CDC739/2006	L	A	A	S	G
103	CY014546	A/Indonesia/CDC759/2006	L	A	A	S	G
104	CY017691	A/Indonesia/CDC887/2006	L	A	A	S	G
105	EU146818	A/Indonesia/583H/2006	L	A	A	S	G
106	EU146810	A/Indonesia/569H/2006	L	V	A	S	G
107	EU146826	A/Indonesia/604H/2006	L	A	A	S	G
108	EU146794	A/Indonesia/546bH/2006	L	V	A	N	G
109	EU146787	A/Indonesia/560H/2006	L	V	A	N	G
110	EU146778	A/Indonesia/542H/2006	L	A	A	S	G
111	EU146758	A/Indonesia/546H/2006	L	V	A	N	G
112	EU146757	A/Indonesia/536H/2006	L	V	A	N	G
113	EU146756	A/Indonesia/535H/2006	L	V	A	N	G
114	EU146746	A/Indonesia/538H/2006	L	V	A	N	G
115	EU146802	A/Indonesia/567H/2006	L	A	A	S	G
116	EU146738	A/Indonesia/534H/2006	L	V	A	N	G
117	EU146730	A/Indonesia/341H/2006	L	V	A	S	G
118	EU146722	A/Indonesia/321H/2006	L	V	A	S	G
119	EU146714	A/Indonesia/292H/2006	L	A	A	S	G
120	EU146706	A/Indonesia/304H/2006	L	A	A	S	G
121	EU146698	A/Indonesia/298H/2006	L	V	A	S	G
122	EU146690	A/Indonesia/286H/2006	L	A	A	S	G
123	EU146683	A/Indonesia/283H/2006	L	A	A	S	G
124	GU183436	A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	L	A	A	S	G
125	GU183437	A/Duck/Jakarta/Slmt306/2006	L	A	A	S	G
126	CY019355	A/Indonesia/CDC1031/2007	L	A	A	S	G
127	CY019363	A/Indonesia/CDC1031T/2007	L	A	A	S	G
128	CY019371	A/Indonesia/CDC1031T2/2007	L	A	A	S	G
129	CY019379	A/Indonesia/CDC1031RE2/2007	L	A	A	S	G
130	CY019387	A/Indonesia/CDC1032/2007	L	A	A	S	G
131	CY019395	A/Indonesia/CDC1032N/2007	L	A	A	S	G
131	CY019403	A/Indonesia/CDC1032T/2007	L	A	A	S	G
133	CY019411	A/Indonesia/CDC1046/2007	L	A	A	N	G
134	CY019419	A/Indonesia/CDC1046T/2007	L	A	A	N	G
135	CY019427	A/Indonesia/CDC1047/2007	L	A	A	N	G
136	CY019435	A/Indonesia/CDC1047S/2007	L	A	A	N	G
137	GU183439	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	L	A	A	S	G

138	GU183440	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	L	A	A	N	G
139	GU183441	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	L	A	A	N	G
140	GU183436	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	L	A	A	S	G
141	GU183437	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	L	A	A	S	G
142	GU183438	A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	L	A	A	S	G
143	GU183442	A/Ck/West Java/Smi-Acl/2008	L	A	A	S	G
144	GU183443	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	L	A	A	S	G
145	GU183444	A/Ck/West Java/Smi-M1/2008	L	A	A	N	G
146	GU183445	A/Ck/West Java/Smi-M6/2008	L	A	A	N	G
147	GU183446	A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008	L	A	A	N	G

Berdasarkan data genetika tersebut diketahui virus yang sensitif dan resisten terhadap amantadin secara molekuler dan selanjutnya dua puluh isolat tersebut dilakukan uji resistensi terhadap amantadin secara in vitro pada sel MDCK. Hasil dari uji ini dapat dilihat pada Tabel 17. Titer virus dapat direpresentasikan dengan uji HA. Hasil uji HA menunjukkan konsistensi bahwa terdapat korelasi antara virus yang resisten atau sensitif pada tingkat molekuler.

Tabel 18. Rerata titer HA virus avian influenza pada pada uji sensitivitas amantadin

No	Nama Virus	Rerata Titer HA				
		MDCK+Virus	MDCK+Virus+ Amantadine 0.1 µg	MDCK+Virus+ Amantadine 1 µg	MDCK+Virus+ Amantadine 4 µg	MDCK+Virus+ Amantadine 8 µg
1	A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	32	-	td	td	td
2	A/Ck/West Java/1074/2003	32	-	td	td	td
3	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	128	-	td	td	td
4	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	32	-	td	td	td
5	A/Ck/Jakarta/DK131/2005	64	-	td	td	td
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	512	128	128	128	128
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	128	-	td	td	td
8	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	512	256	64	64	32
9	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmi306/2006	128	128	128	128	128
10	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	64	64	32	32	32
11	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	106,67	106,67	32	32	32
12	A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	128	128	128	128	128
13	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	64	64	32	16	16
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	128	128	128	128	128
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	256	256	128	128	128
16	A/Ck/West Java/Smi-Acl/2008	128	128	128	128	128
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	85,34	85,34	64	32	32
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	64	64	64	64	64
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	64	64	64	64	64
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	53,33	32	32	32	32

Keterangan :

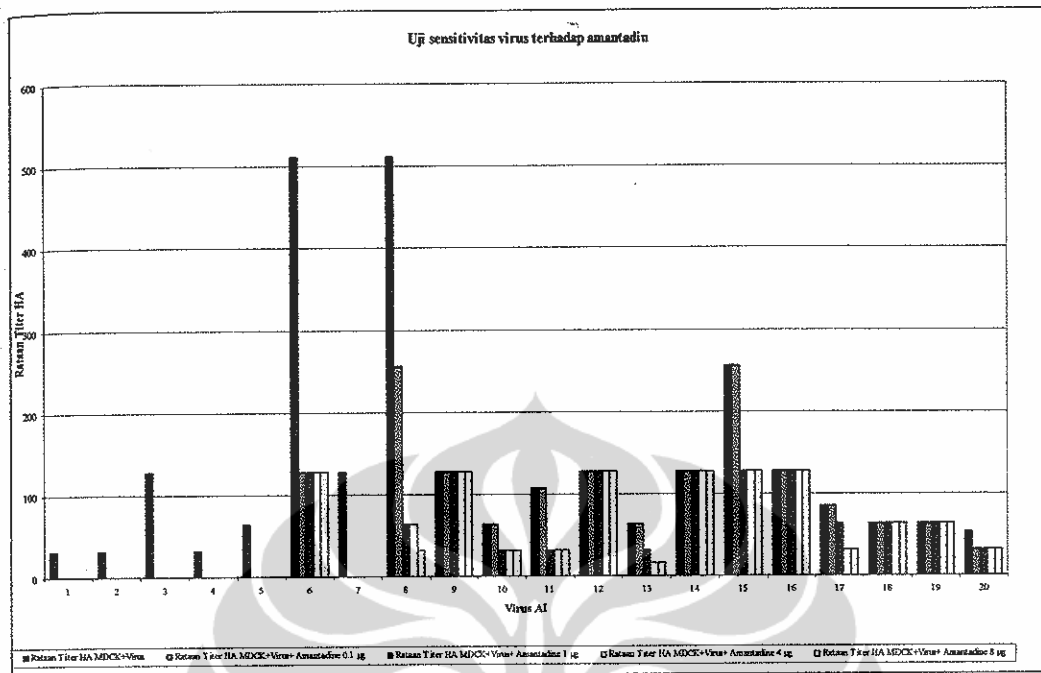
Warna biru : virus sensitif terhadap amantadin

Warna merah : virus resisten amantadin

td : tidak dilakukan

Pada Tabel 18, isolat virus tahun 2003-2005 (ditunjukkan oleh nomor 1-5 dan 7) adalah virus yang sensitif terhadap amantadin, pada uji in vitro juga menunjukkan bahwa virus-virus ini sensitif terhadap amantadin yang ditunjukkan oleh tidak adanya pertumbuhan virus pada sel MDCK (titer virus = 0) pada penambahan konsentrasi amantadin terendah yaitu 0,1 µg/ml. Pada virus resisten amantadin (ditunjukkan oleh nomor 6, 8-20), pertumbuhan virus masih dapat dideteksi dengan masih adanya titer HA meskipun terdapat beberapa virus yang mengalami penurunan titer HA dengan pemberian konsentrasi amantadin yang semakin meningkat (Gambar 33). Dosis amantadin yang diberikan adalah 0,1 µg/ml; 1 µg/ml, 4 µg/ml dan 8 µg/ml. Virus resisten amantadin tidak dapat dihambat oleh amantadin konsentrasi tinggi yaitu 8 µg/ml, karena masih terdeteksinya virus dengan penambahan amantadin pada dosis tersebut (Tabel 17).

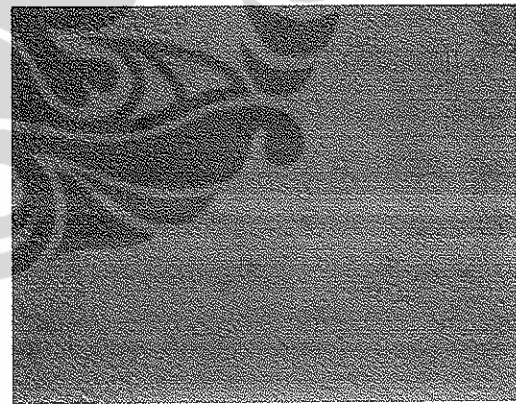
Pada Gambar 34, menunjukkan sel MDCK normal (a), sel MDCK dengan penambahan amantadin (b) dan c, d, e, f, g, h dan i adalah gambar yang menunjukkan sel MDCK yang diinfeksi virus yang sensitif terhadap amantadin dengan penambahan amantadin dan virus-virus yang resisten terhadap amantadin baik itu yang mengalami mutasi tunggal ataupun ganda dengan pemberian berbagai konsentrasi amantadin. Gambar sel MDCK yang diinfeksi virus dan sel MDCK yang diinfeksi virus resisten terhadap amantadin tampak adanya *cytopathic effect* (CPE) yang tidak berbeda satu dengan yang lainnya. Sehingga untuk membuktikan seberapa jauh virus berkembang biak di dalam sel dilakukan uji lanjutan yaitu uji HA seperti yang telah disebutkan sebelumnya.



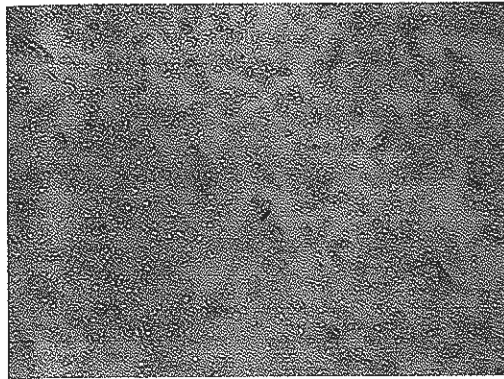
Gambar 33. Rerata titer HA virus avian influenza pada pada uji sensitivitas amantadin



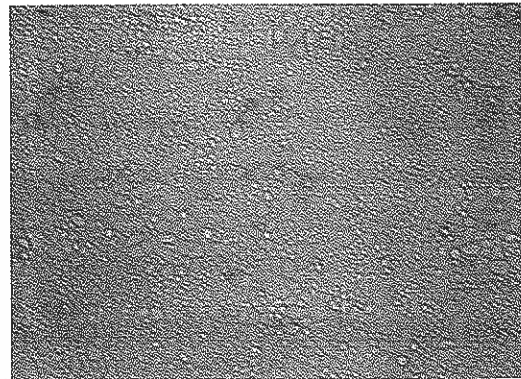
(a)



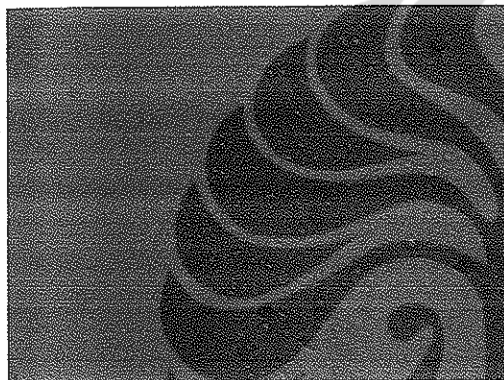
(b)



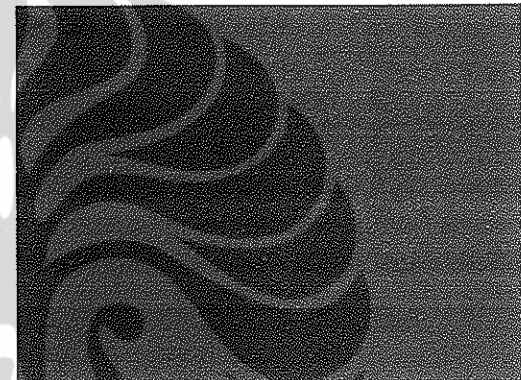
(c)



(d)



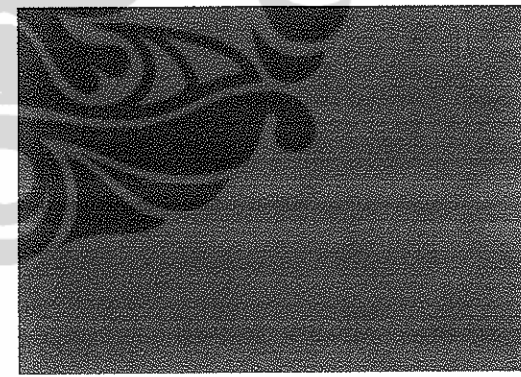
(e)



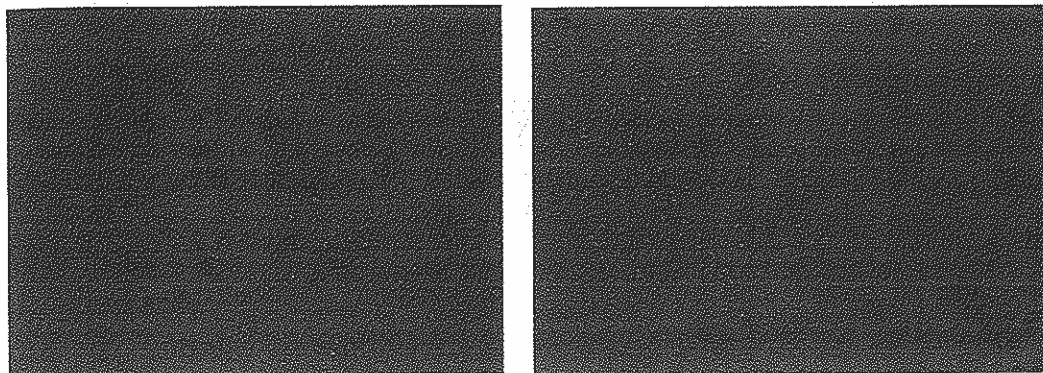
(f)



(g)



(h)



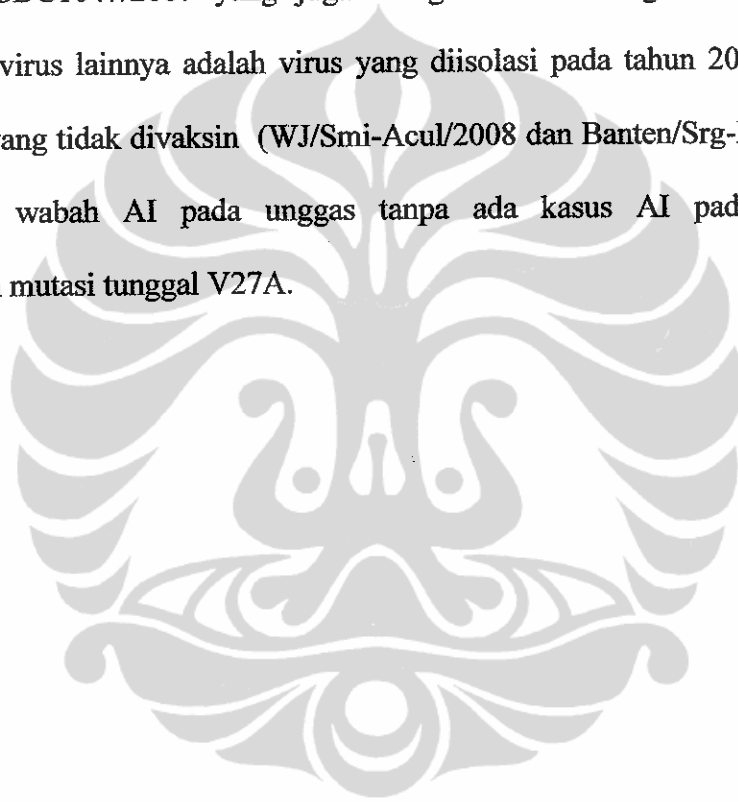
(i)

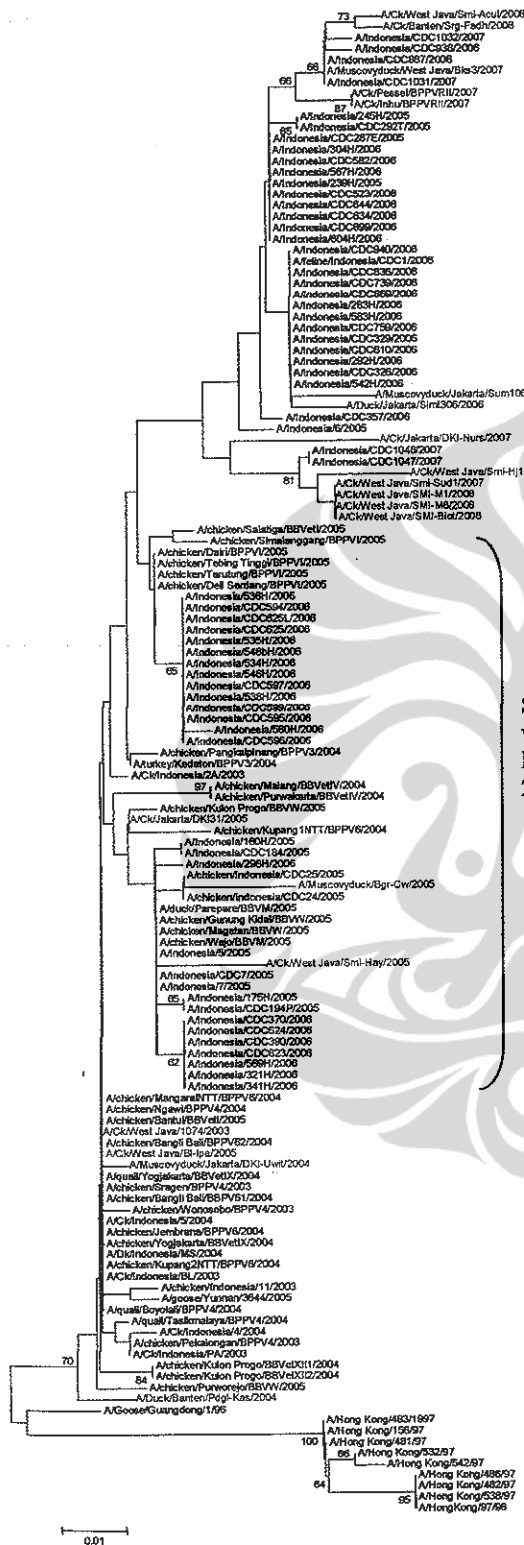
(j)

Gambar 34. Sel MDCK (a) normal; (b) dengan penambahan amantadin (8 $\mu\text{g/ml}$); (c) diinfeksi virus A/Ck/West Java/1074/03; (d) diinfeksi virus A/Ck/West Java/1074/03 dengan penambahan amantadin (0,1 $\mu\text{g/ml}$); (e) Gambar 34. e) Sel MDCK yang A/Ck/West Java/ Bks3/07 f) diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/West Java/ Bks3/07 dengan penambahan amantadin (8 $\mu\text{g/ml}$); (g) diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/West Java/ SMI-Biot/08; (h) diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/West Java/ SMI-Biot/08 dengan penambahan amantadin (1 $\mu\text{g/ml}$); (i) diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/WestJava/SMI-Biot/08 dengan penambahan amantadin (4 $\mu\text{g/ml}$); (j) diinfeksi virus resisten amantadin A/Ck/West Java/ SMI-Biot/08 dengan penambahan amantadin(8 $\mu\text{g/ml}$).

Analisis pohon filogenetik gen M2 menunjukkan bahwa virus influenza asal Indonesia berada dalam satu kelompok besar yang berbeda dengan virus influenza asal Hong Kong dan China (Gambar 32). Dua puluh isolat yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan dalam warna biru. Grup 1b merupakan kelompok virus lama (2005-2006). Virus unggas yang diisolasi di sekitar kasus influenza H5N1 pada manusia (6 isolat) menunjukkan kedekatan genetik pada aras gen Matrix dengan virus asal manusia (grup 1a). Dalam grup 1a, juga terdapat virus asal unggas yang diperoleh dari wabah AI pada unggas

yang mempunyai kedekatan dengan virus asal manusia (sebanyak 7 virus) ; lima virus yang berasal dari tahun 2007-2008 yang mengalami mutasi ganda adalah WJ/Smi-Hj18/2007, WJ/Smi-sud1/2007; WJ/Smi-Biot/2008; WJ/Smi-M1/2008, WJ/Smi-M6/2008 (yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI) mempunyai kedekatan dengan virus A/Indonesia/CDC1047/2007 dan A/Indonesia/CDC1047/2007 yang juga mengalami mutasi ganda V27A dan S31N. Dua virus lainnya adalah virus yang diisolasi pada tahun 2008, berasal dari unggas yang tidak divaksin (WJ/Smi-Acul/2008 dan Banten/Srg-Fadh/2008) berasal dari wabah AI pada unggas tanpa ada kasus AI pada manusia menunjukkan mutasi tunggal V27A.





Sub grup 1a, virus H5N1 asal manusia 2006-2007 dan virus asal unggas sekitar kasus H5N1 pada manusia serta virus asal unggas 2008

Sub grup 1b, virus H5N1 Indonesia 2005-2006

Grup 1, Virus H5N1 Indonesia

Grup 2, Virus asal China dan Hong Kong

Gambar 35. Pohon filogenetik gen M2 virus AI asal unggas di sekitar kasus H5N1 pada manusia. Dua puluh virus yang digunakan ditandai dengan warna biru. Kelompok 1 merupakan kelompok virus H5N1 asal Indonesia dan kelompok 2 adalah virus asal China/Hong Kong.



BAB 5

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, dua puluh virus avian influenza subtipe H5N1 yang digunakan telah diverifikasi dengan berbagai metode. Seluruh virus yang digunakan dibiakkan pada telur ayam berembrio *specific pathogen free* umur 9-11 hari dan dilakukan pengukuran titer virus. Pengukuran titer virus AI menunjukkan bahwa titer virus AI yang diisolasi tidak tergantung pada tahun isolasi virus tersebut. Virus Srg-Fadh/08 yang diisolasi pada tahun 2008, mempunyai titer jauh lebih rendah dibandingkan dengan virus WJ/1074/03 yang diisolasi pada tahun 2003. Kandungan virus pada saat pengambilan sampel diperkirakan mempengaruhi kandungan virus pada saat ditumbuhkan pada telur. Selain itu kemungkinan kemampuan adaptasi virus pada media telur ayam berembrio cukup bervariasi.

Metode molekuler RT-PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk identifikasi virus influenza A (Fouchier dkk., 2000), dan subtipe H5N1 (Lee dkk., 2001; Wright dkk., 1998) membuktikan bahwa dua puluh isolat virus yang digunakan adalah virus avian influenza A subtipe H5N1.

Hasil sekuensing yang dilakukan terhadap gen HA, NA, M dan NS secara lengkap, membuktikan bahwa virus yang digunakan adalah virus avian influenza subtipe H5N1. Analisis bioinformatika komposisi protein dari hasil sekuensing DNA yang diperoleh menunjukkan bahwa virus mempertahankan jumlah dan komposisi asam amino, sehingga tidak ada perbedaan diantara isolat virus yang

digunakan. Pada prediksi topologi protein membuktikan bahwa hasil sekuensing DNA pada gen matrik yang diperoleh menunjukkan kebenaran bahwa protein M2, NA dan HA adalah protein transmembran sesuai dengan Zebedee dan Lamb (1988) bahwa tiga protein virus terdapat dalam membran adalah dua glikoprotein permukaan (*spike*) yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) dan protein *membran-channel*, (M2).

Hasil verifikasi tersebut di atas berdasarkan identifikasi dan sekuensing yang dilakukan membuktikan bahwa dua puluh isolat virus yang digunakan adalah benar virus influenza A subtipe H5N1. Pembahasan yang dilakukan selanjutnya adalah berdasarkan pada pertanyaan penelitian yang diajukan. Pertanyaan 1 dan 2 dibahas secara bersama sedangkan pertanyaan 3 dan 4 akan dibahas secara terpisah.

5.1. Perubahan virus influenza subtipe H5N1 dan karakter virus AI asal unggas dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi

Di Indonesia, virus H5N1 genotipe Z telah menjadi endemik pada populasi unggas sejak tahun 2003 (Smith dkk., 2006). Dalam studinya dinyatakan bahwa berdasarkan analisis filogenetik, virus asal Indonesia dan Vietnam berasal dari sumber tunggal dan diduga berasal dari unggas domestik dari Cina Selatan (Li dkk., 2004; WHO 2005a; Chen dkk., 2006). Analisis filogenetik juga menunjukkan bahwa semua virus dari Indonesia membentuk *sublineage* yang berbeda dari virus H5N1 genotipe Z yang diduga bahwa wabah ini berasal dari

sumber tunggal yang kemudian menyebar ke seluruh Indonesia (Smith dkk., 2006).

Studi evolusi virus influenza sangat penting untuk mengetahui jenis seleksi yang mengendalikan gen terutama pada protein HA yang dihubungkan dengan evolusi virus dengan tujuan untuk memprediksi galur vaksin. Analisis yang dilakukan menunjukkan bahwa sebagian besar mutasi yang terjadi kemungkinan akibat seleksi positif dan terjadi pada protein hemagglutinin, matrix dan *non structural* bukan pada protein neuraminidase

Pada penelitian ini delapan virus yaitu WJ/1074/03, WJ/Bgr-Cw/05, DKI-Nurs/07, WJ/Smi-Hj18/07, WJ/Smi-Sud1/07, WJ/SMI-M1/08, WJ/SMI-M6/08 dan WJ/SMI-Biot/08 menunjukkan bahwa substitusi yang terjadi kemungkinan akibat seleksi positif. Delapan virus ini, kecuali virus WJ/Bgr-Cw/05, DKI-Nurs/07 diisolasi dari peternakan ayam komersial. Virus WJ/1074/03 yang merupakan virus yang diisolasi pada bulan November 2003 meskipun hanya memiliki empat substitusi asam amino jika dibandingkan dengan virus AI yang pertama kali diisolasi pada bulan Oktober tahun 2003 yaitu virus EJ/BL-IPA, telah menunjukkan bahwa substitusi yang terjadi kemungkinan adanya seleksi positif. Lima virus yang diisolasi dari flock yang melakukan vaksinasi AI memiliki substitusi non sinonim yang jauh lebih besar dibandingkan tiga virus lainnya, hal ini kemungkinan akibat adanya tekanan imunologis yang diterima. Pada tahun 2006-2008, virus pav-AI hanya ditemukan pada peternakan di kabupaten Sukabumi dan Purwakarta. Mengapa hal ini terjadi masih belum jelas, apakah dikarenakan dua kabupaten ini merupakan kabupaten dengan padat

populasi unggas dari peternakan rakyat sampai peternakan pembibitan, sehingga lalulintas unggas dan permasalahan pada lokasi tersebut juga kompleks atau karena di kabupaten lain tidak intensif dilakukan pengambilan sampel pada peternakan ayam komersial mengingat tidak mudah untuk dapat melakukan pengambilan sampel pada peternakan komersil.

Mutasi yang terjadi pada protein HA virus pav-AI mengakibatkan penurunan tempat glikosilasi sehingga virus hanya memiliki lima tempat glikosilasi. Virus-virus yang mengalami penurunan tempat glikosilasi dapat menciptakan populasi virus yang mengalami peningkatan afinitas terhadap reseptor dan dapat juga menghasilkan populasi virus yang lebih tahan terhadap netralisasi daripada induknya (Schulze, 1997).

Penggunaan vaksinasi sebagai salah satu dari sembilan strategi pengendalian penyakit AI di sektor peternakan jika dalam implementasinya tidak tepat maka dapat menimbulkan banyak permasalahan diantaranya adalah timbulnya virus baru yang terjadi karena tekanan imunologis akibat vaksinasi. Lebih dari 20 jenis vaksin AI yang terdaftar dan beredar di Indonesia yang menggunakan beberapa galur virus AI sebagai bibit vaksin misalnya galur isolat lokal H5N1 (Legok/2003), H5N2(A/Ck/Mexico/232/94; A/Turkey/England/N28/73) dan H5N9 (A/Turkey/Wisconsin/68) (Syamsudin, 2009).

Penggunaan virus LPAI sebagai bibit vaksin yang digunakan di Indonesia mungkin berdasarkan karena galur virus HPAI kurang umum digunakan sebagai vaksin inaktif karena membutuhkan peralatan yang spesifik, fasilitas *high-*

biocontainment, titer virus yang diperoleh dari telur embrio bertunas juga sangat terbatas dibandingkan jika menggunakan galur virus LPAI. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa galur virus LPAI dapat memproteksi melawan virus HPAI (Swayne dkk., 1999), sehingga produksi vaksin LPAI lebih menguntungkan karena lebih mudah memproduksi kandungan antigen yang tinggi dan juga galur LPAI dapat ditangani dengan lebih aman serta tidak memerlukan fasilitas khusus (Swayne dan Kapczynski, 2008).

Beberapa studi yang mendukung penggunaan vaksin heterolog untuk mengatasi virus di lapangan. Studi virus A/Ck/Indonesia/7/2003 (H5N1) dan A/Ck/Hidalgo/232/1994 (Hidalgo/94) (H5N2) yang mempunyai similaritas asam amino sebanyak 82% (Spackman dkk., 2007), memperlihatkan bahwa seluruh ayam yang divaksinasi dengan vaksin inaktif Hidalgo/94 tetap hidup setelah ditantang dengan virus HPAI Indonesia/7/2003. Ayam secara klinis tampak normal dan vaksin mampu menurunkan titer virus dari virus yang diekskresikan dari saluran napas dan pencernaan dibandingkan dengan kontrol (Spackman dkk., 2007; Swayne dkk., 2006). Pada studi Swayne dkk (1999) menggunakan virus HPAI sebagai virus tantang dan menggunakan galur vaksin yang mempunyai similaritas pada protein HA sebesar 86% memperlihatkan bahwa vaksin mampu memberikan proteksi yang baik pada ayam.

Peternakan ayam komersil seperti peternakan ayam petelur dan pembibitan ayam umumnya melakukan vaksinasi secara intensif termasuk vaksinasi AI. Vaksinasi AI umumnya diberikan oleh peternakan ayam komersil minimal 3 kali sepanjang umur produksi ayam. Peternak seringkali

mengkombinasikan beberapa galur dalam program vaksinasi peternakan miliknya, misalnya menggunakan kombinasi vaksin H5N1 dan H5N2 atau H5N2 dengan H5N9. Berkaitan dengan vaksinasi herealog, pada tahun 2006 Dharmayanti dkk berhasil mengisolasi dua virus AI dari peternakan ayam yang menggunakan vaksin H5N2. Tahun 2006 itu juga dilaporkan bahwa beberapa galur virus yang diisolasi dari lapangan telah lolos dari proteksi yang dihasilkan oleh vaksin komersial yang digunakan, misalnya ditemukannya galur lapang varian di Shanxi, China pada tahun 2006 (Zhigao, 2007). Beberapa virus juga telah diidentifikasi di Indonesia dan Mesir pada tahun 2006 dan awal tahun 2007 yang secara antigenik berbeda dengan virus H5N1 terdahulu, berdasarkan uji serologikal. Virus ini menyebabkan kematian pada ayam yang divaksinasi dengan galur vaksin dari Amerika Utara dan beberapa bibit dari galur Eurasian (Swayne dan Kapczynski, 2008).

Pada penelitian ini memperlihatkan bahwa virus Indonesia telah mengalami perubahan dari virus yang berhasil diisolasi pertama kali pada tahun 2003. Berbagai tindakan pengendalian termasuk vaksinasi yang dilakukan diperkirakan menyebabkan munculnya perubahan virus. Virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI mengalami *genetic drift* yaitu sekitar 1% asam amino berubah setiap tahunnya. Sehingga virus Indonesia sudah berbeda dengan virus asalnya. *Antigenic drift* adalah evolusi gradual dari galur virus yang mengakibatkan mutasi (Both dkk., 1983). Pada virus influenza manusia, mutasi terjadi rata-rata 2-8 tahun sebagai respon terhadap tekanan seleksi untuk menghindar dari imunitas manusia (Smith dkk., 2004; Plotkin dkk.,

2002; Koelle dkk., 2006). Proses *antigenic drift* terjadi pada tingkat nukleotida yang kadang tidak mengubah atau mengubah sebagian kecil mengubah asam amino. Mutasi ini melibatkan mutasi titik dalam tempat melekatnya antibodi pada protein HA, NA atau keduanya yang terjadi setiap saat ketika virus bereplikasi (Finkenstadt dkk., 2005; Koelle dkk., 2006; Fitch dkk., 1991; Boni dkk., 2004). Sebagian besar dari mutasi ini bersifat netral karena mutasi tersebut tidak berakibat pada konformasi protein; namun beberapa mutasi dapat menyebabkan perubahan pada protein viral seperti mutasi yang terjadi pada pengikatan antibodi dari antibodi inang. Hal ini mengakibatkan infeksi virus tidak dapat dihambat oleh antibodi inang (Webby dan Webster, 2001).

Antigenic drift terjadi pada semua virus influenza tipe A dan B, walaupun bentuk evolusi bervariasi tergantung pada galur. Sebagai contoh, virus influenza tipe A subtipe H1 dan B, varian *drift* yang terbentuk umumnya bersirkulasi bersama dengan berbagai varian yang ada dan wabah yang terjadi disebabkan oleh galur lama. Hal berbeda terjadi pada virus influenza subtipe H3, virus ini lebih sering mengalami *antigenic drift* dan membentuk varian baru yang menggantikan virus H3 sebelumnya (Koelle dkk., 2006; Ferguson dkk., 2003; Hay dkk., 2001).

Pada penelitian Smith dkk (2006) menyebutkan bahwa sebagian besar virus yang berasal dari Indonesia mempunyai motif rangkaian asam amino basa pada daerah *cleavage site* yang merupakan karakter dari virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) yaitu PQRERRRKKR/G. Sekuen asam amino di *cleavage site* yang merupakan petanda patogenisitas virus AI menunjukkan

sebagian besar mempunyai motif rangkaian asam amino basa yang menunjukkan *highly pathogenic* avian influenza. Pada tahun 2003-2005, sebagian besar isolat virus unggas di Indonesia menunjukkan motif PQRERRRKKR//G. Pada bulan Maret tahun 2005, Dharmayanti dkk (2005) menemukan isolat AI dari unggas yang mengalami mutasi R→S pada posisi -6 HA sehingga mempunyai motif PQRESRRKKR//G. Tiga bulan setelah itu, pada bulan Juni 2005, Indonesia mempunyai kasus manusia yang terinfeksi AI untuk pertama kalinya dan sekuen *cleavage site* dari virus ini adalah sama dengan motif isolat yang ditemukan Dharmayanti dkk (2005). Sejak saat itu, sebagian besar isolat AI di Indonesia mempunyai motif PQRESRRKKR//G. Pada penelitian ini memperlihatkan delapan isolat virus yang berasal dari pav-AI serta dua isolat (A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006 dan Ck/WestJava/Smi-Pat/06) menunjukkan sekuen asam amino di *cleavage site* protein HA yaitu PQRESRRKKR//G.

Dalam penggunaan vaksin, similaritas asam amino galur virus vaksin dengan virusantang setidaknya harus sebesar 87,3 - 100%, sehingga dapat memproteksi ayam dengan baik (Swayne dkk., 1999; Swayne dkk., 2000). Pendapat ini didukung oleh penelitian lainnya yang menyebutkan pada penggunaan vaksin galur subtipe H7 dari Amerika Utara (A/Turkey/Oregon/1971(H7N3) yang mempunyai similaritas sebanyak 79,6% dengan H5N2 HPAI virus gagal memberikan proteksi ketika ditantang dengan dosis letal tantang (Swayne dkk., 1999). Pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa similaritas antara virus vaksin dan tantang setidaknya harus lebih dari 82%. Penurunan replikasi virus dan *shedding* dari saluran napas bervariasi dan

secara langsung berkorelasi dengan similaritas asam amino antara virus vaksin dan virusantang sehingga semakin dekat kekerabatan antara virusantang dan virus vaksin akan semakin sedikit virusantang yang dikeluarkan ke lingkungan (Swayne dkk., 1999). Pada penelitian ini, diketahui similaritas asam amino antara virus pav-AI dengan bibit vaksin Mexico/232/94 dan Wisconsin/68 pada tingkat molekuler adalah kurang dari 80% sehingga dapat menurunkan potensi vaksin tersebut dalam proteksi infeksi. Data ini mendukung kemungkinan adanya berbagai permasalahan yang terjadi dilapangan yaitu beberapa kasus kegagalan vaksin heterolog yang digunakan dalam memproteksi ayam komersil terhadap virus H5N1 yang bersirkulasi. Hasil analisis tersebut memperlihatkan bahwa penggunaan vaksin heterolog sebenarnya kurang tepat untuk dipergunakan. Data lainnya adalah penelitian uji tantang yang dilakukan Swayne (2007) terhadap semua vaksin yang beredar di Indonesia. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa vaksin yang digunakan tidak mampu memberikan proteksi yang baik jika ditantang dengan virus WJ/Pwt-Wij/06 yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi H5N2.

Pada penelitian ini, lima virus telah berhasil diisolasi dari unggas yang berasal dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI. Adanya lima virus ini menunjukkan kemungkinan terjadi karena tekanan imunologis akibat vaksinasi yang dilakukan dengan menggunakan bibit vaksin virus heterolog. Penemuan awal ini memperlihatkan bahwa semakin jauh perbedaan pada protein HA, semakin kurang efektif vaksin tersebut dalam memberikan proteksi terhadap ayam.

Akibat munculnya virus pav-AI, Indriani dkk (2009, komunikasi pribadi) menggunakan virus pav-AI tahun 2006 (WJ/Smi-Wij/06) sebagai bibit vaksin dan ditantang dengan virus HPAI tahun 2003-2007. Vaksin tersebut mampu memberikan proteksi 80-100% terhadap ayam yang divaksinasi dan maksimal *shedding* virus terjadi sampai hari ke-7. Vaksin tersebut gagal memberikan proteksi ketika ditantang dengan virus pav-AI tahun 2008 (WJ/Smi-M6/2008) dan *shedding* virus terjadi pada ayam sampai hari ke 14. Perbedaan antara virus galur dengan WJ/Smi-M6/2008 kurang dari 3% atau sebanyak 14 asam amino. Hasil ini memperlihatkan bahwa dalam penggunaan vaksin AI, tidak hanya similaritas yang menjadi ukuran dalam kesesuaian bibit vaksin, tetapi harus juga diperhitungkan adanya mutasi signifikan yang kemungkinan dapat mempengaruhi keberhasilan suatu vaksin.

Pada penelitian ini memperlihatkan bahwa mutasi yang terjadi pada virus AI di Indonesia terutama virus pav-AI jauh lebih tinggi dibandingkan dengan virus bukan pav-AI. Kegagalan vaksin WJ/Pwt-Wij/06 dalam memproteksi virus WJ/Smi-M6/08, hal ini dikarenakan virus WJ/Smi-M6/2008 telah mengalami substitusi asam amino yang terletak pada permukaan protein HA. Protein HA virus AI adalah target primer dari antibodi netralisasi. Virus AI dapat menghindari dari sistem imun inang dengan melakukan mutasi pada daerah yang mempengaruhi netralisasi sehingga antibodi tidak dapat melekat pada virus. Mutasi umumnya terjadi pada daerah HA1 di sekitar *conserved receptor binding site*.

Hasil visualisasi prediksi 3D protein HA yang memperlihatkan bahwa perbedaan asam amino dari virus WJ/Pwt-Wij/2006 dengan WJ/Smi-M6/2008 sekitar 14 residu asam amino, termasuk tiga asam amino yang terdapat pada permukaan molekul yang terletak pada epitop B. Mutasi pada daerah ini kemungkinan yang menyebabkan bibit vaksin virus Pwt-Wij/2006 tidak dapat memproteksi virus Smi-M6/2008. Domain HA1 dari hemagglutinin (HA) adalah protein antigenik yang sangat penting dari virus influenza A yang mengandung semua situs antigenik HA yang menentukan pengenalan sistem imun inang (Shih dkk., 2007), sehingga jika terjadi perubahan pada domain ini akan berpengaruh terhadap respon imun inang. Beberapa bagian pada permukaan protein HA lebih mudah untuk berubah dibandingkan bagian yang lain. Beberapa studi menyebutkan bahwa sebanyak 35% substitusi nukleotida terjadi adalah hanya 18 dari 329 kodon pada virus H5 (Ferguson dkk, 2003). Letak dari 18 mutasi ini pada lima tempat perlekatan antibodi atau epitop pada molekul HA (Treanor, 2004) sehingga *antigenic drift* yang terjadi tidak netral dan mempunyai akibat yang nyata terhadap kemampuan protein dalam melakukan *binding* terhadap antibodi netralisasi (Finkenstadt dkk., 2005; Koelle dkk., 2006).

