

TESIS

**ANALISIS ANTIGENIC SITE DAN PHYLOGENIC
GEN HAEMAGLUTININ VIRUS A1 SUBTIPE H5N1
DARI ISOLAT AYAM KAMPUNG DI BEBERAPA
DAERAH DI INDONESIA SEBAGAI KANDIDAT
SEED VAKSIN**

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS



Oleh :

SNR. ANIEKA ROCHMAH
NIM 061144001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**ANALISIS *ANTIGENIC SITE* DAN *PHYLOGENIC*
GEN *HAEMAGLUTININ VIRUS A1* SUBTIPE H5N1
DARI ISOLAT AYAM KAMPUNG
DI BEBERAPA DAERAH DI INDONESIA
SEBAGAI KANDIDAT *SEED* VAKSIN**

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS

TESIS

**untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Magister Vaksinologi dan Imunoterapi
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**SNR. ANIEKA ROCHMAH
NIM 061144001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

Analisis Antigenic site dan Phylogenic Gen Haemagglutinin Virus AI Subtipe H5N1 dari Isolat Ayam Kampung di Beberapa Daerah di Indonesia sebagai Kandidat Seed Vaksin

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 31 Juli 2013



SNR. Anieka Rochmah
NIM 061144001

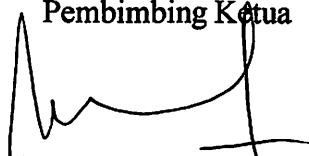
Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 31 Juli 2013

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

NIP.195910031987011001

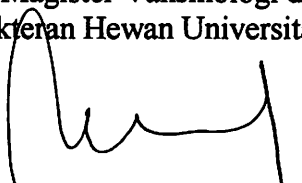
Pembimbing



Dr. Suwarno, Drh., M.Si.

NIP.196105151989031002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Vaksinologi dan Imunoterapetika
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

NIP.195910031987011001

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 31 Juli 2013

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Rahaju Ernawati, Drh., M.Sc.

Anggota : 1. Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, Drh., M.Sc.

2. Dr. AT. Soelih Estoepangestie, Drh.

3. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

4. Dr. Suwarno, Drh., M.Si.

Surabaya, 22 Agustus 2013



Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,

Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh.,PhD.

NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Tiada kata yang lebih tepat selain puji syukur kehadiran Allah SWT atas ridho dan karunia-Nya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menulis tesis dengan judul **Analisis *Antigenic site* dan *Phylogenic Gen Haemagglutinin* Virus AI Subtipe H5N1 dari Isolat Ayam Kampung di Beberapa Daerah di Indonesia sebagai Kandidat *Seed Vaksin*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada Direktur Kesehatan Hewan Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian, Drh. Endhang Pudjiastuti M.Kes. selaku Kepala Pusat Veterinaria Farma, pihak sponsor *United States Department of Agriculture Biosecurity Engagement Programme (USDA BEP)* yang telah memberi kesempatan dan membiayai pendidikan ini sampai selesai dan Prof. Hj. Romziah Sidik, drh.,PhD. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan pada program magister ini.

Tesis ini dapat terselesaikan dengan baik atas dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, perkenankanlah saya menghaturkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. selaku pembimbing pertama yang telah memberikan arahan, dorongan, peringatan dan petunjuk layaknya seorang

bapak dan kakak bagi penulis sehingga mampu melewati berbagai hambatan, rintangan dan kendala dalam proses belajar dan penulisan tesis ini.

Dr. Suwarno, Drh., M.Si. selaku pembimbing kedua yang dengan sabar dan telaten meluangkan tenaga dan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberikan masukan pada penulis selama proses penyusunan tesis.

Prof. Dr .H. Setiawan Koesdarto, Drh., M.Sc., Prof. Dr. Rahaju Ernawati, Drh., M.Sc., Dr. AT. Soelih Estoepangestie, Drh. selaku dosen penguji yang berkenan membimbing penulis, memberikan arahan, pertimbangan dan nasehat yang sangat berarti dan bermanfaat bagi penulis.

Seluruh staf pengajar dan staf Kemahasiswaan Program Studi Magister Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Program Magister Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Kepala Dinas Peternakan Kota Mataram (Nusa Tenggara Barat), Kepala Dinas Peternakan Kota Situbondo (Jawa Timur), Kepala Dinas Peternakan Kabupaten Sinjai (Sulawesi Selatan) dan Kepala Dinas Peternakan Kabupaten Lembata (Nusa Tenggara Timur) beserta teman-teman sejawat Dokter Hewan dan jajarannya yang telah membantu dalam pengambilan sampel penelitian.

Ayahanda tercinta H.M. Slamet Hadi Soeparto yang telah memberi semangat dan doa yang tulus, suami tercinta Drh. Zainal Abidin yang telah memberikan perhatian, dukungan, do'a, cinta, dan motivasi yang tak tergantikan dengan penuh kesabaran serta anak-anakku tersayang Ir. M. Alfian Romadhon dan M. Yoga Rochmanu Akbar yang telah mendukung dan mengizinkan mama

menyelesaikan pendidikan ini sehingga harus mengurangi waktu dan perhatian untuk kalian, ibu Amin yang setia dan ikhlas mengurus semua keperluan rumah.

Teman-teman yang telah membantu penelitian ini sampai selesai Drh. Rosmalina Sari D.D., Drh. Eko Agus Srihanto M.Sc., Drh. Hendra Wibawa M.Sc., PhD., Dr. Rosmelati Situmeang M.Kes., Drh. dan teman-teman sekantor di Laboratorium Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi Pusat Veterinaria Farma di Surabaya.