Data hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jika pemerintah Indonesia masih menggunakan vaksinasi dalam strategi pengendalian penyakit AI, pemerintah harus selalu melakukan perubahan terhadap bibit vaksin sesuai dengan virus yang bersirkulasi di lapang yaitu setidaknya setiap 2 tahun dan rutin memonitoring dinamika virus AI dilapangan untuk mengetahui kecocokan antara virus bibit vaksin dengan virus yang sedang bersirkulasi di lapang.

5.2. Karakter Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 Asal Unggas disekitar kasus Manusia Terinfeksi Virus H5N1

Glikoprotein permukaan virus AI terutama hemagglutinin (HA) berperan sangat penting dalam infeksi (Garten dan Klenk, 1999; Steinhauer dan Holland., 1987). Infeksi diawali dengan pengikatan virus pada reseptor sel dan menyebabkan lepasnya viral RNP setelah proses endositosis (White dkk., 1982). Perbandingan sekuen asam amino antara virus avian influenza avirulen dan virulen telah menunjukkan bahwa HA dengan *cleavability* yang terbatas (tipe avirulen) biasanya mempunyai asam amino arginin tunggal (R) sedangkan tipe virulen dengan *cleavability* yang tinggi mempunyai rangkaian residu asam amino basa pada *upstream* dari *cleavability site* (Bosch dkk., 1981).

Berdasarkan sekuen asam amino pada *cleavage site* HA, enam virus yang digunakan pada penelitian ini mempunyai rangkaian asam amino yang menandakan virus termasuk kelompok *highly pathogenic*. Empat virus AI yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai substitusi pada posisi -6 protein HA1 yaitu R→S, satu virus R→G, sedangkan satu virus lainnya tidak mengalami substitusi. Variasi pada motif dapat terjadi berkaitan dengan geografi asal isolat, tidak dihubungkan dengan perubahan virulensi dan infeksi pada manusia (*Writing Committee of Second World Organization Consultation*, 2008). Virus yang dianalisis pada penelitian ini tidak mengalami mutasi pada asam amino posisi 222 dan 224 sehingga masih mengenal *avian receptor* ($\alpha 2,3$) dan belum mengenal *human receptor* ($\alpha 2,6$) (Stevens dkk., 2006). Substitusi sebuah asam amino pada protein hemagglutinin dapat mengubah spesifisitas pengikatan *sialyl-*

linkage Neu5Ac2-3Gal (Ac2-3) menjadi Neu5Ac2-3Gal (Ac2-6) atau sebaliknya. Substitusi Ser205Tyr yang terletak pada antigenik D dari hemagglutinin virus H3 (jaraknya jauh dari *reseptor binding site*), menghasilkan perubahan spesifisitas pengikatan reseptor dari 2-3 ke 2-6. Perubahan Leu226Gln pada *pocket reseptor binding site* juga mengubah spesifisitas pengikatan reseptor 2-6 ke 2-3. Perubahan ini sangat penting karena berpengaruh pada kemampuan infeksi virus pada inangnya. Pada penelitian ini, dikarenakan virus masih mengenal *avian reseptor* (Ac2-3) sehingga infeksi pada manusia kemungkinan tertular dari unggas yang terlebih dahulu terinfeksi virus H5N1.

Pada protein HA, penambahan atau pengurangan tempat glikosilasi berperan penting dalam menentukan karakteristik morfologi dari virus, antigenisitas dan berpengaruh terhadap pemilihan galur vaksin, meskipun perannya dalam penyakit belum diketahui (Bean dkk., 1985). Lima dari enam virus dalam penelitian ini memiliki tempat glikosilasi pada posisi 154-156 yang serupa dengan virus H5N1 genotipe Z lainnya yang diisolasi di Hong Kong pada akhir tahun 2002, dan akhir tahun 2003-2004 yang diisolasi di Indonesia, Thailand, Vietnam dan Propinsi Yunnan dan Cina. Glikosilasi pada posisi ini, berdekatan dengan pengikatan reseptor dan situs antigenik pada struktur berbentuk bulat molekul HA virus influenza, yang mampu mengubah tempat pengikatan reseptor yang membantu menghindar dari respon antibodi (Li dkk., 2004). Virus Pessel/BPVVRII/07 tidak mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 154-156, yang disebabkan adanya mutasi pada asam amino urutan 156 yaitu T menjadi A.

Pada protein NA, semua virus H5N1 Indonesia mempunyai delesi 20 asam amino pada regio *stalk* yaitu pada posisi 48-67. Tempat glikosilasi pada regio *stalk* dari protein neuraminidase berperan dalam menjaga struktur tetramer dari protein (Luo dkk., 1993). Semua virus pada penelitian ini tidak mempunyai tempat glikosilasi pada *stalk* protein neuraminidase karena delesi di daerah ini. Delesi pada daerah ini akan meningkatkan retensi virion pada membran plasma (Matrosovich dkk., 1999).

Pada protein M1, interaksi M1 dengan RNP telah dipelajari secara ekstensif (Baudin dkk., 1980; Ruigrok dan Baudin, 1995; Schulze, 1972; Ye dkk., 1999). Dua domain dalam M1 disebutkan mempengaruhi asosiasi dengan RNA (Ye dkk., 1999; Ye dkk., 1987). Domain pertama adalah RNA *binding domain* yang mengandung sebuah motif *zinc finger* (C-148C ---- HH162), yang berasosiasi dengan ion *zinc* (Elster dkk., 1997) dan menghalangi replikasi virus (Nasser dkk., 1996). Pada penelitian dari 20 isolat virus yang digunakan 19 isolat menunjukkan motif *zinc finger* yaitu 148CATCEQIADSQHRSH162 dan satu virus yaitu Jakarta/Sum106/06 mempunyai motif 148CSTCEQIADSQHRSH162 (Gambar 25). Substitusi yang terjadi pada daerah ini belum diketahui apakah akan mempengaruhi replikasi virus.

Prediksi berdasarkan studi X-ray kristalografi (Sha dan Luo, 1997) memperlihatkan domain yang lain yaitu domain palindrom asam amino basa (101-RKCLKR-105). Domain tersebut diketahui berikatan dengan RNA virus (Elster dkk., 1997; Wakefield dan Brownlee, 1989; Ye dkk., 1987). Domain ini juga berfungsi sebagai *nuclear localization signal* (NLS) untuk M1 (Ye dkk.,

1989;Ye dkk., 1995), meskipun perannya dalam replikasi virus masih belum begitu jelas. Pada penelitian ini asam amino pada posisi 101 sampai dengan 105 adalah KKLKR sebagai NLS yang dimiliki oleh semua isolat kecuali virus DKI-Nurs/07 mempunyai V menggantikan L sehingga memiliki motif KKVKR (Gambar 25). Belum diketahui apakah terdapat pengaruh dari substitusi Leusin (L) menjadi Valin (V). Delesi RKLKR atau substitusi Lisin (K) dengan Asparagin (N) dalam RKLKR merupakan mutasi yang letal. Liu dan Ye (2002) menunjukkan yaitu delesi RKLKR dengan SNLNS dan substitusi pada posisi 102 (K102N) atau posisi 104 (K104N) akan menghasilkan virus mutasi yang letal. Liu dan Ye (2002) juga menyebutkan bahwa mutasi asam amino pada posisi 101 atau 105 dari RKLKR atau di dalam *zinc finger motif* tidak mempengaruhi ekspor nuklear RNP, hal ini dikarenakan tidak ada satupun mutasi R101S, R105S dan C148S menghasilkan mutasi yang letal.

Lima isolat virus pada analisis penjejeran asam amino protein NS1 menunjukkan adanya delesi asam amino pada posisi 80-84, sedangkan virus Pessel/BPPVR/07 tidak mempunyai delesi tersebut. Virus genotipe Z+, Z, Y, A, B dan C termasuk virus influenza Indonesia mempunyai delesi 5 asam amino tersebut yang berkontribusi terhadap peningkatan virulensi virus. Enam virus yang dianalisis dalam penelitian ini seperti virus influenza Indonesia lainnya adalah tidak mempunyai mutasi pada posisi 92, yang merupakan salah satu marker resistensi terhadap sitokin.

Gen NS menyandi protein NS1 dan NS2. Protein NS1 hanya ditemukan dalam sel terinfeksi dan mengatur berbagai fungsi sel selama infeksi (Krug dkk.,

2003). C-terminal dari virus avian influenza protein NS1 memiliki urutan konsensus dari *PDZ domain ligand* (Obenauer dkk., 2006). Motif yang dapat terikat ke PDZ mengandung protein yang terlibat dalam jalur sinyal selular inang. Virus influenza manusia memiliki berbagai motif seperti RSKV atau RSEV. Motif PDZ pada NS1 merupakan faktor virulensi baru dari virus influenza A (Jackson dkk., 2008). Pada penelitian ini, empat dari enam virus yang digunakan mempunyai motif ESEV yang menunjukkan bahwa virus berasal dari spesies unggas. Dua virus lainnya mempunyai motif yang berbeda. Virus Inhu/BPPVR11/07 menunjukkan motif KSEV seperti halnya motif PDZ dari virus influenza 1918. Suatu hal yang tidak diduga sebelumnya bahwa virus di Indonesia mempunyai motif PDZ yang bukan merupakan motif dari spesies unggas. Motif KSEV adalah motif yang jarang ditemukan di alam, pada tahun 2005 tercatat dua virus H5N1 Indonesia mempunyai motif tersebut adalah virus A/Ck/Indonesia/CDC24/2005 (Nomor akses GenBank CY014196) dan A/Ck/Indonesia/CDC25/2005 (Nomor akses CY014189) dan virus H5N1 2007 yang diisolasi di Arab (Monne dkk., 2008). Virus lainnya yang mempunyai motif PDZ seperti motif virus influenza manusia adalah virus Pessel/BPPVR11/07, virus ini mempunyai motif RSEV. Virus Pessel/BPPVR11/07 dan Inhu/BPPVR11/07 diisolasi dari ayam disekitar kasus infeksi virus AI H5N1 pada manusia ternyata mempunyai karakter genetik pada NS1 yang menarik yang mungkin berkorelasi dengan adaptasi dari virus pada manusia. Belum diketahui apakah motif pada virus Pessel/BPPVR11/07 dan Inhu/BPPVR11/07 berakibat pada virulensi atau adaptasi virus pada manusia sehingga diperlukan studi lebih lanjut.

Delesi pada posisi 80-84 ditemukan pada lima dari enam virus, kecuali virus Pessel/BPPVR11/07. Delesi residu lima asam amino pada posisi tersebut berkontribusi untuk meningkatkan virulensi (Long dkk., 2008). Beberapa studi juga melaporkan bahwa protein NS1 protein juga berkaitan dengan virulensi dan rentang inang berbagai virus influenza pada hewan model yang berbeda (Li dkk., 2006; Quinlivan dkk., 2005; Seo dkk 2002; Solorzano dkk., 2005). Virus Pessel/BPPVR11/07 adalah virus tanpa delesi pada protein NS1 dan seperti virus Indonesia H5N1 lainnya, tidak mengalami mutasi pada posisi 92. Semua virus yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai asam aspartat pada posisi 92 bukan asam glutamat pada molekul NS1. Virus influenza H5N1 yang ditransmisikan pada manusia di Hong Kong tahun 1997 memiliki asam glutamat pada posisi 92 yang merupakan faktor penting dalam virulensi dan resistensi terhadap sitokin pada babi (Seo dkk., 2002). Namun, virus H5N1 dengan amino residu ini tidak lagi beredar di alam dan asam glutamat tidak ditemukan pada protein NS1 virus influenza tipe A.

Virus Pessel/BPPVR11/07 pada analisis filogenetika berkelompok dengan virus HK/497/97 dan HK/498/97 yang merupakan virus H3N2. Selain itu, virus Pessel/BPPVR11/07 dan Hong Kong virus H3N2 mempunyai 8 asam amino yang mirip yaitu asam amino pada posisi 22, 70, 81, 114, 127, 207, 215 dan 227. Analisis ini menunjukkan bahwa virus Pessel/BPPVR11/07 memiliki HA, NA dan M yang berasal dari virus H5N1 Indonesia sedangkan protein NS1 berasal dari virus H3N2 Hong Kong. Analisis ini memperlihatkan bahwa virus Pessel/BPPVR11/07 telah mengalami *genetic reassortment* sehingga kemungkinan

virus Pessel/BPPVR11/07 adalah merupakan virus *reassortant*. Virus *reassortant* di Indonesia pernah dilaporkan oleh Yuk Lam dkk (2008) yang menganalisa data virus H5N1 Indonesia dari GenBank dan analisis Yuk Lam menyebutkan bahwa telah terjadi *reassortant* diantara virus H5N1 di Indonesia terutama pada virus H5N1 asal manusia. Yuk Lam dkk (2008) mengelompokkan virus Indonesia menjadi 3 grup, yaitu grup 1, 2 dan 3. *Reassortant* terjadi yaitu dua gen (MP dan PB1) berasal dari grup 3 sedangkan enam gen lainnya (PB2, PA, HA, NP, NA dan NS) berasal dari grup 2. *Reassortant* terjadi pada 24 dari 25 virus H5N1 manusia yang dianalisis. Yuk Lam dkk (2008) dalam penelitiannya tidak menemukan adanya virus *reassortant* antar galur atau campuran genetik dari galur yang berbeda. Hal ini sangat berbeda dengan virus *reassortant* yang ditemukan pada penelitian ini. Pada penelitian ini meskipun tidak dilakukan analisis pada empat gen lainnya yaitu (PB1, PB2, NP dan PA) berdasarkan analisis gen NS1 telah diketahui virus Pessel/BPPVR11/07 adalah virus *reassortant* yang merupakan campuran genetik antara virus galur H5N1 dengan virus influenza manusia H3N2.

Antigenic shift umumnya terjadi hanya pada virus influenza tipe A dan merupakan hasil dari penggantian HA dan sangat jarang terjadi pada NA (Cox and Subbarao, 2005). Pada penelitian ini yang mengalami *antigenic shift* pada virus Pessel/BPPVR11/07 bukan protein HA atau NA tetapi adalah protein NS1. Karakter genetik protein NS1 pada virus Pessel/BPPVR11/07 pada penelitian ini menunjukkan hal yang lebih menunjukkan kedekatan dengan virus influenza asal manusia seperti pada motif PDZ, kedekatannya dengan virus H3N2 Hong Kong dan bahkan NS1 virus Pessel/BPPVR11/07 memperlihatkan kemiripan dengan

virus H3N2 dibandingkan virus H5N1. Mutasi yang terjadi pada virus Pessel/BPPVR/07 yang merupakan mutasi *antigenic shift* memperlihatkan kemungkinan mutasi dalam hubungannya dengan adaptasi pada manusia.

Peristiwa *antigenic shift* dapat membentuk virus baru yang belum pernah ada pada dekade sebelumnya. Hal ini mempunyai akibat nyata pada peningkatan penyakit, menyebabkan pandemi atau epidemi di dunia dan mengakibatkan ratusan, ribuan bahkan jutaan manusia meninggal dunia (Treanor, 2004). *Antigenic shift* diperkirakan terjadi tiga kali setiap 100 tahun (Potter, 2001). Sejalan dengan pernyataan ini telah terjadi 3 kali pandemi pada abad 20 yaitu pada tahun 1918, 1957 dan 1968.

Proses penting yang berkontribusi pada *shift* terutama pada antigenisitas influenza adalah *genetic reassortment* (campuran dari materi genetik di antara galur yang berbeda) yang terjadi akibat sirkulasi bersama virus influenza tipe A yang berbeda subtipe, dan antara virus influenza A dan B (Lin dkk., 2004). Virus Pessel/BPPVR/07 berdasarkan pada protein NS1 diperkirakan adalah virus yang telah mengalami *genetic reassortment* karena merupakan campuran dari materi genetik di antara galur yang berbeda yaitu galur H5N1 Indonesia dan H3N2 Hong Kong.

Genetic reassortment dapat berkontribusi terhadap *antigenic drift* akan tetapi peranan utamanya adalah bertanggung jawab terhadap *antigenic shift* (Holmes dkk., 2005; Nelson dan Holmes, 2007). *Genetic reassortment* adalah bagian penting dari evolusi virus H3N2 (Schweiger dkk., 2006) yang

membutuhkan analisis komprehensif dalam hubungannya dengan komposisi vaksin (Holmes dkk., 2005; Nelson dan Holmes, 2007).

Pada penelitian ini telah ditemukannya virus Pessel/BPPVR/07 sebagai virus *reassortant* antara H5N1 dan H3N2 di Indonesia, yang kemungkinan adalah yang pertama kali dilaporkan, merupakan peringatan bahwa pemerintah harus semakin serius dalam mengendalikan penyakit ini mengingat situasi terbaru dengan terjadinya pandemi influenza novel H1N1 pada tahun 2009. Situasi virus H5N1 di Indonesia yang telah menjadi penyakit endemis memerlukan kewaspadaan kita kemungkinan adanya *genetic reassortment* antara virus H5N1 dan novel H1N1 maupun virus influenza lainnya seperti H1N1/H3N2 *seasonal flu* yang kemungkinan akan menyebabkan virus H5N1 lebih mudah beradaptasi pada manusia. Pengendalian, surveilans serta monitoring sirkulasi virus harus terus ditingkatkan dan rutin dilakukan untuk mewaspadaai timbulnya virus baru hasil *reassortment* yang kemungkinan akan lebih berbahaya dan lebih mudah beradaptasi pada manusia.

5.2.1. Unggas Air Sebagai Sumber Penularan Virus Influenza H5N1 pada manusia

Unggas air merupakan *reservoir* dari virus avian influenza. Pada unggas air, virus berada dalam keadaan seimbang dan tidak menimbulkan penyakit. Virus H5N1 terkadang hanya menimbulkan gejala klinis yang ringan pada itik, tetapi itik tetap mengekskresikan virus dalam fesesnya secara terus-menerus sehingga berpotensi menyebarkan virus bagi unggas lain dan juga manusia

(Hulse-Post dkk., 2005). Virus avian influenza sebenarnya tidak dapat bereplikasi secara efisien pada manusia (Beare dkk., 1991) dan virus influenza pada manusia tidak dapat bereplikasi secara efisien pada itik (Hinshaw dkk., 1983).

Pada penelitian ini, tiga virus yang dianalisa berasal dari unggas air yaitu entok (Jakarta/Sum106/06) dan itik (Jakarta/Slmt306/06; WJ/Bks3/07). Analisis sekuen dan filogenetika pada gen HA, NA, NS dan M memperlihatkan kedekatan genetik yang tinggi antara virus AI asal unggas air disekitar kasus AI pada manusia dengan virus H5N1 manusia. Dua dari enam virus yang digunakan memiliki kedekatan dengan virus H5N1 asal manusia yaitu virus A/Muscovy duck/West Java/Bks3/2007 mempunyai kedekatan genetik dengan CDC1031/2007 dan virus A/Muscovy duck/Jakarta/Sum106/2006 dengan CDC835/2006

Hasil analisis ini memperlihatkan bahwa unggas air dalam hal ini entok merupakan sumber penularan kepada kasus infeksi AI pada manusia. Entok sebagai *reservoir* virus ini tidak memperlihatkan gejala klinis sampai diketahui adanya kasus AI pada manusia pada lokasi tersebut (F dan R). Kasus tersebut menunjukkan bahwa unggas air peliharaan merupakan sumber infeksi H5N1 pada manusia.

5.2.2. Prediksi Kemungkinan Virus AI Yang Dapat Menginfeksi Manusia

Karakter virus AI yang menginfeksi manusia mempunyai perbedaan dengan virus AI yang hanya menginfeksi unggas, pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya empat lokasi substitusi yang khas pada protein M1. Pada protein

M1, asam amino A (posisi 37) , K (posisi 95), A (posisi 37) dan H (posisi49) merupakan asam amino yang hanya dijumpai pada virus asal manusia ataupun virus unggas yang diisolasi disekitar kasus AI manusia. Berdasarkan data tersebut virus yang diisolasi dari unggas disekitar manusia terinfeksi H5N1 diperkirakan merupakan virus yang menyebabkan infeksi pada manusia pada lokasi tersebut. Hanya virus DKI-Nurs/07 yang memiliki R pada posisi 249 menggantikan H. Virus asal unggas yang tidak menginfeksi manusia mempunyai susunan asam amino yang berbeda yaitu T, R, T dan Q pada posisi tersebut diatas.

Pada protein M2, walaupun tidak spesifik seperti pada protein M1, beberapa asam amino dimiliki secara khas oleh virus unggas disekitar kasus AI pada manusia yaitu asam amino Y (posisi 8), K (posisi 18), I (posisi 20), A (posisi 27), dan F (posisi 50), kecuali virus DKI-Nurs/07 yang hanya memiliki 2 asam amino dari motif diatas yaitu asam amino A dan F. Sebagian besar virus asal manusia mempunyai lima motif asam amino diatas, selebihnya mempunyai setidaknya dua dari lima asam amino diatas dan hanya beberapa yang mempunyai motif lainnya. Hal yang menarik adalah lima virus pav-AI yang dianalisis dalam penelitian ini juga memiliki motif pada M1 dan setidaknya tiga asam amino pada protein M2 serupa dengan motif pada virus AI asal unggas yang diisolasi dari sekitar kasus manusia terinfeksi H5N1. Apakah mutasi pada protein matrix yang terjadi pada virus pav-AI ini menunjukkan hal yang penting dalam kaitannya dengan peningkatan adaptasi ke manusia. Hal ini tentunya membutuhkan penelitian yang komprehensif untuk mendapatkan kemungkinan vaksinasi pada unggas dapat menciptakan virus yang lebih mudah beradaptasi dengan manusia.

Buckler-White dkk (1997) menyatakan bahwa gen M pada virus manusia dan hewan dibedakan dengan adanya substitusi pada protein M1 dan M2. Analisis yang dilakukan pada penelitian ini, virus H5N1 asal unggas menunjukkan substitusi asam amino yang berbeda dengan virus H5N1 asal manusia terutama virus H5N1 asal manusia tahun 2006-2007. Pada penelitian ini, enam virus H5N1 asal unggas yang diisolasi disekitar kasus infeksi H5N1 pada manusia menunjukkan hal yang menarik. Enam virus ini menunjukkan substitusi asam amino yang serupa dengan virus H5N1 asal manusia, memperlihatkan adanya perbedaan antara virus unggas yang diisolasi disekitar kasus manusia terinfeksi H5N1 (kemungkinan manusia ditempat tersebut terinfeksi oleh virus ini) dengan virus asal unggas tanpa kasus infeksi H5N1 pada manusia. Meskipun masih terlalu dini menyatakan bahwa motif substitusi yang terjadi pada protein M kemungkinan dapat dijadikan petanda untuk memprediksi apakah virus H5N1 dapat menginfeksi manusia atau tidak.

Berlainan dengan protein M1 dan M2, pada protein HA, NA dan NS tidak ditemukan perbedaan yang khas antara virus manusia ataupun unggas yang dapat menginfeksi manusia dan tidak. Hal ini semakin memperjelas bahwa protein M1 dan M2 berperan penting dalam kemungkinan memprediksi apakah virus AI kemungkinan dapat menginfeksi manusia atau tidak. Motif pada protein M ini hanya secara khas ditemukan pada virus asal Indonesia saja, belum ditemukan pada virus asal Vietnam, Thailand dan China.

Virus yang diperoleh disekitar kasus H5N1 pada penelitian ini sangat terbatas jumlahnya sehingga surveilans dan monitoring sirkulasi virus di

Indonesia antara bidang peternakan dan kesehatan diharapkan dapat dilakukan secara rutin. Sekuensing dan analisis genetik virus dari wilayah terdapat kasus infeksi H5N1 pada manusia diharapkan dapat dilakukan bersama termasuk motif asam amino pada protein M secara bersama antara virus unggas dan virus asal manusia, sehingga prediksi kemungkinan perubahan keganasan virus dapat dilakukan diharapkan dapat mengantisipasi meluasnya virus H5N1 yang dapat menginfeksi manusia di Indonesia.

5.3. Resistensi Virus AI H5N1 di Indonesia Terhadap Amantadin

Pada manusia, meskipun vaksinasi kemungkinan adalah salah satu cara untuk menurunkan penyebaran virus, pembuatan dan persiapan vaksin membutuhkan waktu lebih dari 6 bulan, sehingga obat antivirus mungkin menjadi sebuah pilihan. Terdapat dua kelompok obat yang digunakan untuk profilaksis dan pengobatan infeksi AI yaitu : M2 *ion channel blockers* (Amantadin dan derivat amantadin) dan NA inhibitor (Zanamivir dan oseltamivir). Cara kerja amantadin dan derivatnya (rimantadin) adalah menghambat aktivitas *ion channel* dari protein M2 dari virus influenza A pada saat virus masuk ke dalam sel (Wang dkk., 1993). Kelompok obat M2 *ion blockers* ini cepat mengalami mutasi dan tidak efektif terhadap virus influenza B (Hayden dan Hay., 1992; Hayden, 1996).

Messenger RNA (mRNA) protein M2 ditranskripsi dari RNA segmen 7, diturunkan dari koliner transkrip M1 dengan *splicing*. Protein M2 adalah protein membran yang memiliki domain *membran-spanning* yang juga menyediakan

sinyal untuk transpor ke permukaan sel. Adanya sejumlah besar tetramer pada permukaan sel terinfeksi dan sejumlah kecil yang ditemukan pada virion, hal ini dipercaya perannya sebagai *ion proton channel* yang dikontrol oleh pH golgi selama sintesis HA yang diikuti interior asidifikasi virion selama *uncoating* virus (Webster dkk., 1992).

Li dkk (2004) menyebutkan bahwa sebagian besar virus influenza yang diisolasi di Asia Tenggara telah resisten terhadap amantadin dan rimantadin. Amantadin dan rimantadin adalah kelompok obat antiviral yang digunakan untuk pengobatan infeksi virus influenza A yang menghambat replikasi virus pada saat stadium awal infeksi dengan menghambat *ion channel* yang dibentuk oleh protein M2. Substitusi satu dari lima asam amino (posisi 26, 27, 30, 31 dan 34) dalam domain transmembran M2 diimplikasikan dengan hilangnya sensitivitas bloker M2 (Hay dkk., 1985; Pinto dkk., 1992).

Ilyushina dkk (2005) dalam penelitiannya melaporkan tentang virus influenza A yang berpotensi menjadi pandemi yaitu (H5, H6, H7 dan H9) sepanjang tahun 1979-1983 belum terdeteksi adanya resistensi terhadap amantadin. Namun pada tahun 2000-2004 terdeteksi adanya resisten di wilayah Asia Tenggara terhadap amantadin sebanyak 31,1 % berasal dari sub tipe H5 dan 10,6% berasal dari sub tipe H9.

Penelitian tentang distribusi mutasi genetik yang berhubungan dengan resistensi derivat adamantan di antara virus yang diisolasi di Vietnam, Thailand, Cambodia, Indonesia, Hong Kong dan China menunjukkan lebih dari 95% virus yang diisolasi dari Vietnam dan Thailand mengalami mutasi di M2 yang

menunjukkan resistensi terhadap adamantane, di Indonesia dilaporkan sekitar 6,3% (2 dari 32 virus) dan China 8,9%. Mutasi terjadi umumnya pada motif Leu26Ile-Ser31Asn ditemukan di hampir seluruh isolat dari Vietnam, Thailand dan Cambodia (Cheung dkk., 2006). Di Indonesia, Smith dkk (2006) juga menyatakan bahwa virus yang berasal dari Sumatra menunjukkan mutasi Ser31Asn pada protein M2, yang mengindikasikan bahwa virus-virus tersebut telah mengalami resistensi terhadap amantadin. Hurt dkk (2007) menunjukkan bahwa sekitar 30% (2 dari 6 virus yang digunakan, berasal dari virus tahun 2005) menunjukkan resistensi terhadap adamantan.

Pada penelitian terdahulu Bright dkk., (2005., 2006) menyatakan bahwa meskipun virus H5N1 yang resisten terhadap amantadin terdapat di Asia, penyebarannya sebagian besar terjadi di Vietnam dan Thailand. Sebagian besar virus H5N1 di Indonesia dan China masih sensitif terhadap amantadin. Umumnya virus influenza (70%-80%) menunjukkan mutasi pada posisi 31 dari protein M2, sedangkan hanya sekitar 1%-2% mempunyai mutasi pada posisi 26. Mutasi yang terjadi pada dua lokasi yaitu Leu26Ile dan Ser31Asn sangat jarang ditemukan; hanya ada satu yaitu A/Swine/Scotland/410440/94 (Marozin dkk., 2002) dari 1307 publikasi yang tersedia pada *data base* sekuen virus influenza A.

Penelitian-penelitian tersebut memperlihatkan bahwa virus Indonesia masih relatif sensitif terhadap amantadin dan sedikit yang mengalami mutasi dibandingkan dengan virus dari Thailand dan Vietnam. Namun pada perkembangan selanjutnya, seperti hasil dari studi ini menunjukkan bahwa terdapat 62,58% (92/147) virus AI asal Indonesia menunjukkan mutasi pada

protein M2. Dua puluh virus yang digunakan pada penelitian ini juga tidak mempunyai sejarah penggunaan amantadin sebelumnya. Pada virus influenza asal Indonesia ditemukan mutasi ganda yang terjadi pada 10 isolat yaitu 5 dari virus asal manusia dan 5 selebihnya dari unggas (V27A dan S31N). Mutasi ganda pada virus Indonesia berdasarkan data sekuen di GenBank, pertama terjadi pada tahun 2006 yaitu pada isolat asal manusia (A/Indonesia/CDC157/2006), dan kemudian pada tahun 2007 terdapat 4 isolat asal manusia dan 2 isolat asal unggas serta pada tahun 2008 terdapat 3 isolat asal unggas yang mengalami mutasi ganda.

Pada penelitian ini yang menarik adalah virus yang mengalami mutasi ganda yang terjadi pada unggas diisolasi dari unggas yang telah melakukan vaksinasi AI secara rutin. Pada penelitian ini virus yang mengalami mutasi cukup signifikan pada gen HA, adalah lima pav-AI. Pada protein HA telah diketahui terjadinya mutasi diperkirakan akibat tekanan imunologis yang diterima oleh unggas. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa virus pav-AI juga mengalami mutasi yang signifikan pada protein M2 yaitu adanya mutasi ganda V27A dan S31N tanpa induksi pemberian amantadin sebelumnya. Mutasi spesifik yang terjadi pada gen HA dan M2 yang terjadi pada virus pav-AI menunjukkan bahwa virus pav-AI mengalami mutasi yang cukup signifikan.

Pada hasil uji *in vitro* resistensi amantadin jika dibandingkan antara isolat virus yang mengalami mutasi tunggal (V27A atau S31N) atau ganda (V27A dan S31N), serta tidak terdapat perbedaan kemampuan dalam meningkatkan titer virus, terbukti dari rerata titer yang hampir sama antara isolat virus yang mengalami mutasi tunggal ataupun ganda. Sehingga setidaknya pada penelitian ini

diketahui bahwa virus yang mengalami mutasi ganda pada protein M2 tidak lebih resisten terhadap amantadin dan mempunyai sifat resistensi yang sama pada sel MDCK dibandingkan dengan virus-virus yang hanya mengalami mutasi tunggal.

Hasil studi ini juga menunjukkan adanya peningkatan resistensi terhadap amantadin terutama pada virus-virus baru (2007-2008) dibandingkan dengan studi yang pernah dilakukan sebelumnya. Hal menarik adalah semua virus AI asal Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini termasuk 20 isolat yang diteliti menunjukkan motif mutasi yang sama yaitu pada posisi 27 dan atau 31 (V27A; S31N), serta tidak ditemukan virus yang bermutasi pada posisi 26 dan 34. Hal berbeda terjadi di Vietnam, Thailand dan Cambodia karena mutasi umumnya terjadi pada motif Leu26Ile-Ser31Asn (Le dkk., 2008).

5.4. Pengaruh Mutasi dan Perubahan Genom Virus

Virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia telah mengalami perubahan yaitu dengan adanya mutasi yang terjadi pada gen yang dianalisa pada penelitian ini yaitu HA, NA, M dan NS. Mutasi virus AI biasanya terjadi pada glikoprotein permukaan virus ini. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar virus mengalami mutasi kemungkinan akibat adanya seleksi positif dan mutasi yang tinggi terjadi pada protein HA, M dan NS. Hal ini memperlihatkan bahwa gen NA kemungkinan bukan merupakan target dari mutasi dari virus influenza yang diteliti pada penelitian ini. Mutasi virus lebih difokuskan pada protein-protein yang bertanggung jawab terhadap protein yang bertanggung jawab terhadap pengikatan reseptor (HA), virulensi (NS) dan

restriksi inang (M). Sebagai contoh, motif pada protein M1 yang khas yang ditemukan pada virus AI disekitar kasus AI pada manusia dan virus pav-AI memperlihatkan bahwa mutasi yang terjadi pada virus AI asal unggas ini ditujukan pada protein virus yang paling berlimpah dan berperan penting dalam beberapa aspek dari replikasi virus dari mulai masuknya virus dan *uncoating* sampai penyusunan dan *budding* dari pertikel virus (Lamb dan Krug, 2001; Nayak dan Hui, 2002).

Perubahan tersebut kemungkinan menghasilkan virus yang lebih dapat beradaptasi pada manusia. Hal ini diperlihatkan mutasi yang terjadi pada virus pav-AI adalah sama dengan mutasi yang terjadi pada virus AI yang diisolasi dari unggas disekitar kasus manusia dan virus H5N1 manusia di Indonesia 2006-2007. Jika yang terjadi adalah vaksinasi pada unggas ternyata menginduksi virus-virus lebih cepat bermutasi dan lebih adaptif terhadap manusia, sebaiknya kebijakan melakukan vaksinasi sebagai salah satu langkah untuk mengendalikan penyakit AI pada unggas harus dievaluasi kembali. Tindakan pemusnahan jika terjadi kasus AI pada unggas sebaiknya menjadi prioritas utama dalam program pengendalian penyakit AI.

Sampai pada tahun 2009, kejadian wabah avian influenza subtipe H5N1 pada unggas yang masih terjadi dan terjadinya pandemi yang disebabkan virus novel H1N1 yang terjadi pada tahun 2009 dikhawatirkan akan menciptakan virus *reassortant* baru di Indonesia yang lebih mudah beradaptasi dengan manusia dan lebih berbahaya. Peristiwa pandemi influenza di Asia yang terjadi pada tahun 1957 dan Hong Kong pada tahun 1968 merupakan virus *reassortant* antara virus

unggas dan manusia, yang mengindikasikan adanya introduksi gen hemagglutinin virus unggas pada populasi manusia (Guan dkk., 2004) sehingga kebijakan pengendalian AI pada unggas merupakan salah satu kunci yang penting bagi pengendalian penyakit AI pada manusia.



BAB 6

KETERBATASAN PENELITIAN

Keterbatasan dan hambatan penelitian ini adalah :

1. Virus AI mempunyai delapan gen yang menyandi sepuluh protein. Gen tersebut adalah PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M dan NS. Pada penelitian ini menganalisa gen-gen yang bertanggung jawab terhadap binding reseptor, spesifitas reseptor, patogenisitas, virulensi, dan sensitivitas terhadap amantadin yaitu gen HA, NA, M dan NS. Pada penelitian ini tidak dilakukan sekuensing pada gen yang terlibat dalam polimerase kompleks yaitu PB1, PB2, PA, dan NP.
2. Ditemukannya virus *reassortant* dan virus yang mengalami *genetic drift* memerlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan apakah mutasi-mutasi tersebut berakibat pada peningkatan keganasan virus dan kemampuan adaptasi pada manusia. Pada penelitian ini tidak dilakukan hal tersebut.
3. Untuk memperoleh virus AI subtipe H5N1 yang diperoleh disekitar kasus infeksi H5N1 cukup sulit dilakukan karena pada saat pengambilan sampel di lokasi korban seringkali ayam sudah dimusnahkan atau lingkungan telah dibersihkan dengan desinfektan sehingga tidak diperoleh virus asal unggas yang diduga menginfeksi manusia pada lokasi tersebut. Seringkali, manusia yang terinfeksi H5N1 tidak mempunyai sejarah

kontak dengan unggas sehingga pengambilan sampel pada unggas seringkali tidak memuaskan.

4. Kesulitan untuk mengkoleksi sampel dari wabah AI yang terjadi pada peternakan ayam komersil dikarenakan peternakan tersebut biasanya tidak terbuka dalam menjelaskan kondisi peternakannya. Pengambilan sampel hanya bisa dilakukan jika ada peternak yang proaktif atau petugas yang telah dipercaya oleh peternak.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Analisis molekuler pada gen HA, NA, M dan NS memperlihatkan bahwa dua puluh virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah virus avian influenza *highly pathogenic* (HPAI) berdasarkan rangkaian asam amino basa pada daerah *cleavage site* gen HA, masih mengenal *avian receptor* (α 2, 3), dan sebagian besar berasal dari unggas berdasarkan motif PDZ.
2. Analisis pada gen HA, NA, M dan NS memperlihatkan bahwa satu virus (A/Chicken/Pessel/BPPVR11/07) diperkirakan virus *reassortant* karena mengalami *genetic shift* antara virus H5N1 Indonesia dengan virus H3N2 asal Hong Kong.
3. Analisis molekuler pada motif PDZ protein NS1 memperlihatkan bahwa dua virus mempunyai motif manusia yaitu virus A/Chicken/Inhu/BPPVR11/07 dan virus A/Chicken/Pessel/BPPVR11/07.
4. Gambaran molekuler duapuluh virus yang digunakan memperlihatkan bahwa sebagian besar mutasi yang terjadi akibat seleksi positif pada protein hemagglutinin, matrix dan non struktural bukan pada protein neuraminidase.
5. Analisis molekuler pada gen HA, NA, M dan NS menunjukkan bahwa virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia telah bermutasi dan virus AI

- subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI mengalami mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan virus AI subtipe H5N1 asal unggas pada umumnya.
6. Virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI khususnya yang diisolasi pada tahun 2008 memiliki substitusi asam amino yang khas pada protein HA, NA, M dan NS serta secara molekuler berbeda dengan virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia lainnya.
 7. Virus avian influenza subtipe H5N1 asal unggas yang diisolasi di sekitar kasus infeksi AI H5N1 pada manusia memiliki petanda molekuler yaitu adanya substitusi asam amino spesifik pada protein M yang juga ditemukan pada virus asal unggas yang divaksinasi AI dan virus AI H5N1 asal manusia di Indonesia pada tahun 2006-2007.
 8. Kemiripan genetika pada protein M virus avian influenza subtipe H5N1 asal unggas yang divaksinasi AI dengan virus asal unggas yang diisolasi di sekitar kasus infeksi AI H5N1 pada manusia dan virus AI H5N1 asal manusia di Indonesia pada tahun 2006-2007 memperlihatkan adanya suatu proses adaptasi virus AI subtipe H5N1 asal unggas pada manusia.
 9. Sebanyak 62,58% virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia menunjukkan resistensi terhadap amantadin dan mutasi terjadi pada posisi 27 (Val→ Ala/Thr; V27A) atau 31 (Ser→Asn/Arg; S31N) atau dapat terjadi pada kedua posisi tersebut dan tidak dapat dihambat dengan amantadin dosis tinggi yaitu 8 µg/ml pada sel MDCK.

7.2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka diajukan saran sebagai berikut :

1. Analisis yang dilakukan pada gen HA, NA, M dan NS pada penelitian ini dan ditemukannya motif asam amino tertentu pada gen M dan NS1 serta virus *reassortant* pada penelitian ini, menunjukkan adanya kemungkinan usaha virus untuk beradaptasi pada manusia sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut pada gen-gen yang lainnya untuk mengetahui patogenisitas dan kemampuan virus dalam menginfeksi manusia.
2. Melakukan monitoring situasi virus avian influenza H5N1 pada unggas dan manusia secara berkelanjutan untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada virus avian influenza.
3. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa virus H5N1 Indonesia telah bermutasi sehingga peran surveilans sangat penting untuk pengkajian vaksin. Pemantauan dan evaluasi vaksin harus dilakukan secara terus menerus untuk menentukan pemilihan dan produksi vaksin. Kebijakan pemerintah Indonesia yang menggunakan vaksin H5N1 isolat lokal kemudian beralih menjadi H5N2 dalam menanggulangi AI pada unggas sebaiknya dikaji ulang.
4. Jika pemerintah Indonesia masih menggunakan strategi vaksinasi pada unggas untuk mengendalikan penyakit AI, maka monitoring sirkulasi virus di lapangan harus terus dilakukan untuk mengetahui karakter terkini dari

virus AI dan evaluasi bibit vaksin harus disesuaikan dengan virus yang bersirkulasi di lapangan.

5. Melakukan penelitian dengan cakupan virus AI yang lebih banyak untuk mengkonfirmasi variasi genetik dan antigenik pada virus AI di Indonesia terutama yang berasal dari peternakan unggas yang melakukan vaksinasi AI dan virus AI asal unggas yang diisolasi disekitar kasus H5N1 pada manusia dalam rangka mengantisipasi munculnya virus AI H5N1 yang lebih berbahaya dan dapat beradaptasi pada manusia.
6. Tindakan pemusnahan (*stamping out*) sebaiknya dijadikan prioritas utama dalam mengendalikan penyakit AI pada unggas untuk memutus rantai penyebaran dan siklus hidup virus.
7. Surveilans dan monitoring sirkulasi virus di Indonesia antara bidang peternakan dan kesehatan diharapkan dapat dilakukan secara rutin, sehingga sekuensing dan analisis genetik virus dari wilayah kasus diharapkan dapat dilakukan bersama termasuk motif asam amino pada protein M secara bersama antara virus unggas dan virus asal manusia, sehingga prediksi kemungkinan perubahan keganasan virus dapat dilakukan diharapkan dapat mengantisipasi meluasnya virus H5N1 yang dapat menginfeksi manusia di Indonesia.

BAB 8

DAFTAR PUSTAKA

- Arzt, S., Baudin, F., Barge, A., Timmins, P., Burmeister, W.P., and Ruigrok, R.W.H. 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology*. 279 : 439–446.
- Allen, H., McCauley, J., Waterfield, M., and Gething, M.J. 1980. Influenza virus RNA segment 7 has the coding capacity for two polypeptides. *Virology*. 107:438-442.
- Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W., and Ruigrok, R.W.H. 2001. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* 281:102–108.
- Bean, W.J., Kawaoka, Y., Wood, J.M., Pearson, J.E., and Webster, R.G. 1985. Characterization of virulent and avirulent A/Chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: Potential role of defective interfering RNAs in nature. *J. Virol.* 54 : 151-160.
- Beare, A.S., and Webster, R.G. 1991. Replication of avian influenza viruses in human. *Arch. Virol.* 119: 37-42.
- Belshe, R. B., Smith, M.H, Hall, C.B., Betts, R., Hay, A.J. 1988. Genetic basis of resistance to rimantadine e.merging during treatment of influenza virus infection. *J Virol*; 62: 1508–12.
- Bender, C., Hall, H., Huang, J., Klimov, A., Cox, N., Hay, A., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W., and Subbarao, K. 1999. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997–1998. *Virology*. 254:115–123.
- Bergmann, M., Romirer, I., Sacht, M., Fleischhacker, R., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jakesz, R., and Muster, T. 2001. A genetically engineered influenza A virus with rasdependent oncolytic properties. *Cancer Res.* 61 : 8188–8193.
- Betakova, T., Nermt, M.V., and Hay, A.J. 1996. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *J. Gen. Virol.* 77.2689-94.
- Boni, M.F., Grog, J.R., Andreasen, V., and Christiansen, F.B. 2004. Influenza drift and epidemic size : the race between generating and escaping immunity. *Theor. Popul. Boil.* 65. 2 : 179 – 191.
- Bornholdt, Z. A and Prasad, B.V. 2006. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat Struct Mol Biol.* 13: 559–560.
- Bosch, F.X., Orlich, M., Klenk, H.D., and Rott, R. 1979. The structure of hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology*. 95. 197-207
- Bosch, F.X., Garten, Klenk, H.D., and Rott, R. 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting

- peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology*. 113 : 725-735
- Brassard, D.L., Leser, G.P., and Lamb, R.A. 1996. Influenza B NB glycoprotein is a component of virions. *Virology*. 220:350-60
- Bright, R.A., Shay, D.K., Shu, B., Cox, N.J., Klimov, A.I. 2006. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 295-891
- Bright RA, Marie-jo, M., Xu X, Perez-Orozco, G., Wallis, T.R, Davis, X.M., Povinelli L., Cox, N.J, and Klimov, A.I. 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005 : a cause for concern. *Lancet* 366 : 1175-81
- Buckler-White, A.J., Naeve, C.W., and Murphy, B.R. 1986. Characterization of gene coding for M protein which is involved in host range restriction of an avian influenza A virus in monkeys. *J. Virol*. 57: 697-700
- Bunkrinskaya, A.G., Vorkunova, N.K., Kornilayeva, G.V., Narmanbetakova, R.A and Vorkunova, G.K. 1982. Influenza virus uncoating in infected cells and effect of rimantadine. *J. Gen. Virol*. 60 : 49-59
- Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Cases of influenza A (H5N1)—Thailand 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 53:100–103.
- Chen, H., Smith, G. J., Li, K. S., Wang, J., Fan, X. H., Rayner, J. M. Vijaykrishna, D., Zhang, J. X., Zhang, L. J., Guo, C. T., Cheung, C. L., Xu, K. M., Duan, L., Huang, K., Qin, K., Leung, Y. H., Wu, W. L., Lu, H. R., Chen, Y., Xia, N. S., Naipospos, T. S. P., Yuen, K. Y., Hassan, S. S., Bahri, S., Nguyen, T. D., Webster, R. G., Peiris, J. S., and Guan, Y. 2006. Establishment of multiple sub-lineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2845–2850
- Cheung, C.L., Rayner, R.M., Smith, G.J.D., Wang, P., Naipospos, T.S.P., Zhang, J., Yuen, K.Y., Webster, R.G., Peiris, J.S.M., Guan, Y., and Chen, H. 2006. Distribution of amantadine-resistant H5N1 Avian Influenza variants in Asia. *The Journal of Infectious Diseases*. 193: 1626-1629
- Cheung, C. Y., Poon, L.L., Lau, A.S., Luk, W., Lau, Y.L., Shortridge, K.F., Gordon, S., Guan, Y., and Peiris, J.S.M. 2002. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet*. 360 : 1831–1837.
- Chien, C. Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J.M., Sahasrabudhe, P.V., Krug R.M., and Montelione, G.T. 2004. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry*. 43 : 1950–1962.
- Chien, C. Y., Tejero, R., Huang, Y., Zimmerman, D.E., Rios, C.B., Krug, R.M., and Montelione, G.T. 1997. A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nat Struct Biol*. 4 : 891–895.

- Choppin, P. W., Compans, R. W., Scheild, A., Mcsharry, J., and Lazarowitz, S. 1972. Structure and assembly of viral membranes. p. 163-179. In C. F. Fox (ed.), *Membrane research*. Academic Press, Inc., New York.
- Chotpitayasunondh, T., Ungehusak, K., Hanshaoworakul, W., Chunsuthiwat, S., and Sawanpanyalert, P. 2005. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand. 2004. *Emerging Infect. Dis.* 11: 201-209.
- Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F., and Webster, R. G. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 351:472-477.
- Compans, R.W., Bishop, D.H.L and Meier-Ewert, H. 1977. Structural components of influenza C viruses. *J. Virol.* 21 : 658-665
- Colman, P.M. 1989. Neuraminidase : Enzyme and antigen. In : R.M.Krug (ed). *The influenza viruses*, pp. 175-218. Plenum Press. New York London.
- Cox, N.J and Subbarao, K. 2005. Global epidemiology of influenza : past and present. *Annu. Rev.Med.* 51 : 407 - 421
- Desselberger, U., Racainello, V.R., Zazra, J.J., and Palase, P. 1980. The 3' and 5' terminal sequences of influenza A,B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementary. *Gene.* 8:315-28
- Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Wiyono, A., Indriani, R., dan Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode reverse transcripatese polimerase chain reaction RT-PCR. *JITV.* 9. 2 : 136-143
- Dharmayanti, NLP.I., Indriani, R., Damayanti, R., dan Wiyono, A. 2005a. Isolasi dan identifikasi wabah avian influenza pada bulan Oktober 2004 – Maret 2005 di Indonesia. *J Biol Indon.* 9: 341-350
- Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Indriani, R., Wiyono, A., dan Adjid, R.M.A. 2005b. Karakterisasi molekuler virus avian influenza isolat indonesia pada wabah oktober 2003-2004. *JITV.* 10. 2 : 127-133
- Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Indriani, R., Wiyono, A., dan Adjid, R.M.A. 2005c. Studi avian influenza di Indonesia : Karakter virus avian influenza isolat indonesia pada wabah gelombang kedua. *JITV.* 10 : 217-226
- Dharmayanti, N.L.P.I., dan Indriani, R. 2007. Patogenesis molekuler virus avian influenza yang diisolasi pada tahun 2005. *MKH.* 23. 2 : 68-73
- Dharmayanti, Indriani, R., dan Darminto. 2006. Laporan akhir penelitian tahun 2006. Bbalitvet. Bogor
- Damayanti, R, Dharmayanti, N.L.P. I., Indriani, R., Wiyono, A., dan Darminto. 2004a. Deteksi antigen H5N1 pada organ ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) pada kasus wabah di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan teknik imunohistokimia. *JITV.* 9. 3 : 197-203
- Damayanti, R, Dharmayanti, N.L.P. I., Indriani, R., Wiyono, A., dan Darminto. 2004b. Gambaran klinis dan patologis ayam yang terserang flu burung

- sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV*. 9.2 :128-135
- Dittmann, J., Stertz, S., Grimm, D., Steel, J., Garcia-Sastre, A., Haller, O., and Kochs, G. 2008. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J Virol*. 82: 3624–3631.
- Dolin, R., Reichman, R.C., Madore, H.P., Maynard, R., Linton, P.N., and Webber-Jones, J. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N Engl J Med* 1982; **307**: 580–84
- Donelan, N. R., Basler, C.F., and Garcia-Sastre, A. 2003. A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J Virol*. 77 : 13257–13266.
- DW. 2005. [File://A:/DW World OR-ancaman wabah flu burung. Htm](#) (15 Maret 2005).
- Egorov, A., Brandt, S., Sereinig, S., Romanova, J., Ferko, B., Katinger, D., Grassauer, A., G. Alexandrova., H. Katinger and T. Muster. 1998. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol*. 72 : 6437–6441.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J.G., Schmolke, M., and Ludwig, S. 2007. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol*. 81 : 3058–3067.
- Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *J Gen Virol*. 78: 1589–1596.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences : Inferences and realibility. *Annu. Rev. genet.* 22: 521-565
- Felsenstein, J. 1996. Inferring phylogeny from protein sequences by parsimony, distance and likelihood methods. *Methods Enzymol*. 266 : 268-382
- Feng, D.F and Doolittle, R.F. 1996. Progressive alignment of amino acid sequences and construction of phylogenetic trees from them. *Methods Enzymol*. 266 : 368-382
- Fernandez-Pol, J. A., Hamilton, P.D., and Klos, D.J. 2001. Essential viral and cellular zinc and iron containing metalloproteins as targets for novel antiviral and anticancer agents: implications for prevention and therapy of viral diseases and cancer. *Anticancer Res*. 21: 931–957.
- Ferguson, N.M., Galvani, A.P., and Bush, R.M. 2003. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature*. 422. 6930 : 428 - 433
- Finkenstadt, B.F., Morton, A and Rand, D.A. 2005. Modelling antigenic drift in weekly flu incidence. *Statist. Med*. 24. 22 : 3447 – 3461
- Fitch, W.M and Margoliash, E. 1987. Construction of phylogenetic trees. *Science*. 155: 279-284.

- Fitch, W.M., Leiter, J.M., Li, X.Q., and Palese, P. 1991. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88. 10 : 4270 - 4274
- Fouchier, R.A.M., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van der Kemp, L., Rimmelzwaan, G.F., and Osterhaus, A.D.M.E. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.* 38. 11 : 4096 - 4101
- Fouchier, R.A.M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., and Osterhaus, A.D.M.E. 2005. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 79.5 : 2814-2822
- Garaigorta, U and Ortin, J. 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res.* 35 : 4573-4582.
- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., and Esteban, M. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:1032-1060.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P., and Muster, T. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* 252 : 324-330.
- Garten, W and Klenk, H.D. 1999. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 7: 99-100.
- Guan, Y., Poon, L.L.M., Cheung, C.Y., Ellis, T.M., Lim, W., Lipatov, A.S., Chan, K.H., Strum-Ramirez, K.M., Cheung, C.L., Leung, Y.H.C., Yuen, K.Y., Webster, R.G., and Peiris, J.S.M. 2004. H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *PNAS.* 102. 21: 8156-8161
- Gunther, I., Glatthaar, B., Duller, G., and Garten, W. 1993. A H1 hemagglutinin of a human influenza A virus with a carbohydrate-modulated receptor binding site and an unusual cleavage site. *Virus Res.* 27. 147-160
- Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., Koerner, I., Martinez-Sobrido, L., Solorzano, A., Garcia-Sastre, A., Haller, O., and Kochs, G. 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 : 6806-6811.
- Hale, B. G., Barclay, W.S., Randall, R.E., and Russell. R.J. 2008a. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology.* 378 : 1-5.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., and Jackson, D. 2008b. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 89: 2359-2376
- Hatada, E., Saito, S., and Fukuda, R. 1999. Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol.* 73 : 2425-2433.

- Harris, A., Forouhar, F., Qiu, S., Sha, B., and Luo, M. 2001. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology*. 289 : 34-44.
- Hatada, E. and Fukuda, R. 1992. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol*. 73 : 3325-3329.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J and Smith, M.H. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*. 4 : 3021-3024
- Hay, A.J., Zambon, M.C., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., Smith, M.H. 1986. Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J Antimicrob Chemother*; (8 (suppl B): 19-29.
- Hay, A.J., Gregory, V., Dauglas, A.R., Lin, Y.P. 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B : Biol Sci*. 356. 1416 : 1861 = 1870.
- Hayden, F.G., and Hay, H.J. 1992. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr.Top.Microbiol.Immunol*.176:119-130
- Hayden, F.G. 1996. Amantadine and Rimantadine-clinical aspects, P. 59-77. In : D.D.Richman (ed). *Antiviral Drug resistance*. John Willey and Sons, Ltd., New York, N.Y.
- Hien, T.T., Liem, N.T., Dung, N.T, San, L.T, Mai, P.P., Chau, N.V.V., Suu, P.T., Dong, V.C., Mai, L.T.Q., Thi, N.T., Khao, D.B., Phat, L.P., Thruong, N.T., Long, H.T., Tung, C.V., Giang, L.T., Tho, N.D., Nga, L.H., Tien, N.T.K., San, L.H., Tuan, L.V., Dolecek, C., Thanh, T.T., de Jong, M., Schultsz, C., Ceng, P., Lim, W., Horby, P., Farrar, J. 2004a. Avian influenza (H5N1) in 10 patient in Vietnam. *N. Engl. J. Med*.350. 1179-1188
- Hien, T. T., de Jong, M., and Farrar, J. 2004b. Avian influenza - a challenge to global health care structures. *N. Engl. J. Med*. 351:2363-2365.
- Hinshaw, V.S., Webster R.G., Naeve, C.W., and Murphy, B.R. 1983. Altered tissue tropism of human-avian reassortant influenza viruses. *Virology*. 128. 8041-8046
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., and Perez, D.R. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol*. 146: 2275-2289.
- Holmes, E.C., Ghedin, E., Miller, N., Taylor, J., Bao, Y., St. George, K., Grenfell, B.T., Salzberg, S.L., Fraser, C.M., David J. Lipman, D.J., and Jeffery K. Taubenberger, J.K. 2005. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol*. 2005. 3. 9 : e300
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and VandePol, S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 215: 1577-1585
- Herrler, G., Compans, R.W., and Meier-Ewart, H.. 1979. A precursor glycoprotein in influenza C virus. *Virology*. 99: 49-56

- Herrler, G., A.Nagele, H. Meier-Ewart, and A.S.Bhown. 1981. Isolation and structural analysis of influenza C virion glycoprotein. *Virology*. 113 : 439-51
- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.D., Muller, H.P., Shukla, A.K., and Schauer, R. 1985. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J.* 4: 1503-6
- Hongo, S., Sugawara, K., Muraki, Y., Kitame, F., and Nakamura, K. 1997. Characterization of second protein (CM2) encoded by RNA segment 6 of influenza C virus. *J. Virol.* 71 : 2786-2792.
- Horisberger, M.A. 1980. The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology*. 107: 302-305
- Hui, E. K.-W., Barman, S., Yang, T.Y., and Nayak, D.P. 2003. Basic residues of the helix six domain of influenza virus M1 involved in nuclear translocation of M1 can be replaced by PTAP and YPDL late assembly domain motifs. *J Virol.* 77: 7078-7092.
- Hurt, A.C., Selleck, P., Komadina, N., Shaw, R., Brown, I.G.Barr, L. 2007. Susceptibility of highly pathogenic A (H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. 2007. *Antiviral Research*. 73. 228-231
- Hyland, L., Webby, R., Sandbulte, M.R., Clarke, B., and Hou, S. 2006. Influenza virus NS1 protein protects against lymphohematopoietic pathogenesis in an in vivo mouse model. *Virology*. 349 : 156-163.
- Ilyushina, N.A., Govorkova, E.A., and Webster, R.G. 2005. Detection of amantadine-resistant variant among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology*. 341 : 102-106
- Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C.M., and Almond, J.W. 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 : 3790-3794.
- Iuchi, S. 2001. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci.* 58: 625-635.
- Jackson D, Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R., Lamb, R.A. 2008. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci* .105: 4381-4386.
- Judd, A. K., Sanchez, A., Bucher, D.J., Huffman, J.H., Bailey, K., and Sidwell, R.W. 1997. In vivo anti-influenza virus activity of a zinc finger peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 41 : 687-692.
- Katz, J. M., Lü, X., Frace, A.M., Mörken, T., Zaki, S. R., and Tumpey, T. M. 2000. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses. *Biomed. Pharmacother.* 54:178-187.
- Kates, M., C.Allison, A., Tyrell, D.A., and James, A.T. 1962. Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 27. 293-301
- Kawaoka, Y., Yamnikova, S., Chambers, T.M., Lvov, D.K., and Webster, R.G. 1990. Molecular characterization of a new hemagglutinin subtype H14 of influenza A virus. *Virology*. 179. 759-767

- Kawaoka, Y., Naeve, C.W., and Webster, R.G. 1984. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with a loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology*. 139. 303-316.
- Kendal, A.P. 1975. A comparison of influenza C with prototype myxovirus receptor-destroying activity (neuraminidase) and structural polypeptides. *Virology*. 65: 87-99.
- Kitame, F., Suguwara, K., Ohwada, K., and Homma, M. 1982. Proteolytic activation of haemolysis and fusion by influenza C virion. *Arch Virol*. 73.757-61
- Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M., and Blodorn, J. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. 68. 426-429.
- Lazarowitz, S.G and P.W. Choppin. 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*. 68. 440-454
- Kochs, G., Koerner, I., Thiel, L., Kothlow, S., Kaspers, B., Ruggli, N., Summerfield, A., Pavlovic, J., Stech, J., and Staeheli, P. 2007. Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J Gen Virol*. 88 : 1403–1409.
- Koelle, K., Cobey, S., Grenfell, B., and Pascual, M. 2006. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in human. *Science*. 2006. 314 : 1898 – 1903.
- Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., Van der Nat, H., Vennema, A., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A and Bosman, A. 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in Netherlands. *Lancet*. 363 : 587 - 593
- Krug, R.M., and Etkind, P.R. 1973. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology*. 56 : 334 - 338
- Krug, R.M., Yuan, W., Noah, D.L., and Latham, A.G. 2003. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*. 309:181–189.
- Kurokawa, M., Koyama, A.H., Yasuoka, S., and Adachi, A. 1999. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int J Mol Med*. 3 : 527–530.
- Lam, W. Y., Tang, J.W., Yeung, A. C., Chiu, L.C., Sung, J.J., and Chan, P.K. 2008. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. *J Virol*. 82 : 2741–2751.
- Lamb, R. A and Choppin, P.W. 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76 : 4908–4912.
- Lamb, R. A. and Lai, C.J. 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21. 475–485.
- Lamb, R. A., Choppin, P.W., Chanock, R.M., and Lai, C.J. 1980. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77: 1857–1861

- Lamb, R.A., Lai, C.J., and Choppin, P.W. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus : coliner and intereupted mRNA code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 78. 4170 – 4174.
- Lamb, R. A., and C.-J. Lai. 1981. Conservation of influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains. *Virology* 112:746-751.
- Lamb, R. A., Zebedee, L. S., and Richardson, C. D. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. *Cell.* 40:627-633.
- Lamb, R. A. 1989. The genes and proteins of the influenza viruses, p. 1-87. In R. M. Krug (ed.), *The influenza viruses*. Plenum Press, New York.
- Lamb, R. A. and Krug, R.M. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, pp. 725–769. Edited by D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Lazarowitz, S.G. and Choppin, P.W. 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A dan B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology.* 68 : 440 - 454
- Le, M.T.Q., Wertheim, H.F L., Nguyen, H.D., Taylor, W., Hoang, P.V. M., Vuong, C.D., Nguyen, H.L. K., Nguyen, H.H., Nguyen, T.Q., Nguyen, T.V., Van, T.D., Ngoc, B. T., Bui, T.N., Nguyen, B.G., Nguyen, L. T., Luong, S.T., Phan, P.H., Pham, H.V., Nguyen, T., Fox, A., Nguyen, C.V., Do, H.Q., Crusat, M., Farrar, J., Nguyen, H.T., de Jong, M. D., and Horb, P. 2008. Influenza A H5N1 Clade 2.3.4 Virus with a Different Antiviral Susceptibility Profile replaced Clade 1 Virus in Humans in Northern Vietnam *Plos ONE.* www.plosone.org.
- Lee, M.S., Chang, P.C., Shien, J.H., Cheng, M.C., and Shieh, H.P. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J.Virol. Methods.* 97: 13-22.
- Lever, W.G. 1978. Crystallization and peptide maps of neuraminidase heads from H2N2 and H3N2 influenza virus strains. *Virology.* 137. 314 - 324
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J.D., Xu, K.M., Duan, L., Ronohardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L.M., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G., and Peiris, J.S.M. 2004. Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 340: 209-213.
- Li, S., Min, J.Y., Krug, R.M., and Sen, G.C. 2006a. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology.* 349 : 13–21.
- Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, A. Wang, F. Zhao, G. Tian, X. Wang, K. Yu, Z. Bu, and H. Chen. 2006b. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.* 80: 11115–11123.

- Lin, Y.P., Gregory, V., Bennett, M., and Hay, A. 2004. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res.* 103 : 47 - 52
- Lipatov, A. S., Andreadsky, S., Webby, R.J., Hulse, D.J., Rehg, J.E., Krauss, S., Perez, D.R., Doherty, P.C., Webster, R.G., and Sangster, M.Y. 2005. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol.* 86 : 1121–1130.
- Liu, J., Lynch, P.A., Chien, C.Y., Montelione, G.T., Krug, R.M., and Berman, H.M. 1997. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol.* 4 : 896–899.
- Liu, T and Ye, Z. 2002. Restriction of Viral Replication by Mutation of the Influenza Virus Matrix Protein. *J Virol.* 76. 24 : 13055–13061
- Long, J. X., Peng, D.C., Liu, Y.L., Wu, Y.T., and Liu, X.F. 2008. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes.* 36 : 471–478.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M.G., and Krug, R.M. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology.* 214 : 222–228.
- Ludwig, S., Schultz, U., Mandler, J., Fitch, W.M. and Scholtissek, C. 1991. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology.* 183 : 566–577.
- Ludwig, S., Wang, . X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G., and Wolff, T. 2002. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol.* 76 : 11166–11171
- Luo, G., Chung, J., and Palese, P. (1993). Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: Deletions and insertions. *Virus Res.* 29. 141-153
- Marozin, S., Gregory, V., Cameron, K., Bennett, M., Valette, M., Aymard, M., Foni, E., Barigazzi, G., Lin, Y., and Hay, A. 2002. Antigenic and genetic diversity among swine influenza H1N1 and N1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol* 83 : 735-45
- Min, J. Y and Krug, R.M. 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: inhibiting the 29-59 oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 : 7100–7105.
- Martin, K and Helenius, A. 1991. Nuclear transpor of influenza virus ribonucleoproteins: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell.*67.117-30.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., and Webster, R. 1999. The surface glycoprotein of H5 influenza viruses isolated from human, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73: 1146-115
- McDonald, J.H and Kreitman, M. 1991. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature.* 351: 652-654

- McGeoch, D., Fellner, P., and Newton, C. 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci.* 73. 3049-9
- Melen, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K.Y., Krug, R., and Julkunen, I. 2007. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol.* 81 : 5995–6006.
- Min, J. Y and Krug, R.M. 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: inhibiting the 29-59 oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 : 7100–7105.
- Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C., and Krug, R. M. 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology.* 363 : 236–243.
- Monne, I., Fusaro, A., Al-Bodowi, M.H., Ismail, M.M., Khan, O.A., Dauphin, G., Tripodi, A., Salviato, A., Marangon, S., Capua, I., and Cattoli, G. 2008. Co-circulation of two sub-lineages of HPAI H5N1 virus in the Kingdom of Saudi Arabia with unique molecular signatures suggesting separate introductions into the commercial poultry and falconry sectors. *J. Gen. Virol.* 89:2691-2697.
- Mount, D.W. 2001. Phylogenetic Prediction In : Bioinformatic. Sequence and genome analysis. Cold Spring Harbor laboratory. Press. New York. 237-280
- Murphy, B.R., and Webster, R.G. 1999. Orthomyxovirus. P. 1397 – 1445. Dalam : Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M (ed). *Fields virology.* 3rd ed. Lipincott-Raven. Philadelphia.
- Nasser, E. H., Judd, A. K., Sanchez, A., Anastasiou, D., and Bucher, D. J. 1996. Antiviral activity of influenza virus M1 zinc finger peptides. *J. Virol.* 70: 8639-8644.
- Nayak, D. P. and Hui, E.K.W. 2002. Assembly and morphogenesis of influenza viruses. *Recent Res Dev Virol.* 4 : 35–54.
- Nelson, M.I., and Holmes, E.C. 2007. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.* 8. 3 : 196 - 205
- Nidom, C.A. 2005. Analisis Molekuler Genoma Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi Doktor. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nielsen, R and Yang, Z. 1998. Likelihood modelas for detecting positively selected amino acid sites and application to the HIV-1 envelope gene. *Genetics.* 148: 929-936
- Obenauer, J.C, Denson, J., Mehta, P.K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D. B., Xu, X. , Wang, J., Ma, J., Fan, Y., Rakestraw, K. M., Webster, R. G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z., and Naeve, C.W. 2006. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311: 1576–1580.
- OIE . 2000. Manual Of Standards for Diagnostik tests and vaccines. Pp 212 – 219.

- Okada, A., Miura, T., and Takeuchi, H. 2003. Zinc- and pH-dependent conformational transition in a putative interdomain linker region of the influenza virus matrix protein M1. *Biochemistry*. 42 : 1978–1984.
- Palese, P and Compans, R.W. 1976. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoro-acetyl-neuraminic acid (FANA) : mechanism of action. *J Gen Virol*. 33 : 159-163
- Palese, P and Young, J.F. 1982. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*. 61. 397-410
- Palese, P and Shaw, M.L. 2007. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 5th ed.. Edited by D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1647–1689
- Payne, L. M., and Powell, P.C. 1984. The lymphoid system. In: Freeman BM, ed. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Orlando, FL: Academic Press, 277–321.
- Pieler, T and Bellefroid, E. 1994. Perspectives on zinc finger protein function and evolution: an update. *Mol Biol Rep*. 20 : 1–8.
- Peiris, M., Yuen, K.Y., Leung, C.W., Chan, K.H., Ip, P. L., Lai, R.W., Orr, W.K., and Shortridge, K.F. 1999. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. 354 : 916 - 917
- Peiris, J. S., Yu, W. C., Leung, C. W., Cheung, C. Y., Ng, W. F., Nicholls, J. M., Ng, T. K., Chan, K.H., Lai, S. T., Lim, W. L., Yuen, K. Y., and Guan, Y. 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 363:617–619
- Peiris, J.S.M., de Jong, M.D., and Guan, Y. 2007. Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health. *Microbiol. Rev*. 20: 243-267.
- Plotkin, J.B., Dushoff, J., and Levin, S.A. 2002. Hemagglutinin sequence clusters and antigenic evolution of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99. 9. 6263 - 6268.
- Perez, D. R and Donis, R.O. 1998. The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology*. 249 : 52–61.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J. and Lamb, R.A. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 69.517-28
- Poon, L.L.M. 2005. *Manual of Influenza Virus Training*. Hong Kong University. Organized by WHO. Bbalitvet. Juli 2005.
- Potter, C.W. 2001. A history of influenza. *J. Appl microbial*. 91. 4 : 572 - 579
- Pringle, C.R. 1996. *Virus Taxonomy 1996-a bulletin from the Xth international congress of virology in Jerusalem*. *Arch Vrol*. 141.2251-6
- Probert, L., Keffer, J., Corbella, P., Cazlaris, H., Patsavoudi, E., Stephens, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. 1993. Wasting, ischemia, and lymphoid abnormalities in mice expressing T cell-targeted human tumor necrosis factor transgenes. *J. Immunol*. 51:1894–1906.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P.C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupha, P., Kijphati, R., and Sawanpanyalert, P. 2005. Molecular characterization of the complete

- genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J. Gen Virol.* 86 : 423-433
- Qian, X. Y., Chien, C.Y., Lu, Y., Montelione, G.T., and Krug, R.M. 1995. An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *RNA.* 1 : 948-956.
- Quinlivan, M., Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T., and Palese, P. 2005. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J. Virol.* 79:8431-8439
- Randall, R. E and Goodbourn, S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 89: 1-47.
- Reed, L.J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* 27 : 493 - 497
- Rees, P. J., and Dimmock, N. J. 1982. Kinetics of synthesis of influenza virus ribonucleoprotein structures. *J. Gen. Virol.* 59:403-408.
- Rohm, C., Suss, J.C., Pohle, V., and Webster, R.G. 1996. Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chicken in Leipzig, Germany. *Virology.* 218. 253-257
- Ruigrok, R. W. H., and Baudin, F. 1995. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J. Gen. Virol.* 76:1009-1014.
- Saitou, N., and Mei, M. 1987. The neighbor-joining method : A new method for constructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4 : 406-425
- Schadt, E.E., Sinsheimer, J. S., and Lange, K. 1998. Computational advances in maximum likelihood methods for molecular phylogeny. *Genome Res.* 8 : 222-233
- Schulze, I. T. 1972. The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology* 47:181-196.
- Schulze, I. T. 1997. Effect of glycosilation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *Journal Infectious Diseases.* 176 : S24-8
- Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoaka, Y., and Hinshaw, V.S. 2001. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol.* 75 : 7875-7881.
- Schweiger, B., Bruns, L., Meixenberger, K. 2006. Reassortment between human A (H3N2) viruses is an important evolutionary mechanism. *Vaccine.* 24 : 6683 - 6690
- Sedyaningsih, E.R., Isfandari, S., Setyawati, V., Rifati, L., Harun, S., Purba, W., Imari, S., Giriputra, S., Blair, P.J., Putnam, S. D., Uyeki, T. M., and Soendoro, T. 2007. Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. *J. Infect Dis.* 196: 522-527.
- Seo, S. H., Hoffmann, E., and Webster, R. G. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape hosts anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 8: 950-954.

- Senne, D.A., Panigrahy, B., Kawaoka, Y., Pearson, J.E., Suss, J., Lipkind, M., Kida, H., and Webster, R.G. 1996. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses : amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.* 40. 425-437
- Sha, B. and Luo, M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol.* 4 : 239-244.
- Shaw, M.W., Choppin, P.W., and Lamb, R.A. 1983. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein form a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80. 4879-83
- Shih, A.C.C., Hsiao, T.C., Ho, M.S., and Li, W.H. 2007. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution. *Proceeding of the National Academy of Science.* 10. 15: 6283-6288
- Shin, Y.-K., Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., and Zhou, Y. 2007a. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol.* 88 : 13-18.
- Shin, Y. K., Li, Y., Liu, Q., Anderson, D. H., Babiuk, L. A., and Zhou, Y. 2007b. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signalling pathway activation. *J Virol.* 81:12730–12739.
- Shishkov, A. V., Goldanskii, V.I., Baratova, L.A., Fedorova, N.V., Ksenofontov, A.L., Zhirnov, O.P., and Galkin, A.V. 1999. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7827–7830.
- Shortridge, K. F., Zhou, N. N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K. G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A., and Webster, R. G. 1998. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from birds in Hong Kong. *Virology.* 252: 331–342.
- Shortridge, K. F., Allan, W.H., and Alexander, D.J. Virus isolation, viral identification. *Dalam : Newcastle Disease. Laboratory diagnosis and vaccine evaluation.* 1982. 4-16. Hong Kong University Press.
- Silverman, R. H. 2007. Viral encounters with 29,59-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol.* 81 : 12720–12729.
- Skehel, J.J., and Hay, A.J. 1978. Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza RNAs and their transcripts. *Nucl. Acid Res.* 56.394-9.
- Smith, G.J.D., Naipospos, T.S.P., Nguyen, T.D., de Jong, M.D., Vijaykrishna, D., Usman, T.B., Hassan, S.S., Nguyen, T.V., Dao, T.V., Bui, N.A., Leung, Y.H.C., Cheung, C.L., Rayner, J.M., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Poon, L.L.M., Li, K.S., Nguyen, V.C., Hien, T.T., Farrar, J., Webster, R.G., Chen, H., Peiris, J.S.M., and Guan, Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology.* 350: 258-268.

- Smith, D.J., Lapedes, A.S., de Jong, J.C., Besterbroer, T.M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E and Fouchier, R.A.M. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 305 : 371 - 376
- Solorzano, A., Webby, R. J., Lager, K. M., Janke, B. H., Garcia-Sastre, A., and Richt, J. 2005. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J. Virol*. 79: 7535–7543.
- Spackman, E., Swayne, D.E., Suarez, D.L., Senne, D.A., Pedersen, J.C., Killian, M.L., Pasick, J., Handel, K., Pillai, S.P. , Lee, C., Stallknecht, D., Slemons, R., Ip, H.S., and Deliberto, T. 2007. Characterization of low pathogenicity H5N1 avian influenza viruses from North America. *J Virol*. 81 : 11612-11619
- Stasakova, J., Ferko, B., Kittel, C., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, H., and Egorov, A. 2005. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1b and 18. *J Gen Virol*. 86 : 185–195.
- Stevens, A., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., and Wilson, I.A. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 312 : 404-410.
- Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. 258 : 1 – 2
- Steinhauer, D.A, and J.J. Holland. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu.Rev.Microbiol*. 41: 409-433.
- Suarez, D. L., Perdue, M. L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J., and Swayne, D. E. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol*. 72:6678–6688.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., and Cox, N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279:393–396.
- Suarez, D. L., Perdue, M. L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J., and Swayne, . D. E. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol*. 72: 6678–6688.
- Suarez, D. L. and Perdue, M. L. 1998. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res*. 54 : 59–69.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., and Cox, N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*. 279: 393–396.

- Stoeckle, M.Y., Shaw, M.W., and Chopin, P.W. 1987. Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNAs. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 2703-7
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender C., and other authors. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* 279 : 393-396.
- Sugrue, R.J. and Hay, A.J. 1991. Structural characteristics of M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology.* 180. 617-24
- Syamsudin, T.R. 2009. Evaluasi dan Rencana Kebijakan Vaksinasi AI di Indonesia. Direktorat Kesehatan Hewan Ad interim. Direktorat Jendral Peternakan. Departemen Pertanian. Rapat Kebijakan Vaksinasi AI dengan pakar/ahli. Hotel Kaisar. Jakarta. 20-21 Maret 2009.
- Swayne, D.E., Beck, J.R., Garcia, M., and Stone, H.D. 1999. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathol.*, 28 : 245-255.
- Swayne, D.E., Garcia, M., Beck, J.R., Kinney, N., and Suarez, D.L. 2000. Protection against diverse highly pathogenic avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowl pox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine.* 18 :1088-1095.
- Swayne, D.E., Lee, C.W., and Spackman, E. 2006. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.* 5 : 141-146.
- Swayne, D.E and Kapczynski, D. 2008. Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunological Reviews.* 225 : 314-331
- Swayne, D.E. 2007. Overview of avian influenza vaccine and vaccination. International avian influenza vaccination seminar. Jakarta, 11-12 Juni 2007
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. and Hills, D.M. 1996. Phylogenetic inference. In *molecular systematics*, 2nd edition (ed D.M. Hillis et al) chap. 5. pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Syukur, D.A. 2006. Situasi penyakit flu burung. <http://www.disnakkeswan-lampung.go.id>
- Takatsuji, H. 1998. Zinc finger transcription factors in plants. *Cell Mol Life Sci.* 54 : 582-596.
- Takizawa, T., Ohashi, K., and Nakanishi, Y. 1996. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J Virol.* 70 : 8128-8132.
- Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. 2000. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* 74 : 7989-7996.

- Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Lourens, R.M., Wang, R., Jin, G., and Fanning, T.G. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 437: 889-893.
- To, K. F., Chan, P.K., Chan, K.F., Lee, W.K., Lam, Y., Wong, K.F., Tang, N.L., Tsang, D.N., Sung, R.Y., and other authors. 2001. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol*. 63 : 242-246.
- Toivanen, A., Toivanen, P., Eskola, J., and Lassila, O. Ontogeny of the chicken lymphoid system. (1981). In: Rose ME, Payne LN, Freeman BM, eds. *Avian Immunology*. Edinburgh: British Poultry Science Ltd. 45-62.
- Tominack, R.L., and Hayden, F.G. 1987. Rimantadine hydrochloride and amantadine hydrochloride use in influenza A virus infections. *Infect Dis Clin North Am*. 1: 459-78
- Treanor, J. J., Snyder, M.H., London, W.T., and Murphy, B.R. 1989. The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology*. 171 : 1-9.
- Treanor, J. Influenza vaccine-outmaneuvering antigenic shift and drift. *N. Engl.Med*. 350. 3: 218-220.
- Tweed, A.A., Skowronski, D.M., David, S.T., Larder, A., Petric, M., Lees, W., Li, Y., Katz, J., Kraiden, M., Tellier, R., Halpert, C., Hirst, M., Astell, C., Lawrence, D., and Mak, A. 2004. Human illness from avian influenza H7N3 in British Columbia. *Emerg Infect Dis*. 10. 12 :2196 - 9
- Ungehusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S.F., Kitphati, R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uprasertkul, M., Boonak, K., Pitayawonganon, C., Cox, N.J., Zaki, S.R., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Khantong, R., Simmerman, J.M., and Chunsutthiwat, S. 2005. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N.Engl.J.Med*. 352: 333-340
- Varghese, J.N., Webster, R.G., Lever, W.G and Colman, P.M. 1988. Structure of an escape mutant of glycoprotein N2 neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 3A. *J Mol Biol*. 200 : 201-203
- Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H.D., Rott, R., and Garten, W. 1992. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-R/R-R. *Virology*. 188. 408-413
- Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S. & other authors (2004). The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. *Virology*. 328, 169-176.
- Von Itzstein, M., Wu, W-Y., Kok, G.B, Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W, et al. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza replication. *Nature*. 363 : 418 - 423
- Webby, R.J and Webster, R.G. 2001. Emergence of influenza A viruses. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol Sci*. 2001 : 356 : 1817 - 1828.

- Wakefield, L. and Brownlee, G.G. 1989. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Res.* 17 : 8569–8580.
- Wang, X., Basler, C.F., Williams, B.R., Silverman, R.H., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. 2002. Functional replacement of the carboxyterminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J Virol.* 76: 12951–12962.
- Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L.H., and Lamb, R.A. 1993. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein : Characterization of the amantadine block. *J.Virol.* 67:5585-5594
- Watanabe, K., Handa, H., Mizumoto, K., and Nagata, K. 1996. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol.* 70 : 241–247.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. 1992. Evolution and Ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews.* 56 : 152-179
- Wharton, S.A., J. Hay, A., Sugrue, R.J., Skehel, J.J., Weis, W.I., and Wiley, D.C. 1990. Membrane fusion by influenza viruses and mechanism of action of amantadine. In : Laver, W.G and G.M. Air (eds). *Use of X-ray Crystallography in the design of antiviral agents*. pp. 1-12. Academic Press. Orlando
- White, J., Kartenback, J., and Helenius, A. 1982. Membrane fusion activity of influenza virus. *EMBO J.* 1: 217-222
- White, R.G. The structural organization of avian lymphoid tissues. 1981. In: Rose ME, Payne LN, Freeman BM, eds. *Avian Immunology*. Edinburgh: British Poultry Science Ltd. 21–42.
- Wolff, T., O'Neill, R. E., and Palese, P. 1996. Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J Virol.* 70 : 5363–5372.
- World Health Organization. 2002. *Dalam : WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. Department of Communicable Disease Surveillance and Response, WHO.
- World Health Organization, 2005a. Global influenza program surveillance network, 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerging Infect.Dis.* 11.1515-1521
- World Health Organization. 2005b. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. *N.Engl.J.Med.* 353: 1374-1385.
- World Health Organization. 2009. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. Avian Influenza-situation in Indonesia. Diakses 1 Februari 2009. [http : //www.who.int](http://www.who.int).
- Wright, P and Webster, R.G. 2001. Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*. 4 th ed. P. 1533 – 1579. Edited by Knipe, D and Howley, P. Philadelphia. Lippincott William & Wilkin.

- Wright, K. E., Wilson, G.A.R., D. Novosad, D., Dimock, C., Tan, D., and J. M. Weber, J.M. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J. Clinical Microbiology*. 33:1180–1184.
- Wrigley, N.G., Skehel, J.J., Charlwood, P.A and Brand, C.M. 1973. The size and shape on influenza virus neuraminidase. *Virology*. 51 : 525 -529
- Writing Committee of Second World Organization Consultation. 2008. Update on Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Human. *N.Engl.J.Med*. 358 : 261-273.
- Wiyono, A., Indriani, R., Dharmayanti, N.L.P.I., Damayanti, R., dan Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza sub tipe H5 dari ayam asal Wabah di Indonesia. *JITV*. 9.1 : 61-71.
- Yamashita, M., Krystal, M and Palase, P. 1989. Comparison of three large polymerase protein of influenza A, B and C viruses. *Virology*. 171 : 458-466
- Ye, Z., Baylor, N. W., and Wagner, R. R. 1989. Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza virus matrix protein mapped with anti idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J. Virol*. 63:3586–3594.
- Ye, Z., Liu, T., Offringa, D. P., McInnis, J., and Levandowski, R. A., 1999. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J. Virol*. 73:7467–7473.
- Ye, Z., Pal, R., Fox, J. W., and Wagner, R. R. 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza virus. *J. Virol*. 61:239–246.
- Ye, Z., Robinson, D and Wagner, R. R. 1995. Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J. Virol*. 69:1964–1970.
- Yin, C., Khan, J.A., Swapna, G.V., Ertekin, A., Krug, R.M., Tong, L., and Montelione, G. T. 2007. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *J Biol Chem*. 282 : 20584–20592.
- Yuk Lam, T.S., Hon, C.C., Pybus, O.G., Pond, S.L.K., Wong, R.T.Y., Yip, C.W., Zeng, F., and Leung, F.C.C. 2008. Evolutionary and transmission dynamics of reassortant H5N1 influenza virus in Indonesia. *PLoS Pathogen*. 4. 8 : e1000130. www.plospathogens.org.
- Zebedee, S.L and Lamb, R.A. 1988. Influenza virus M2 protein : monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol*. 62 : 2762-2772
- Zhigao, B. 2007. Field trials with chimera vaccines. OIE/FAO conference on vaccination: a tool for the control of avian influenza Presented 22 March 2007. Verona, Italy.
- Zhirnov, O. P and Klenk, H.D. 2007. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis*. 12 : 1419–1432.
- Zhirnov, O. P., Konakova, T.E., Wolff, T., and Klenk, H.D. 2002. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*. 76 : 1617–1625.