Teman-teman seperjuangan dalam menempuh ilmu di program studi ini Drh. Ulfa Mochtar, Drh. Andi Jaya Wardana, Nailul Izzah S.Pi, Drh. Desty A M.Vet., Drh. Risky Arya Pradikta M.Vet., Drh. Febri Kusuma M.Vet., Drh. Almaedawati, Drh. Deya Karsari yang telah menjadi teman yang baik dan memberi semangat selama menjalani perkuliahan.

Terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu yang telah membantu hingga tesis ini dapat disusun.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembimbing/penguji untuk penyempurnaan penulisan tesis ini. Semoga tesis ini dapat menjadi salah satu informasi yang bermanfaat bagi dunia kedokteran. Akhir kata penulis sangat bersyukur dan mengucapkan terimakasih yang tak terhingga.

Surabaya, 31 Juli 2013

Penulis



RINGKASAN

RINGKASAN

Flu burung atau Avian Influenza (AI) merupakan penyakit yang bersifat zoonosis terjadi pada unggas dan manusia. Penyakit flu burung disebabkan oleh virus *Avian Influenza* (AI) tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*. Virus AI dibedakan menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Di antara sub tipe virus influenza A, sub tipe H5, H7 dan H9 telah diketahui mempunyai patogenitas yang tinggi. Kematian pada unggas menimbulkan dampak sosial ekonomi yang sangat serius meliputi : (a) keterpurukan pada industri perunggasan; (b) meningkatnya impor produk peternakan; (c) kepanikan masyarakat yang berakibat pada konsumsi telur dan daging ayam menurun.

Virus ini telah mengalami diversifikasi baik genetik maupun antigenik sehingga berpengaruh pada kebutuhan virus sebagai kandidat seed vaksin untuk persiapan apabila terjadi pandemi (WHO, 2012). Virus AI yang ditemukan tahun 2008-2010 diduga telah berubah secara genetik dan antigenik berbeda dengan virus AI yang ditemukan saat terjadi kasus AI tahun 2003-2007. Virus ini dikhawatirkan lebih berbahaya dibandingkan dengan sebelumnya, perubahan tersebut tidak lepas dari karakter dasar virus AI yang mudah bermutasi. Tidak semua vaksin yang terdaftar secara resmi memberikan perlindungan yang memadai dan oleh karena itu seed vaksin secara antigenik dan genetik harus sesuai dengan virus lapang. Pengkajian terhadap vaksin AI harus secara terus menerus dilakukan untuk memastikan apakah vaksin masih memberikan perlindungan secara sempurna.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi secara molekuler gen pengkode HA dan daerah antigenik/*antigenic site* virus AI isolat ayam kampung yang diambil dari beberapa daerah di Indonesia yang akan digunakan sebagai kandidat seed vaksin, dengan cara menganalisis heterogenitas asam amino pada gen HA virus AI sub tipe H5N1, menentukan kandidat seed vaksin berdasarkan daerah antigenik/*antigenic site*, dan menganalisis hubungan kekerabatan/*phylogenetic* virus AI antar isolat ayam kampung dari beberapa daerah di Indonesia dibandingkan dengan virus AI lain di Indonesia yang berada di bank gen.

Jumlah sampel swab yang diambil sebanyak 33 dan 5 sampel organ terdapat 6 sampel positif dalam uji *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan primer H5N1, selanjutnya dilakukan karakterisasi molekuler terhadap *whole* gen HA menggunakan empat pasang primer HA10, HA20, HA30 dan HA40. Sekuensing terhadap DNA sampel yang telah murni dilakukan dengan bantuan primer M13F dan M13R dengan menggunakan mesin *Genetic Analyser AB* tipe 3130. Hasil sekuen DNA menunjukkan bahwa ORF (*Open Reading Frame*) dari gen HA dari virus-virus ini adalah 1689 bp dan ini mengkode 553 asam amino dari HA protein.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil analisis sekuen DNA pada *whole* gen HA terlihat adanya heterogenitas asam amino terlihat dengan adanya beberapa perbedaan pada asam amino antar isolat yaitu sebesar 0 – 1,1 % dan homologi sebesar 98,9 % - 100 % apabila dibandingkan dengan

A/chicken/Legok/2003 yang dianggap virus AI pertama di Indonesia dan A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 merupakan isolat yang digunakan sebagai *master seed* vaksin yang beredar pada saat ini. Pada hasil penelitian ini ditemukan variasi genetik pada daerah antigenik dengan adanya beberapa substitusi asam amino pada posisi 53 (R53K), 115 (R115Q), 124 (D124N), 185 (E185A) dan 189 (R189M), perubahan ini kemungkinan akibat dari pengaruh lingkungan, bukan pengaruh dari vaksinasi. Pada posisi asam amino 138 dan 140 tidak mengalami perubahan apabila dibandingkan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 yang digunakan sebagai *seed* vaksin sehingga sifat antigenesitas virus tidak berubah. Hasil analisis *phylogenetic* dan keragaman genetik dengan menggunakan *software* MEGA 5 menunjukkan bahwa pada pohon *phylogenic* dari gen HA keenam isolat sampel penelitian termasuk dalam *clade* 2.1.3.2 dimana mempunyai kedekatan kekerabatan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 sebagai *seed* vaksin yang beredar pada saat ini, sehingga keenam isolat tersebut dapat digunakan sebagai kandidat *seed* vaksin.

SUMMARY

Avian Influenza (AI) is a lethal disease and zoonosis which occurred in poultry and human. Bird flu disease is caused by Avian Influenza (AI) virus type A of the *Orthomyxoviridae* family. AI viruses can be divided into *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) and *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Among subtypes of influenza A virus, subtype H5, H7, and H9 have been known to have a high pathogenicity. The poultry's death has caused very serious socio-economic impacts, such as: (a) the downturn of the poultry industry, (b) increasing imports of livestock products, (c) public panicking which is resulting in the declining of consumption of eggs and chicken meat.

This virus has undergone both genetic and antigenic diversification so that affecting the needs of virus as a *seed* vaccine candidates in the preparation for the event of a pandemic (WHO, 2012). AI virus which is found in 2008-2010 is alleged to have changed, both genetically and antigenically different from the AI virus which was found during the 2003-2007 AI cases. This virus is feared to be more dangerous than earlier virus, moreover these changes can not be separated from the basic character of the AI virus which could mutates easily. Not all officially registered vaccines provide adequate protection, therefore a vaccine *seed* should both antigenically and genetically be match with the field virus. Assessment of AI vaccines should continuously be done to determine whether the vaccine still provides protection completely.

This research aimed to characterize molecular the encoding HA gene and the antigenic site AI virus isolate chicken taken from several areas in Indonesia, which will be used as a vaccine *seed* candidates, by analyzing the heterogeneity of amino acids in the HA gene AI virus of H5N1 subtype, to determine the *seed* vaccine candidates based on *antigenic site*, and analyze the *phylogenic* AI virus among isolate chicken from several areas in Indonesia which is compared with other AI viruses in Indonesia located in the gene bank.

This research took 33 swab samples and 5 organ samples there are 6 positive samples in *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) test with H5N1 primers, then the molecular characterization was performed to the whole HA gene using four pairs of primers HA10, HA20, HA30, and HA40. Sequencing of the already pure DNA samples that had been done with the help of M13F and M13R primers using sequencer Genetic Analyser AB 3130 type. The results of DNA sequence showed that the ORF (*Open Reading Frame*) of the HA gene of these viruses is the 1689 bp and encodes 553 amino acids of the HA protein.

The results of this research showed that the analysis result of DNA sequences in the whole HA gene indicate the presence of the nucleotide and amino acid heterogeneity differences between isolates in the amount of 0 - 1.1% and homology of 98.9% - 100% which are compared with A/chicken/Legok/2003 as the first AI virus in Indonesia and A / chicken / West Java/PWT-WIJ/2006 as isolate which a master *seed* vaccine at this time. On the results of this study, the transformation of amino acid that occurred in the antigenic positions 53 (R53K), 115 (R115Q), 124 (D124N), 185 (E185A) dan 189 (R189M), the transformation

is more likely the result of environmental influences, rather than because of the effect of vaccination. The amino acid positions 138 and 140 did not transform so that the natural characteristic of virus antigenicity does not exchange. The results of phylogenetic analysis and genetic diversity using the Mega 5 software shows that the phylogenetic tree from the HA gene, the six sample study isolate are included in *clade* 2.1.3.2 which have the proximity of kinship with A / Chicken / West Java/PWT-WIJ/2006 as seed vaccine, so that the six isolate can be used as a *seed* vaccine candidates.

**ANALYSIS OF ANTIGENIC SITE AND PHYLOGENIC
HAEMAGGLUTININ GEN OF AI VIRUS SUBTYPE H5N1
ISOLATE KAMPUNG CHICKEN
TAKEN FROM SEVERAL AREAS IN INDONESIA
AS SEED VACCINE CANDIDATES**

SNR. Anieka Rochmah

ABSTRACT

Avian Influenza (AI) is a lethal disease and zoonosis which occurred in poultry. The poultry's death has caused very serious socio-economic impacts. Molecular characterization was performed to analyse the whole HA gene AI virus isolate kampung chicken taken from several areas in Indonesia using four pairs of primers HA10, HA20, HA30, and HA40. Six samples were positive in the *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) with primers H5N1 test, then the molecular characterization was performed to determine vaccine *seed* candidates based on the analysis of the antigenic sites and phylogenetic analysis. The results of this study should the transformation of amino acid that occurred in the antigenic positions 53, 115, 124, 185, and 189 is more likely due to the environmental influences, rather than because of the effect of vaccination. The amino acid positions 138 and 140 did not transform so that the natural characteristic of virus antigenicity does not exchange. The result of phylogenetic analysis and genetic diversity of those six isolates have proximity of kinship with A / Chicken / West Java/PWT-WIJ/2006 as seed vaccine, therefore it can be used as *seed* vaccine candidates.

Key words : antigenic sites, phylogenetic, seed candidates

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR	iii
PERNYATAAN	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS	vi
UCAPAN TERIMAKASIH	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	8
1.3. Tujuan Penelitian.....	9
1.3.1. Tujuan Umum.....	9
1.3.2. Tujuan Khusus.....	9
1.4 Manfaat Penelitian.....	10
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	10
1.4.2. Manfaat Praktis.....	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1. Sejarah Virus Avian Influenza.....	11
2.2. Virus Avian Influenza.....	14
2.3. Gen <i>Haemagglutinin</i> Virus H5N1.....	21
2.4. Patogenesitas Virus H5N1.....	23
2.5. Daerah Antigenik (<i>Antigenic site</i>).....	25
2.6. Karakteristik Virus H5N1.....	26
2.7. Klasifikasi Virus H5N1 di Indonesia.....	28
2.8. Vaksin Flu Burung.....	29
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	30
3.1. Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian.....	31