- Zohari, S., Gyarmati, P., Thoren, P., Czifra, G., Brojer, C., Belak, S., and Berg, M. 2008. Genetic characterization of the NS gene indicates cocirculation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus Genes*. 36 : 117–125.
- Zhu, Q., Yang, H., Chen, W., Cao, W., Zhong, G., Jiao, P., Deng, G., Yu, . K., Yang, C., and other authors. 2008. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol*. 82 : 220–228.





Lampiran 1

Virus Avian Influenza yang diperoleh dalam penelitian

LAMPIRAN 1

Isolat yang diperoleh pada penelitian sebelumnya (tahun 2003-2005)

No	Tanggal	Lokasi	Spesies	Jenis sampel	Sejarah	Status vaksinasi	RT-PCR FluA	RT-PCR H5	RT-PCR NI	Nama Isolat
1	Oct-03	Biliar	Ayam	organ proventrikulus	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/East Java/BL-TPA/2003
2	Nov-03	Bekasi	Ayam	organ	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/1074/2003
3	Oct-04	Jakarta	Entok	organ	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Muscovy duck/Jakarta/DKI-Uwit/04
4	Oct-04	Pandeglang	Itik	organ	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004
5	Jan-05	Ciawi, Bogor	Entok	organ	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Muscovy duck/West Java/Bgr-Cw/2005
6	Feb-05	Sukahumi	Ayam	organ	Ses ayam pada wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/SmsiHay/2005
7	Mar-05	Jakarta	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Jakarta/DKI31/05

Lanjutan LAMPIRAN 1

Isolat yang diperoleh pada tahun 2006 (Diisolasi dan dikarakterisasi oleh Dharmayanti, 2006)

No	Tanggal	Lokasi	Spesies	Jenis sampel	Sejarah	Status vakinsasi	RT-PCR FluA	RT-PCR H5	RT-PCR N1	Nama Isolat
1	Mei 2006	Loji/sukabumi/west jara	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-Hamid/2006
2	Mei 2006	sukaraja/sukabumi/west java	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-Endrit/2006
3	Mei 2006	sukaraja/sukabumi/west java	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-Endrit/2006
4	Mei 2006	sukabumi	Ayam	Organ	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-Pai/2006
5	agt-06	Cikela/Grant	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik/2006
6	Juli 2006	Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik/2006
7	Juli 2006	Mulyasari, Sekeloa/Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-CsIk-Eb/2006
8	Sep-06	Csokik, Sukahurmi	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-CsIk-Ec/2006
9	Sep-06	Csokik, Sukahurmi	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Smi-CsIk-Ec/2006
10	Juni 2006	Semarang	Puyuh	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Quail/Central Java/Smg/2006
11	Agst-06	Jakarta	Puyuh	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Quail/Jakarta/Jul/2006
12	Agst-06	Jakarta	Puyuh	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Quail/Jakarta/Jul/2006
13	Juli 2006	Timika	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Papua/TA/5/2006
14	Juli 2006	Timika	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Papua/TB/1/2006
15	Juli 2006	Timika	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Papua/TB/15/2006
16	30 Agst 2006	Chalenarik, Tanjung Jaya, Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/TasikSub/2006
17	30 Agst 2006	Chalenarik, Tanjung Jaya, Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/TasikSub/2006
18	Sep-09	Jakarta Timur	Emok	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Muscovy Duck/Jakarta/Ha BW/1/2006
19	Sep-06	Purwakarta	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Pwt-Vij/2006
20	Sep-06	Jakarta Timur	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Jakarta/Jakim-Is/2006
21	Sep-06	Jakarta Timur	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Jakarta/Jakim-Rah/2006
22	Sep-06	Jakarta Pusat	merpati	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/Jakarta/Jakus-Hendri/2006
23	Sep-06	Da. Sarimangg, Karangnunggal, Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-Memed/2006
24	Sep-06	Punjatjan, Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-Rosli/2006
25	Sep-06	Bj. Gambir, Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-Andri/2006
26	Sep-06	Nangkajaya, Bj. Gambir, Tasikmalaya	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-dadi/2006
27	Sep-06	Kel. Rambutan, Cirebon Jaktim	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Jaktim-Rah/2006
28	Sep-06	Raya Ciputat, Pondok Pinang, Kebayoran	Emok	Swab kloaka	dituga kasus AI pada manusia, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Muscovy duck/Jakarta-Sum/106/2006
29	Sep-06	Raya Ciputat, Pondok Pinang, Kebayoran	Itik	Swab kloaka	dituga kasus AI pada manusia, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Duck/Jakarta/Smi/306/2006
30	Okt 2006	Kota Tasik	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-sudoyo/2006
31	Okt 2006	Tanjungsari, Rajapolah, Tasik	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-rah/2006
32	Okt 2006	Ds. Banitarkalong, Kec. Cipatjah	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-Rosli/2006
33	Okt 2006	Ds. Banitarkalong, Kec. Cipatjah	Ayam	Swab kloaka	Wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Chicken/West Java/Tasik-selam/2006

Lampiran 1 (Lanjutan)

Lanjutan LAMPIRAN I

Isolat yang diperoleh pada tahun 2007 (Disolvasi dan dikarakterisasi oleh Dharmayanti, 2007)

No	Tanggal	Lokasi	Spesies	Jenis sampel	Sejarah	Status vaksinasi	RT-PCR FluA	RT-PCR H5	RT-PCR NI	Nama isolat
1	4-Jan-07	Jakarta	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Lakarna/DK1-Waz/2007
2	4-Jan-07	Jakarta	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Lakarna/DK1-Nuz/2007
3	4-Jan-07	Jakarta	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Lakarna/DK1-emb/2007
4	4-Jan-07	Jakarta	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Lakarna/DK1-Ars/2007
5	21-Jan-07	Jakarta	ayam	swab kloaka, beses	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Bid/Alakarna/Walokot 1/2007
6	21-Jan-07	Jakarta	burang	swab kloaka, beses	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Bid/Alakarna/Walokot 4/2007
7	21-Jan-07	Jakarta	burang	swab kloaka, beses	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Bid/Alakarna/Walokot 19/2007
8	Jan 2007	Tasikmalaya	ayam	swab kloaka	Wabah ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Tank-2/2007
9	Jan 2007	Tasikmalaya	ayam	swab kloaka	Wabah ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Tank-Osh/2007
10	Jan 2007	Bekasi	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/BK3/2007
11	Jan 2007	Bekasi	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada unggas	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/BK3/2007
12	11-Jul-07	Mogelang-Central Java	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam layer	waksh	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Central Java/Agg-Nuis/2007
13	6-Ags-07	Sukabumi-Purung Kidul, West Java	ayam	swab kloaka	wabah pada ayam layer	waksh	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Sud/12/007
14	Jul-07	Tangerang-East Java	ayam	swab kloaka	ayam sakit di rumah	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Jane-15/2007
15	Jul-07	Tangerang-East Java	ayam	swab kloaka	ayam sakit di rumah	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Jane-15/2007
16	Jul-07	Tangerang-East Java	ayam	swab kloaka	ayam sakit di rumah	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Jane-15/2007
17	Jul-07	Malang-East Java	ayam	swab kloaka	ayam sakit di rumah	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Jane-15/2007
18	Jul-07	Malang-East Java	ayam	swab kloaka	ayam sakit di rumah	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Jane-15/2007
19	Jul-07	Sukabumi-West Java	ayam	swab kloaka	ayam sakit di rumah	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Jane-15/2007
20	Agst 2007	Sukabumi-West Java	ayam	swab kloaka	Wabah ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-cen/2007
21	Agst 2007	Sukabumi-West Java	ayam	swab kloaka	Wabah ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-cen/2007
22	Sep-07	Tangerang	ayam	swab kloaka	wabah pada ayam layer	waksh	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Bj/18/2007
23	Sep-07	Tangerang	ayam	swab kloaka	wabah pada ayam layer	waksh	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Bj/18/2007
24	7-Mars-07	desa Lumbang, Kec. Lumbang, Lar. Kab. Posir	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada ayam kampung, kemad	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Banten/Jagg-Sud3A/2007
25	19 Juni 2007	Semarang, Tembung, Pemamp, Indragiri Hilir	ayam	swab kloaka	ditiga kasus AI pada manasa, wabah pada ayam kampung, kemad	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/Passi/BPPVRI/2007

Keterangan : Isolat no. 24 dan 25 adalah dikarakterisasi oleh Dharmayanti (2008)

Isolat yang diperoleh pada tahun 2008 (Disolvasi dan dikarakterisasi oleh Dharmayanti, 2008)

No	Tanggal	Lokasi	Spesies	Jenis sampel	Sejarah	Status vaksinasi	RT-PCR FluA	RT-PCR H5	RT-PCR NI	Nama isolat
1	18-Jan-08	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Acu/2008
2	18-Jan-08	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Buny/2008
3	18-Jan-08	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Mes/2008
4	Febuari 2008	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Pan/2008
5	Januari 2008	Sarang	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Fad/2008
6	Januari 2008	Sarang	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Fad/2008
7	20 Juni 2008	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Yad/2008
8	20 Juni 2008	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Hf/2008
9	20 Juni 2008	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-M2/2008
10	20 Juni 2008	Sukabumi	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-M3/2008
11	20 Juni 2008	Sukabumi (Pa.2)	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam kampung	Tidak	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-M6/2008
12	30 Juli 2008	Sukabumi, Banjar Lingsel, Jampang 2	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam layer, kematian tinggi, ovarium pecah	waksh	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Bj/2008
13	30 Juli 2008	Sukabumi, Parangkada	ayam	swab kloaka	Wabah pada ayam layer, kematian tinggi, ovarium pecah	waksh	Positif	Positif	Positif	A/Ck/West Java/Sms-Bj/2008

Lampiran 2

Perhitungan Konsentrasi Cetakan DNA yang digunakan dalam reaksi PCR sekuensing

Konsentrasi DNA yang dibutuhkan untuk produk PCR :

1. PCR product	
100-200 bp	1-2 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
>2000bp	20-50 ng
2. Single strand	25-50 ng
3. Double strand	150-300 ng
4. Cosmid, BAC	0,2-1,0 µg
5. genomic DNA	2-3 µg

Pada penelitian ini yang digunakan adalah PCR product dengan panjang :
Gen HA, NA, M dan NA adalah 1000 – 2000 bp sehingga konsentrasi yang dibutuhkan adalah 10-40 ng.

Rata-rata konsentrasi PCR product yang diperoleh adalah : 25-50 ng, sehingga DNA yang digunakan sebagai cetakan pada reaksi PCR sekuensing adalah 1 ng

PCR untuk Reaksi PCR Sekuensing menggunakan BIGDYE v 3.1 (Applied Biosystem) :

- Buat campuran :

Big Dye terminator mix	4 µl
Primer 3,2 pmol (jika alikuot primer 2 pmol/ul)	2 µl
Templat DNA	1 ng/µl
Buffer sekuensing	4 µl
Total volume	**
PCR product	1 µl
Total reaksi	10 µl

- Sentrifugasi 15 detik
- Set PCR sesuai dengan program :
 - initial denaturasi : 96°C, 10 detik
 - 96°C, 5 detik
 - 60°C, 4 menit

Sebanyak 25 X Siklus

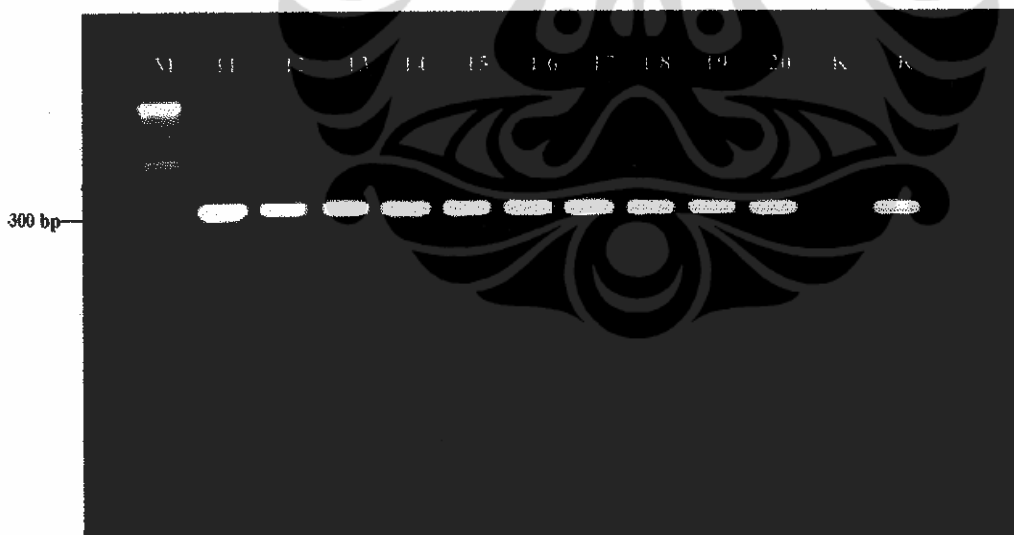
- Jalankan PCR pada mesin PCR
- Purifikasi Hasil sekuensing

Lampiran 3

Hasil Elektroforesis/amplikon dengan primer Matrix, H5 dan N1 dari 20 virus AI yang digunakan dalam penelitian ini



(a)

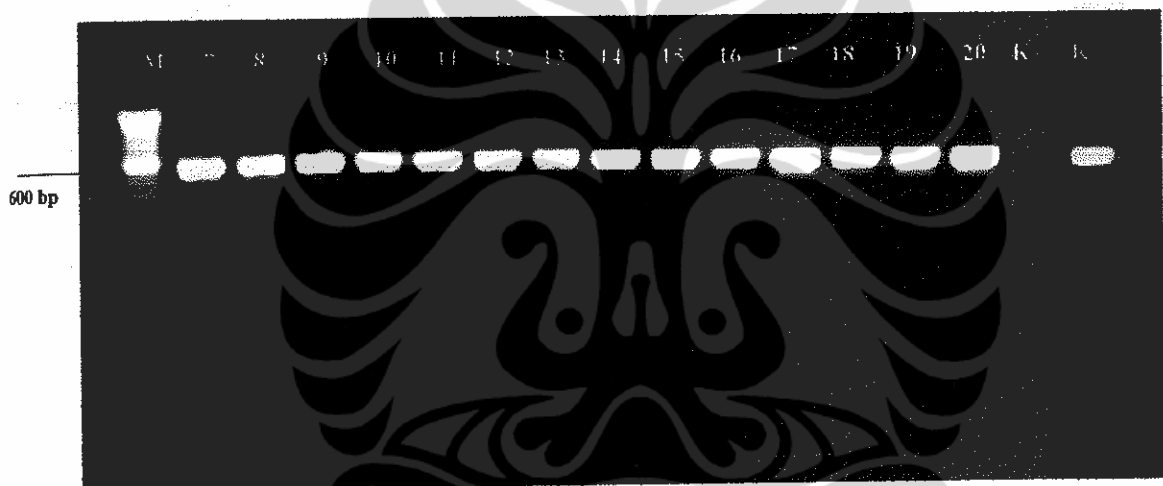


(b)

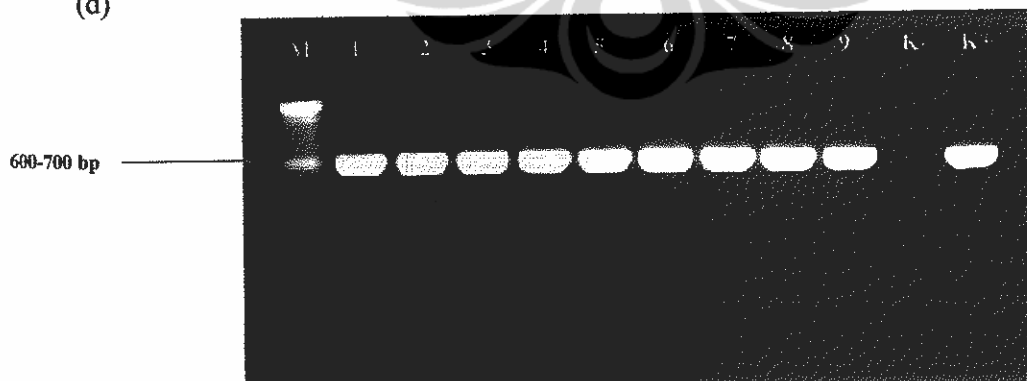
Lampiran 3 (Lanjutan)



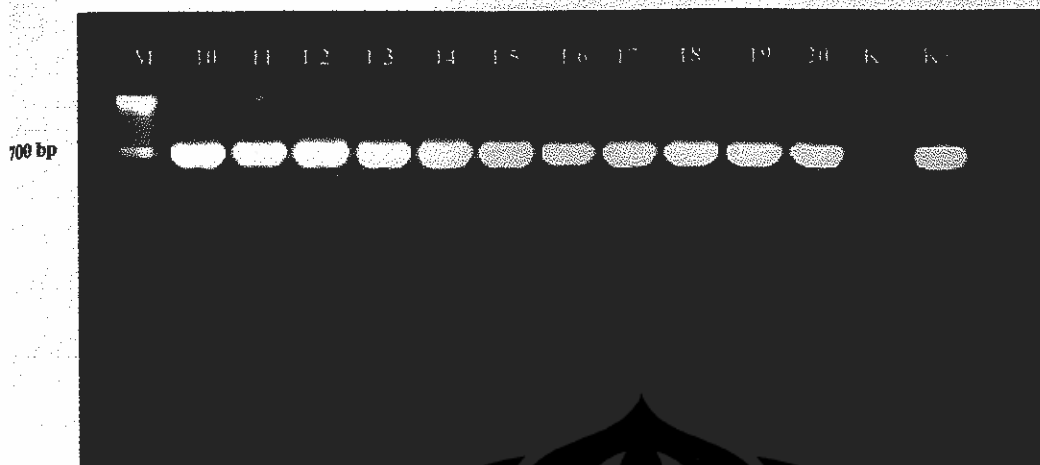
(c)



(d)



(e)



(f)

Gambar 1. Hasil elektroforesis hasil RT-PCR dengan primer a) Matrix b) Matrix c) H5 d) H5 e) N1 f) N1 dua puluh isolat virus (*) yang digunakan dalam penelitian ini. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa duapuluh virus yang digunakan adalah virus avian influenza sub tipe H5N1. Hasil amplikon dengan Primer Matrix : 200-300 bp; Hasil amplikon dengan Primer H5 : 500-600 bp; Hasil amplikon dengan Primer N1 : 600-700 bp

Keterangan : (*)

M : Molecular weight (MW) 100 bp

1. A/Ck/East Java/BL-IPA/2003
2. A/Ck/West Java/1074/2003
3. A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004
4. A/Ck/Jakarta/DKI31/2005
5. A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004
6. A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005
7. A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005
8. A/Duck/Jakarta/Simt306/2006
9. A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006
10. A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007
11. A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007
12. A/Ck/Pessel/BPPVR11/2007
13. A/Ck/Inhu/BPPVR11/2007
14. A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007
15. A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007
16. A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008
17. A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008
18. A/Ck/West Java/SMI-M1/2008
19. A/Ck/West Java/SMI-M6/2008
20. A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008

K- : Kontrol negatif

K+ : Kontrol positif

Lampiran 4

Hasil Perhitungan EID₅₀ dua puluh virus AI yang digunakan dalam penelitian ini

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/BL-IPA/2003

Pengenceran (Log of virus dibuat)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati (A)	Hidup (B)	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	35	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	30	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	25	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	20	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	15	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	10	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	3	2	5	2	0.71	71.43
10 ⁻⁸	2	3	2	5	0.29	28.57
10 ⁻⁹	0	5	0	10	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	15	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{71.43 - 50}{71.43 - 28.57}$$

$$= 0.50$$

$$\text{Log EID}_{50} = (\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{Proportionate distance} \times \text{log dilution factor})$$

$$= (-7) + (0.50 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{7.50}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{7.50} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{8.50} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/1074/2003

Pengenceran (Log of virus dibuat)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati (A)	Hidup (B)	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	39	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	34	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	29	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	24	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	19	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	14	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	9	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	4	1	4	1	0.80	80.00
10 ⁻⁹	0	5	0	6	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	11	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{80.00 - 50}{80.00 - 0.00}$$

$$= 0.38$$

$$\text{Log EID}_{50} = (\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{Proportionate distance} \times \text{log dilution factor})$$

$$= (-8) + (0.38 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{8.38}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{8.38} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{9.38} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Muscovyduck/Jakarta/DK1-Uwit/2004

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	34	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	29	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	24	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	19	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	14	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	9	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	4	1	4	1	0.80	80.00
10 ⁻⁸	0	5	0	5	0.00	0.00
10 ⁻⁹	0	5	0	11	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	16	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{80.00 - 50}{80.00 - 0.00}$$

$$= 0.38$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-7) + (0.38 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-7.38}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{-7.38} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-8.38} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/Jakarta/DK131/2005

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	36	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	31	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	26	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	21	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	16	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	11	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	6	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	1	4	1	4	0.20	20.00
10 ⁻⁹	0	5	0	9	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	14	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 20.00}$$

$$= 0.63$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-7) + (0.63 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-7.63}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{-7.63} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-8.63} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	29	0	1,00	100,00
10 ⁻²	5	0	24	0	1,00	100,00
10 ⁻³	5	0	19	0	1,00	100,00
10 ⁻⁴	5	0	14	0	1,00	100,00
10 ⁻⁵	5	0	9	0	1,00	100,00
10 ⁻⁶	2	3	4	3	0,57	57,14
10 ⁻⁷	1	4	2	7	0,22	22,22
10 ⁻⁸	1	4	1	11	0,08	8,33
10 ⁻⁹	0	5	0	16	0,00	0,00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	21	0,00	0,00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{57,14 - 50}{57,14 - 22,22}$$

$$= 0,20$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-6) + (0,20 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{6,20}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{6,20} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{7,20} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/Sri-Hay/2005

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	35	0	1,00	100,00
10 ⁻²	5	0	30	0	1,00	100,00
10 ⁻³	5	0	25	0	1,00	100,00
10 ⁻⁴	5	0	20	0	1,00	100,00
10 ⁻⁵	5	0	15	0	1,00	100,00
10 ⁻⁶	5	0	10	0	1,00	100,00
10 ⁻⁷	5	0	5	0	1,00	100,00
10 ⁻⁸	0	5	0	5	0,00	0,00
10 ⁻⁹	0	5	0	10	0,00	0,00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	15	0,00	0,00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100,00 - 50}{100,00 - 0,00}$$

$$= 0,50$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-7) + (0,50 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{7,50}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{7,50} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{8,50} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Muscovyduck/Egr-Cw/2005

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	41	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	36	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	31	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	26	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	21	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	16	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	11	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	5	0	6	0	1.00	100.00
10 ⁻⁹	1	4	1	4	0.20	20.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	9	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 20.00}$$

$$= 0.63$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-8) + (0.63 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{8.63}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{8.63} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{8.63} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Duck/Jakarta/DKI-Sim306/2006

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	28	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	23	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	18	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	13	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	8	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	3	2	3	2	0.60	60.00
10 ⁻⁷	0	5	0	7	0.00	0.00
10 ⁻⁸	0	5	0	12	0.00	0.00
10 ⁻⁹	0	5	0	17	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	22	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{60.00 - 50}{60.00 - 0.00}$$

$$= 0.17$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-6) + (0.17 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{6.17}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{6.17} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{6.17} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Isolat Virus : A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	33	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	28	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	23	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	18	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	13	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	8	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	1	4	3	4	0.43	42.86
10 ⁻⁸	2	3	2	7	0.22	22.22
10 ⁻⁹	0	5	0	12	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	17	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 42.86}$$

$$= 0.88$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-6) + (0.88 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-6.88}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{-6.88} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-7.88} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	37	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	32	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	27	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	22	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	17	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	12	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	7	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	2	3	2	3	0.40	40.00
10 ⁻⁹	0	5	0	8	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	13	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 40.00}$$

$$= 0.83$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-7) + (0.83 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-7.83}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{-7.83} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-8.83} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/Pesse/BPPVR/2007

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	32	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	27	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	22	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	17	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	12	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	7	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	2	3	2	3	0.40	40.00
10 ⁻⁸	0	5	0	8	0.00	0.00
10 ⁻⁹	0	5	0	13	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	18	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 40.00}$$

$$= 0.83$$

$$\text{Log EID}_{50} = (\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{Proportionate distance} \times \text{log dilution factor})$$

$$= (-6) + (0.83 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-6.83}$$

Inokulum yang diberikan tiap tetrah = 0,1 ml

$$= 10^{-6.83} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-7.83} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/Inhu/BPPVR/2007

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	41	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	36	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	31	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	26	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	21	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	16	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	11	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	5	0	6	0	1.00	100.00
10 ⁻⁹	1	4	1	4	0.20	20.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	9	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 20.00}$$

$$= 0.63$$

$$\text{Log EID}_{50} = (\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{Proportionate distance} \times \text{log dilution factor})$$

$$= (-8) + (0.63 \times -1.0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-8.63}$$

Inokulum yang diberikan tiap tetrah = 0,1 ml

$$= 10^{-8.63} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-9.63} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	38	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	33	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	28	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	23	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	18	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	13	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	8	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	3	2	5	2	0.60	60.00
10 ⁻⁹	0	5	0	7	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	12	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{60.00 - 50}{60.00 - 0.00}$$

$$= 0.17$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-8) + (0.17 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{8.17}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{8.17} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{8.17} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/Smi-Sud 1/2007

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	36	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	31	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	26	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	4	1	21	1	0.95	95.45
10 ⁻⁵	4	1	17	2	0.89	89.47
10 ⁻⁶	4	1	13	3	0.81	81.25
10 ⁻⁷	5	0	9	3	0.75	75.00
10 ⁻⁸	4	1	4	4	0.50	50.00
10 ⁻⁹	0	5	0	9	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	14	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{75.00 - 50}{75.00 - 50.00}$$

$$= 1.00$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-8) + (1,0 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{8.00}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{8.00} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{8.00} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4(Lanjutan)

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/Smi-Acu/2008

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	39	0	1,00	100,00
10 ⁻²	5	0	34	0	1,00	100,00
10 ⁻³	5	0	29	0	1,00	100,00
10 ⁻⁴	5	0	24	0	1,00	100,00
10 ⁻⁵	5	0	19	0	1,00	100,00
10 ⁻⁶	5	0	14	0	1,00	100,00
10 ⁻⁷	5	0	9	0	1,00	100,00
10 ⁻⁸	4	1	4	1	0,80	80,00
10 ⁻⁹	0	5	0	6	0,00	0,00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	11	0,00	0,00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{80,00 - 50}{80,00 - 0,00}$$

$$= 0,38$$

$$\text{Log EID}_{50} = (\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{Proportionate distance} \times \text{log dilution factor})$$

$$= (-8) + (0,38 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-8,38}$$

Inokulum yang diberikan tiap tetrah = 0,1 ml

$$= 10^{-8,38} \quad \text{EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-7,28} \quad \text{EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/Banten/Srg-Fedh/2008

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	32	0	1,00	100,00
10 ⁻²	5	0	27	0	1,00	100,00
10 ⁻³	5	0	22	0	1,00	100,00
10 ⁻⁴	5	0	17	0	1,00	100,00
10 ⁻⁵	5	0	12	0	1,00	100,00
10 ⁻⁶	5	0	7	0	1,00	100,00
10 ⁻⁷	1	4	2	4	0,33	33,33
10 ⁻⁸	1	4	1	8	0,11	11,11
10 ⁻⁹	0	5	0	13	0,00	0,00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	18	0,00	0,00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100,00 - 50}{100,00 - 33,33}$$

$$= 0,75$$

$$\text{Log EID}_{50} = (\text{Log dilution above } 50\%) + (\text{Proportionate distance} \times \text{log dilution factor})$$

$$= (-6) + (0,75 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-6,75}$$

Inokulum yang diberikan tiap tetrah = 0,1 ml

$$= 10^{-6,75} \quad \text{EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-5,65} \quad \text{EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/SMI-M1/2008

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	39	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	34	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	29	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	24	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	19	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	14	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	5	0	9	0	1.00	100.00
10 ⁻⁸	4	1	4	1	0.80	80.00
10 ⁻⁹	0	5	0	6	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	11	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 80.00}$$

$$= 2.50$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-8) + (2.50 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{9.25}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{9.25} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{9.25} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID50 berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/SMI-M6/2008

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	38	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	33	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	28	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	23	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	18	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	4	1	13	1	0.93	92.86
10 ⁻⁷	5	0	9	1	0.90	90.00
10 ⁻⁸	4	1	4	2	0.67	66.67
10 ⁻⁹	0	5	0	7	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	12	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{66.67 - 50}{66.67 - 0.00}$$

$$= 0.25$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-8) + (0,25 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{8.25}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{8.25} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{8.25} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 4 (Lanjutan)

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	33	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	28	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	23	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	18	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	4	1	13	1	0.93	92.86
10 ⁻⁶	3	2	9	3	0.75	75.00
10 ⁻⁷	3	2	6	5	0.55	54.55
10 ⁻⁸	3	2	3	7	0.30	30.00
10 ⁻⁹	0	5	0	12	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	17	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{54.55 - 50}{54.55 - 30.00}$$

$$= 0.19$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-7) + (0.19 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-7.19}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{-7.19} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-6.19} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Penghitungan EID₅₀ berdasarkan metode Reed and Muench

Isolat Virus : A/Muscovy/duck/Jakarta/DKI-Sum106/2006

Pengenceran (Log of virus dilution)	Jumlah		Kumulatif		Ratio A/(A+B)	%
	Mati	Hidup	Mati (A)	Hidup (B)		
10 ⁻¹	5	0	32	0	1.00	100.00
10 ⁻²	5	0	27	0	1.00	100.00
10 ⁻³	5	0	22	0	1.00	100.00
10 ⁻⁴	5	0	17	0	1.00	100.00
10 ⁻⁵	5	0	12	0	1.00	100.00
10 ⁻⁶	5	0	7	0	1.00	100.00
10 ⁻⁷	2	3	2	3	0.40	40.00
10 ⁻⁸	0	5	0	8	0.00	0.00
10 ⁻⁹	0	5	0	13	0.00	0.00
10 ⁻¹⁰	0	5	0	18	0.00	0.00

Rumus

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)}$$

$$= \frac{100.00 - 50}{100.00 - 40.00}$$

$$= 0.83$$

Log EID₅₀ = (Log dilution above 50%) + (Proportionate distance X log dilution factor)

$$= (-6) + (0.83 \times -1,0)$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-6.83}$$

Inokulum yang diberikan tiap telur = 0,1 ml

$$= 10^{-6.83} \text{ EID}_{50} / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 10^{-5.83} \text{ EID}_{50} / \text{ml}$$

Lampiran 5 (Lanjutan)

Lanjutan LAMPIRAN 5
Analisis Komposisi Protein

Gen NA

AA	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10			
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%		
Ala (A)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	19	4.30%	19	4.30%	19	4.30%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%
Arg (R)	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%
Asn (N)	29	6.60%	29	6.60%	31	7.00%	31	7.00%	29	6.60%	31	7.00%	30	6.80%	30	6.80%	31	7.00%	30	6.80%	30	6.80%
Asp (D)	20	4.50%	20	4.50%	21	4.80%	21	4.80%	21	4.80%	19	4.30%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%
Cys (C)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%
Gln (Q)	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%
Glu (E)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	19	4.30%	19	4.30%	18	4.10%	18	4.10%
Gly (G)	44	10.00%	44	10.00%	44	10.00%	44	10.00%	43	9.80%	43	9.80%	44	10.00%	43	9.80%	43	9.80%	43	9.80%	43	9.80%
His (H)	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%
Ile (I)	33	7.50%	34	7.70%	34	7.70%	35	8.00%	35	8.00%	34	7.70%	34	7.70%	34	7.70%	34	7.70%	34	7.70%	35	8.00%
Leu (L)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	17	3.90%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%
Lys (K)	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%
Met (M)	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	15	3.40%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%
Phe (F)	22	5.00%	22	5.00%	22	5.00%	22	5.00%	23	5.20%	23	5.20%	23	5.20%	21	4.80%	21	4.80%	21	4.80%	22	5.00%
Pro (P)	55	12.50%	55	12.50%	55	12.50%	54	12.30%	54	12.30%	53	12.00%	54	12.30%	55	12.50%	55	12.50%	55	12.50%	54	12.30%
Ser (S)	28	6.40%	27	6.10%	26	5.90%	25	5.70%	26	5.90%	27	6.10%	27	6.10%	27	6.10%	26	5.90%	26	5.90%	25	5.70%
Thr (T)	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%
Trp (W)	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%
Tyr (Y)	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%	28	6.40%	30	6.80%	28	6.40%	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%
Val (V)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

AA	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20			
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%		
Ala (A)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	19	4.30%	19	4.30%	19	4.30%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%
Arg (R)	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%	17	3.90%
Asn (N)	30	6.80%	30	6.80%	31	7.00%	30	6.80%	30	6.80%	31	7.00%	31	7.00%	31	7.00%	31	7.00%	31	7.00%	31	7.00%
Asp (D)	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%	19	4.30%	19	4.30%	19	4.30%	18	4.10%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%
Cys (C)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%
Gln (Q)	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%	12	2.70%
Glu (E)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	19	4.30%	19	4.30%	19	4.30%	19	4.30%
Gly (G)	43	9.80%	43	9.80%	43	9.80%	42	9.50%	41	9.30%	44	10.00%	43	9.80%	43	9.80%	42	9.50%	44	10.00%	44	10.00%
His (H)	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	11	2.50%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%	10	2.30%
Ile (I)	35	8.00%	34	7.70%	33	7.50%	33	7.50%	35	8.00%	33	7.50%	35	8.00%	35	8.00%	35	8.00%	34	7.70%	34	7.70%
Leu (L)	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	19	4.30%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%	18	4.10%
Lys (K)	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%	9	2.00%
Met (M)	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	15	3.40%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%	16	3.60%
Phe (F)	22	5.00%	22	5.00%	21	4.80%	21	4.80%	20	4.50%	22	5.00%	22	5.00%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%	20	4.50%
Pro (P)	54	12.30%	54	12.30%	55	12.50%	55	12.50%	54	12.30%	54	12.30%	54	12.30%	56	12.70%	56	12.70%	55	12.50%	55	12.50%
Ser (S)	26	5.90%	26	5.90%	27	6.10%	27	6.10%	26	5.90%	26	5.90%	26	5.90%	26	5.90%	26	5.90%	26	5.90%	26	5.90%
Thr (T)	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%	15	3.40%
Trp (W)	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%	11	2.50%
Tyr (Y)	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%	28	6.40%	28	6.40%	29	6.60%	28	6.40%	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%	29	6.60%
Val (V)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

Lanjutan LAMPIRAN 5
Analisis Komposisi Protein

AA	M1																			
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	27	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	25	9.50%	28	11.10%
Arg (R)	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	16	6.30%	15	5.80%	16	6.30%
Asn (N)	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%
Asp (D)	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%
Cys (C)	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%
Gln (Q)	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%
Glu (E)	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	18	7.10%	17	6.70%
Gly (G)	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%
His (H)	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%
Ile (I)	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%
Leu (L)	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	25	9.90%	25	9.90%	26	10.30%
Lys (K)	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	13	5.20%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%
Met (M)	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	15	6.00%	14	5.60%
Phe (F)	7	2.80%	7	2.80%	7	2.80%	7	2.80%	7	2.80%	7	2.80%	7	2.80%	8	3.20%	8	3.20%	7	2.80%
Pro (P)	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%
Ser (S)	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%
Thr (T)	19	7.50%	19	7.50%	19	7.50%	18	7.10%	19	7.50%	19	7.50%	19	7.50%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%
Trp (W)	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%
Tyr (Y)	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	4	1.60%	4	1.60%	5	2.00%
Val (V)	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	14	5.60%	15	6.00%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

AA	M1																			
	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	29	11.50%	28	11.10%	28	11.10%	26	10.30%	28	11.10%	28	11.10%	28	11.10%	27	10.70%	28	11.10%	28	11.10%
Arg (R)	16	6.30%	16	6.30%	15	6.00%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%
Asn (N)	13	5.20%	13	5.20%	14	5.60%	11	4.40%	14	5.60%	13	5.20%	13	5.20%	15	6.00%	14	5.60%	14	5.60%
Asp (D)	6	2.40%	6	2.40%	5	2.00%	8	3.20%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%
Cys (C)	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	5	2.00%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%	3	1.20%
Gln (Q)	13	5.20%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%
Glu (E)	17	6.70%	17	6.70%	18	7.10%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%
Gly (G)	15	6.00%	16	6.30%	16	6.30%	17	6.70%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	16	6.30%	17	6.70%
His (H)	7	2.80%	6	2.40%	6	2.40%	5	2.00%	6	2.40%	6	2.40%	6	2.40%	5	2.00%	6	2.40%	6	2.40%
Ile (I)	11	4.40%	11	4.40%	12	4.80%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%	11	4.40%
Leu (L)	26	10.30%	26	10.30%	25	9.90%	24	9.50%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	26	10.30%	25	9.90%	25	9.90%
Lys (K)	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%
Met (M)	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%	14	5.60%
Phe (F)	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%	8	3.20%
Pro (P)	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%
Thr (T)	19	7.50%	19	7.50%	19	7.50%	18	7.10%	19	7.50%	19	7.50%	19	7.50%	17	6.70%	17	6.70%	17	6.70%
Trp (W)	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%
Tyr (Y)	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	5	2.00%	4	1.60%	4	1.60%	5	2.00%
Val (V)	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	15	6.00%	14	5.60%	15	6.00%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

Lampiran 5 (Lanjutan)

Lanjutan LAMPIRAN 5
Analisis Komposisi Protein

Gen M2

AA	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	4	4.10%	4	4.10%	3	3.10%	4	4.10%	3	3.10%	3	3.10%	4	4.10%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%
Arg (R)	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	8	8.20%	9	9.30%	10	10.30%	8	8.20%	8	8.20%	8	8.20%	8	8.20%
Asn (N)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%
Asp (D)	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%
Cys (C)	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	3	3.10%	2	2.10%	2	2.10%
Gln (Q)	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%
Glu (E)	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	8	8.20%	9	9.30%	9	9.30%
Gly (G)	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	4	4.10%
His (H)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%
Ile (I)	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	8	8.20%	10	10.30%	12	12.40%	11	11.30%
Leu (L)	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	9	9.30%	10	10.30%
Lys (K)	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	5	5.20%	4	4.10%	5	5.20%	4	4.10%	6	6.20%	5	5.20%	5	5.20%
Met (M)	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	2	2.10%	1	1.00%
Phe (F)	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	5	5.20%	5	5.20%
Pro (P)	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	3	3.10%
Ser (S)	7	7.20%	7	7.20%	8	8.20%	7	7.20%	7	7.20%	7	7.20%	7	7.20%	7	7.20%	6	6.20%	5	5.20%
Thr (T)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	0	0.00%	2	2.10%
Trp (W)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%
Tyr (Y)	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
Val (V)	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	5	5.20%	6	6.20%	5	5.20%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
See (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

AA	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20			
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%		
Ala (A)	5	5.20%	5	5.20%	4	4.10%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%		
Arg (R)	8	8.20%	8	8.20%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	8	8.20%	8	8.20%	8	8.20%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%
Asn (N)	3	3.10%	3	3.10%	4	4.10%	2	2.10%	4	4.10%	3	3.10%	3	3.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
Asp (D)	7	7.20%	7	7.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	6	6.20%	7	7.20%	7	7.20%	7	7.20%	7	7.20%	7	7.20%
Cys (C)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	3	3.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%
Gln (Q)	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%	3	3.10%
Glu (E)	9	9.30%	9	9.30%	10	10.30%	9	9.30%	10	10.30%	9	9.30%	9	9.30%	9	9.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%
Gly (G)	4	4.10%	4	4.10%	5	5.20%	2	2.10%	5	5.20%	2	2.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
His (H)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%
Ile (I)	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%	11	11.30%
Leu (L)	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%	10	10.30%
Lys (K)	5	5.20%	5	5.20%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	5	5.20%	5	5.20%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
Met (M)	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	0	0.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%	1	1.00%
Phe (F)	3	3.10%	5	5.20%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
Pro (P)	6	6.20%	5	5.20%	4	4.10%	8	8.20%	4	4.10%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%
Ser (S)	6	6.20%	5	5.20%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
Thr (T)	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%	2	2.10%
Trp (W)	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	3	3.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%	4	4.10%
Tyr (Y)	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%	5	5.20%
Val (V)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
See (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