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	34
4.1. Jenis Penelitian.....	34
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	34
4.3. Sampel Penelitian.....	34
4.4. Bahan dan Alat Penelitian.....	34
4.4.1. Bahan Penelitian.....	34
4.4.2. Alat Penelitian.....	35
4.5. Teknik Pengambilan Sampel.....	35
4.6. PCR	36
4.6.1. Ekstraksi RNA.....	36
4.6.2. Deteksi virus AI sub tipe H5N1 dengan PCR	37
4.6.3. PCR gen HA virus AI sub tipe H5N1	38
4.7. Elektroforesis.....	40
4.8. Purifikasi Hasil PCR Gen HA.....	40
4.9. Sequencing.....	41
4.9.1. <i>Cycle Sequencing</i>	41
4.9.2. Purifikasi Hasil <i>Cycle Sequencing</i>	42
4.9.3 <i>Loading</i> ke mesin Sequencer ABI 3130 Genetic Analyzer	42
4.10. Pengolahan Data.....	43
4.11. Analisis Sekuen dan <i>Phylogenetic</i>	43
4.12. Analisis Daerah Antigenik	44
4.13. Kerangka Operasional.....	45
 BAB 5 HASIL PENELITIAN	 46
5.1. Isolasi virus	46
5.2. Analisis Hasil Uji RT-PCR	47
5.3. Sekuensing gen HA virus AI	49
5.4. Hasil Analisis Perbedaan dan Homologi Antar Isolat	49
5.5. Hasil Analisis Asam Amino pada Daerah Antigenik	51
5.6. Hasil Analisis <i>Phylogenic tree</i>	52
 BAB 6 PEMBAHASAN	 54
 BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	 62
7.1. Kesimpulan	62
7.2. Saran	63
DAFTAR PUSTAKA.....	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Beberapa Fungsi Protein pada Virus AI Subtipe H5N1	17
4.1. Urutan Nukleotida Primer Spesifik Deteksi Virus AI Subtipe H5N1	37
4.2. Urutan Nukleotida Primer Spesifik untuk PCR Gen HA	38
4.3. Urutan Nukleotida Primer untuk <i>Cycle Sequencing</i>	38
5.1. Hasil Isolasi Virus Sampel di Beberapa Daerah di Indonesia	46
5.2. Hasil Analisis Perbedaan Jumlah Nukleotida dan Asam Amino Antar Isolat	50
5.3. Hasil Analisis Perbedaan dan Homologi Nukleotida Antar Isolat.....	50
5.4. Hasil Analisis Perbedaan dan Homologi Asam Amino Antar Isolat ..	51
5.5. Perbedaan Asam Amino pada Daerah Antigenik	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Fragmen gen yang membentuk Virus H5N1	16
2.2. Struktur virus AI	19
2.3. Struktur <i>sialyl-galactosyl</i> α 2-3NeuAcGal dan α 2-6NeuAcGal	20
2.4. Replikasi Virus Influenza A.....	21
2.5. Perbedaan <i>cleavage site</i> antara LPAI dan HPAI.....	25
3.1. Kerangka konseptual.....	30
4.1. Desain primer untuk amplifikasi PCR gen HA virus AI sub tipe H5N1...	39
4.2. Desain primer untuk <i>cycle sequencing</i> gen HA virus AI sub tipe H5N1..	39
5.1. Hasil elektroforesis DNA dengan primer spesifik virus AI sub tipe H5N1	47
5.2. Hasil elektroforesis DNA dengan primer gen HA10-HA40	48
5.3. Hasil analisis <i>phylogenetic tree</i> keenam isolat	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Hasil sekuensing isolat Lembata dengan primer Forward	73
Lampiran 2. Hasil sekuensing isolat Lembata dengan primer Reverse	77
Lampiran 3. Hasil sekuensing isolat Mataram O12 dengan primer Forward ..	81
Lampiran 4. Hasil sekuensing isolat Mataram O12 dengan primer Reverse ...	85
Lampiran 5. Hasil sekuensing isolat Mataram O14 dengan primer Forward ..	89
Lampiran 6. Hasil sekuensing isolat Mataram O14 dengan primer Reverse...	93
Lampiran 7. Hasil sekuensing isolat Mataram O20 dengan primer Forward...	97
Lampiran 8. Hasil sekuensing isolat Mataram O20 dengan primer Reverse...	101
Lampiran 9. Hasil sekuensing isolat Situbondo dengan primer Forward	105
Lampiran 10. Hasil sekuensing isolat Situbondo dengan primer Reverse	109
Lampiran 11. Hasil sekuensing isolat Sinjai dengan primer Forward.....	113
Lampiran 12. Hasil sekuensing isolat Sinjai dengan primer Reverse.....	117
Lampiran 13. Data sekuen antar isolat.....	121
Lampiran 14. Data asam amino antar isolat	128
Lampiran 15. Hasil uji BLAST	131



BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Flu burung atau Avian Influenza (AI) merupakan penyakit yang bersifat zoonosis terjadi pada unggas dan manusia. Penularan pada manusia dapat dicegah dengan mengetahui karakteristik virus dan cara pengendaliannya. Kasus flu burung merupakan salah satu penyakit yang menarik perhatian dunia.

Penyakit flu burung disebabkan oleh virus Avian Influenza (AI) tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*. Virus AI dibedakan menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Di antara sub tipe virus influenza A, sub tipe H5, H7 dan H9 telah diketahui mempunyai patogenitas yang tinggi/*High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan sering menimbulkan penyakit serius pada ternak unggas (Asmara, 2006; Pattnaik *et al.*, 2006). Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 yang *High Pathogenic* (HPAI) telah mempengaruhi kesehatan manusia dan perekonomian di Asia Tenggara sejak virus tersebut terdeteksi tahun 1997 (Gutierrez *et al.*, 2009). Nenek moyang semua virus H5N1 yang bersirkulasi saat ini adalah *A/goose/Guangdong/1/1996*, yang pertama kali diisolasi dari seekor angsa sakit di Guangdong, China pada 1996. Turunan virus dari Guangdong China ini yang kemudian menyebar ke Asia Tenggara, Eurasia dan Afrika. Sejalan dengan penyebarannya, virus-virus H5N1 yang telah berdiversifikasi, banyak diantaranya terus bersirkulasi secara bersamaan dan menyebabkan infeksi pada manusia sampai saat ini (Ducatez, *et al.*, 2011; Pfeiffer, 2009).

Kasus flu burung menjadi perhatian dunia ketika ditemukan ada strain (turunan) dari subtipe H5N1 yang patogen, yang mungkin sudah muncul di China Selatan sebelum tahun 1997, menyerang ternak unggas di seluruh Asia Tenggara ketika terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi, manusia) (Perkins and Swayne, 2003). Sejak mewabahnya kembali flu burung (HPAI H5N1) pada tahun 2003 telah menjadi enzootik di beberapa negara dan terus menimbulkan wabah pada unggas serta infeksi sporadis pada manusia. Virus ini telah mengalami diversifikasi baik genetik maupun antigenik sehingga berpengaruh pada kebutuhan virus sebagai kandidat *seed* vaksin untuk persiapan apabila terjadi pandemi (WHO, 2012). Wabah dilaporkan menyebar luas pada unggas akhir tahun 2003 dan pada awal tahun 2004 di negara kawasan Asia Timur dan Asia Tenggara seperti Thailand, Vietnam, Kamboja dan Indonesia (Peiris *et al.*, 2007; Lupiani and Reddy, 2009). Pada bulan Januari 2010 telah dilaporkan sudah sekitar 470 orang terinfeksi di lebih dari 15 negara dan tingkat kematian sekitar 60 %. Virus H5N1 masih menjadi ancaman pandemik yang sangat potensial di masa depan karena terjadinya evolusi dan penyebaran secara global (OIE, 2010).

Di Indonesia wabah flu burung terjadi sejak pertengahan tahun 2003, tetapi secara resmi pemerintah Indonesia baru mengumumkan kepada masyarakat adanya wabah flu burung pada ayam dan unggas lainnya di Indonesia pada tanggal 25 Januari 2004 melalui Keputusan Menteri Pertanian No. 96/Kpts/PD.620/2/2004. Kasus flu burung di Indonesia mencapai puncaknya pada bulan Januari–Februari 2004. Kejadian flu burung kemudian menurun sejalan dengan mulai dilakukannya

kebijakan pemerintah melakukan vaksinasi pada unggas. Kasus flu burung mulai terjadi kembali secara sporadis di beberapa tempat pada bulan Agustus 2004. Wabah flu burung gelombang ke dua di Indonesia terjadi sekitar akhir bulan Oktober 2004-Maret 2005 (Dharmayanti dkk., 2005). Kematian pada unggas menimbulkan dampak sosial ekonomi yang sangat serius meliputi : (a) keterpurukan pada industri perunggasan; (b) meningkatnya impor produk peternakan; (c) kepanikan masyarakat yang berakibat pada konsumsi telur dan daging ayam menurun (Martindah *et al.*, 2007).

Virus AI yang ditemukan tahun 2008-2010 diduga telah berubah secara genetik dan antigenik berbeda dengan virus AI yang ditemukan saat terjadi kasus AI tahun 2003-2007. Virus ini dikhawatirkan lebih berbahaya dibandingkan dengan sebelumnya, perubahan tersebut tidak lepas dari karakter dasar virus AI yang mudah bermutasi. Perubahan ini juga dipicu dari pemilihan vaksin yang tidak tepat, hal ini akan menimbulkan cemaran virus (*viral shedding*) yang sangat tinggi di lingkungan kandang.

Virus AI subtipe H5N1 dari berbagai negara, secara *phylogenetic* terpisah menjadi 2 *clade*. *Clade* 1 adalah virus yang diisolasi dari unggas dan manusia di Kamboja, Thailand, Vietnam, Laos, Korea Selatan, dan Jepang tahun 2003-2004. *Clade* 2 terbagi menjadi 3 *subclade*, *subclade* 1 adalah virus dari Indonesia tahun 2004-2006 dan isolat Hongkong tahun 2003 (WHO, 2005; Webster and Govorkova, 2006).

Virus AI mempunyai kemampuan untuk mempertahankan diri di alam. Karakteristik khusus dari virus AI adalah kemampuan untuk bermutasi di dalam genom RNA, kemampuan bermutasi ini dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Pada faktor internal, enzim polimerase yang berperan dalam proses replikasi (perbanyak) virus tidak dilengkapi dengan sistem *proofreading* menjadi faktor utama yang mendorong virus AI bermutasi. Faktor internal lain yaitu proses multiplikasi virus AI yang terjadi dalam inti sel. Kondisi dimana RNA yang saling lepas satu dengan lainnya dapat memperbesar kemungkinan kesalahan penyusunan asam amino dalam RNA pada saat proses replikasi. Sedangkan faktor eksternal yang memicu terjadinya mutasi virus AI yaitu penggunaan vaksin dengan kandungan *seed* yang berbeda dengan virus AI lapangan sehingga penggunaan vaksin ini tidak akan memberikan perlindungan yang sempurna.

Gen eksternal pada virus AI terdiri dari gen *haemagglutinin* (HA) dan gen *neuraminidase* (NA) yang banyak berfungsi dalam perlekatan dengan sel inang dan bersifat antigenik (Horimoto and Kawaoka, 2001). Respons imun yang timbul dalam tubuh baik oleh alam, maupun akibat program vaksinasi dapat menimbulkan tekanan pada gen HA maupun gen NA yang akan menyebabkan terjadinya *antigenic drift*. Adanya infeksi virus Influenza A di alam maupun penggunaan vaksin influenza diperlukan koreksi terhadap *seed* vaksin yang digunakan (Tamura and Kurata, 2004; Seo *et al.*, 2002; CDC, 2005). Proses mutasi virus AI secara umum dibedakan menjadi dua yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. *Antigenic drift* terjadi secara

perlahan-lahan dengan menghasilkan sedikit perubahan pada struktur antigen permukaan HA dan atau NA, sehingga dihasilkan virus strain baru (CDC, 2005). Proses mutasi *antigenic shift* membutuhkan waktu yang relatif lama, dengan efek yang ditimbulkan sangat berbahaya.