Lanjutan LAMPIRAN 5
Analisis Komposisi Protein

Gen NSI

AA	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	15	6.70%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	15	6.70%	14	6.20%	13	5.80%	14	6.20%	14	6.20%	16	7.00%
Arg (R)	19	8.40%	19	8.40%	17	7.60%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	20	8.70%
Asn (N)	7	3.10%	8	3.60%	7	3.10%	7	3.10%	8	3.60%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	8	3.60%	8	3.50%
Asp (D)	17	7.60%	16	7.10%	17	7.60%	17	7.60%	15	6.70%	17	7.60%	17	7.60%	17	7.60%	16	7.10%	14	6.10%
Cys (C)	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%
Gln (Q)	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.50%
Glu (E)	19	8.40%	18	8.00%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	20	8.90%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.30%
Gly (G)	15	6.70%	15	6.70%	16	7.10%	16	7.10%	16	7.10%	16	7.10%	18	8.00%	16	7.10%	16	7.10%	14	6.10%
His (H)	2	0.90%	2	0.90%	4	1.80%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%
Ile (I)	14	6.20%	16	7.10%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	14	6.20%	14	6.10%
Leu (L)	24	10.70%	24	10.70%	26	11.60%	24	10.70%	24	10.70%	24	10.70%	24	10.70%	24	10.70%	24	10.70%	24	10.40%
Lys (K)	12	5.30%	13	5.80%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.20%
Met (M)	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	4.00%	9	3.90%
Phe (F)	10	4.40%	10	4.40%	9	4.00%	10	4.40%	10	4.40%	10	4.40%	9	4.00%	10	4.40%	11	4.80%	11	4.80%
Pro (P)	9	4.00%	13	5.80%	14	6.20%	12	5.30%	13	5.80%	12	5.30%	13	5.80%	12	5.30%	12	5.30%	16	7.00%
Ser (S)	12	5.30%	12	5.30%	13	5.80%	13	5.80%	12	5.30%	13	5.80%	13	5.80%	13	5.80%	13	5.80%	14	6.10%
Thr (T)	14	6.20%	12	5.30%	13	5.80%	13	5.80%	12	5.30%	13	5.80%	13	5.80%	13	5.80%	13	5.80%	14	6.10%
Trp (W)	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.70%
Tyr (Y)	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%
Val (V)	12	5.30%	12	5.30%	10	4.40%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	10	4.40%	12	5.30%	12	5.30%	15	6.50%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

AA	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	13	5.80%	14	6.20%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	15	6.70%	14	6.20%	15	6.70%	14	6.20%
Arg (R)	19	8.40%	18	8.00%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%	18	8.00%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%
Asn (N)	6	2.70%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%	7	3.10%
Asp (D)	17	7.60%	17	7.60%	17	7.60%	17	7.60%	18	8.00%	18	8.00%	18	8.00%	17	7.60%	17	7.60%	17	7.60%
Cys (C)	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%
Gln (Q)	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%	8	3.60%
Glu (E)	18	8.00%	18	8.00%	19	8.40%	19	8.40%	18	8.00%	18	8.00%	18	8.00%	19	8.40%	19	8.40%	19	8.40%
Gly (G)	16	7.10%	15	6.70%	16	7.10%	16	7.10%	16	7.10%	15	6.70%	16	7.10%	16	7.10%	16	7.10%	16	7.10%
Ile (I)	3	1.30%	4	1.80%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%	2	0.90%
Leu (L)	24	10.70%	24	10.70%	24	10.70%	25	11.10%	24	10.70%	24	10.70%	24	10.70%	25	11.10%	25	11.10%	25	11.10%
Lys (K)	13	5.80%	13	5.80%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	13	5.80%	13	5.80%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%
Met (M)	10	4.40%	10	4.40%	10	4.40%	10	4.40%	10	4.40%	10	4.40%	9	4.00%	10	4.40%	9	4.00%	10	4.40%
Phe (F)	8	3.60%	9	4.00%	10	4.40%	10	4.40%	9	4.00%	10	4.40%	9	4.00%	10	4.40%	10	4.40%	10	4.40%
Ser (S)	13	5.80%	13	5.80%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%	13	5.80%	12	5.30%	12	5.30%	12	5.30%
Thr (T)	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%	14	6.20%
Trp (W)	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%	4	1.80%
Tyr (Y)	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%	1	0.40%
Val (V)	11	4.90%	12	5.30%	11	4.90%	11	4.90%	11	4.90%	12	5.30%	12	5.30%	11	4.90%	11	4.90%	11	4.90%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

Analisis Komposisi Protein

Gen NS2

AA	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Arg (R)	10	8.40%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	10	8.40%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%
Asn (N)	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%
Asp (D)	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Cys (C)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Gln (Q)	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%
Glu (E)	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%
Gly (G)	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
His (H)	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Ile (I)	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%	9	7.60%
Leu (L)	17	14.30%	17	14.30%	17	14.30%	16	13.40%	17	14.30%	16	13.40%	16	13.40%	16	13.40%	17	14.30%	19	16.00%
Lys (K)	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%
Met (M)	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%
Phe (F)	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%
Pro (P)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Ser (S)	10	8.40%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%
Thr (T)	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%
Trp (W)	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%
Tyr (Y)	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Val (V)	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

AA	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Ala (A)	4	3.40%	3	2.70%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Arg (R)	9	7.60%	8	7.20%	10	8.40%	9	7.60%	10	8.40%	9	7.60%	9	7.60%	11	9.20%	10	8.40%	10	8.40%
Asn (N)	3	2.50%	3	2.70%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%	3	2.50%
Asp (D)	4	3.40%	4	3.60%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Cys (C)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Gln (Q)	11	9.20%	10	9.00%	13	10.90%	11	9.20%	10	8.40%	11	9.20%	11	9.20%	10	8.40%	10	8.40%	10	8.40%
Glu (E)	13	10.90%	13	11.70%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%	13	10.90%
Gly (G)	4	3.40%	4	3.60%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
His (H)	4	3.40%	4	3.60%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Ile (I)	9	7.60%	8	7.20%	10	8.40%	9	7.60%	10	8.40%	9	7.60%	9	7.60%	11	9.20%	10	8.40%	10	8.40%
Leu (L)	16	13.40%	15	13.50%	17	14.30%	16	13.40%	17	14.30%	16	13.40%	16	13.40%	16	13.40%	17	14.30%	17	14.30%
Lys (K)	5	4.20%	5	4.50%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%	5	4.20%
Met (M)	6	5.00%	6	5.40%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%	6	5.00%
Phe (F)	8	6.70%	8	7.20%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%	8	6.70%
Pro (P)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Ser (S)	11	9.20%	10	9.00%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%	11	9.20%
Thr (T)	2	1.70%	2	1.80%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%
Trp (W)	2	1.70%	2	1.80%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%	2	1.70%
Tyr (Y)	4	3.40%	4	3.60%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Val (V)	4	3.40%	4	3.60%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%	4	3.40%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

Lampiran 6

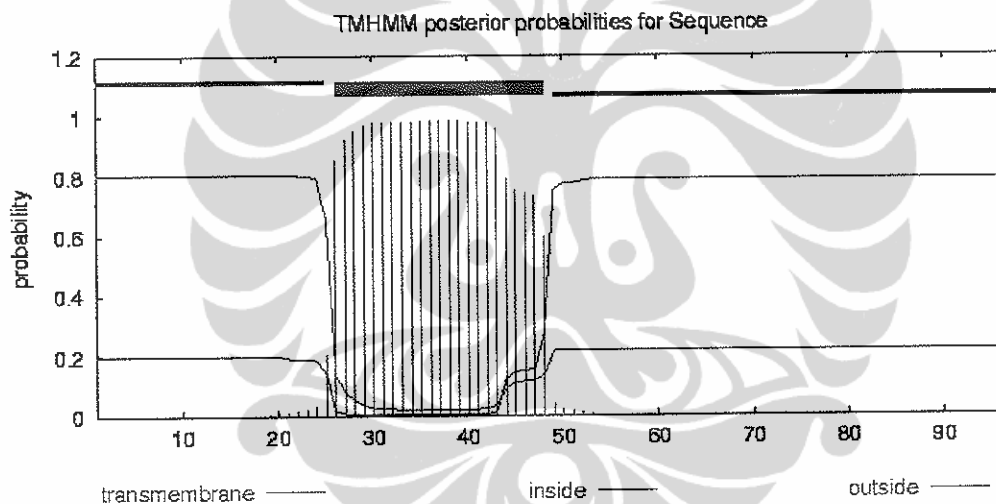
Hasil Prediksi Protein Transmembran dengan menggunakan TMHMM

Hasil TMHMM untuk membuktikan bahwa protein tersebut adalah protein transmembran

TMHMM result 1074 (M2 - A/Ck/WJ/1074/03)

HELP with output formats

```
# Sequence Length: 97
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 21.2843
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 21.2843
# Sequence Total prob of N-in: 0.19823
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence
Sequence      TMHMM2.0      outside      1      25
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix     26     48
Sequence      TMHMM2.0      inside      49     97
```

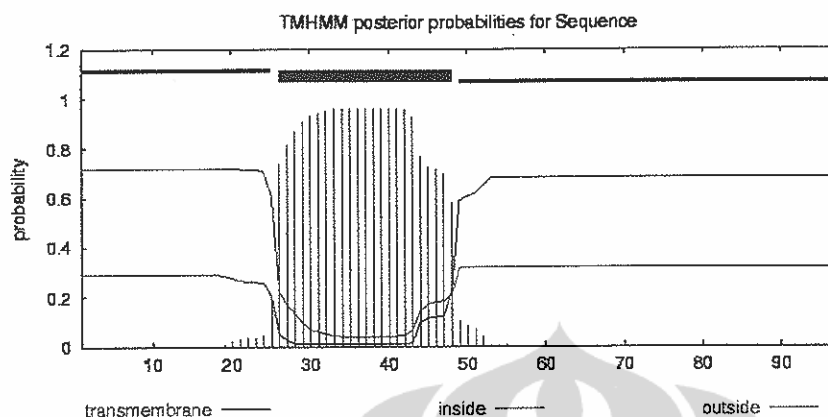


TMHMM result Biotek (M2 - A/Ck/WJ/SMI-Biotek/08)

HELP with output formats

```
# Sequence Length: 97
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 20.67793
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 20.67793
# Sequence Total prob of N-in: 0.28662
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence
Sequence      TMHMM2.0      outside      1      25
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix     26     48
Sequence      TMHMM2.0      inside      49     97
```

Lampiran 6 (Lanjutan)

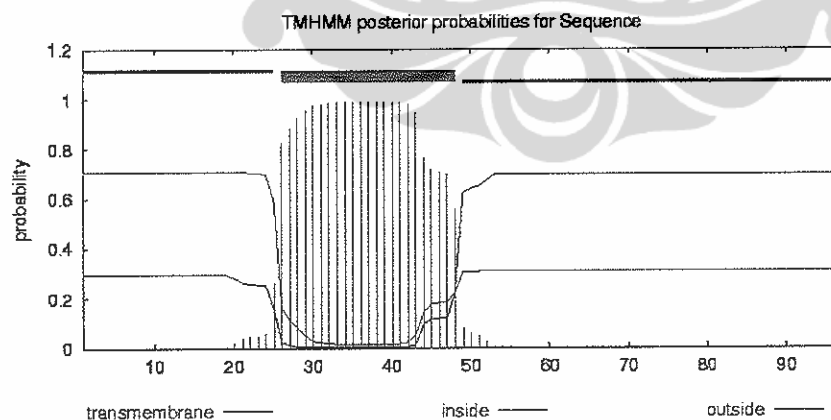


plot in postscript, script for making the plot in gnuplot, data for plot

TMHMM result Inhu (M2 - A/Ck/Inhu/BPPVR11/08)

HELP with output formats

```
# Sequence Length: 97
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 21.37998
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 21.37998
# Sequence Total prob of N-in: 0.29448
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence
Sequence      TMHMM2.0      outside      1      25
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix     26     48
Sequence      TMHMM2.0      inside      49     97
```



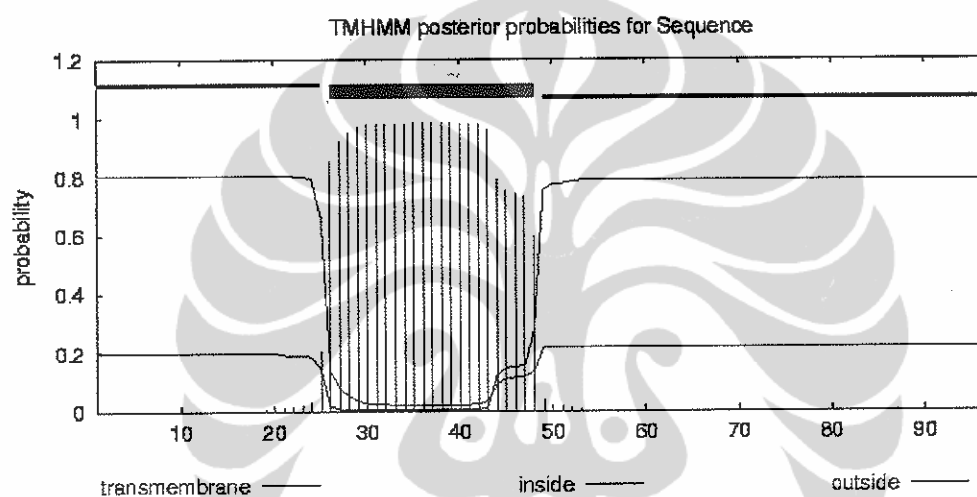
plot in postscript, script for making the plot in gnuplot, data for plot

TMHMM result IPA(M2 - A/Ck/EJ/BL-IPA/03)HELP with output formats

```

# Sequence Length: 97
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 21.2843
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 21.2843
# Sequence Total prob of N-in: 0.19823
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence
Sequence      TMHMM2.0      outside      1      25
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix     26      48
Sequence      TMHMM2.0      inside      49      97

```



```

# plot in postscript, script for making the plot in gnuplot, data for plot

```


Lampiran 7

Persentase Mutasi Virus AI asal Indonesia pada protein HA, NA, M1 dan NS1

Tabel a. Jumlah mutasi dan persentase asam amino pada protein HA virus influenza H5N1 asal Indonesia dibandingkan dengan virus AI H5N1 yang diisolasi pada tahun 2003

No	Isolat Virus influenza H5N1	Jumlah asam amino yang mengalami mutasi	Persentase asam amino yang mengalami mutasi	Persentase homologi asam amino
1	A/Ck/West Java/BL-IPA/2003	-	-	100,00
2	A/chicken/Indonesia/11/2003	0	0,00	100,00
3	A/chicken/Indonesia/7/2003	2	0,37	99,63
4	A/Ck/West Java/1074/2003	7	1,28	98,72
5	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	9	1,65	98,35
6	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	9	1,65	98,35
7	A/Turkey/Langkat/BBPVI/2005	8	1,47	98,53
8	A/Chicken/Deli Serdang/BPPV1/2005	9	1,65	98,35
9	A/Chicken/Duma/BBPVII/2005	10	1,83	98,17
10	A/chicken/Indonesia/CDC24/2005	8	1,47	98,53
11	A/chicken/Indonesia/CDC25/2005	8	1,47	98,53
12	A/Chicken/Indonesia/Wates1/2005	9	1,65	98,35
13	A/Chicken/Indonesia/Wates126/2005	9	1,65	98,35
14	A/Chicken/Indonesia/Wates130/2005	10	1,83	98,17
15	A/Chicken/Indonesia/Wates77/2005	6	1,10	98,90
16	A/Chicken/Indonesia/Wates80/2005	6	1,10	98,90
17	A/Chicken/Indonesia/Wates83/2005	7	1,28	98,72
18	A/Chicken/Langkat/BBPV1576/2005	10	1,83	98,17
19	A/Chicken/Madiun/BBVW1420/2005	9	1,65	98,35
20	A/Chicken/Medan/BBPV1571/2005	7	1,28	98,72
21	A/Chicken/Medan/BBPV1576/2005	6	1,10	98,90
22	A/Chicken/Medan/BPPV1498/2005	6	1,10	98,90
23	A/chicken/Medan/BPPV1534/2005	7	1,28	98,72
24	A/Chicken/Murao Jambi/BBPVII/2005	8	1,47	98,53
25	A/Chicken/Pakun Baru/BPPVII/2005	10	1,83	98,17
26	A/Chicken/Palembang/BPPVII/2005	9	1,65	98,35
27	A/Chicken/Pidie/BPPV1/2005	8	1,47	98,53
28	A/Chicken/Rokan Hilli/BPPVII/2005	8	1,47	98,53
29	A/Chicken/Agam/BBPVI/2005	8	1,47	98,53
30	A/Chicken/Sembawa/BPPVIII/2005	9	1,65	98,35
31	A/Chicken/Siak/BPPVII/2005	8	1,47	98,53
32	A/Chicken/Taput/BBPV1576/2005	6	1,10	98,90
33	A/Duck/Bufeleng/BPPV1/2005	9	1,65	98,35
34	A/Duck/Pali/BBVW1358/2005	7	1,28	98,72
35	A/Duck/Tabanan/BPPV1/2005	9	1,65	98,35
36	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	7	1,28	98,72
37	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	9	1,65	98,35
38	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	11	2,02	97,98
39	A/Indonesia/5/2005	9	1,65	98,35
40	A/Indonesia/6/2005	7	1,28	98,72
41	A/Indonesia/7/2005	9	1,65	98,35
42	A/Indonesia/160H/2005	11	2,02	97,98
43	A/Indonesia/175H/2005	10	1,83	98,17
44	A/Indonesia/195H/2005	11	2,02	97,98
45	A/Indonesia/239H/2005	11	2,02	97,98
46	A/Indonesia/245H/2005	10	1,83	98,17
47	A/Indonesia/CDC184/2005	11	2,02	97,98
48	A/Indonesia/CDC194P/2005	10	1,83	98,17
49	A/Indonesia/CDC287E/2005	11	2,02	97,98
50	A/Indonesia/CDC292N/2005	10	1,83	98,17
51	A/Indonesia/CDC7/2005	9	1,65	98,35
52	A/Muscovy Duck/Indonesia/Kedri163124/2006	12	2,20	97,80
53	A/Muscovy Duck/Jakarta/HABWIN/2006	10	1,83	98,17
54	A/Pigeon/Indonesia/Rokhit16316/2006	10	1,83	98,17
55	A/Quail/Central Java/SMRG/2006	9	1,65	98,35
56	A/Quail/Jakarta/JU1/2006	12	2,20	97,80

57	A/Chicken/Bandar Lampung/BBPVIII/2006	9	1,65	98,35
58	A/Chicken/Gunung Kidul/BBVW/2006	8	1,47	98,53
59	A/Chicken/Indonesia/Agam16313/2006	10	1,83	98,17
60	A/Chicken/Indonesia/Bandung163149/2006	11	2,02	97,98
61	A/Chicken/Indonesia/Bangka Seletan163120/2006	11	2,02	97,98
62	A/Chicken/Indonesia/Bangka Seletan163121/2006	11	2,02	97,98
63	A/Chicken/Indonesia/Belitung Timori163118/2006	10	1,83	98,17
64	A/Chicken/Indonesia/Garut163151/2006	11	2,02	97,98
65	A/Chicken/Indonesia/Gunung Kidul163133/2006	10	1,83	98,17
66	A/Chicken/Indonesia/Kulon163147/2006	10	1,83	98,17
67	A/Chicken/Indonesia/Lampung163123/2006	10	1,83	98,17
68	A/Chicken/Indonesia/Padang163111/2006	10	1,83	98,17
69	A/Chicken/Indonesia/Pekenbaru163111/2006	11	2,02	97,98
70	A/Chicken/Indonesia/Rejang Lebong163122/2006	9	1,65	98,35
71	A/Chicken/Indonesia/Siak16312/2006	10	1,83	98,17
72	A/Chicken/Karo/BBPVII/2006	8	1,47	98,53
73	A/Chicken/Padang/BBPVII/2006	7	1,28	98,72
74	A/Chicken/Papua/TA5/2006	13	2,39	97,61
75	A/Chicken/Papua/TB1/2006	12	2,20	97,80
76	A/Chicken/Papua/TB15/2006	13	2,39	97,61
77	A/Chicken/Pulau Rampang/BBPVII/2006	7	1,28	98,72
78	A/Chicken/Way Kanan/BBPVIII/2006	9	1,65	98,35
79	A/Chicken/West Java/GARUTMAY/2006	9	1,65	98,35
80	A/Chicken/West Java/HAMD/2006	2	0,37	99,63
81	A/Chicken/West Java/PWTWII/2006	27	4,95	95,05
82	A/Chicken/West Java/SMICSLKEB/2006	27	4,95	95,05
83	A/Chicken/West Java/SMICSLKEC/2006	27	4,95	95,05
84	A/Chicken/West Java/SMIENDRII/2006	19	3,49	96,51
85	A/Chicken/West Java/SMIPAT/2006	27	4,95	95,05
86	A/Chicken/West Java/TASIK1/2006	11	2,02	97,98
87	A/Chicken/West Java/TASIK2/2006	11	2,02	97,98
88	A/Chicken/West Java/TASIKSOB/2006	11	2,02	97,98
89	A/Chicken/West Java/TASIKSOL/2006	12	2,20	97,80
90	A/feline/Indonesia/CDC1/2006	11	2,02	97,98
91	A/Duck/Indramayu/BBPW109/2006	9	1,65	98,35
92	A/Indonesia/283H/2006	10	1,83	98,17
93	A/Indonesia/286H/2006	10	1,83	98,17
94	A/Indonesia/292H/2006	10	1,83	98,17
95	A/Indonesia/298H/2006	12	2,20	97,80
96	A/Indonesia/341H/2006	11	2,02	97,98
97	A/Indonesia/534H/2006	9	1,65	98,35
98	A/Indonesia/535H/2006	9	1,65	98,35
99	A/Indonesia/538H/2006	9	1,65	98,35
100	A/Indonesia/542H/2006	10	1,83	98,17
101	A/Indonesia/CDC326/2006	10	1,83	98,17
102	A/Indonesia/CDC329/2006	11	2,02	97,98
103	A/Indonesia/CDC357/2006	11	2,02	97,98
104	A/Indonesia/CDC370/2006	12	2,20	97,80
105	A/Indonesia/CDC390/2006	12	2,20	97,80
106	A/Indonesia/CDC582/2006	12	2,20	97,80
107	A/Indonesia/CDC594/2006	9	1,65	98,35
108	A/Indonesia/CDC595/2006	10	1,83	98,17
109	A/Indonesia/CDC596/2006	9	1,65	98,35
110	A/Indonesia/CDC597/2006	9	1,65	98,35
111	A/Indonesia/CDC599/2006	9	1,65	98,35
112	A/Indonesia/CDC610/2006	10	1,83	98,17
113	A/Indonesia/CDC623/2006	13	2,39	97,61
114	A/Indonesia/CDC624/2006	10	1,83	98,17
115	A/Indonesia/CDC625/2006	10	1,83	98,17
116	A/Indonesia/CDC634/2006	11	2,02	97,98
117	A/Indonesia/CDC644/2006	12	2,20	97,80
118	A/Indonesia/CDC669/2006	11	2,02	97,98
119	A/Indonesia/CDC699/2006	12	2,20	97,80
120	A/Indonesia/546bH/2006	9	1,65	98,35
121	A/Indonesia/546H/2006	9	1,65	98,35
122	A/Indonesia/560H/2006	8	1,47	98,53
123	A/Indonesia/567H/2006	12	2,20	97,80
124	A/Indonesia/604H/2006	11	2,02	97,98
125	A/Indonesia/CDC739/2006	12	2,20	97,80
126	A/Indonesia/CDC742/2006	11	2,02	97,98
127	A/Indonesia/CDC759/2006	13	2,39	97,61

128	A/Indonesia/CDC835/2006	10	1,83	98,17
129	A/Indonesia/CDC836/2006	11	2,02	97,98
130	A/Indonesia/CDC887/2006	14	2,57	97,43
131	A/Indonesia/CDC938/2006	14	2,57	97,43
132	A/Indonesia/CDC940/2006	11	2,02	97,98
133	A/Indonesia/TLL001/2006	11	2,02	97,98
134	A/Indonesia/TLL002/2006	9	1,65	98,35
135	A/Indonesia/TLL003/2006	12	2,20	97,80
136	A/Indonesia/TLL004/2006	13	2,39	97,61
137	A/Indonesia/TLL005/2006	10	1,83	98,17
138	A/Indonesia/TLL006/2006	9	1,65	98,35
139	A/Indonesia/TLL007/2006	11	2,02	97,98
140	A/Indonesia/TLL008/2006	10	1,83	98,17
141	A/Indonesia/TLL009/2006	14	2,57	97,43
142	A/Indonesia/TLL010/2006	10	1,83	98,17
143	A/Indonesia/TLL011/2006	10	1,83	98,17
144	A/Indonesia/TLL012/2006	15	2,75	97,25
145	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	3	0,55	99,45
146	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	6	1,10	98,90
147	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	3	0,55	99,45
148	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	3	0,55	99,45
149	A/Ck/inhu/BPPVRII/2007	4	0,73	99,27
150	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	27	4,95	95,05
151	A/Chicken/Indonesia/Magelang163157/2007	12	2,20	97,80
152	A/Chicken/Indonesia/Semerang163162/2007	11	2,02	97,98
153	A/Chicken/Indonesia/Soppeng163171/2007	9	1,65	98,35
154	A/Swan/Indonesia/Malang163161/2007	10	1,83	98,17
155	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	37	6,79	93,21
156	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	36	6,61	93,39
157	A/Indonesia/CDC1031/2007	12	2,20	97,80
158	A/Indonesia/CDC1032/2007	15	2,75	97,25
159	A/Indonesia/CDC1046/2007	17	3,12	96,88
160	A/Indonesia/CDC1047/2007	16	2,94	97,06
161	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	13	2,39	97,61
162	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	17	3,12	96,88
163	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	41	7,52	92,48
164	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	43	7,89	92,11
165	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	43	7,89	92,11

Lampiran 7 (Lanjutan)

Tabel b. Jumlah mutasi dan persentase asam amino pada protein NA virus influenza H5N1 asal Indonesia dibandingkan dengan virus AI H5N1 yang diisolasi pada tahun 2003

No	Isolat Virus influenza H5N1	Jumlah asam amino yang mengalami mutasi	Persentase asam amino yang mengalami mutasi	Persentase homologi asam amino
1	A/Ck/East Java/BI-IPA/2003		100,00	0,00
2	A/Ck/West Java/1074/2003	1	0,26	99,74
3	A/Ck/Indonesia/PA/2003	1	0,26	99,74
4	A/chicken/Indonesia/7/2003	5	1,30	98,70
5	A/Goose/Guangdong/1/96	50	12,99	87,01
6	A/Hong Kong/483/1997	41	10,65	89,35
7	A/Hong Kong/514/97	43	11,17	88,83
8	A/Hong Kong/542/97	46	11,95	88,05
9	A/Ck/Thailand/73/2004	16	4,16	95,84
10	A/Dk/Indonesia/MS/2004	4	1,04	98,96
11	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	5	1,30	98,70
12	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	6	1,56	98,44
13	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	4	1,04	98,96
14	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	4	1,04	98,96
15	A/Indonesia/5/2005	4	1,04	98,96
16	A/Indonesia/6/2005	6	1,56	98,44
17	A/Indonesia/7/2005	3	0,78	99,22
18	A/Indonesia/CDC7/2005	3	0,78	99,22
19	A/Indonesia/CDC184/2005	3	0,78	99,22
20	A/Indonesia/CDC194P/2005	4	1,04	98,96
21	A/Indonesia/CDC287E/2005	3	0,78	99,22
22	A/Indonesia/CDC292T/2005	4	1,04	98,96
23	A/Indonesia/160H/2005	3	0,78	99,22
24	A/Indonesia/175H/2005	4	1,04	98,96
25	A/Indonesia/195H/2005	3	0,78	99,22
26	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	2	0,52	99,48
27	A/Turkey/Langkat/BBPV1/2005	7	1,82	98,18
28	A/Chicken/Agam/BBPV1/2005	11	2,86	97,14
29	A/Chicken/Duma/BPPV11/2005	8	2,08	97,92
30	A/chicken/Indonesia/CDC24/2005	5	1,30	98,70
31	A/chicken/Indonesia/CDC25/2005	5	1,30	98,70
32	A/Chicken/Deli Derdang/BBPV1/2005	3	0,78	99,22
33	A/Chicken/Indonesia/Wates1/2005	3	0,78	99,22
34	A/Chicken/Indonesia/Wates126/2005	4	1,04	98,96
35	A/Chicken/Indonesia/Wates130/2005	3	0,78	99,22
36	A/Chicken/Indonesia/Wates77/2005	3	0,78	99,22
37	A/Chicken/Indonesia/Wates80/2005	6	1,56	98,44
38	A/Chicken/Indonesia/Wates83/2005	2	0,52	99,48
39	A/Chicken/Langkat/BBPV1/2005	6	1,56	98,44
40	A/Chicken/Medan/BBPV1-498/2005	7	1,82	98,18
41	A/Chicken/Medan/BBPV1-534/2005	7	1,82	98,18
42	A/Chicken/Medan/BBPV1-576/2005	7	1,82	98,18
43	A/Chicken/Murao Jambi/BPPV11/2005	4	1,04	98,96
44	A/Chicken/Palembang/BPPV111/2005	6	1,56	98,44
45	A/Chicken/Pakunbaru/BPPV11/2005	4	1,04	98,96
46	A/Chicken/Pidie/BBPV1/2005s	9	2,34	97,66
47	A/Chicken/Salam/BBPV11/2005	9	2,34	97,66
48	A/Duck/IBufeleng/BBPV1/2005	5	1,30	98,70
49	A/Duck/Madiun/BBVW1358/2005	6	1,56	98,44
50	A/Duck/Pali/BBVW/2005	5	1,30	98,70
51	A/Chicken/Siak/BPPV11/2005	11	2,86	97,14
52	A/Chicken/Gaput/BBPV1/2005	8	2,08	97,92
53	A/Chicken/Rokan Hilli/BPPV11/2005	11	2,86	97,14
54	A/Chicken/Bandar Lampung/BPPV11/2006	4	1,04	98,96
55	A/Chicken/Indonesia/Agam1631-3/2006	4	1,04	98,96
56	A/Chicken/Indonesia/Bangka Seletan1631-20/2006	4	1,04	98,96
57	A/Chicken/Indonesia/Garut1631-51/2006	5	1,30	98,70
58	A/Chicken/Indonesia/Kulon1631-47/2006	9	2,34	97,66
59	A/Chicken/Indonesia/Lampung1631-23/2006	5	1,30	98,70
60	A/Chicken/Indonesia/Padang1631-1/2006	4	1,04	98,96

61	A/Chicken/Indonesia/Pekenbaru1631-11/2006	5	1,30	98,70
62	A/Chicken/Indonesia/Rejang Lebong1631-22/2006	3	0,78	99,22
63	A/Chicken/Indonesia/Siak1631-2/2006	4	1,04	98,96
64	A/Chicken/Karo/BPPV1/2006	8	2,08	97,92
65	A/Chicken/Padang/BPPV11/2006	12	3,12	96,88
66	A/Chicken/Paulau Rampang/BPPV11/2006	12	3,12	96,88
67	A/Chicken/Way Kanan/BPPV111/2006	3	0,78	99,22
68	A/Duck/Indramayu/BBVW109/2006	2	0,52	99,48
69	A/feline/Indonesia/CDC1/2006	3	0,78	99,22
70	A/Indonesia/283H/2006	4	1,04	98,96
71	A/Indonesia/286H/2006	5	1,30	98,70
72	A/Indonesia/292H/2006	3	0,78	99,22
73	A/Indonesia/321H/2006	5	1,30	98,70
74	A/Indonesia/341H/2006	3	0,78	99,22
75	A/Indonesia/534H/2006	6	1,56	98,44
76	A/Indonesia/535H/2006	6	1,56	98,44
77	A/Indonesia/536H/2006	6	1,56	98,44
78	A/Indonesia/538H/2006	6	1,56	98,44
79	A/Indonesia/546H/2006	7	1,82	98,18
80	A/Indonesia/560H/2006	8	2,08	97,92
81	A/Indonesia/567H/2006	5	1,30	98,70
82	A/Indonesia/569H/2006		0,00	100,00
83	A/Indonesia/583H/2006	4	1,04	98,96
84	A/Indonesia/604H/2006	4	1,04	98,96
85	A/Indonesia/CDC326/2006	4	1,04	98,96
86	A/Indonesia/CDC329/2006	4	1,04	98,96
87	A/Indonesia/CDC357/2006	4	1,04	98,96
88	A/Indonesia/CDC370/2006	5	1,30	98,70
89	A/Indonesia/CDC390/2006	4	1,04	98,96
90	A/Indonesia/CDC523/2006	4	1,04	98,96
91	A/Indonesia/CDC582/2006	4	1,04	98,96
92	A/Indonesia/CDC594/2006	6	1,56	98,44
93	A/Indonesia/CDC595/2006	6	1,56	98,44
94	A/Indonesia/CDC596/2006	6	1,56	98,44
95	A/Indonesia/CDC597/2006	6	1,56	98,44
96	A/Indonesia/CDC599/2006	6	1,56	98,44
97	A/Indonesia/CDC610/2006	4	1,04	98,96
98	A/Indonesia/CDC623/2006	6	1,56	98,44
99	A/Indonesia/CDC624/2006	4	1,04	98,96
100	A/Indonesia/CDC625/2006	6	1,56	98,44
101	A/Indonesia/CDC634/2006	7	1,82	98,18
102	A/Indonesia/CDC644/2006	5	1,30	98,70
103	A/Indonesia/CDC669/2006	4	1,04	98,96
104	A/Indonesia/CDC699/2006	4	1,04	98,96
105	A/Indonesia/CDC739/2006	3	0,78	99,22
106	A/Indonesia/CDC742/2006	6	1,56	98,44
107	A/Indonesia/CDC759/2006	3	0,78	99,22
108	A/Indonesia/CDC835/2006	5	1,30	98,70
109	A/Indonesia/CDC836/2006	3	0,78	99,22
110	A/Indonesia/CDC887/2006	5	1,30	98,70
111	A/Indonesia/CDC938/2006	6	1,56	98,44
112	A/Indonesia/CDC940/2006	6	1,56	98,44
113	A/Pigeon/Indonesia/Rohkit1631-6/2006	4	1,04	98,96
114	A/Quail/Indonesia/Sleman1631-25/2006	5	1,30	98,70
115	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	5	1,30	99,08
116	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	7	1,82	98,72
117	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	4	1,04	99,27
118	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	6	1,56	98,90
119	A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	5	1,30	99,08
120	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	4	1,04	99,27
121	A/Chicken/Indonesia/Magelang1631-57/2007	5	1,30	98,70
122	A/Chicken/Indonesia/Semerang1631-62/2007	9	2,34	97,66
123	A/Chicken/Indonesia/Soppeng1631-71/2007	7	1,82	98,18
124	A/Indonesia/CDC1031/2007	5	1,30	98,70
125	A/Indonesia/CDC1032/2007	7	1,82	98,18
126	A/Indonesia/CDC1046/2007	3	0,78	99,22
127	A/Indonesia/CDC1047/2007	4	1,04	98,96
128	A/Swan/Indonesia/Magelang1631-57/2007	5	1,30	98,70
129	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	6	1,56	98,44
130	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	5	1,30	98,70
131	A/chicken/Thailand/NS-339/2008	24	6,23	93,77

132	A/chicken/Thailand/NS-342/2008	24	6,23	93,77
133	A/chicken/Thailand/PC-340/2008	24	6,23	93,77
134	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	12	3,12	96,88
135	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	11	2,86	97,14
136	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	8	2,08	97,92
137	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	7	1,82	98,18
138	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	8	2,08	97,92



Lampiran 7 (Lanjutan)

Tabel c. Jumlah mutasi dan persentase asam amino pada protein NS1 virus influenza H5N1 asal Indonesia dibandingkan dengan virus AI H5N1 yang diisolasi pada tahun 2003

No	Isolat Virus influenza H5N1	Jumlah asam amino yang mengalami mutasi	Persentase asam amino yang mengalami mutasi	Persentase homologi asam amino
1	A/Ck/East Java/Bl-Ipa/2003	217	100,00	0,00
2	A/Goose/Guangdong/1/96	80	36,87	63,13
3	A/Hong Kong/483/97	39	17,97	82,03
4	A/Hong Kong/497/97	51	23,50	76,50
5	A/Hong Kong/498/97	52	23,96	76,04
6	A/Hong Kong/514/97	39	17,97	82,03
7	A/Hong Kong/532/97	40	18,43	81,57
8	A/Hong Kong/542/97	40	18,43	81,57
9	A/duck/Guangdong/07/2000	77	35,48	64,52
10	A/duck/Zhejiang/11/2000	81	37,33	62,67
11	A/duck/Guangdong/12/2000	78	35,94	64,06
12	A/duck/Shanghai/08/2001	81	37,33	62,67
13	A/duck/Fujian/17/2001	12	5,53	94,47
14	A/duck/Guangxi/35/2001	13	5,99	94,01
15	A/duck/Guangxi/50/2001	9	4,15	95,85
16	A/duck/Shanghai/13/2001	10	4,61	95,39
17	A/duck/Fujian/13/2002	28	12,90	87,10
18	A/Ck/West Java/1074/2003	7	3,23	96,77
19	A/goose/Jiangsu/220/2003	8	3,69	96,31
20	A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003	6	2,76	97,24
21	A/Ck/Indonesia/2A/2003	3	1,38	98,62
22	A/Ck/Indonesia/BI/2003	2	0,92	99,08
23	A/Ck/Indonesia/PA/2003	4	1,84	98,16
24	A/duck/Guangxi/13/2004	8	3,69	96,31
25	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	8	3,69	96,31
26	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	11	5,07	94,93
27	A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XII-1/2004	4	1,84	98,16
28	A/chicken/Yogyakarta/BBVet-IX/2004	8	3,69	96,31
29	A/Ck/Indonesia/4/2004	4	1,84	98,16
30	A/Ck/Indonesia/5/2004	2	0,92	99,08
31	A/Dk/Indonesia/MS/2004	5	2,30	97,70
32	A/Ck/Jakarta/DKI131/2005	7	3,23	96,77
33	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	8	3,69	96,31
34	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	5	2,30	97,70
35	A/chicken/Bantul/BBVet-I/2005	4	1,84	98,16
36	A/chicken/Indonesia/CDC24/2005	8	3,69	96,31
37	A/chicken/Indonesia/CDC25/2005	8	3,69	96,31
38	A/chicken/Salatiga/BBVet-I/2005	5	2,30	97,70
39	A/chicken/Wajo/BBVM/2005	5	2,30	97,70
40	A/duck/Vietnam/1/2005	38	17,51	82,49
41	A/duck/Vietnam/8/05	38	17,51	82,49
42	A/Indonesia/160H/2005	5	2,30	97,70
43	A/Indonesia/175H/2005	7	3,23	96,77
44	A/Indonesia/195H/2005	6	2,76	97,24
45	A/Indonesia/239H/2005	6	2,76	97,24
46	A/Indonesia/245H/2005	5	2,30	97,70
47	A/Indonesia/5/2005	4	1,84	98,16
48	A/Indonesia/6/2005	4	1,84	98,16
49	A/Indonesia/7/2005	5	2,30	97,70
50	A/Indonesia/CDC184/2005	5	2,30	97,70
51	A/Indonesia/CDC194P/2005	7	3,23	96,77
52	A/Indonesia/CDC287E/2005	6	2,76	97,24
53	A/Indonesia/CDC292T/2005	5	2,30	97,70
54	A/Indonesia/CDC7/2005	5	2,30	97,70
55	A/feline/Indonesia/CDC1/2006	5	2,30	97,70
56	A/Indonesia/283H/2006	5	2,30	97,70
57	A/Indonesia/286H/2006	5	2,30	97,70
58	A/Indonesia/292H/2006	5	2,30	97,70
59	A/Indonesia/304H/2006	6	2,76	97,24
60	A/Indonesia/321H/2006	6	2,76	97,24
61	A/Indonesia/341H/2006	7	3,23	96,77

62	A/Indonesia/534H/2006	9	4,15	95,85
63	A/Indonesia/535H/2006	9	4,15	95,85
64	A/Indonesia/536H/2006	9	4,15	95,85
65	A/Indonesia/538H/2006	9	4,15	95,85
66	A/Indonesia/546H/2006	9	4,15	95,85
67	A/Indonesia/560H/2006	9	4,15	95,85
68	A/Indonesia/567H/2006	7	3,23	96,77
69	A/Indonesia/569H/2006	6	2,76	97,24
70	A/Indonesia/583H/2006	5	2,30	97,70
71	A/Indonesia/604H/2006	7	3,23	96,77
72	A/Indonesia/CDC326/2006	6	2,76	97,24
73	A/Indonesia/CDC329/2006	5	2,30	97,70
74	A/Indonesia/CDC357/2006	7	3,23	96,77
75	A/Indonesia/CDC370/2006	6	2,76	97,24
76	A/Indonesia/CDC390/2006	7	3,23	96,77
77	A/Indonesia/CDC523/2006	7	3,23	96,77
78	A/Indonesia/CDC582/2006	7	3,23	96,77
79	A/Indonesia/CDC594/2006	9	4,15	95,85
80	A/Indonesia/CDC595/2006	9	4,15	95,85
81	A/Indonesia/CDC596/2006	9	4,15	95,85
82	A/Indonesia/CDC597/2006	9	4,15	95,85
83	A/Indonesia/CDC599/2006	9	4,15	95,85
84	A/Indonesia/CDC610/2006	5	2,30	97,70
85	A/Indonesia/CDC623/2006	7	3,23	96,77
86	A/Indonesia/CDC624/2006	5	2,30	97,70
87	A/Indonesia/CDC625/2006	9	4,15	95,85
88	A/Indonesia/CDC634/2006	6	2,76	97,24
89	A/Indonesia/CDC644/2006	6	2,76	97,24
90	A/Indonesia/CDC669/2006	5	2,30	97,70
91	A/Indonesia/CDC699/2006	7	3,23	96,77
92	A/Indonesia/CDC739/2006	5	2,30	97,70
93	A/Indonesia/CDC742/2006	6	2,76	97,24
94	A/Indonesia/CDC759/2006	5	2,30	97,70
95	A/Indonesia/CDC835/2006	5	2,30	97,70
96	A/Indonesia/CDC836/2006	5	2,30	97,70
97	A/Indonesia/CDC887/2006	8	3,69	96,31
98	A/Indonesia/CDC938/2006	7	3,23	96,77
99	A/Indonesia/CDC940/2006	5	2,30	97,70
100	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	7	3,23	96,77
101	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	5	2,30	97,7
102	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	11	5,07	94,93
103	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007	32	14,75	85,25
104	A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007	10	4,61	95,39
105	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	7	3,23	96,77
106	A/Indonesia/CDC1031/2007	7	3,23	96,77
107	A/Indonesia/CDC1032/2007	9	4,15	95,85
108	A/Indonesia/CDC1032N/2007	8	3,69	96,31
109	A/Indonesia/CDC1046/2007	8	3,69	96,31
110	A/Indonesia/CDC1047/2007	8	3,69	96,31
111	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	8	3,69	96,31
112	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	7	3,23	96,77
113	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	7	3,23	96,77
114	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	8	3,69	96,31
115	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	8	3,69	96,31
116	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	9	4,15	95,85
117	A/Ck/West Java/SMI-Blot/2008	10	4,61	95,39