Virus AI mempunyai mekanisme untuk menghindari respon imun dari inang sehingga virus dapat bertahan hidup dan bereplikasi dalam tubuh sel inang secara langsung berkorelasi dengan peningkatan patogenitas virus. Patogenitas virus AI sub tipe H5N1 secara molekuler dapat ditentukan berdasarkan pada sekuen asam amino regio *cleavage site* pada gen HA (Plotkin and Dushof, 2003; Hulse *et al.*, 2004; Horimoto and Kawaoka, 2005). Gen HA berperan sebagai pengikat reseptor, fusi membran, target utama netralisasi oleh antibodi sel inang (Cross *et al.*, 2001; Hulse *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005; Gambaryan *et al.*, 2006). Disamping itu pada gen HA yang harus diperhatikan adalah daerah antigenik (*antigenic site*), *reseptor binding site*, *reseptor binding pocket* dan glikosilasi. Daerah antigenik berkaitan dengan pertahanan terhadap respon imun sel inang. *Reseptor binding pocket* berkaitan dengan kemampuan adaptasi virus pada inang dan patogenitas strain. Sedangkan posisi glikosilasi ikut menentukan afinitas ikatan reseptor serta pengenalan daerah antigenik oleh antibodi. *Reseptor binding site* adalah asam amino yang berikatan secara langsung dengan reseptor sel inang (Hulse *et al.*, 2004; Gambaryan *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006; Steven *et al.*, 2006). Daerah antigenik merupakan asam amino dimana sebagai target pengenalan dan netralisasi oleh antibodi. Substitusi asam amino pada daerah antigenik meningkatkan potensi terjadinya *antigenic drift*

karena mekanisme virus untuk menghindari respon imun dari inang dan antibodi yang terbentuk akibat vaksinasi (Plotkin and Dushoff, 2003; Campitelli *et al.*, 2006). Pada glikoprotein HA terdapat lima epitop daerah antigenik sebagai daerah target netralisasi antibodi (Smith *et al.*, 2004). Kelima epitop tersebut terdapat pada 25 asam amino subunit HA1 (Plotkin and Dushoff, 2003).

Protein HA pada virus AI mempunyai asam amino Leucine pada posisi 222 dan Serine pada posisi 224 berikatan dengan asam sialat α 2-6NeuAcGal pada manusia. Sedangkan protein HA pada virus AI mempunyai asam amino Glutamine pada posisi 222 dan Glycine pada posisi 224 berikatan dengan asam sialat α 2-3NeuAcGal pada unggas (Suzuki *et al.*, 2000; Leung, 2007). Strategi virus AI untuk menutup atau membuka daerah antigenik dari sistem kekebalan adalah dengan menambah posisi glikosilasi pada asam amino 84-86 yang merupakan mekanisme virus untuk menghindar pengenalan daerah antigenik oleh antibodi (Campitelli *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Posisi asam amino 138 dan 140 pada daerah antigenik sangat berpengaruh dalam spesifisitas karbohidrat molekul gen HA sehingga mempengaruhi sifat antigenesitas virus (Duvvuri *et al.*, 2009).

Virus AI selalu melakukan adaptasi, baik adaptasi terhadap tekanan respon imun maupun terhadap spesies inang baru (Taunberger, 2005). Adaptasi merupakan kekuatan utama virus AI untuk melakukan evolusi. Perbedaan spesies inang dan perbedaan tekanan respon imun menyebabkan perbedaan kecepatan evolusi virus (Brown *et al.*, 2001). Perubahan pada satu asam amino saja dapat merubah

konfigurasi reseptor tersebut sehingga virus H5N1 sangat berpotensi untuk melakukan mutasi dan dapat membuat varian baru dari HPAI H5N1.

Berdasarkan sifat virus AI tersebut diperlukan pemilihan *seed* vaksin yang tepat karena sampai saat ini belum ada vaksin yang tepat. Tidak semua vaksin yang terdaftar secara resmi memberikan perlindungan yang memadai dan oleh karena itu *seed* vaksin yang ada saat ini perlu disesuaikan dengan virus lapang. Pemerintah Indonesia memiliki kebijakan untuk mengembangkan kemampuan dalam menyediakan vaksin yang sesuai untuk digunakan di semua sektor industri unggas. Strain *seed* vaksin H5N1 yang akan digunakan harus secara antigenik dan genetik sesuai dengan virus lapang (strain yang non homolog tidak disarankan untuk digunakan) (Kawaoka, 2009). *Seed* vaksin dari strain virus yang relevan secara epidemiologis dan antigen yang spesifik diperlukan agar dapat mencakup semua sektor produksi, oleh karena itu diperlukan lebih dari satu strain *seed* vaksin H5N1 (OFFLU, 2010).

Dalam pengendalian penyakit AI yang sangat patogen, pemusnahan hewan (*stamping out*) merupakan kebijakan yang direkomendasikan oleh *Office International des Epizooties/OIE* (2000). Pada pertemuan OIE/FAO/WHO di Roma pada bulan Februari 2004, program vaksinasi dapat dilakukan untuk mengendalikan penyebaran penyakit AI di negara-negara tertular wabah yang berat dan telah meluas. Program ini dilakukan dalam periode waktu tertentu dan secara serempak di seluruh wilayah dimana merupakan suatu aksi darurat. Sebagai bagian dari pengendalian

virus, vaksinasi dilakukan pada berbagai spesies unggas seperti ayam kampung, ayam ras, bebek dan burung puyuh (Nidom dkk., 2012).

Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian pada tahun 2009 mengeluarkan kebijakan berdasarkan pada rekomendasi Komisi Ahli Kesehatan Hewan, Komisi Obat Hewan, narasumber UPP-AI dan OFFLU (kerjasama OIE dan FAO) memberikan gambaran mengenai kriteria vaksin yang baik dengan kualitas, efikasi dan keamanan yang tinggi serta potensi yang optimal adalah dengan kriteria subtype H5N1 (homolog), mempunyai sifat imunogenitas tinggi, antigenisitas dengan cakupan geografis yang luas, sifat genetik dan antigenik yang stabil, dan tingkat proteksi yang tinggi terhadap uji tantang dengan beberapa isolat virus yang berbeda karakter genetik dan antigeniknya (OFFLU, 2010).

Berdasarkan uraian diatas, maka vaksin merupakan salah satu bagian penting dalam pengendalian virus AI. Pengkajian terhadap vaksin AI harus secara terus menerus dilakukan untuk memastikan apakah vaksin masih memberikan perlindungan secara sempurna. Penelitian mengenai urutan nukleotida dan asam amino pada daerah antigenik virus AI sangat diperlukan guna memberikan informasi secara ilmiah tentang perkembangan genetik dan antigenik virus AI dan dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk menentukan kandidat *seed* vaksin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka didapatkan beberapa permasalahan yang mendorong dilakukannya penelitian ini :

1. Bagaimanakah heterogenitas asam amino pada gen HA virus AI subtipe H5N1 isolat ayam kampung di beberapa daerah di Indonesia?
2. Apakah virus AI isolat ayam kampung yang diambil dari beberapa daerah di Indonesia berdasarkan heterogenitas asam amino pada daerah antigenik/*antigenic site* dapat digunakan sebagai kandidat *seed* vaksin?
3. Bagaimanakah hubungan kekerabatan/*phylogenetic* virus AI isolat ayam kampung di beberapa daerah di Indonesia dibandingkan dengan virus AI lain di Indonesia yang berada di GenBank?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi secara molekuler gen pengkode HA dan daerah antigenik/*antigenic site* virus AI isolat ayam kampung yang diambil dari beberapa daerah di Indonesia yang akan digunakan sebagai kandidat *seed* vaksin dalam rangka pengendalian virus AI di Indonesia.

1.3.2 Tujuan Khusus

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menganalisis heterogenitas asam amino pada gen HA virus AI subtipe H5N1 isolat ayam kampung di beberapa daerah di Indonesia.
2. Menentukan kandidat *seed* vaksin berdasarkan daerah antigenik/*antigenic site* dari virus AI isolat ayam kampung yang diambil dari beberapa daerah di Indonesia.

3. Menganalisis hubungan kekerabatan/*phylogenetic* virus AI antar isolat ayam kampung dari beberapa daerah di Indonesia dibandingkan dengan virus AI lain di Indonesia yang berada di GenBank.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu informasi ilmiah tentang kekerabatan dan antigenik virus AI isolat ayam kampung yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia sehingga dapat digunakan sebagai strategi awal dalam rangka pengendalian virus AI di Indonesia.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat sebagai data pembanding berdasarkan susunan nukleotida dan asam amino pada daerah antigenik virus AI sehingga dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan pemerintah dalam pengambilan kebijakan pada penentuan strain *seed* vaksin AI di Indonesia. Vaksinasi terhadap penyakit flu burung dapat tercapai dan berhasil dengan baik menggunakan vaksin yang protektif sesuai penyakit di lapangan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Virus Avian Influenza

Sejak lebih dari satu abad yang lalu berbagai variasi mutasi subtipe virus Influenza A menyerang manusia dan menyebabkan pandemi, sehingga meningkatkan kewaspadaan global terhadap wabah pandemi flu burung. Tingkat kematian yang cukup tinggi sebanyak 25-40 juta jiwa di dunia terjadi pada tahun 1918 disebut "*Spanish Pandemi*", merupakan sejarah pandemi yang terjadi luar biasa (XU Cuilin *et al.*, 2009; Taubenberger *et al.*, 2006; Lupiani and Reddy, 2009). Tahun 1957 terjadi wabah global "*Asian Flu*" yang telah merenggut 100.000 jiwa disebabkan oleh virus H2N2. Pada tahun 1968, kembali terjadi pandemi menyebabkan 700.000 orang meninggal dunia yang dikenal dengan "*Hongkong Flu*" yang disebabkan oleh virus H3N2. Kasus Avian Influenza H5N1 pertama kali menewaskan 6 orang penduduk di Hongkong pada tahun 1997 dari 18 orang terinfeksi (Horimoto and Kawaoka, 2001; Chengjun, 2009). Nenek moyang virus AI subtipe H5N1 yang bersirkulasi saat ini adalah A/goose/Guangdong/1/1996, yang pertama kali diisolasi dari seekor angsa sakit di Guangdong, China pada 1996. Virus tersebut kemudian menyebar ke Asia Tenggara, Eurasia dan Afrika. (Ducatez , *et al.*, 2011; Pfeiffer, 2009).