Tabel d. Jumlah mutasi dan persentase asam amino pada protein M1 virus influenza H5N1 asal Indonesia dibandingkan dengan virus AI H5N1 yang diisolasi pada tahun 2003

No	Isolat Virus influenza H5N1	Jumlah asam amino yang mengalami mutasi	Persentase asam amino yang mengalami mutasi	Persentase homologi asam amino
1	A/Ck/Eastt Java/BI-IPA/2003	243	100,00	0,00
2	A/chicken/Indonesia/11/2003	1	0,41	99,59
3	A/chicken/Indonesia/7/2003	0	0,00	100,00
4	A/Ck/West Java/1074/2003	0	0,00	100,00
5	A/chicken/Pekalongan/BPPV4/2003	0	0,00	100,00
6	A/mallard/Vietnam/3/2003	2	0,82	99,18
7	A/chicken/Sragen/BPPV4/2003	0	0,00	100,00
8	A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003	0	0,00	100,00
9	A/Ck/Indonesia/2A/2003	0	0,00	100,00
10	A/Ck/Indonesia/BL/2003	0	0,00	100,00
11	A/Ck/Indonesia/PA/2003	0	0,00	100,00
12	A/chicken/Vietnam/4/2003	2	0,82	99,18
13	A/chicken/Yogyakarta/BBVet-IX/2004	1	0,41	99,59
14	A/Ck/Indonesia/4/2004	0	0,00	100,00
15	A/Ck/Indonesia/5/2004	0	0,00	100,00
16	A/Dk/Indonesia/MS/2004	0	0,00	100,00
17	A/chicken/Bangli Bali/BPPV6-1/2004	0	0,00	100,00
18	A/chicken/Bangli Bali/BPPV6-2/2004	0	0,00	100,00
19	A/chicken/Jembrana/BPPV6/2004	0	0,00	100,00
20	A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XII-1/2004	0	0,00	100,00
21	A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XII-2/2004	0	0,00	100,00
22	A/chicken/Kupang-1-NTT/BPPV6/2004	1	0,41	99,59
23	A/chicken/Kupang-2-NTT/BPPV6/2004	0	0,00	100,00
24	A/chicken/Kupang-3-NTT/BPPV6/2004	0	0,00	100,00
25	A/quail/Boyolali/BPPV4/2004	0	0,00	100,00
26	A/quail/Tasikmalaya/BPPV4/2004	0	0,00	100,00
27	A/quail/Vietnam/177/2004	2	0,82	99,18
28	A/quail/Yogyakarta/BBVet-IX/2004	0	0,00	100,00
29	A/Thailand/1(KAN-1)/2004	2	0,82	99,18
30	A/turkey/Kedaton/BPPV3/2004	1	0,41	99,59
31	A/Vietnam/CL36/2004	1	0,41	99,59
32	A/chicken/Mangarai-NTT/BPPV6/2004	0	0,00	100,00
33	A/chicken/Ngawi/BPPV4/2004	0	0,00	100,00
34	A/chicken/Pangkalpinang/BPPV3/2004	1	0,41	99,59
35	A/chicken/Purwakarna/BBVet-IV/2004	0	0,00	100,00
36	A/chicken/Malang/BBVet-JV/2004	0	0,00	100,00
37	A/goose/Vietnam/264/2004	1	0,41	99,59
38	/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	3	1,23	98,77
39	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	1	0,41	99,59
40	A/Ck/Jakarta/DK131/2005	0	0,00	100,00
41	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	1	0,41	99,59
42	A/Indonesia/CDC7/2005	1	0,41	99,59
43	A/wild bird/Vietnam/434/2005	1	0,41	99,59
44	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	0	0,00	100,00
45	A/chicken/Bantul/BBVet-I/2005	0	0,00	100,00
46	A/chicken/Dairi/BPPVI/2005	0	0,00	100,00
47	A/chicken/Deli Serdang/BPPVI/2005	0	0,00	100,00
48	A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/2005	1	0,41	99,59
49	A/chicken/Indonesia/CDC24/2005	3	1,23	98,77
50	A/chicken/Indonesia/CDC25/2005	3	1,23	98,77
51	A/chicken/Kulon Progo/BBVW/2005	0	0,00	100,00
52	A/chicken/Magetan/BBVW/2005	1	0,41	99,59
53	A/chicken/Purworejo/BBVW/2005	2	0,82	99,18
54	A/chicken/Salatiga/BBVet-I/2005	1	0,41	99,59
55	A/chicken/Simalanggang/BPPVI/2005	0	0,00	100,00
56	A/chicken/Tarutung/BPPVI/2005	0	0,00	100,00
57	A/chicken/Tebing Tinggi/BPPVI/2005	0	0,00	100,00
58	A/chicken/Wajo/BBVM/2005	1	0,41	99,59
59	A/duck/Parepare/BBVM/2005	1	0,41	99,59
60	A/duck/Vietnam/317/2005	1	0,41	99,59
61	A/Indonesia/5/2005	1	0,41	99,59
62	A/Indonesia/6/2005	4	1,65	98,35
63	A/Indonesia/7/2005	1	0,41	99,59

64	A/Indonesia/CDC184/2005	1	0,41	99,59
65	A/Indonesia/CDC194P/2005	1	0,41	99,59
66	A/Indonesia/CDC287E/2005	4	1,65	98,35
67	A/Indonesia/CDC292T/2005	4	1,65	98,35
68	A/Indonesia/160H/2005	1	0,41	99,59
69	A/Indonesia/175H/2005	1	0,41	99,59
70	A/Indonesia/239H/2005	4	1,65	98,35
71	A/Indonesia/245H/2005	4	1,65	98,35
72	A/Indonesia/283H/2006	4	1,65	98,35
73	A/Indonesia/286H/2006	4	1,65	98,35
74	A/Indonesia/292H/2006	4	1,65	98,35
75	A/Indonesia/298H/2006	1	0,41	99,59
76	A/Indonesia/304H/2006	4	1,65	98,35
77	A/Indonesia/321H/2006	1	0,41	99,59
78	A/Indonesia/341H/2006	1	0,41	99,59
79	A/Indonesia/534H/2006	0	0,00	100,00
80	A/Indonesia/535H/2006	0	0,00	100,00
81	A/Indonesia/536H/2006	0	0,00	100,00
82	A/Indonesia/538H/2006	0	0,00	100,00
83	A/Indonesia/542H/2006	4	1,65	98,35
84	A/Indonesia/546H/2006	0	0,00	100,00
85	A/Indonesia/560H/2006	0	0,00	100,00
86	A/Indonesia/567H/2006	4	1,65	98,35
87	A/Indonesia/569H/2006	1	0,41	99,59
88	A/Indonesia/583H/2006	5	2,06	97,94
89	A/Indonesia/604H/2006	5	2,06	97,94
90	A/Indonesia/CDC326/2006	4	1,65	98,35
91	A/Indonesia/CDC329/2006	5	2,06	97,94
92	A/Indonesia/CDC357/2006	4	1,65	98,35
93	A/Indonesia/CDC370/2006	1	0,41	99,59
94	A/Indonesia/CDC390/2006	1	0,41	99,59
95	A/Indonesia/CDC523/2006	4	1,65	98,35
96	A/Indonesia/CDC582/2006	4	1,65	98,35
97	A/Indonesia/CDC594/2006	0	0,00	100,00
98	A/Indonesia/CDC595/2006	0	0,00	100,00
99	A/Indonesia/CDC596/2006	0	0,00	100,00
100	A/Indonesia/CDC597/2006	0	0,00	100,00
101	A/Indonesia/CDC599/2006	0	0,00	100,00
102	A/Indonesia/CDC610/2006	4	1,65	98,35
103	A/Indonesia/CDC623/2006	1	0,41	99,59
104	A/Indonesia/CDC624/2006	1	0,41	99,59
105	A/Indonesia/CDC625/2006	0	0,00	100,00
106	A/Indonesia/CDC634/2006	4	1,65	98,35
107	A/Indonesia/CDC644/2006	4	1,65	98,35
108	A/Indonesia/CDC669/2006	5	2,06	97,94
109	A/Indonesia/CDC699/2006	5	2,06	97,94
110	A/Indonesia/CDC836/2006	4	1,65	98,35
111	A/Indonesia/CDC887/2006	4	1,65	98,35
112	A/Indonesia/CDC938/2006	4	1,65	98,35
113	A/Indonesia/CDC940/2006	4	1,65	98,35
114	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	12	4,94	95,06
115	A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	9	3,70	96,3
116	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	4	1,65	98,35
117	A/Ck/Pessel/BPPVR1/2007	4	1,65	98,35
118	A/Ck/Inhu/BPPVR2/2007	6	2,47	97,53
119	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	19	7,82	92,18
120	A/Indonesia/CDC1031/2007	4	1,65	98,35
121	A/Indonesia/CDC1032/2007	5	2,06	97,94
122	A/Indonesia/CDC1046/2007	4	1,65	98,35
123	A/Indonesia/CDC1047/2007	4	1,65	98,35
124	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	8	3,29	96,31
125	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	5	2,06	97,94
126	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	4	1,65	98,35
127	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	4	1,65	98,35
128	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	9	3,70	96,30
129	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	8	3,29	96,71
130	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	7	2,88	97,12

Lampiran 8

Hasil penjejeran asam amino protein HA1-virus pav-AI dengan virus yang menjadi seed vaksin (Mex/232/94; Wisc/68 dan N28/73) di Indonesia

Gambar a) Hasil penjejeran asam amino virus seed vaksin A/Turkey/England/N28/73 dengan 20 virus AI yang digunakan dalam penelitian ini

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A/Turkey/England/N28/73	DQICIGYHANNSTEQVDITMERNVYVTHAQDILERTINGKLSLNGVPLILRDCSVAGLIGNPNCDFLNFVNSWYIVKDNPTMGLCYGGDFNDYEE									
A/Ck/West Java/1074/2003										
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2										
A/Ck/Pesael/BPPVRII/2007										
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007										
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005										
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005										
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005										
A/Ck/West Java/BL-IPA/2003										
A/Duck/Banten/Edgl-Kas/2004										
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Suml										
A/Duck/Jakarta/DKI-Slnt306/200										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit										
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008										
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007										
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007										
A/Ck/West Java/Smi-M1/2008										
A/Ck/West Java/Smi-M6/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008										
A/Chicken/West Java/PWRI/200										
A/Chicken/West Java/SMPAT/200										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A/Turkey/England/N28/73	LKHLLSSTHFEKIQIIPRSWSMHDASGVSSAGFYNYGRSSFFRNWVWIKQKNAIYPTIKRSYNYMQRDLLELWGHHPNDAAEQKLYQNPPTIVS									
A/Ck/West Java/1074/2003										
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2										
A/Ck/Pesael/BPPVRII/2007										
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007										
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005										
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005										
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005										
A/Ck/West Java/BL-IPA/2003										
A/Duck/Banten/Edgl-Kas/2004										
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Suml										
A/Duck/Jakarta/DKI-Slnt306/200										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit										
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008										
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007										
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007										
A/Ck/West Java/Smi-M1/2008										
A/Ck/West Java/Smi-M6/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008										
A/Chicken/West Java/PWRI/200										
A/Chicken/West Java/SMPAT/200										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A/Turkey/England/N28/73	VGTSTLNQSVPEIATRPVNGCSGRMEFTWILKPNDAINFESNGNFAPEYAKIVKQGSATPKSGLEYGNCHTCCQYFFGAINSSMEYHNIHPLTI									
A/Ck/West Java/1074/2003										
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2										
A/Ck/Pesael/BPPVRII/2007										
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007										
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005										
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005										
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005										
A/Ck/West Java/BL-IPA/2003										
A/Duck/Banten/Edgl-Kas/2004										
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Suml										
A/Duck/Jakarta/DKI-Slnt306/200										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit										
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008										
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007										
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007										
A/Ck/West Java/Smi-M1/2008										
A/Ck/West Java/Smi-M6/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008										
A/Chicken/West Java/PWRI/200										
A/Chicken/West Java/SMPAT/200										
	310	320	330							
A/Turkey/England/N28/73	GECPYKSNRLVLTGPRNVQPRETR--GLEGA									
A/Ck/West Java/1074/2003										
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2										
A/Ck/Pesael/BPPVRII/2007										
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007										
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005										
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005										
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005										
A/Ck/West Java/BL-IPA/2003										
A/Duck/Banten/Edgl-Kas/2004										
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Suml										
A/Duck/Jakarta/DKI-Slnt306/200										
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit										
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008										
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007										
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007										
A/Ck/West Java/Smi-M1/2008										
A/Ck/West Java/Smi-M6/2008										
A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008										
A/Chicken/West Java/PWRI/200										
A/Chicken/West Java/SMPAT/200										

Lampiran 8 (Lanjutan)

Gambar b) Hasil penjejeran asam amino virus seed vaksin A/turkey/Wisconsin/68 dengan 20 virus AI yang digunakan dalam penelitian ini

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A/turkey/Wisconsin/68	DQKICIGYHANNSTKQVDTIEHKNVYTHAODILEKHNKGLCSLNGVRELLKDCSVAGMLGNEMKDEELNFWPNSYLVKNDHNTGLGCLYGFDFDIEY									
A/Turkey/England/N28/73
A/Ck/West Java/1074/2003
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2
A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007
A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005
A/Ck/West Java/BL-IPA/2003
A/Duck/Banten/Edgl-Kas/2004
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Suml
A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/200
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007
A/Ck/West Java/Smi-Sudi/2007
A/Ck/West Java/SMT-MI/2008
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008
A/Chicken/West Java/PWTW13/200
A/Chicken/West Java/SMI-PAT/200

Lampiran 8 (Lanjutan)

Gambar c) Hasil penjejeran asam amino virus seed vaksin A/chicken/Mexico/232/94 dengan 20 virus AI yang digunakan dalam penelitian ini

Table showing amino acid alignment for various virus strains. Columns are numbered 10-100, 110-200, 210-300, 310-330. Rows list strains like A/chicken/Mexico/232/94, A/Turkey/Wisconsin/66, A/Turkey/England/N28/73, etc.

Lampiran 9

Total jumlah dan posisi tempat glikosilasi protein HA dan NA dari virus AI yang di gunakan dalam penelitian ini

Jumlah dan letak glikosilasi gen HA

No	Isolat	HA										Total
		HA1								HA2		
		11	23	84	154	165	193	286	Sub Total	484	Sub total	
1	A/Ck/East Java/Bl-Ipa/2003	NST	NVT	NPA	NSA	NNT	NPT	NSS	5	NGT	1	6
2	A/Ck/West Java/1074/2003	NST	NVT	NPA	DSA	NNT	NPT	NSS	5	NGT	1	6
3	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	NST	NVT	NPA	NNT	NNT	NPS	NSS	6	NGT	1	7
4	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	NST	NVT	NPA	NNT	NNT	NPT	NSS	6	NGT	1	7
5	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	NST	NVT	NPA	NST	NNT	NPI	NSS	5	NGT	1	6
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	NST	NVT	NPA	NST	NNT	NPT	NSS	6	NGT	1	7
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	NST	NVT	NPT	NST	NNT	NPT	NSS	7	NGT	1	8
8	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	NST	NVT	NPT	NST	NNT	NPT	NSS	7	NGT	1	8
9	A/Duck/Jakarta/DKI-Sim306/2006	NST	NVT	NPA	NNT	NNT	NPT	NSS	6	NGT	1	7
10	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	NST	NVT	NPT	NST	KNT	NNT	NSS	6	NGT	1	7
11	A/Ck/Pesae/BPPVRII/2007	NST	NVT	NPT	NSA	NNT	NNT	NSS	6	NGT	1	7
12	A/Ck/Jaku/BPPVRII/2007	NST	NVT	NPA	NNT	NNT	NNT	NSS	6	NGT	1	7
13	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	NST	NVT	SPT	NST	KNT	NPT	NSS	4	NGT	1	5
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	NST	NVT	SPT	NST	KNT	NPI	NSS	4	NGT	1	5
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	NST	NVT	SPT	NST	KNT	NPI	NSS	4	NGT	1	5
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	NST	NVT	NPT	NST	NNT	NPT	NSS	7	NGT	1	8
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	NST	NVT	NPT	NST	NNT	NPT	NSS	7	NGT	1	8
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	NST	NVT	SPT	NST	KNT	NSI	NSS	4	NGT	1	5
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	NST	NVT	SPT	NST	KNT	NSI	NSS	4	NGT	1	5
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	NST	NVT	SPT	NST	KNT	NSI	NSS	4	NGT	1	5

Jumlah dan letak glikosilasi gen NA

No	Isolat	NA			Total
		88	146	235	
1	A/Ck/East Java/Bl-Ipa/2003	NSS	NGT	NGS	3
2	A/Ck/West Java/1074/2003	NSS	NGT	NGS	3
3	A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	NSS	NGT	NGS	3
4	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	NSS	NGT	NGS	3
5	A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	NSS	NGT	NGS	3
6	A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	NSS	NGT	NGS	3
7	A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	NSS	NGT	NGS	3
8	A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	NSS	NGT	NGS	3
9	A/Duck/Jakarta/DKI-Sim306/2006	NSS	NGT	NGS	3
10	A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	NSS	NGT	NGS	3
11	A/Ck/Pesae/BPPVRII/2007	NSS	NGT	NGS	3
12	A/Ck/Jaku/BPPVRII/2007	NSS	NGT	NGS	3
13	A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	NSS	NGT	NGS	3
14	A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	NSS	NGT	NGS	3
15	A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	NSS	NGT	NGS	3
16	A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	NSS	NGT	NGS	3
17	A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	NSS	NGT	NGS	3
18	A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	NSS	NGT	NGS	3
19	A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	NSS	NGT	NGS	3
20	A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	NSS	NGT	NGS	3

Keterangan :

Glikosilasi : Huruf warna hitam

Bukan Glikosilasi : Huruf warna merah



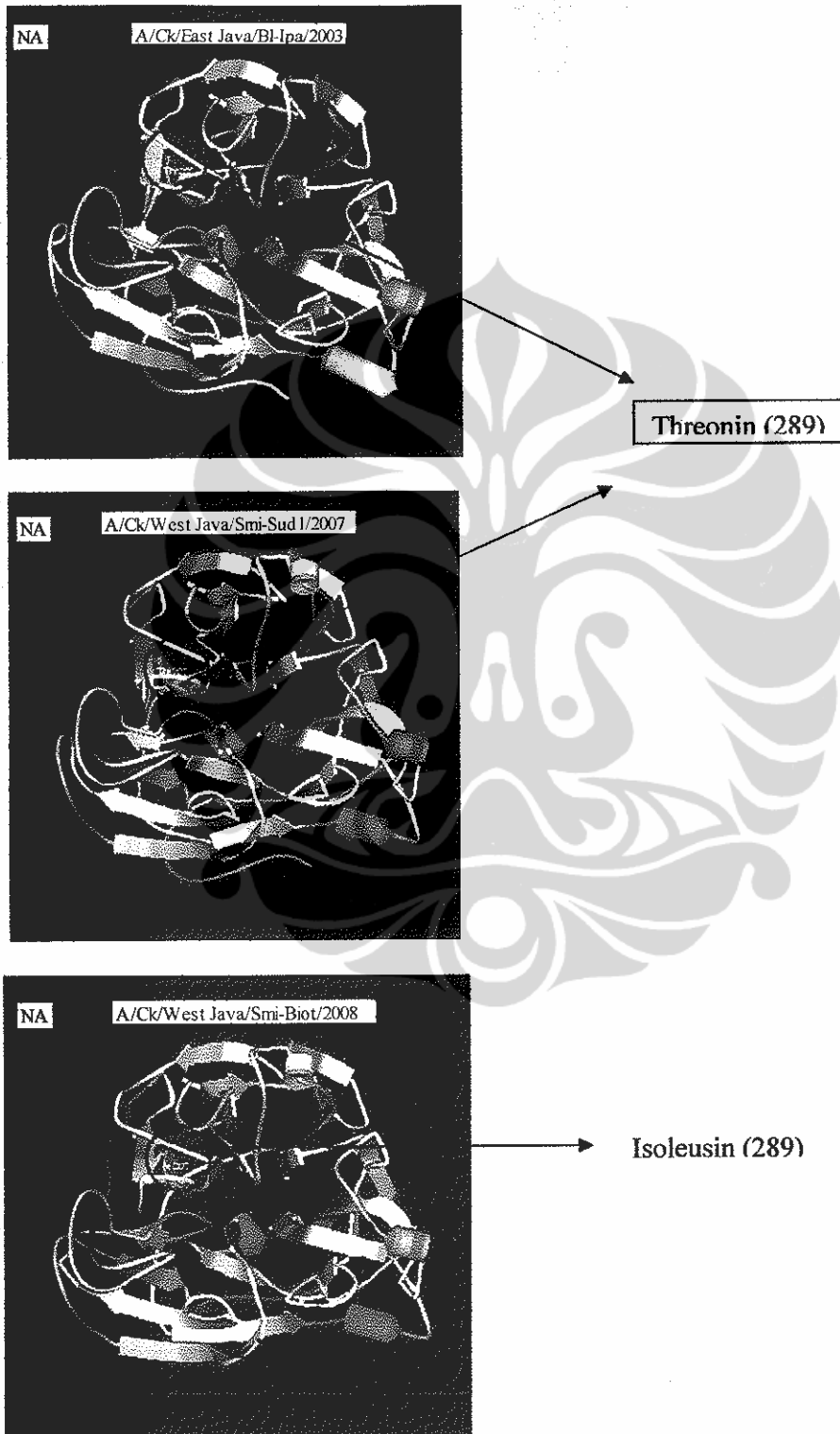
: Virus yang diisolasi dari unggas



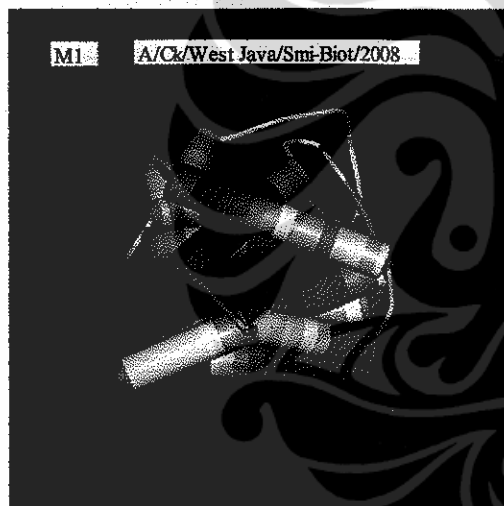
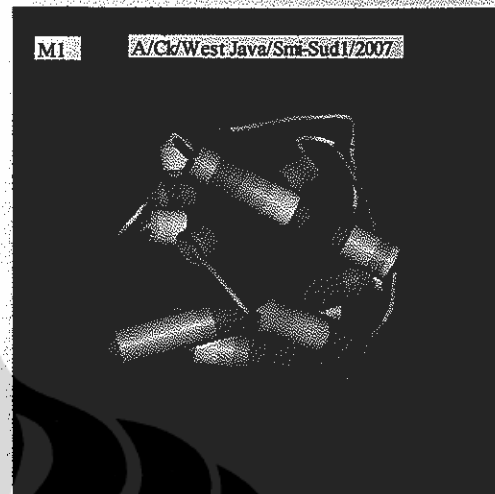
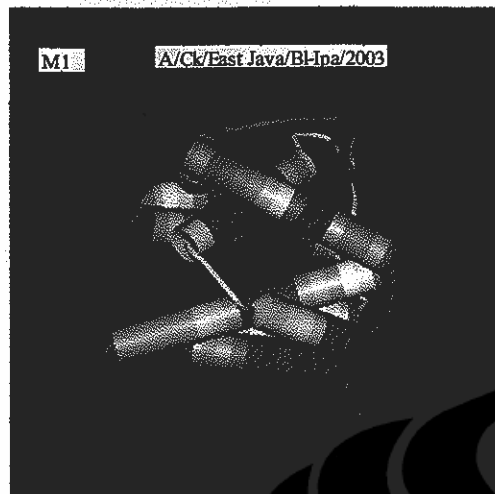
: Virus yang diisolasi dari unggas disekitar kasus manusia terinfeksi virus AI H5N1

Lampiran 10

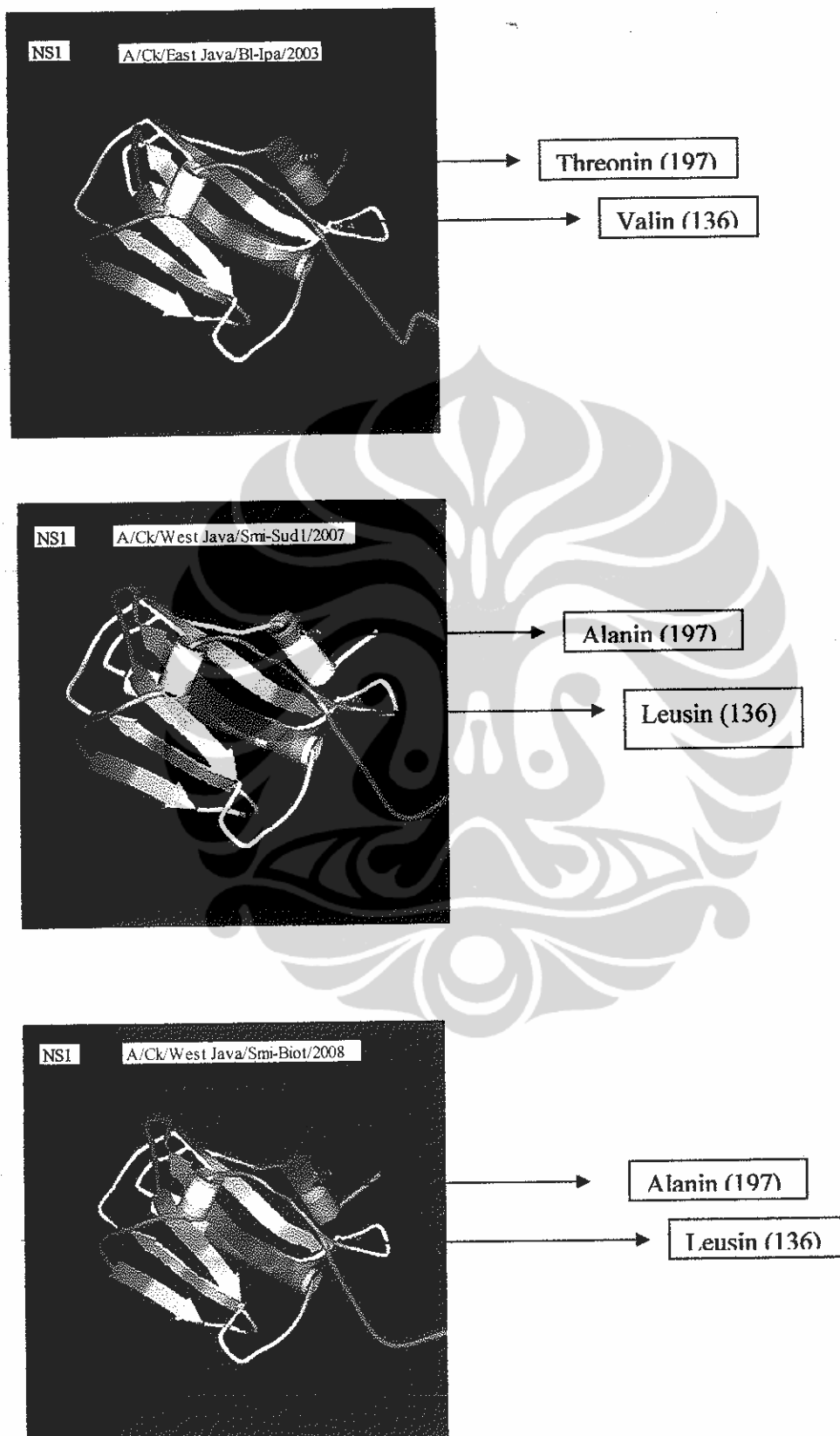
Visualisasi tiga dimensi (3D) protein HA, NA, M dan NS virus yang digunakan dalam penelitian ini



Lampiran 10 (Lanjutan)



Lampiran 10 (Lanjutan)



Lampiran 11

Data kasus AI dan sampel yang diisolasi dari unggas di sekitar kasus manusia terinfeksi virus H5N1

1. LAPORAN HASIL UJI IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 DI DKI JAKARTA

Tanggal Kunjungan : 25 September 2006

Lokasi : Jl. Raya Ciputat no. 41 Rt 09/09, Kel. Pondok pinang,
Kec. Kebayoran lama

Sejarah :

Ibu Sum mempunyai anak bernama F (9 tahun). Tidak banyak informasi yang diperoleh dari ibu Sum. Informasi yang diperoleh bahwa anaknya meninggal dunia pada tanggal 24 September 2006 karena terinfeksi flu burung dan tidak pernah bermain dengan unggas peliharaannya. Ibu Sum mempunyai beberapa unggas peliharaan, yang tiba-tiba mati tanpa diketahui sebabnya, yang tertinggal hanya satu ekor entok yang akan disembelih pada saat pengambilan sampel. Pengambilan Sampel di Rumah/sekitar Orang Suspect AI dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nama Peternak, jenis unggas dan hasil uji identifikasi virus AI sub tipe H5N1

No	Nama Peternak	Alamat	Jenis unggas (jumlah)	Hasil uji RT-PCR (sub tipe H5)	Hasil uji RT-PCR (sub tipe N1)
1	Shr	Jl. Raya Ciputat no. 41 Rt 09/09 Kel. Pondok pinang, Kec. Kebayaoran lama	Ayam buras	negatif	negatif
			Entok	positif	positif
2	Trim	sda	ayam buras	td	td
			kotoran kandang	negatif	negatif
3	Sum (Ibu F)	sda	entok	positif	positif
4	Ngdnn	sda	Ayam buras	negatif	negatif
			Itik	td	td
5	Abd	sda	tekukur	negatif	negatif
6	Muj	sda	itik	negatif	negatif
7	Sty	sda	Ayam buras	negatif	negatif
8	Slmt	sda	ayam	negatif	negatif
			itik	positif	positif
9	Mtp	sda	Ayam buras	negatif	negatif
10	Ssto	sda	Perkutut	positif	positif
11	Mrsd	sda	Ayam buras	negatif	negatif
12	Sgt	sda	Nuri	negatif	negatif

2. LAPORAN HASIL UJI IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 DI DKI JAKARTA DAN TANGERANG

Tgl kunjungan : 8-9 Januari 2007
 Lokasi : 1. Kampung Rawalele, Kelurahan Kalideres, Kec. Kalideres, Jakarta Barat
 2. Kelurahan Semanan, Kec kalideres, Jakarta Barat
 3. Kelurahan Pondok Jagung, Serpong, Tangerang
 Sejarah : Pada lokasi tersebut terdapat lima orang suspect terinfeksi AI (Kec. Kalideres) dan 1 orang suspect AI (Serpong)

Lima orang *suspect* AI (di Kec Kalideres):

1. R (14 th)

Alamat : Rt.02/Rw 10, Kp Rawalele, Kel. Kalideres, Kec. Kalideres

Sejarah R : R dalam keadaan sesak napas, koma di RS Persahabatan. Menurut ibu R (Ibu Rana) : Sebelumnya, sekitar 4 hari yang lalu, Ri sakit panas dan sesak napas, dibawa ke klinik umum. Sehari kemudian karena panasnya tidak turun dibawa ke RSU Tangerang, dan oleh RSU Tangerang dirujuk ke RS Persahabatan.

Sejarah Unggas : Orangtua R memelihara 18 ekor itik, 3 ekor ayam dan 4 pasang burung merpati. Letak kandang berjauhan dengan rumah, yaitu dilokasi Setu (Kolam Besar) disekitar RT.07/Rw 10, yang dipisahkan oleh jalan raya. Sebulan yang lalu, terjadi kematian pada 4 ekor itik dan satu ekor ayam. Sampai pengambilan sampel dilakukan populasi unggas yang tersisa adalah tiga ekor itik dan dua ekor ayam. Menurut pengakuan ibu R, R jarang bermain di lokasi kandang.

2. I (4,5 th)

Alamat : RT 08/RW 10

Dirawat di RS Persahabatan

Tidak punya unggas

3. A

Alamat : RT 08/RW 10

Dirawat di RS Persahabatan

Tidak punya unggas

4. W (5 th), sekolah TK

Alamat : RT 08/RW 10

Dirawat di RS Persahabatan

Tidak punya unggas

5. N (pembantu RT, bp Nababan karyawan Deptan), baru satu bulan tinggal di Bp Nab.

Alamat : RT 02/RW 10

Dirawat di RS Persahabatan

Tidak punya unggas

Satu orang suspect AI di Serpong :

H. R mempunyai anak bernama Ry. Mempunyai ayam 20 ekor, sekitar sebulan lalu terjadi kematian terhadap 13 ekor unggas. Pada akhir Desember 2006, Ry memotong dan memasak empat ekor ayam yang tersisa dan beberapa ekor ayam broiler yang dibeli dari pasar. Setelah kejadian itu, Ry menegluh batuk kering yang tidak sembuh-sembuh dan dibawa ke klinik 24 jam. Klinik 24 jam tersebut merujuk Ry ke RS Persahabatan.

HASIL UJI

Tabel 1. Nama Peternak, jenis unggas dan hasil uji identifikasi virus AI sub tipe H5N1

Nama Peternak	Alamat	Jenis unggas (jumlah)	Hasil uji HI (log2)	Hasil uji RT-PCR (sub tipe H5)	Hasil uji RT-PCR (sub tipe N1)
WILAYAH KALIDERES JAKARTA BARAT					
Bp U	RT 09/RW10	Burung jalak	negatif	negatif	
		Burung jalak hijau	negatif	negatif	
Bp. Mah		Burung Poksay	negatif	negatif	
		Burung Jalak	negatif	negatif	
Bp. Ml	RT 08/RW10	Alas kandang ayam			
		Alas kandang itik		negatif	
		Bulu ayam			negatif
Ibu An		Ayam (2 ekor, 2 bulan)	negatif	negatif	
Bp.Abd Rjk		Ayam (4 ekor)	negatif	negatif	
Wsito		Alas kandang			negatif
		Ayam	negatif	negatif	
Wt		Ayam (1 ekor)	negatif	positif	positif
Msn		Ayam (4 ekor)	negatif	negatif	
Onh		Ayam (1 ekor)	negatif	positif	positif
Amh	Ayam (2 ekor)	negatif	negatif		
	Entok (1 ekor)	negatif	negatif		
Ars	Entok (2ekor)	negatif	positif	positif	
Tidak berpemilik		Kucing			
Nurs	RT 02/RW 10	Ayam (2 ekor)	negatif	positif	positif
Ek		Merpati (5 ekor)	negatif	negatif	
Wrsn		Entok (2 entok)	negatif	negatif	

Zkr		Burung Puter	negatif	negatif	
		Burung Cerucut	negatif	negatif	
Bp. Ahmad	RT 07/RW 10		negatif	negatif	
Ran (ibunya R)		Itik (3 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (2 ekor)	negatif	negatif	
Msd	RT 05/RW 04 kel. Semanan	Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
Nsr		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Entok (4 ekor)	(titer : 2 ² , 2 ³ dan 2 ⁵)	negatif	
H. Sn		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Entok (3 ekor)	Titer 2 ⁵	negatif	
		Angsa (3 ekor)	Titer 2 ⁸ , 2 ⁵ dan 2 ⁴	negatif	
		Kutilang (1 ekor)		negatif	
Tt		Beo (1 ekor)		negatif	
				negatif	
				negatif	
WILAYAH SERPONG TANGGERANG					
Nurd	RT 05/RW02, Serpong Tangerang	Kucing	negatif	negatif	
Armt		Ayam (2 ekor)	negatif	negatif	
Tn		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Merpati (8 ekor)	negatif	negatif	
		Kucing (3 ekor)	negatif	negatif	
Mch Rkh			negatif	negatif	
H. R (bapaknya Ry)		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	
		Ayam (5 ekor)	negatif	negatif	

KESIMPULAN

Hasil pemeriksaan diatas diperoleh hasil bahwa terdapat 4 sampel dari wilayah Kelurahan Kalideres yang menunjukkan hasil positif H5N1 yaitu unggas yang berasal dari Ibu Wt, Ars, Onh dan Bpk Nurs.

3. LAPORAN HASIL UJI IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5 DI KABUPATEN BEKASI

Tanggal Kunjungan : 12 Januari 2007
 Lokasi : Kp Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan
 Serang Baru, Bekasi, Jawa Barat
 Sejarah : Pada lokasi tersebut terdapat 8 orang suspect terinfeksi AI

Pengambilan Sampel di Rumah Orang *Suspect* AI

1. Nj (12 tahun)

Alamat :

Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
 Bekasi, Jawa Barat

Sejarah Nj :

Pada tanggal 7 Januari 2007 sore Nj beserta 7 temannya yaitu Adr (10 tahun), M R (8 tahun), D (6 tahun), H (12 tahun), M (15 tahun), Dw (7 tahun) dan T (10 tahun) membakar 3 ekor ayam pemberian pak Mkr tetangga mereka. Pagi tanggal 8 Januari 2007 Nj yang merupakan anak pak Ahd mulai demam. Karena demamnya tetap tinggi disertai batuk dan pilek oleh orang tuanya dibawa ke dokter Obg (dokter praktek RS Siloam), oleh dokter Obing disarankan untuk dibawa ke puskesmas. Tanggal 10 Januari 2007 Nj dibawa ke RSUD Bekasi atas rujukan puskesmas terdekat, dan akhirnya dibawa ke RS Persahabatan.

Sejarah Unggas :

Orang tua Nj (pak Ahd) tidak mempunyai unggas peliharaan namun di dekat rumah ada beberapa warga yang memelihara unggas. Namun tetangganya pak Mkr mempunyai unggas peliharaan yaitu ayam buras (15 ekor) dan entok (35 ekor). Pak Mkr bekerja sebagai pedagang beras/gabah keliling. Kira-kira bulan November 2006 pak Mkr membeli 50 ekor ayam ras (broiler), namun karena pertumbuhannya dinilai lambat pada awal tahun 2007 pak Mkr berinisiatif mencoba memberi pakan dedak. Sejak pemberian dedak terjadi kematian ayam ras miliknya, dari 50 ekor tinggal 3 ekor. Sisa ayam 3 ekor ini oleh pak Mkr dipotong dan dagingnya diberikan ke anak-anak tetangga. Ayam buras miliknya tidak ada yang mati, ada beberapa ekor tampak lemah. Sebagai catatan, pada bulan September 2006, terjadi kematian sebagian unggas di kampung tersebut, namun tidak dilakukan investigasi.

2. M R (8 th)

Alamat :

Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
 Bekasi, Jawa Barat

Sejarah M R:

M R adik dari Nj. Dia ikut makan ayam pemberian pak Mkr. Tanggal 11 Januari 2007 mulai demam tinggi dan dibawa ke RS Persahabatan.

Sejarah Unggas :

Tidak punya unggas

3. A (10 th)
Alamat :
Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
Bekasi, Jawa Barat
Sejarah A :
A adalah anak pak Nana. Dia ikut makan ayam pemberian pak Mukri. Tanggal 10
Januari 2007 mulai demam tinggi dan dibawa ke RS Persahabatan.
Sejarah Unggas :
Tidak punya unggas
4. D (6 th)
Alamat :
Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
Bekasi, Jawa Barat
Sejarah D :
D adalah anak pak Sd. Dia ikut makan ayam pemberian pak Mkr. Dia mengalami
demam tinggi dan tanggal 12 Januari 2007 dibawa ke RS Persahabatan bersamaan
dengan 2 temannya yaitu H (12 tahun) dan M (15 tahun).
Sejarah Unggas :
Tidak punya unggas
5. H (12 tahun)
Alamat :
Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
Bekasi, Jawa Barat
Sejarah H :
H adalah anak pak Sd (kakak D). Dia ikut makan ayam pemberian pak Mkr. Dia
mengalami demam tinggi dan tanggal 12 Januari 2007 dibawa ke RS Persahabatan
bersamaan dengan 2 temannya yaitu D (6 tahun) dan M (15 tahun).
Sejarah Unggas :
Tidak punya unggas
6. M (15 tahun)
Alamat :
Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
Bekasi, Jawa Barat
Sejarah M :
M adalah anak pak J (alm.). Dia ikut makan ayam pemberian pak Mkr. Dia
mengalami demam tinggi dan tanggal 12 Januari 2007 dibawa ke RS Persahabatan
bersamaan dengan 2 temannya yaitu H (12 tahun) dan D (6 tahun).
Sejarah Unggas :
Tidak punya unggas
7. Dw (8 tahun)
Alamat :
Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru,
Bekasi, Jawa Barat

8. Sejarah Dw :
Dw adalah anak pak Rhm. Dia ikut makan ayam pemberian pak Mkr. Dw mengalami demam namun sembuh dengan-sendirinya sehingga tidak dibawa ke rumah sakit.
Sejarah Unggas :
Tidak punya unggas
9. T (10 tahun)
Alamat :
Kampung Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru, Bekasi, Jawa Barat
Sejarah T :
T adalah anak pak Ws. Dia ikut makan ayam pemberian pak Mkr. T mengalami demam namun sudah mulai membaik tetapi menunjukkan gejala flu ringan dan tidak dibawa ke rumah sakit
Sejarah Unggas :
Tidak punya unggas

HASIL UJI

Tabel 1. Nama Peternak, Jenis Unggas dan Hasil Uji Identifikasi virus AI sub tipe H5

Nama Peternak	Alamat (RT/RW)	Jenis unggas (ekor)	Hasil uji HI (log ₂)	Hasil Uji RT-PCR (sub tipe H5)
Mkr	(12/06)	Ayam buras (sakit) 1	negatif	negatif
		Ayam buras (sakit) 2	negatif	
		Ayam buras (sakit) 3	negatif	
		Ayam buras (sakit) 4	negatif	
		Ayam buras 5	negatif	positif
		Ayam buras 6	negatif	
		Ayam buras 7	negatif	
		Ayam buras 8	negatif	
		Ayam buras 9	negatif	
		Entok 1	negatif	positif
		Entok 2	negatif	
		Entok 3	negatif	
		Entok 4	negatif	
		Entok 5	negatif	
		Entok 6	negatif	
Entok 7	negatif			
Entok 8	negatif			
Entok 9	negatif			
Entok 10	negatif			
		Tidak diambil serumnya		
		Entok 11		
		Entok 12		
		Entok 13		
		Entok 14		
		Entok 15		
K	(12/06)	Ayam buras (1)	Tidak diambil serumnya	positif
		Entok (1)	negatif	negatif
H. Dmg	(12/06)	Entok (1)	Tidak diambil serumnya	negatif
		Kucing (1)	Tidak diambil serumnya	negatif
H. Sa	(12/06)	Entok 1	Tidak diambil serumnya	positif
		Entok 2		
Ecn	(12/06)	Ayam buras 1	negatif	positif
		Ayam buras 2	negatif	

Kmn	(12/06)	Entok 1	negatif	negatif
		Entok 2	negatif	
		Entok 3	negatif	
		Entok 4	negatif	
		Entok 5	negatif	
		Entok 6	negatif	
		Entok 7	negatif	
		Entok 8	negatif	
Mkn	(12/06)	Ayam buras (1)	negatif	positif
In	(12/06)	Ayam buras 1	negatif	negatif
		Ayam buras 2	Tidak diambil serumnya	
		Perkutut (1)	Tidak diambil serumnya	positif
		Kutilang (1)	Tidak diambil serumnya	negatif

Keterangan : Pengambilan sampel dilakukan bersamaan dengan kegiatan vaksinasi AI (H5N2/Qilu Biofarma) oleh UPTD Kecamatan Serang Baru Dinas Peternakan, Perikanan dan Kelautan Kabupaten Bekasi.

KESIMPULAN

Dari hasil pemeriksaan diatas diperoleh hasil bahwa terdapat 7 sampel dari wilayah Kp Cipalahlar RT 12/06 Kelurahan Sukaragam, Kecamatan Serang Baru, Bekasi, Jawa Barat yang menunjukkan hasil positif H5 yaitu unggas yang berasal dari Bp. Mkr (ayam buras), Bp. Mkr (entok), Bu K (ayam buras), H Sa (entok), Bu Een (ayam buras), Bp. Mkn (ayam buras) dan Bp. In (br. perkutut).

4. LAPORAN HASIL UJI IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 DI KABUPATEN TANGERANG

Tanggal Kunjungan : 22 Oktober 2007
 Lokasi : Kampung Sukaasih, Desa Sukaasih RT 05 RW 01, Kecamatan Pasar Kemis, Kabupaten Tangerang
 Sejarah : Pada lokasi tersebut terdapat 1 orang suspect terinfeksi AI

Pengambilan Sampel di Rumah Orang Suspect AI

DA (4,5 tahun)

Alamat : Kampung Sukaasih, Desa Sukaasih RT 05 RW 01, Kecamatan Pasar Kemis, Kabupaten Tangerang

Sejarah DA :

DA merupakan putri dari Bapak ZA yang masih berumur 4,5 tahun. Sehari setelah Hari Raya Idul Fitri 1428 H (14 Oktober 2007), DA mengalami sakit dengan gejala demam. Sehari kemudian Dewi dibawa ke Rumah Sakit milik ABRI (KESDAM) di Tangerang dan didiagnosa sebagai radang tenggorokan. Setelah mendapatkan pengobatan keadaan DA membaik, namun beberapa hari kemudian tepatnya tanggal 19 Oktober 2007, Dewi kembali mengalami sakit dengan gejala demam tinggi dan keesokan harinya dibawa ke Rumah Sakit Sari Asih di Tangerang. Setelah diopname selama 2 hari di Rumah Sakit Sari Asih, diagnosa mengarah pada suspect Flu Burung dan tanggal 22 Oktober 2007 DA dirujuk ke Rumah Sakit Persahabatan di Jakarta. Namun dalam perjalanan, DA meninggal dunia. Jenazah DA kemudian dibawa kembali ke Tangerang untuk

dikebumikan. Pemakaman DA dilakukan sesuai dengan prosedur untuk korban Flu Burung.

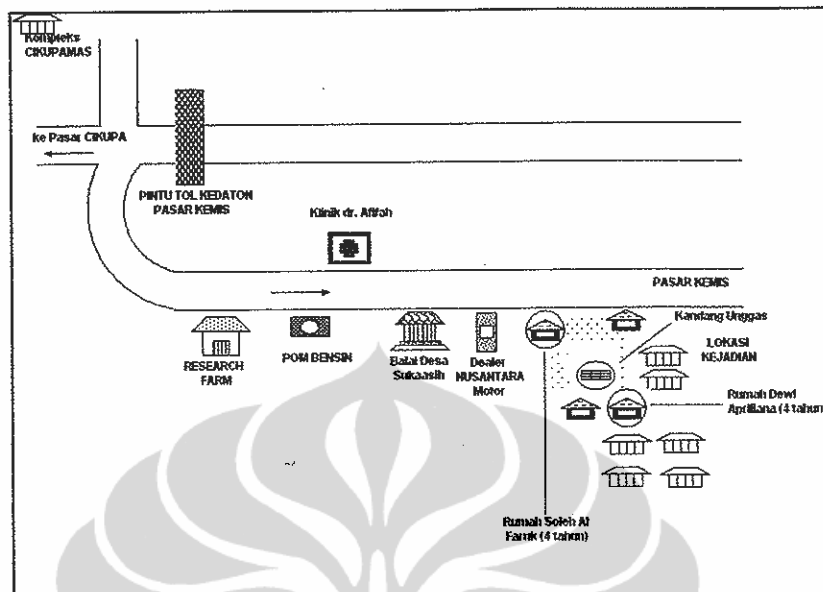
Pada tanggal 20 Oktober 2007, seorang anak bernama SAIF berumur 4 tahun putra pasangan AR dan Mh juga mengalami sakit dengan gejala demam. Bapak Ahmad merupakan tetangga dari Bapak ZA, dimana rumah mereka hanya berjarak sekitar 10 meter. Pada tanggal 21 Oktober 2007, SAIF sudah dibawa berobat ke seorang dokter praktek di Tangerang namun masih menunjukkan gejala sakit. Pada saat kunjungan Tim AI BBalitvet ke lokasi korban flu burung, dr. Gindo Simanjuntak dari Sekretariat Bersama Pilot Project Flu Burung untuk Tangerang melakukan pengambilan sampel swab dari anak yang menunjukkan gejala sakit yaitu SAIF dan saudara kembarnya yang bernama Sul. Sampel swab tersebut kemudian dibawa ke Litbangkes untuk dilakukan pemeriksaan.

Sejarah Unggas :

Rumah Dewi DA dimana sebagian besar dari penduduknya memelihara unggas seperti ayam, entok, angsa, merpati dan burung ochean. Sebagian besar dari unggas-unggas tersebut dibiarkan berkeliaran di sekitar perumahan penduduk pada siang hari dan hanya dikandangkan pada malam hari. Selain itu, didekat rumah korban juga banyak dijumpai burung-burung gereja berkeliaran bebas.

Pada hari ke-10 bulan Ramadhan 1428 H, sejumlah besar ayam milik penduduk disekitar rumah korban mengalami kematian mendadak dan terus berlanjut hingga beberapa hari setelah lebaran. Didekat rumah DA terdapat sebuah kandang unggas yang berukuran cukup besar milik tetangganya. Selain itu pada saat lebaran Bapak ZA membeli beberapa ayam layer afkir dari pasar untuk keperluan lebaran. Sedangkan orang tua S A I F yaitu Bapak AR juga memelihara 8 ekor ayam, merpati dan burung perkutut. Namun semua ayam miliknya mati mendadak pada saat 4 hari menjelang lebaran.

Pada saat kedatangan Tim BBalitvet, masih dijumpai beberapa ekor ayam, entok, angsa dan merpati yang masih berkeliaran sehingga dapat dilakukan pengambilan sampel pada unggas-unggas yang berada disekitar rumah korban.

Denah Rumah DA (*suspect* Flu Burung)

HASIL UJI

Tabel 1. Nama Peternak, Jenis Unggas dan Hasil Uji Identifikasi virus AI sub tipe H5N1

Nama Peternak	RT/RW	Jenis unggas	Hasil uji HI (log2)	Hasil Uji RT-PCR (sub tipe H5)
Bapak I	05/01	Ayam 1	negatif	negatif
		Ayam 2	negatif	
		Ayam 3	negatif	
		Lantai Kandang		
Bapak Her	05/01	Ayam 1	negatif	negatif
		Ayam 2	negatif	
		Ayam 3	negatif	
Bapak R	05/01	Burung Penthet 1	Tidak diambil serum darahnya	negatif
		Burung Penthet 2		
Ibu Rtn	05/01	Ayam 1	negatif	negatif
		Ayam 2	negatif	
		Ayam 3	negatif	
		Ayam 4	negatif	
		Ayam 5	negatif	
		Ayam 6	negatif	
		Ayam anak 1	Tidak diambil serum darahnya	
		Ayam anak 2		
		Ayam anak 3		
		Ayam anak 4		
Bapak AR	05/01	Burung Penthet	Tidak diambil serum darahnya	negatif
		Lantai kandang merpati		negatif
		Lantai kandang percutut		negatif
Bapak Op	05/01	Angsa 1	5	negatif
		Angsa 2	1	

		Entok 1	2	negatif
		Entok 2	1	
		Entok 3	negatif	
		Entok 4	4	
		Entok 5	negatif	
		Ayam 1	negatif	negatif
		Ayam 2	negatif	
		Ayam 3	negatif	
Bapak Al	05/01	Burung Dederuk	Tidak diambil serum darahnya	negatif
Bapak Dd	05/01	Burung Dederuk	Tidak diambil serum darahnya	negatif

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil RT-PCR yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa semua sampel yang diuji tidak mengandung virus avian influenza subtipe H5. Hasil uji hanya berlaku pada sampel yang diuji.

5. LAPORAN HASIL UJI IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 DI KABUPATEN TANGERANG

Tanggal Kunjungan : 23 Oktober 2007
 Lokasi : Kampung Ceger, Desa Lebak Wangi RT 08 RW 06, Kecamatan Sepatan, Kabupaten Tangerang
 Sejarah : Pada lokasi tersebut terdapat 1 orang suspect terinfeksi AI

Pengambilan Sampel di Rumah Orang Suspect AI

Ir (12 tahun)

Alamat : Kampung Ceger, Desa Lebak Wangi RT 08 RW 06, Kecamatan Sepatan, Kabupaten Tangerang

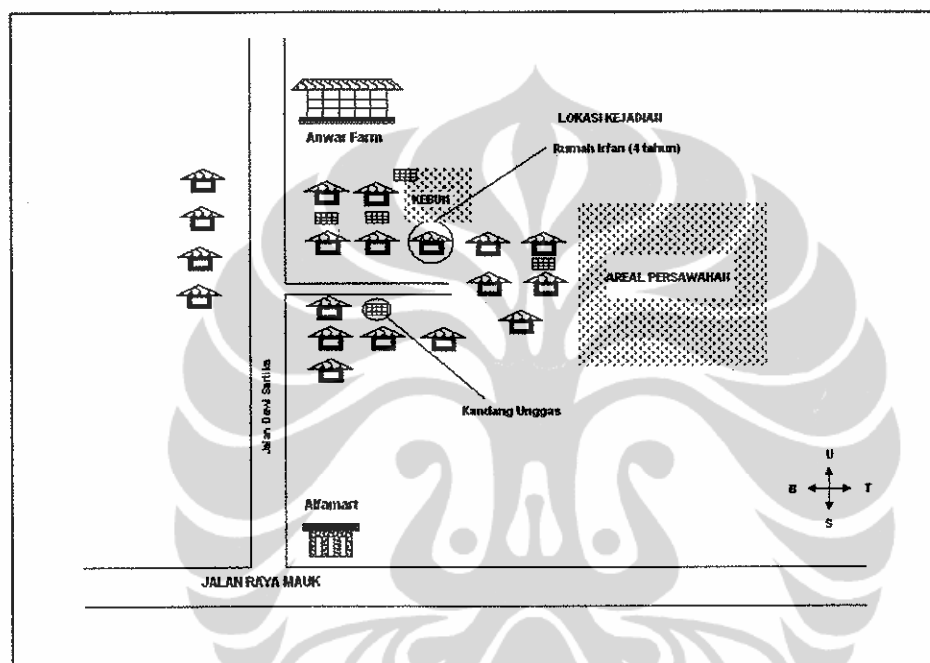
Sejarah Ir :

Ir berumur 12 tahun, merupakan anak dari Bapak Tw. Ada beberapa versi tentang asal mula tentang sakitnya Ir. Salah satu cerita, menyebutkan bahwa sekitar tanggal 30 September 2007, Ir terlihat bermain di pasar yang berjarak sekitar 4 km dari rumahnya. Pada saat itu dia melihat ada ayam yang mati di salah satu pedagang ayam di pasar. Pada tanggal 3 Oktober 2007, Ir mengalami sakit dengan gejala demam dan dibawa ke berobat ke Puskesmas, namun kondisinya tidak membaik. Ir kemudian dibawa ke Klinik dokter praktek. Pada tanggal 7 Oktober 2007, kondisi Ir memburuk dan dibawa ke RSUD Tangerang. Diagnosa kemudian mengarah pada penyakit Flu Burung sehingga Ir langsung dirujuk ke Rumah Sakit Persahabatan, Jakarta. Setelah beberapa hari dirawat di Rumah Sakit Persahabatan tepatnya pada tanggal 13 Oktober 2007 Irfan meninggal dunia. Jenazah korban kemudian dibawa kembali ke Tangerang untuk dikuburkan.

Sejarah Unggas :

Rumah Ir terletak di pemukiman penduduk yang padat penduduknya dimana sebagian besar dari penduduknya memelihara unggas seperti ayam, entok,

angsa, merpati dan burung ochean. Sebagian besar dari unggas-unggas tersebut dibiarkan berkeliaran disekitar perumahan penduduk pada siang hari dan hanya dikandangkan pada malam hari. Namun pada saat itu, tidak ada kematian yang mendadak pada unggas-unggas di sekitar rumah korban. Menurut sejarahnya, pernah terjadi kematian mendadak pada sejumlah besar ayam di desa tersebut namun kejadian itu sudah berlangsung setahun yang lalu. Sekitar 500 m dari rumah Ir, terdapat sebuah peternakan ayam broiler komersial (Anwar Farm). Tim BBalitvet yang datang berkunjung mengambil beberapa sampel (serum dan swab) dari farm tersebut.



Denah Rumah Ir (korban meninggal Flu Burung)

HASIL UJI

Tabel 1. Nama Peternak, Jenis Unggas dan Hasil Uji Identifikasi virus AI sub tipe H5N1

Nama Peternak	RT/RW	Jenis unggas	Hasil uji HI (log2)	Hasil Uji RT-PCR (sub tipe H5)
A Farm		Broiler 1	1	negatif
		Broiler 2	negatif	
		Broiler 3	negatif	
		Broiler 5	negatif	
		Broiler 6	1	
		Broiler 7	negatif	
		Broiler 8	2	
		Broiler 9	1	
		Broiler 10	2	
		Bapak D	08/06	
Entok 2	negatif			negatif
Ayam 1	negatif			

Bapak Edg	08/06	Ayam 1	negatif	negatif
Bapak Mkn	08/06	Ayam 1	negatif	negatif
Bapak Mdb	08/06	Ayam 1	negatif	negatif
		Entok 1	negatif	negatif
Bapak O	08/06	Ayam 1	negatif	negatif
		Ayam bangkok 1	negatif	negatif
Ayam bangkok 2	negatif			
Ayam bangkok 3	negatif			
Ayam bangkok 4	negatif			
Ayam bangkok 5	negatif			
Bapak Ysr	08/06	Ayam bangkok 6	negatif	
		Merpati 1	Tidak diambil serum darahnya	
		Merpati 2		
Merpati 3				
Bapak Yd	08/06	Ayam 1	negatif	negatif
Bapak Mt	08/06	Ayam anak 1	negatif	negatif
Bapak Usp	08/06	Ayam anak 2	negatif	
		Ayam anak 3	negatif	
		Ayam anak 4	Tidak diambil serum darahnya	
		Ayam anak 5		
		Ayam anak 6		
Bapak Zu	08/06	Ayam 1	negatif	
		Ayam 2	negatif	
		Ayam 3	negatif	
Bapak J	08/06	Ayam kate 1	negatif	negatif
		Ayam kate 2	negatif	
Bapak Wly	08/06	Ayam anak 1	negatif	negatif
		Ayam anak 2	negatif	
		Ayam anak 3	negatif	
Bapak Otg	08/06	Entok 1	negatif	negatif

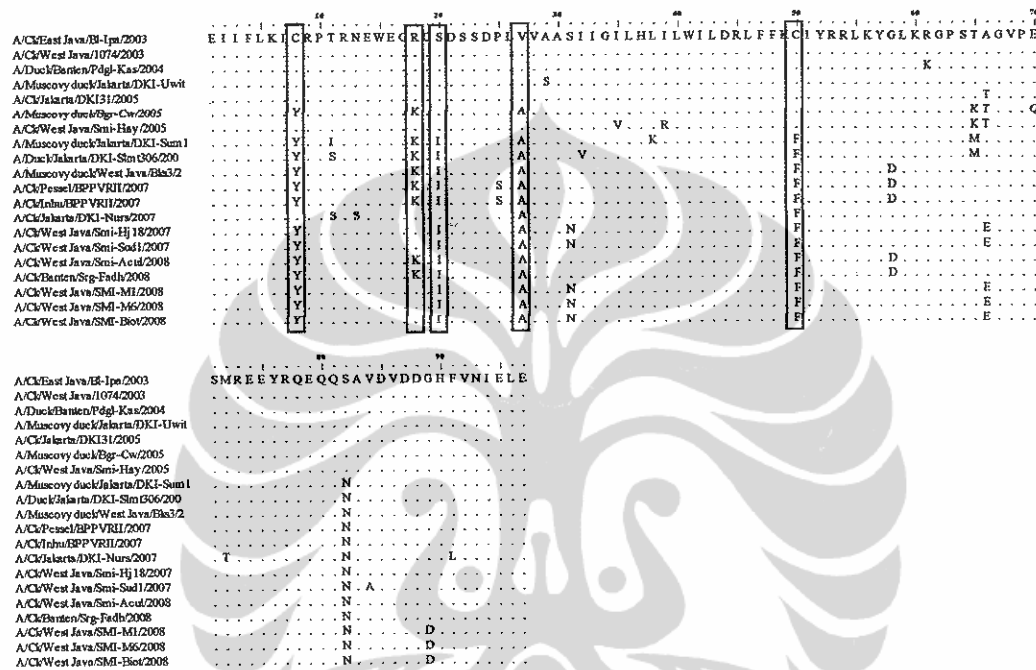
KESIMPULAN

Berdasarkan hasil RT-PCR yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa semua sampel yang diuji tidak mengandung virus avian influenza subtipe H5. Hasil uji hanya berlaku pada sampel yang diuji.

Lampiran 12

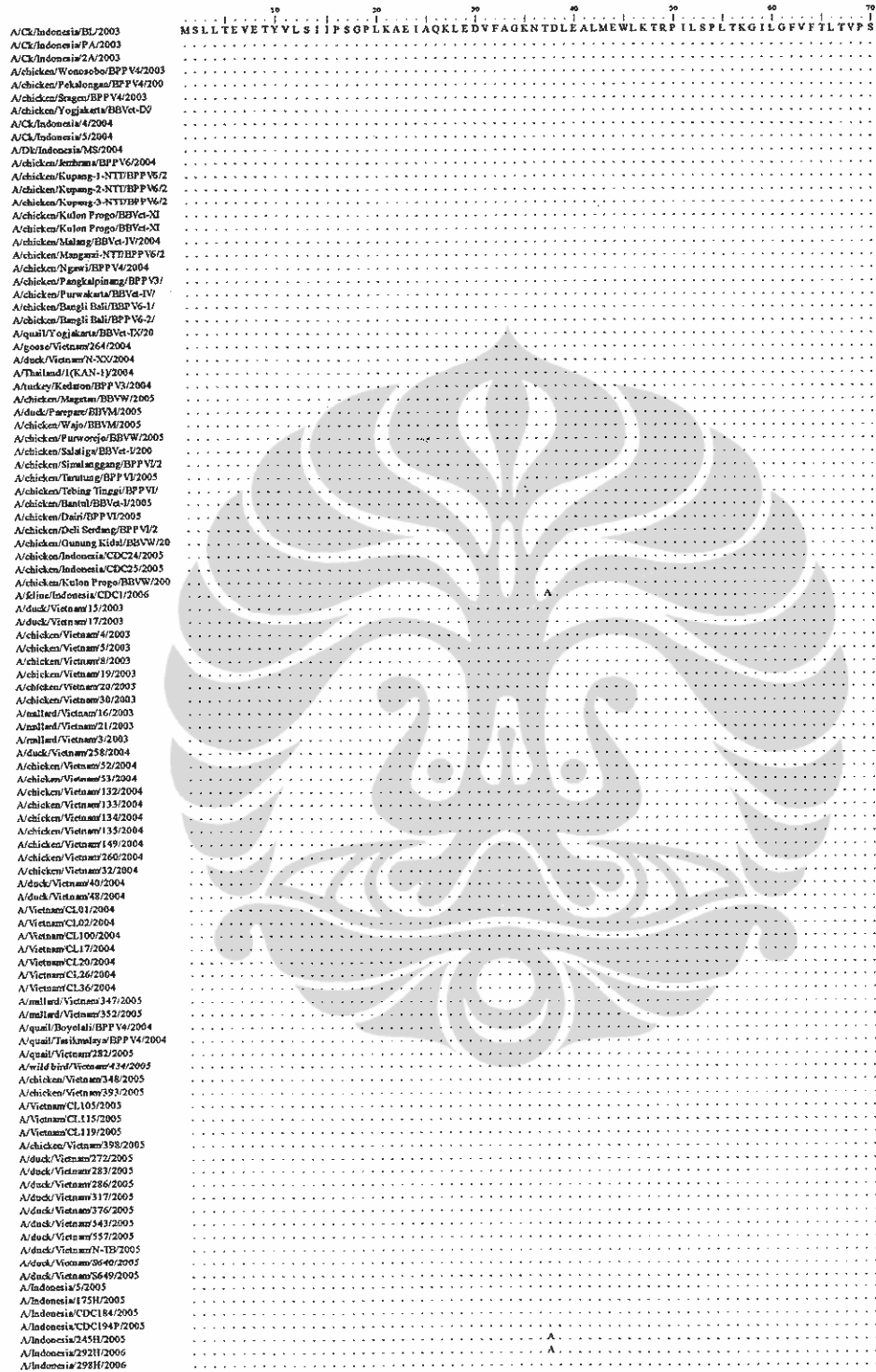
Hasil penjejeran asam amino protein M1 dan-M2 dari virus H5N1 yang diisolasi dari unggas disekitar kasus manusia terinfeksi H5N1 dibandingkan dengan data virus H5N1 manusia yang diperoleh dari GenBank (NCBI)

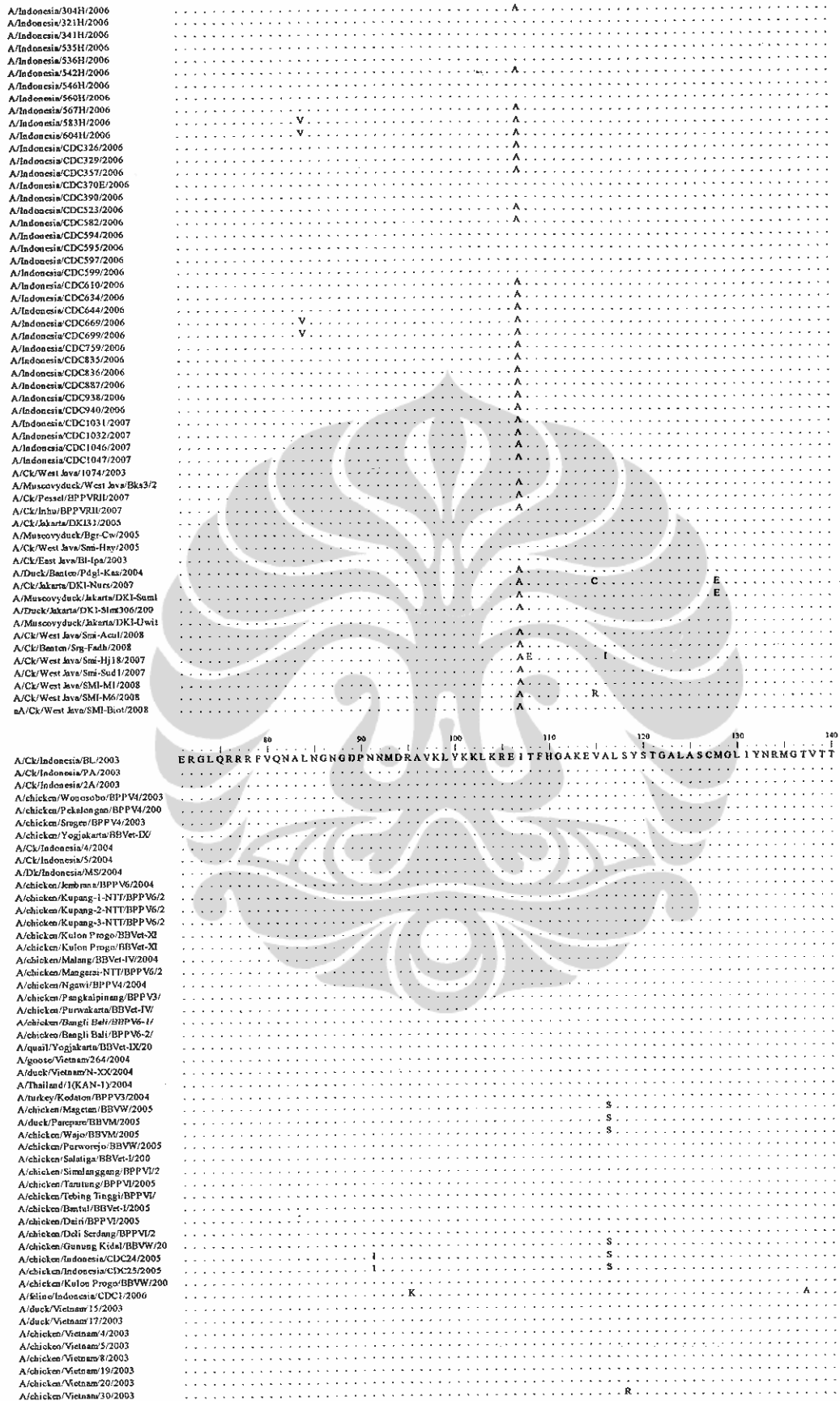
Gambar a. Hasil penjejeran asam amino protein M1 dua puluh virus influenza subtipe H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini



Lampiran 12 (Lanjutan)

Gambar b. Hasil penjejeran asam amino protein M1 virus influenza subtipe H5N1





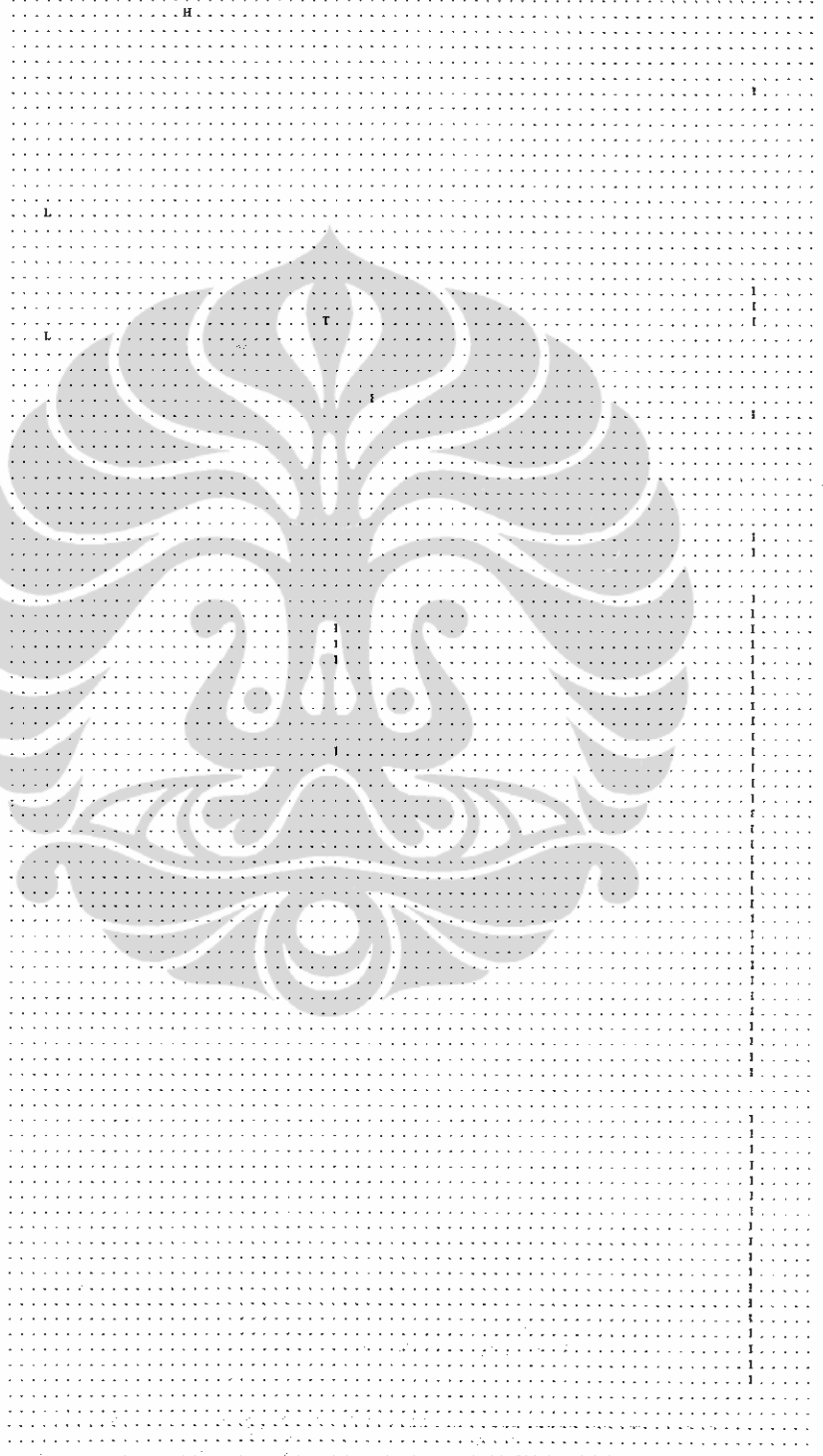
A/mandar/Vietnam/16/2003									
A/mandar/Vietnam/21/2003									
A/mandar/Vietnam/3/2003									
A/duck/Vietnam/258/2004									
A/chicken/Vietnam/52/2004									
A/chicken/Vietnam/53/2004									
A/chicken/Vietnam/132/2004									
A/chicken/Vietnam/133/2004									
A/chicken/Vietnam/134/2004									
A/chicken/Vietnam/135/2004		S							
A/chicken/Vietnam/149/2004		S							
A/chicken/Vietnam/260/2004									
A/chicken/Vietnam/32/2004									
A/duck/Vietnam/40/2004									
A/duck/Vietnam/48/2004									
A/Vietnam/CL01/2004									
A/Vietnam/CL02/2004									
A/Vietnam/CL100/2004									
A/Vietnam/CL17/2004									
A/Vietnam/CL20/2004									
A/Vietnam/CL26/2004									
A/Vietnam/CL36/2004									
A/mandar/Vietnam/347/2005									
A/mandar/Vietnam/352/2005									
A/mandar/Vietnam/BPPV4/2004									
A/mandar/Vietnam/BPPV4/2004									
A/wild_bird/Vietnam/434/2005									
A/chicken/Vietnam/348/2005									
A/chicken/Vietnam/353/2005									
A/Vietnam/CL105/2005									
A/Vietnam/CL115/2005									
A/Vietnam/CL119/2005									
A/chicken/Vietnam/398/2005									
A/duck/Vietnam/272/2005									
A/duck/Vietnam/283/2005									
A/duck/Vietnam/286/2005									
A/duck/Vietnam/317/2005									
A/duck/Vietnam/376/2005									
A/duck/Vietnam/543/2005									
A/duck/Vietnam/557/2005									
A/duck/Vietnam/N-TH/2005									
A/duck/Vietnam/S640/2005									
A/duck/Vietnam/S649/2005									
A/Indonesia/5/2005		S							
A/Indonesia/175H/2005		S							
A/Indonesia/CDC184/2005		S							
A/Indonesia/CDC194P/2005		S							
A/Indonesia/749H/2005	K			A					
A/Indonesia/292H/2006	K			A					
A/Indonesia/298H/2006	K	S		A					
A/Indonesia/304H/2006	K			A					
A/Indonesia/323H/2006	K	S		A					
A/Indonesia/341H/2006	K	S		A					
A/Indonesia/535H/2006	K			A					
A/Indonesia/536H/2006	K			A					
A/Indonesia/542H/2006	K			A					
A/Indonesia/546H/2006	K			A					
A/Indonesia/560H/2006	K			A					
A/Indonesia/567H/2006	K			A					
A/Indonesia/583H/2006	K			A					
A/Indonesia/604H/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC326/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC329/2006	K		F	A					
A/Indonesia/CDC357/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC370E/2006	K	S		A					
A/Indonesia/CDC390/2006	K	S		A					
A/Indonesia/CDC523/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC582/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC594/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC595/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC597/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC599/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC610/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC634/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC644/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC669/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC699/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC759/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC835/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC836/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC887/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC938/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC940/2006	K			A					
A/Indonesia/CDC1031/2007	K			A					
A/Indonesia/CDC1032/2007	K			A					
A/Indonesia/CDC1046/2007	K			A					
A/Indonesia/CDC1047/2007	K			A					
A/Ck/West Java/1074/2003	K			A					
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2	K			A					
A/Ck/Pascal/BPPVRJI/2007	K			A					
A/Ck/Inhu/BPPVRJI/2007	H	A	K		A				
A/Ck/Akarta/DKI1/2005	K		R		A				
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	K				A				
A/Ck/West Java/Sml-Hay/2005	K				A				
A/Ck/East Java/Bl-lps/2003	K				A				
A/Duck/Benteng/Pdgl-Kes/2004	M	S	S	D	K	V	D		A
A/Ck/Akarta/DKI-News/2007	S				K			F	A
A/Muscovyduck/Akarta/DKI-Suml	S				K				A
A/Duck/Akarta/DKI-Slm306/200					K				A
A/Muscovyduck/Akarta/DKI-Uwiti					K				A
A/Ck/West Java/Sml-Aca1/2008					K				A

A/Ck/Bantes/Srg-Fadh/2008
 A/Ck/West Java/Sri-1518/2007
 A/Ck/West Java/Sri-Sud1/2007
 A/Ck/West Java/SMI-M1/2008
 A/Ck/West Java/SMI-M6/2008
 A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008

..... K A
 S A
 K A
 K P GP N A
 T K A
 K A

A/Ck/Indonesia/BL/2003
 A/Ck/Indonesia/PA/2003
 A/Ck/Indonesia/ZA/2003
 A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003
 A/chicken/Pekalongan/BPPV4/2003
 A/chicken/Sragen/BPPV4/2003
 A/chicken/Yogyakarta/BBVet-DG
 A/Ck/Indonesia/4/2004
 A/Ck/Indonesia/5/2004
 A/Dk/Indonesia/MS/2004
 A/chicken/Jembera/BPPV6/2004
 A/chicken/Kupang-1-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kupang-2-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kupang-3-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-38
 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-35
 A/chicken/Malang/BBVet-IV/2004
 A/chicken/Mangrove-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Ngezi/BPPV4/2004
 A/chicken/Pangkalpinang/BPPV3/
 A/chicken/Purwokerto/BBVet-IV/
 A/chicken/Bangli Bali/BBP6-1/
 A/chicken/Bangli Bali/BBP6-2/
 A/quail/Yogyakarta/BBVet-DG/20
 A/goose/Vietnam/264/2004
 A/duck/Vietnam/N-XX/2004
 A/Thailand/1(KAN-1)/2004
 A/turkey/Kedaton/BPPV3/2004
 A/chicken/Magetan/BBVW/2005
 A/duck/Parepare/BBVM/2005
 A/chicken/Wajo/BBVM/2005
 A/chicken/Purworejo/BBVW/2005
 A/chicken/Salatiga/BBVet-J/200
 A/chicken/Simalanggang/BPPV1/2
 A/chicken/Tarutung/BPPV1/2005
 A/chicken/Tobing Tinggi/BPPV1/
 A/chicken/Bantul/BBVet-J/2005
 A/chicken/Bani/BPPV1/2005
 A/chicken/Deli Serdang/BPPV1/2
 A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/20
 A/chicken/Indonesia/CDC24/2005
 A/chicken/Indonesia/CDC25/2005
 A/chicken/Kulon Progo/BBVW/200
 A/Ethiopia/Indonesia/CDC1/2006
 A/duck/Vietnam/15/2003
 A/duck/Vietnam/17/2003
 A/chicken/Vietnam/4/2003
 A/chicken/Vietnam/5/2003
 A/chicken/Vietnam/8/2003
 A/chicken/Vietnam/19/2003
 A/chicken/Vietnam/20/2003
 A/chicken/Vietnam/30/2003
 A/mallard/Vietnam/16/2003
 A/mallard/Vietnam/21/2003
 A/mallard/Vietnam/3/2003
 A/duck/Vietnam/258/2004
 A/chicken/Vietnam/52/2004
 A/chicken/Vietnam/53/2004
 A/chicken/Vietnam/132/2004
 A/chicken/Vietnam/133/2004
 A/chicken/Vietnam/134/2004
 A/chicken/Vietnam/135/2004
 A/chicken/Vietnam/149/2004
 A/chicken/Vietnam/260/2004
 A/chicken/Vietnam/32/2004
 A/duck/Vietnam/40/2004
 A/duck/Vietnam/48/2004
 A/Vietnam/CL1/2004
 A/Vietnam/CL2/2004
 A/Vietnam/CL100/2004
 A/Vietnam/CL17/2004
 A/Vietnam/CL20/2004
 A/Vietnam/CL26/2004
 A/Vietnam/CL36/2004
 A/mallard/Vietnam/347/2005
 A/mallard/Vietnam/352/2005
 A/quail/Bojoli/BPPV4/2004
 A/quail/Vietnam/282/2005
 A/wild bird/Vietnam/434/2005
 A/chicken/Vietnam/348/2005
 A/chicken/Vietnam/393/2005
 A/Vietnam/CL105/2005
 A/Vietnam/CL115/2005
 A/Vietnam/CL119/2005
 A/chicken/Vietnam/398/2005
 A/duck/Vietnam/272/2005
 A/duck/Vietnam/283/2005
 A/duck/Vietnam/286/2005
 A/duck/Vietnam/317/2005
 A/duck/Vietnam/376/2005
 A/duck/Vietnam/543/2005
 A/duck/Vietnam/557/2005
 A/duck/Vietnam/N-TB/2005
 A/duck/Vietnam/S640/2005
 A/duck/Vietnam/S649/2005
 A/Indonesia/5/2005
 A/Indonesia/175H/2005
 A/Indonesia/CDC184/2005
 A/Indonesia/CDC194P/2005

150 160 170 180 190 200 210
 EYVAFGLVCAATCEQIADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVANQAR



A/Indonesia/242H/2003
 A/Indonesia/292H/2006
 A/Indonesia/298H/2006
 A/Indonesia/304H/2006
 A/Indonesia/321H/2006
 A/Indonesia/341H/2006
 A/Indonesia/535H/2006
 A/Indonesia/536H/2006
 A/Indonesia/542H/2006
 A/Indonesia/546H/2006
 A/Indonesia/560H/2006
 A/Indonesia/567H/2006
 A/Indonesia/583H/2006
 A/Indonesia/604H/2006
 A/Indonesia/CDC326/2006
 A/Indonesia/CDC329/2006
 A/Indonesia/CDC357/2006
 A/Indonesia/CDC370E/2006
 A/Indonesia/CDC390/2006
 A/Indonesia/CDC523/2006
 A/Indonesia/CDC582/2006
 A/Indonesia/CDC594/2006
 A/Indonesia/CDC595/2006
 A/Indonesia/CDC597/2006
 A/Indonesia/CDC599/2006
 A/Indonesia/CDC610/2006
 A/Indonesia/CDC634/2006
 A/Indonesia/CDC644/2006
 A/Indonesia/CDC669/2006
 A/Indonesia/CDC699/2006
 A/Indonesia/CDC759/2006
 A/Indonesia/CDC835/2006
 A/Indonesia/CDC836/2006
 A/Indonesia/CDC887/2006
 A/Indonesia/CDC938/2006
 A/Indonesia/CDC940/2006
 A/Indonesia/CDC1031/2007
 A/Indonesia/CDC1032/2007
 A/Indonesia/CDC1045/2007
 A/Indonesia/CDC1047/2007
 A/Ck/West.Java/1074/2003
 A/Muscovyduck/West.Java/Bks3/2
 A/Ck/Pesud/BPPVRB/2007
 A/Ck/Anhu/BPPVRB/2007
 A/Ck/Jakarta/DK.II/2005
 A/Muscovyduck/Igo-Cw/2005
 A/Ck/West.Java/Sri-Hay/2005
 A/Ck/East.Java/79-1pa/2003
 A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004
 A/Ck/Jakarta/DK.I-Nurs/2007
 A/Muscovyduck/Jakarta/DK.I-Suml
 A/Duck/Jakarta/DK.I-Slmt366/200
 A/Muscovyduck/Jakarta/DK.I-Uwil
 A/Ck/West.Java/Sri-Aeul/2008
 A/Ck/Banten/Sig-Fadh/2008
 A/Ck/West.Java/Sri-Hj18/2007
 A/Ck/West.Java/Sri-Sud1/2007
 A/Ck/West.Java/SMI-MI/2008
 A/Ck/West.Java/SMI-M6/2008
 a/Ck/West.Java/SMI-Bot/2008

*** *** *** ***
 QM V Q A M R T I G T H P N S S A G L R D N L L E N L Q A Y Q K R M G V Q M Q R F K

A/Ck/Indonesia/BL/2003
 A/Ck/Indonesia/PA/2003
 A/Ck/Indonesia/2A/2003
 A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003
 A/chicken/Pekalongan/BPPV4/200
 A/chicken/Stagen/BPPV4/2003
 A/chicken/Yogyakarta/BBVet-DK
 A/Ck/Indonesia/4/2004
 A/Ck/Indonesia/MS/2004
 A/chicken/Jember/BPPV6/2004
 A/chicken/Kupang-1-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kupang-2-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kupang-3-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XI
 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XI
 A/chicken/Malang/BBVet-IV/2004
 A/chicken/Mangrai-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Ngawi/BPPV4/2004
 A/chicken/Pangkalpinang/BPPV3/
 A/chicken/Purwakarta/BBVet-IV/
 A/chicken/Bangli Bali/BBV6-1/
 A/chicken/Bangli Bali/BBV6-2/
 A/quail/Yogyakarta/BBVet-DX/20
 A/goose/Vietnam/264/2004
 A/duck/Vietnam/N-XX/2004
 A/Thailand/1(KAN-1)/2004
 A/turkey/Kedaton/BPPV3/2004
 A/chicken/Megetan/BBVW/2005
 A/duck/Parepare/BBVM/2005
 A/chicken/Wajo/BBVM/2005
 A/chicken/Purwojo/BBVW/2005
 A/chicken/Salatiga/BBVet-U/200
 A/chicken/Simalanggang/BPPV1/2
 A/chicken/Tarutung/BPPV1/2005
 A/chicken/Tebing Tinggi/BPPV1/
 A/chicken/Bantul/BBVet-U/2005
 A/chicken/Daini/BPPV1/2005
 A/chicken/Deli Serdang/BPPV1/2
 A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/20
 A/chicken/Indonesia/CDC24/2005
 A/chicken/Indonesia/CDC25/2005
 A/chicken/Kulon Progo/BBVW/200
 A/Hine/Indonesia/CJCI/2006
 A/duck/Vietnam/15/2003
 A/duck/Vietnam/17/2003
 A/chicken/Vietnam/4/2003
 A/chicken/Vietnam/5/2003
 A/chicken/Vietnam/8/2003

S S T Q
 P P E K P
 N N
 N N
 N N

D

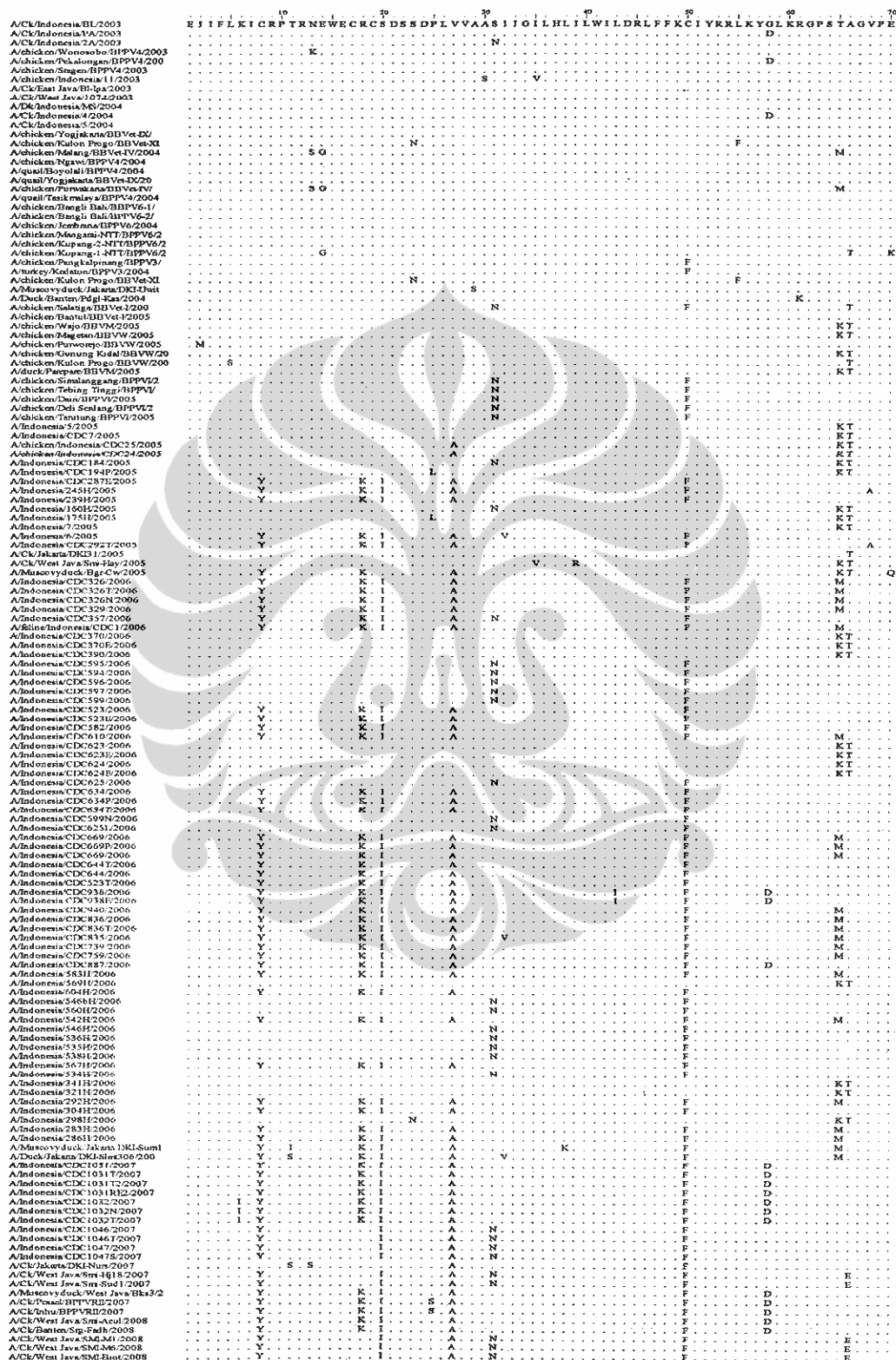
H

A/Indonesia/2431H/2003
 A/Indonesia/292H/2006
 A/Indonesia/2981H/2006
 A/Indonesia/304H/2006
 A/Indonesia/321H/2006
 A/Indonesia/341H/2006
 A/Indonesia/535H/2006
 A/Indonesia/536H/2006
 A/Indonesia/542H/2006
 A/Indonesia/5461H/2006
 A/Indonesia/5601H/2006
 A/Indonesia/5671H/2006
 A/Indonesia/5831H/2006
 A/Indonesia/604H/2006
 A/Indonesia/CDC326/2006
 A/Indonesia/CDC329/2006
 A/Indonesia/CDC357/2006
 A/Indonesia/CDC370E/2006
 A/Indonesia/CDC390/2006
 A/Indonesia/CDC523/2006
 A/Indonesia/CDC582/2006
 A/Indonesia/CDC594/2006
 A/Indonesia/CDC595/2006
 A/Indonesia/CDC597/2006
 A/Indonesia/CDC599/2006
 A/Indonesia/CDC610/2006
 A/Indonesia/CDC634/2006
 A/Indonesia/CDC644/2006
 A/Indonesia/CDC669/2006
 A/Indonesia/CDC699/2006
 A/Indonesia/CDC739/2006
 A/Indonesia/CDC835/2006
 A/Indonesia/CDC836/2006
 A/Indonesia/CDC887/2006
 A/Indonesia/CDC938/2006
 A/Indonesia/CDC940/2006
 A/Indonesia/CDCI031/2007
 A/Indonesia/CDCI032/2007
 A/Indonesia/CDCI046/2007
 A/Indonesia/CDCI047/2007
 A/Ck/West Java/1074/2003
 A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2
 A/Ck/Pesici/BPPVRII/2007
 A/Ck/Anhu/BPPVRII/2007
 A/Ck/Bkarta/DKIS1/2005
 A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005
 A/Ck/West Java/Sri-Hay/2005
 A/Ck/East Java/Bj-Ips/2003
 A/Duck/Banten/Pgl-Kas/2004
 A/Ck/Bkarta/DK1-Nurs/2007
 A/Muscovyduck/Bkarta/DK1-Suml
 A/Duck/Bkarta/DK1-Sim306/2000
 A/Muscovyduck/Bkarta/DK1-Uwit
 A/Ck/West Java/Sri-Acul/2008
 A/Ck/Banten/Sig-Fadh/2008
 A/Ck/West Java/Sri-Hj18/2007
 A/Ck/West Java/Sri-Sud1/2007
 A/Ck/West Java/SMI-M1/2008
 A/Ck/West Java/SMI-M6/2008
 SA/Ck/West Java/SMI-Boi/2008

A/Ck/Indonesia/BL/2003
 A/Ck/Indonesia/PA/2003
 A/Ck/Indonesia/2A/2003
 A/chicken/Wonosobo/BPPV4/2003
 A/chicken/Pekalongan/BPPV4/200
 A/chicken/Sragen/BPPV4/2003
 A/chicken/Yogyakarta/BBVet-DX
 A/Ck/Indonesia/4/2004
 A/Ck/Indonesia/5/2004
 A/Dk/Indonesia/MS/2004
 A/chicken/Kebmas/BPPV6/2004
 A/chicken/Kupang-1-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kupang-2-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kupang-3-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XI
 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XI
 A/chicken/Malang/BBVet-IV/2004
 A/chicken/Mangari-NTT/BPPV6/2
 A/chicken/Ngawi/BPPV4/2004
 A/chicken/Pangkalpinang/BPPV3/
 A/chicken/Purwokerta/BBVet-IV/
 A/chicken/Bangli Bati/BBP V6-1/
 A/chicken/Bangli Bati/BBP V6-2/
 A/qaui/Yogyakarta/BBVet-IX/20
 A/goose/Vietnam/264/2004
 A/duck/Vietnam/N-XG/2004
 A/Thailand/1/(KAN-1)/2004
 A/turkey/Kedaton/BPPV3/2004
 A/chicken/Megetan/BBVW/2005
 A/duck/Parepare/BBVM/2005
 A/chicken/Wajo/BBVM/2005
 A/chicken/Purworejo/BBVW/2005
 A/chicken/Salatiga/BBVet-I/200
 A/chicken/Simlanggang/BPPV2/
 A/chicken/Terutung/BPPV/2005
 A/chicken/Tebing Tinggi/BPPV/
 A/chicken/Bantul/BBVet-I/2005
 A/chicken/Dairi/BPPV/2005
 A/chicken/Dei Serdang/BPPV/2
 A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/20
 A/chicken/Indonesia/CDC24/2005
 A/chicken/Indonesia/CDC25/2005
 A/chicken/Kulon Progo/BBVW/200
 A/Etne/Indonesia/CDC1/2006
 A/duck/Vietnam/15/2003
 A/duck/Vietnam/17/2003
 A/chicken/Vietnam/4/2003
 A/chicken/Vietnam/5/2003
 A/chicken/Vietnam/8/2003

QMVQAMR T I G T H P N S S A G L R D N L L E N L Q A Y Q K R M G V Q M Q R F K

Gambar c. Hasil Penjejeran asam amino protein M2 virus influenza sub tipe H5N1



Accession Number	Genome Type
A/CK/Indonesia/BL/2003	SMREERYRQEQQSAVDVDDG
A/CK/Indonesia/PA/2003	
A/CK/Indonesia/2A/2003	
A/chicken/Wonosari/BPPV4/2003	
A/chicken/Pekalongan/BPPV4/200	
A/chicken/Sragen/BPPV4/2003	
A/chicken/Indonesia11/2003	
A/CK/East Java/1074/2003	
A/CK/West Java/1074/2003	
A/DK/Indonesia/MS/2004	
A/CK/Indonesia/4/2004	
A/CK/Indonesia/5/2004	
A/chicken/Yogyakarta/BBVet-DK/	
A/chicken/Kulon Progo/BBVet-30/	
A/chicken/Malang/BBVet-IV/2004	
A/chicken/Ngawi/BBPV4/2004	
A/quail/Bojolar/BPPV4/2004	
A/quail/Yogyakarta/BBVet-DK/20	
A/chicken/Purwokerto/BBVet-4/1/	
A/quail/Tasikmalaya/BBPV4/2004	
A/chicken/Bangli Bali/BBPV6-1/	
A/chicken/Jembrana/BBPV6/2004	
A/chicken/Mangarai-NTT/BBPV6/2	
A/chicken/Kupang-2-NTT/BBPV6/2	
A/chicken/Kupang-1-NTT/BBPV6/2	
A/chicken/Bangka/BBPV3/	K
A/hukey/Kedaton/BBPV3/2004	
A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XI	
A/Buscovy duck/Jakarta/DKI-Uwit	
A/Duck/Banten/Pid/4Kes/2004	
A/chicken/Salatiga/BBVet-1/200	
A/chicken/Bantul/BBVet-1/2005	
A/chicken/Wajo/BBVM/2005	
A/chicken/Magelang/BBVet-1/2005	
A/chicken/Purworejo/BBVW/2005	
A/chicken/Gunung Kidul/BBVW/20	
A/Duck/Purworejo/BBVW/2005	
A/chicken/Simalanggang/BBPV1/2	
A/chicken/Tebing Tinggi/BBPV1/	
A/chicken/Dairi/BBPV1/2005	
A/chicken/Deli Serdang/BBPV1/2	
A/chicken/Tatung/BBPV1/2005	
A/Indonesia/5/2005	
A/Indonesia/CDC7/2005	
A/chicken/Indonesia/CDC25/2005	
A/chicken/Indonesia/CDC24/2005	
A/Indonesia/CDC184/2005	
A/Indonesia/CDC194/2005	
A/Indonesia/CDC287/2005	N
A/Indonesia/243H/2005	
A/Indonesia/239H/2005	
A/Indonesia/160B/2005	
A/Indonesia/175H/2005	
A/Indonesia/7/2005	
A/Indonesia/6/2005	
A/Indonesia/CDC292/2005	
A/CK/Jakarta/DKI1/2005	
A/CK/West Java/Semi-Hay/2005	
A/Buscovy duck/Bgr-Cw/2005	
A/Indonesia/CDC26/2006	N
A/Indonesia/CDC326T/2006	
A/Indonesia/CDC326N/2006	
A/Indonesia/CDC129/2006	N
A/Indonesia/CDC157/2006	N
A/Gline/Indonesia/CDC1/2006	N
A/Indonesia/CDC370/2006	
A/Indonesia/CDC370B/2006	
A/Indonesia/CDC390/2006	
A/Indonesia/CDC395/2006	
A/Indonesia/CDC394/2006	
A/Indonesia/CDC396/2006	
A/Indonesia/CDC397/2006	
A/Indonesia/CDC399/2006	
A/Indonesia/CDC523/2006	
A/Indonesia/CDC523E/2006	
A/Indonesia/CDC547/2006	N
A/Indonesia/CDC610/2006	N
A/Indonesia/CDC623/2006	
A/Indonesia/CDC623E/2006	
A/Indonesia/CDC624/2006	
A/Indonesia/CDC624E/2006	
A/Indonesia/CDC625/2006	
A/Indonesia/CDC634/2006	N
A/Indonesia/CDC634B/2006	
A/Indonesia/CDC634T/2006	
A/Indonesia/CDC599N/2006	
A/Indonesia/CDC625L/2006	
A/Indonesia/CDC669/2006	N
A/Indonesia/CDC669P/2006	N
A/Indonesia/CDC669/2006	N
A/Indonesia/CDC644T/2006	
A/Indonesia/CDC644/2006	N
A/Indonesia/CDC623T/2006	
A/Indonesia/CDC938/2006	N
A/Indonesia/CDC938E/2006	
A/Indonesia/CDC940/2006	N
A/Indonesia/CDC836/2006	N
A/Indonesia/CDC836T/2006	
A/Indonesia/CDC835/2006	
A/Indonesia/CDC739/2006	
A/Indonesia/CDC759/2006	N
A/Indonesia/CDC887/2006	N
A/Indonesia/583/2006	N
A/Indonesia/569H/2006	
A/Indonesia/604H/2006	N
A/Indonesia/566H/2006	Q
A/Indonesia/567H/2006	N
A/Indonesia/542H/2006	N
A/Indonesia/546H/2006	
A/Indonesia/536H/2006	
A/Indonesia/531H/2006	
A/Indonesia/538H/2006	
A/Indonesia/567H/2006	N
A/Indonesia/534H/2006	
A/Indonesia/341H/2006	
A/Indonesia/321H/2006	
A/Indonesia/292H/2006	
A/Indonesia/304H/2006	N
A/Indonesia/298H/2006	
A/Indonesia/283H/2006	
A/Indonesia/286H/2006	
A/Buscovy duck/Jakarta/DKI-Smat	N
A/Duck/Jakarta/DKI-Slm306/200	N
A/Indonesia/CDC1031/2007	N
A/Indonesia/CDC1031T/2007	
A/Indonesia/CDC1031R1/2/2007	
A/Indonesia/CDC1031R1/2/2007	N
A/Indonesia/CDC1032/2007	
A/Indonesia/CDC1032N/2007	
A/Indonesia/CDC1033T/2007	
A/Indonesia/CDC1046/2007	N
A/Indonesia/CDC1046T/2007	



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

A. DATA PRIBADI

Nama : Ni Luh Putu Indi Dharmayanti
Tempat tanggal lahir : Banyuwangi, 10 Mei 1972
Agama : Islam
Alamat : Pakuan Regency, Jl. Linggabuana
Blok E/VI no. 8 Bogor
Nama Suami : Sutanto Arso Birowo, S.Pt
Nama Anak : Muhammad Fikri Dharmasutanto
Nama Ayah : I. Wayan Suwarya
Nama Ibu : Dwi Anna Sulasi, AmPd

B. RIWAYAT PENDIDIKAN

SEKOLAH/ UNIVERSITAS	KOTA	TAHUN	KUALIFIKASI
TK Pertiwi	Banyuwangi	1977-1978	Lulus
SDN Brawijaya	Banyuwangi	1978-1984	Lulus
SMPN 1	Banyuwangi	1984-1987	Lulus
SMAN 2	Banyuwangi	1987-1990	Lulus
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga	Surabaya, Indonesia	1991-1997	Dokter Hewan
S2-Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada	Yogyakarta, Indonesia	2000-2003	Magister Sains bidang Bioteknologi
S3-Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	Jakarta, Indonesia	2006-2009	Doktor Ilmu Biomedik

C. PEKERJAAN : Peneliti Muda di Departemen Virologi
Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

Alamat Kantor : Balai Besar Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, PO Box 50
Bogor, Indonesia
Ph. (62 251) 8331048; 8334456
Fax. (62 251) 8336425
E-mail: nlpdharmayanti@yahoo.com
nlpdharmayanti@gmail.com

D. PENGHARGAAN YANG PERNAH DITERIMA

1. **Penghargaan dari Menteri Pendidikan Nasional** sebagai Mahasiswa Berprestasi Terbaik, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya pada tahun 1995
2. **Penghargaan dari Direktorat Pendidikan Tinggi - Departemen Pendidikan Nasional** sebagai Pemenang dalam Lomba Karya Inovatif Produktif Tingkat Nasional dalam Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) di Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya pada tahun 1996
3. **Penghargaan dari Rektor Universitas Airlangga** sebagai Wisudawan Terbaik, Universitas Airlangga pada tahun 1996
4. **Penghargaan dari Direktorat Pendidikan Tinggi - Departemen Pendidikan Nasional** sebagai Pemenang dalam Lomba Karya Inovatif Produktif Tingkat Nasional dalam Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) di Universitas Udayana, Denpasar, Bali pada tahun 1997
5. **Sebagai Lulusan Cum laude** dari Universitas Gadjah Mada pada tahun 2003
6. **Ootojo Award** dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan sebagai Peneliti Terbaik pada tahun 2005
7. **Penghargaan dari Menteri Pertanian** sebagai **Penelitian Terbaik** yang mendukung Ketahanan Pangan pada tahun 2006
8. **Penghargaan dari Microbiology Indonesia Society** sebagai The 2nd Best Paper Award 2009

E. INFORMASI LAINNYA

Pengalaman Kerja, Training dan Penelitian

1997-1999 : Supervisor Health and Disease Control Laboratory (Cheil Jedang Group)

1999-sekarang : Peneliti Bidang Virologi dan Biologi Molekuler Virus

Bidang Penelitian :

1. Penelitian Virus Newcastle Disease (NDV)
2. Penelitian Biologi Molekuler Virus Infectious Bronchitis (IBV)
3. Penelitian Biologi Molekuler Virus Avian Influenza (AIV)

Pengalaman Dalam Melakukan Training :

- Sebagai Pengajar dalam Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 24 veterinarian and paramedic from 7 Disease Investigation Centre (DIC) and 10 type B laboratory se Indonesia (17-22 May 2004).
- Sebagai peserta pada WHO Training Course on animal influenza

NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

- surveillance and Diagnosis. 18-23 August 2004, Sapporo, Japan
- Sebagai peserta pada avian influenza diagnostic training. Collaboration with the Hong Kong University Team and LitBang Kes DepKes. BBalitvet, Bogor. (Juli 2005)
 - Sebagai Pengajar pada Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 50 veterinarian paramedic from Quarantine Station se Indonesia (March 2006)
 - Sebagai Pengajar pada Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 40 veterinarian from Quarantine Station se Indonesia (April 2006)
 - Sebagai participant on Workshop of avian influenza in University Georgia, Athens, Georgia, USA (14-16 Nov 2006)
 - Sebagai peserta pada Regional workshop for Laboratory staff members of HPAI diagnostic laboratories (Sequencing and sequence analysis), organized by OIE/NIAH-DLD, in Bangkok Thailand (26-30 March 2007)
 - Sebagai peserta pada The Second symposium and workshop on carbohydrate Acting Enzymes Bioengineering. "DNA microarray and Bioinformatics ", organized by UI-KNAW-RuG-UNAIR, Jakarta (15-16 May 2007)
 - Sebagai peserta pada International Workshop on DNA Microarray and RealTime PCR. Organized by National University of Singapore and Catholic Atmajaya University. Jakarta (16-19 July 2007)
 - Sebagai peserta pada Avian Influenza workshop for Asian countries (Avian Influenza and Zoonosis Diseases) organized by JICA and Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan. (16-24 January 2008).
 - Sebagai peserta pada Sequencing and DNA analysis workshop. FAO-OFFLU Project. AAHL-Geelong, Australia. June 2008
 - Sebagai Pengajar pada Training to identification and mutation of highly pathogenic avian influenza virus for doctor for veterinary medicine (DVM) se Indonesia. Attendance: 200 veterinarian from 20 provinces (October 2008). Cinagara, Bogor
 - Sebagai Pengajar pada Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 5 veterinarian from Nangroe Aceh Darusalam (25-29 May 2009)
 - Sebagai Pengajar pada Training to identification and mutation of highly pathogenic avian influenza virus for doctor for veterinary medicine (DVM) se Indonesia. Attendance: 70 veterinarian from 10 provinces (Juni, 2009). Cinagara, Bogor

Sebagai Presenter/Moderator dalam Forum International :

- **Country Report from Indonesia** about Recent Situation of avian influenza outbreak in Indonesia, Hokkaido University, Sapporo, Japan, 2004

NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

- surveillance and Diagnosis. 18-23 August 2004, Sapporo, Japan
- Sebagai peserta pada avian influenza diagnostic training. Collaboration with the Hong Kong University Team and LitBang Kes DepKes. BBalitvet, Bogor. (Juli 2005)
 - Sebagai Pengajar pada Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 50 veterinarian paramedic from Quarantine Station se Indonesia (March 2006)
 - Sebagai Pengajar pada Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 40 veterinarian from Quarantine Station se Indonesia (April 2006)
 - Sebagai participant on Workshop of avian influenza in University Georgia, Athens, Georgia, USA (14-16 Nov 2006)
 - Sebagai peserta pada Regional workshop for Laboratory staff members of HPAI diagnostic laboratories (Sequencing and sequence analysis), organized by OIE/NIAH-DLD, in Bangkok Thailand (26-30 March 2007)
 - Sebagai peserta pada The Second symposium and workshop on carbohydrate Acting Enzymes Bioengineering. "DNA microarray and Bioinformatics", organized by UI-KNAW-RuG-UNAIR, Jakarta (15-16 May 2007)
 - Sebagai peserta pada International Workshop on DNA Microarray and RealTime PCR. Organized by National University of Singapore and Catholic Atmajaya University. Jakarta (16-19 July 2007)
 - Sebagai peserta pada Avian Influenza workshop for Asian countries (Avian Influenza and Zoonosis Diseases) organized by JICA and Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan. (16-24 January 2008).
 - Sebagai peserta pada Sequencing and DNA analysis workshop. FAO-OFFLU Project. AAHL-Geelong, Australia. June 2008
 - Sebagai Pengajar pada Training to identification and mutation of highly pathogenic avian influenza virus for doctor for veterinary medicine (DVM) se Indonesia. Attendance: 200 veterinarian from 20 provinces (October 2008). Cinagara, Bogor
 - Sebagai Pengajar pada Training on highly pathogenic avian influenza virus diagnostic techniques. Attendance: 5 veterinarian from Nangroe Aceh Darusalam (25-29 May 2009)
 - Sebagai Pengajar pada Training to identification and mutation of highly pathogenic avian influenza virus for doctor for veterinary medicine (DVM) se Indonesia. Attendance: 70 veterinarian from 10 provinces (Juni, 2009). Cinagara, Bogor

Sebagai Presenter/Moderator dalam Forum International :

- **Country Report from Indonesia** about Recent Situation of avian influenza outbreak in Indonesia, Hokkaido University, Sapporo, Japan, 2004

NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

- **Sebagai Presenter in APEC symposium** in response to outbreaks of avian influenza and preparedness for human health emergency. San Francisco, California July 28-29, 2005.
- **Representative Group from Indonesia in IDRC-Research Project**, Bangkok, Thailand, 2005
- **Country Report from Indonesia** about Research of avian influenza virus in Indonesia, Bangkok, Thailand, 2005
- **Country Report from Indonesia** about Vaccination and Recent Situation of avian influenza disease in Indonesia, Sapporo, Japan, 2008
- **Sebagai presenter reporting Live Bird Market and influenza Disease** in High Level WHO influenza meeting, Denpasar, Indonesia, March. 2008
- **Country Report from Indonesia in International Meeting** about Molecular Characteristic of avian influenza in Indonesia, Jakarta, Indonesia, June. 2008
- **First Moderator in Avian Influenza International Meeting** about avian influenza research, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, 2008

F. PUBLIKASI :

Sebagai Penulis Pertama :

1. **Dharmayanti, NLP.I.** 1999. Leg problem pada peternakan ayam. Poultry Indonesia. September 1999.
2. **Dharmayanti, NLP.I.** 2000. Berbagai faktor yang mempengaruhi keberhasilan penetasan telur. 2000. Poultry Indonesia. Agustus.2000.
3. **Dharmayanti, NLP.I., E. Soelistyowati, M.N.Tejolaksono and R. Prasetya.** The effect of bee propolis and royal jelly in abscess caused by Staphylococcus aureus. Berita Biologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 5. 1 : 41-48.
4. **Dharmayanti, NLP.I. and Darminto.** 2000. Viral arthritis in chicken : Problem and Its Control. Wartazoa. Vo. 9. No.2. 57-64
5. **Dharmayanti, NLP.I and Darminto.** 2000. Newcastle disease (ND) control in village chickens to support the development of village chicken farm industry in central Java and Yogyakarta. Proceeding Hasil penelitian bagian proyek Rekayasa teknologi peternakan/ARMP-II Th. 1999/2000. 315-326.
6. **Dharmayanti, NLP.I., Asmara, W., Arthama, W.T., Indriani, R and Darminto.** 2002. Kemampuan primer general CK4/CK2 virus infectious bronchitis IBV untuk mengamplifikasi genom IBV isolat lapang Indonesia. Jurnal Biologi Indonesia. 3.3.227-235.
7. **Dharmayanti, NLP.I., Asmara, W., Arthama, W.T., Indriani, R and Darminto.** 2003. Optimation of program RT-PCR for infectious bronchitis (IBV) field isolates in Indonesia. Proceeding Nasional Peternakan dan Veteriner. 466-468

NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

- Darminto. 2003. Comparison of sequences hypervariable region (HVR) subunit S-1 gene of field isolate I-37 infectious bronchitis virus with Connecticut serotype. *Jurnal Ilmu ternak dan Veteriner*. Vol. 8.2. 107-113
8. **Dharmayanti, NLP.I.** 2003. Kenali penyebab Newcastle Disease (ND). *Poultry Indonesia*. Edisi Agustus 2003.
 9. **Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Wiyono, A., Indriani, R., dan Darminto.** 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode Reverse Transcripatese Polymerase Chain Reaction RT-PCR. *JITV*. 9. 2 : 136-143.
 10. **Dharmayanti, NLP.I., Indriani, R., Damayanti, R., dan Wiyono, A.** 2005a. Isolasi dan identifikasi wabah avian influenza pada bulan Oktober 2004 – Maret 2005 di Indonesia. *J Biol Indon*. 9: 341-350.
 11. **Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Indriani, R., Wiyono, A., dan Adjid, R.M.A.** 2005b. Karakterisasi molekuler virus avian influenza isolat indonesia pada wabah Oktober 2003-2004. *JITV*.10. 2 : 127-133.
 12. **Dharmayanti, NLP.I., Damayanti, R., Indriani, R., Wiyono, A., dan Adjid, R.M.A.** 2005c. Studi avian influenza di Indonesia : Karakter virus avian influenza isolat indonesia pada wabah gelombang kedua. *JITV*. 10 : 217-226.
 13. **Dharmayanti, NLP.I., Indriani, R., dan Adjid, R.M.A.** 2005d. Deteksi Virus avian influenza pada beberapa jenis unggas di Taman Margasatwa Ragunan dan upaya eradikasinya. *MKH*. 22. 2 : 79-83
 14. **Dharmayanti, N.L.P.I., dan Indriani, R.** 2007. Patogenisitas molekuler virus avian influenza yang diisolasi pada tahun 2005. *MKH*. 23. 2 : 68-73
 15. **Dharmayanti, NLP.I., R. Damayanti, R.Indriani, A. Wiyono and R MA. Adjid.** 2005. Efikasi Lapangan Vaksin Avian Influenza Isolat Lokal pada Ayam buras di Kabupaten Pandeglang dan Tangerang. 2005. *J Biol Indon*.3. 10
 16. **Dharmayanti, NLP.I., Indriani, R., Damayanti, R., dan Wiyono, A.** 2005a. Isolasi dan identifikasi wabah avian influenza pada bulan Oktober 2004 – Maret 2005 di Indonesia. *J Biol Indon*. 9: 341-350
 17. **Dharmayanti, N.L.P.I., dan Indriani, R.** 2007. Patogenisitas molekuler virus avian influenza yang diisolasi pada tahun 2005. *MKH*. 23. 2 : 68-73
 18. **Dharmayanti, Indriani, R., dan Darminto.** 2006. Laporan akhir penelitian tahun 2006. *Bbalitvet*. Bogor
 19. **Dharmayanti, NLP.I.** 2005. APEC Economy Experience : Animal Health Impact in Indonesia. In : APEC symposium in response to outbreaks of avian influenza and preparedness for human health emergency. San Francisco, California July 28-29, 2005.
 20. **Dharmayanti, NLP I.** 2005. Analisis fragmen Gen HA1 Virus Avian Influenza yang menginfeksi Sebuah Breeding Farm pada awal Tahun 2004 dan 2005 di kabupaten Sukabumi. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 10.2 : 86-90.
 21. **Dharmayanti, NLP I., Indriani,R., Hartawan, R., Hewajuli, DA., Ratnawati, A and Darminto.** 2008. Pemetaan genetic virus avian influenza tahun 2007. *Jurnal Biologi Indonesia*. 5. 2 : 155-171

NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

22. **Dharmayanti, NLP I,** and Darminto. 2009. Indonesian Avian Influenza Viruses Mutation : Antigenic drift on Hemagglutinin (HA) Protein during 2003-2006. MKH. Inpress.
23. **Dharmayanti, NLP I,** Ibrahim, F., Indriani, R., Sybli, M., Miswati, Y., Darminto., and Soebandrio, 2009. A. Molecular characterization of avian influenza (AI) virus subtype H5N1 on birds surrounding human cases infected by AI virus subtype H5N1 in Indonesia. Dalam proses.
24. **Dharmayanti, NLP I,** Ibrahim, F., Indriani, R., Darminto., and Soebandrio, A. 2009. Extensive antigenic drift of H5N1 avian influenza (AI) virus isolated from AI chickens vaccinated flock in Indonesia. Dalam proses.
25. **Dharmayanti, NLP I,** Ibrahim, F., and Soebandrio, A. 2009. Amantadine resistant of Indonesian influenza H5N1 subtype virus during 2003-2008. Microbiology Indonesia Journal. Submitted. Accepted.

Sebagai Co- Author :

26. Damayanti, R., **NLP.I. Dharmayanti,** Indriani, R., Wiyono, A and Darminto. 2004. Detection of avian influenza virus H5N1 subtype in organs of chicken affected by highly pathogenic in East Java by using immunohistochemical technique. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. Vol. 9. No.3. 197-303
27. Damayanti, R., **Dharmayanti, NLP.I.** Indriani, R., .Wiyono , A and Darminto. 2004. The clinico-pathological effects of chicken infected with highly pathogenic avian influenza in some farms located in East Java and West Java. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 9. 2 : 197-303
28. Damayanti, R., **Dharmayanti, NLP.I.,** Indriani, R., Wiyono, A and Adjid, R.M.A. 2005. Monitoring of avian influenza cases based on detection of viral antigen subtype H5N1 by immunohistochemical technique. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. Vol. 10.322-330
29. Indriani, R., **Dharmayanti, NLP.I.,** Wiyono, A., Darminto and. Parede. L. 2004. Detection of antibody responses by using hemagglutination inhibition test and the protection titer of avian influenza H5N1 subtype. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. Vol. 9.No.3. 204-209
30. Indriani, R., **Dharmayanti, NLP.I.,** Syafriati, T., Wiyono, A and Adjid, R.M.S. 2005. Development inactivated vaccine prototype of avian influenza (AI) H5N1 local isolate and its application at laboratory level. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. Vol. 10. 2. 315-321
31. Indriani, R and **Dharmayanti, NLP I.** 2006. Detection antibody of avian influenza (AI) in egg yolk post vaccination of AI H5N1 subtypes. Media Kedokteran Hewan. Vol. 22.no.2. 84-88
32. Hewajuli, D.A and NLP I Dharmayanti. 2008. Characterization and identification of avian influenza virus (AI). Wartozoa. Vol. 18. 2..86-100.
33. Bouma, A., Muljono, A.TM .,Jatikusumah, S., Nell, A.J., Mudjiartiningsih, S., **Dharmayanti, NLP.I.,** Siregar, E.S., Claassen, I., Koch, G and Stageman, J.A. 2008. Field trial for assessment of avian influenza vaccination effectiveness in Indonesia. Rev.Sci.tech.Off.int.Epiz. 27.3.633-642.
34. Kandun, I.N., E.Tresnaningsih, S. Harun, G.Samaan, W.H.Purba, E.

NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

Sariwati, C. Septiawati, M. Silitonga, V. Lee, NLP I Dharmayanti, M. Peiris and T. Wandra. 2009. Chicken Feces Garden Fertilizer: Probable source of human avian influenza H5N1 infection. *Zoonoses and Public Health Journal*. In Press.



NLP. Indi DHARMAYANTI - CV

ACCEPTED (Microbiology Indonesia)

**AMANTADINE RESISTANT OF INDONESIAN H5N1 SUBTYPE INFLUENZA VIRUSES
DURING 2003-2008**

NI LUH PUTU INDI DHARMAYANTI^{1*}, FERA IBRAHIM² AND AMIN SOEBANDRIO^{2,3,4}

¹Virology Department, Balai Besar Penelitian Veteriner, Jalan RE Martadinata No. 30, Bogor, West Java 16114, Indonesia Tel.: +62-251-8331048; Fax: 62-251-8336425; Email : nlpdharmayanti@yahoo.com

²Microbiology Department, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jl. Pegangsaan Timur No. 16 Jakarta 10320, Indonesia,

³State Ministry of Research and Technology, Gedung II BPP Teknologi Jl. MH Thamrin 8, Jakarta 10340, Indonesia

⁴Indonesia National Committee for Avian Influenza Control and Pandemic Influenza Preparedness, Jl. Medan Merdeka Barat No. 3 Jakarta Pusat

The M2 protein of 147 avian influenza (AI) viruses data available in public database (NCBI) including twenty AI isolates used in this study were sequenced at the M2 protein to find out the probability of mutation and the increase of resistance to amantadine after more than five years the AI viruses have circulated in Indonesia. The result of study showed that during 2003-2008, around 62.58% (92/147) AI viruses in Indonesia have experienced resistances to amantadine and ten of them are viruses have dual mutations at V27A and S31N.

Key words : Amantadine, resistant, H5N1 subtype influenza virus

DRAFT ARTIKEL

Running Head: Genetic drift of H5N1 virus in Indonesia

Title: Genetic drift of avian influenza A H5N1 viruses in Indonesia and the need for updated vaccines

Authors:

1. Ni Luh Putu Indi Dharmayanti^{1*}
2. Fera Ibrahim²
3. Risa Indriani¹
4. Gina Samaan³
5. Darminto¹
6. Amin Soebandrio^{2,4,5}

¹Indonesian Research Center for Veterinary Science, Agency for Agricultural Research and Development (AARD), Department of Agriculture, Bogor, West Java, Indonesia

²Microbiology Department, Medicine Faculty, Indonesia University, Jakarta, Indonesia

³Australian National University, Canberra, Australia

⁴State Ministry of Research and Technology, Jakarta, Indonesia

⁵Indonesia National Committee for Avian Influenza Control and Pandemic Influenza Preparedness

Word Count (abstract): 118

Word Count (text): 1,920

Conflicts of interest statement: None of the authors have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.

Financial sources: This study was funded by the 2008 the Indonesian Department of Agriculture State Budget, Agency Agriculture Research and Development, Agriculture Department, Indonesia.

Previous reporting of findings at meetings: none

***Corresponding author:** Ni Luh Putu Indi Dharmayanti, ¹Indonesian Center Research Institute for Veterinary Science, Bogor, Indonesia, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor, West Java 16114, Indonesia, Tel.: +62-251-8331048; Fax: 62-251-8336425; nlpdharmayanti@yahoo.com ; nlpdharmayanti@gmail.com

ABSTRACT

Vaccination as one tool to control avian influenza (AI) disease in Indonesia has been implemented since 2004. Two years after the implementation of vaccination, there were many problem related to vaccination. In 2006, the first genetic drift viruses were isolated from chicken farm conducting the vaccination intensively and all of the H5 subtype vaccines which were used in Indonesia failed to protect the chickens against the virus. This data inform that the viruses undergo to mutation and the viruses have genetic distinct with the seed of the vaccines. In this study revealed that viruses from chickens with vaccination showed more extensive mutation at the HA molecule compared to poultry or avian species without vaccination. The mutation continued as the substitutions were not only at the HA gene level but also at NA, M1 and NS1 genes and viruses from vaccinated chickens in 2008 have substitution that only found in those viruses. In the laboratory experiment, the new vaccine using antigenic drift virus in 2006 as seed vaccine can not give good protective against the genetic drift viruses in 2008. If Indonesia still uses vaccination as one of the strategy in controlling AI disease, up-dating vaccine seeds must always be conducted at least every two years