Kasus flu burung akhir-akhir ini memperoleh perhatian dunia ketika ditemukan ada strain (turunan) dari subtipe H5N1 yang sangat patogen, yang mungkin sudah muncul di China Selatan sebelum tahun 1997, menyerang ternak unggas di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga melintasi batas antar kelas

(Perkins and Swayne, 2003) ketika terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi, manusia) (Koopmans 2004, Hayden and Croisier 2005). Sejumlah kasus infeksi pada manusia ditandai dengan gejala yang parah dan menyebabkan kematian telah menimbulkan kekhawatiran akan kemungkinan terjadinya pandemi infeksi virus strain H5N1 (Klempner and Saphiro 2004; Webster 2006). Virus Influenza A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda dan kadang-kadang pada mamalia lain, misalnya anjing laut dan ikan paus. Sedangkan virus Influenza B dan C hanya ditemukan pada manusia (OIE, 2004). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa virus H5N1 telah mengalami peningkatan potensi patogenik pada beberapa spesies mamalia. Oleh karena itu dapat dipahami bahwa hal ini telah menimbulkan kekhawatiran umum di seluruh dunia (Kaye and Pringle, 2005).

Wabah flu burung di Indonesia terjadi sejak pertengahan tahun 2003, tetapi secara resmi pemerintah Indonesia baru mengumumkan kepada masyarakat adanya wabah flu burung pada ayam dan unggas lainnya di Indonesia pada tanggal 25 Januari 2004 melalui Keputusan Menteri Pertanian No. 96/Kpts/PD.620/2/2004. Pada laporan resmi tersebut dilaporkan telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, sampai dengan akhir februari 2004 telah tercatat kematian unggas 6,2 juta ekor (Nidom dkk, 2006). Data Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian tahun 2004, awal kejadian AI yang ganas di Indonesia tidak diketahui secara pasti. Kasus flu burung pada ayam diduga muncul pertama kali pada bulan Agustus 2003 di beberapa peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Kasus tersebut kemudian secara cepat meluas ke berbagai daerah di

wilayah Jawa, Bali, Sumatera dan Kalimantan. Pada tahun yang sama, 9 propinsi, yang terdiri dari 51 kabupaten/kota dinyatakan telah terjangkit penyakit avian influenza, dengan kasus kematian unggas mencapai 4,13 juta ekor. Jenis unggas yang terserang meliputi ayam ras petelur, pedaging, ayam bibit, ayam buras, ayam arab, burung puyuh, burung merpati, itik, entok, burung perkutut dan burung merak. Hasil kajian lapangan, klinik, patologik dan laboratorik yang dilakukan oleh *Office International des Epizooties* (OIE) yang merupakan organisasi kesehatan hewan dunia menunjukkan bahwa penyebab kematian jutaan unggas di Indonesia sejak bulan Agustus 2003 adalah virus Influenza tipe A, subtipe H5N1 yang termasuk dalam virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (Asmara, 2006; UGM, 2006).

Virus Avian Influenza subtipe H5N1 di Indonesia termasuk genotipe Z. Genotipe ini pertama kali ditemukan pada unggas di China Selatan pada tahun 2002 (Smith *et al.*, 2006). Analisis filogenik dari gen HA virus AI H5N1 dari beberapa wilayah geografis dan berbagai spesies hewan di Indonesia menunjukkan bahwa virus tersebut termasuk dalam satu *cluster* (Smith *et al.*, 2006).

Kasus flu burung di Indonesia mencapai puncaknya pada bulan Januari–Februari 2004. Selama wabah dari bulan Agustus 2003 sampai September 2004 ada 16 propinsi dan 99 kabupaten/kota di Indonesia yang tertular (Naipospos, 2004) dan sampai saat ini dari 33 propinsi yang ada di Indonesia sejumlah 32 propinsi sudah merupakan daerah endemis terhadap virus AI kecuali Propinsi Maluku Utara. Data terakhir menyebutkan masih terjadi 22 kasus di 22 desa (diantara 76.613 desa se-Indonesia) pada 18 kabupaten/kota di 10 propinsi. Sampai saat ini kasus flu burung

(H5N1) masih membayangi Indonesia, bahkan kematian pada manusia akibat flu burung di Indonesia, tertinggi di dunia. Sejak tahun 2003, ada 182 kasus penularan flu burung terhadap manusia di Indonesia dan hampir 80 persen berakhir dengan kematian yaitu sekitar 150 kasus. Menurut data WHO (2012), Indonesia sebagai negara dengan jumlah korban H5N1 pada manusia tertinggi di dunia.

Kementerian Kesehatan pada tgl 12 Agustus 2012 menyatakan korban akibat flu burung (H5N1) di Indonesia menjadi 191 orang dengan kasus kematian mencapai 159 orang, terakhir adalah warga Prambanan Jogjakarta berusia 37 tahun menurut data Riset dan Investigasi Lembaga Riset Indonesia, Jumat (19/10/2012). Direktur Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan mengatakan, tingginya kematian terkait dengan faktor virus dan manusia. Virus ini menyebar dari unggas ke manusia melalui kontak langsung, tetapi para ahli mengkhawatirkan kemungkinan adanya mutasi virus sehingga dapat menular dari manusia ke manusia.

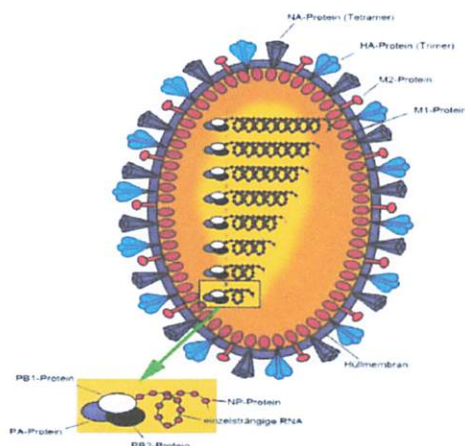
2.2 Virus Avian Influenza

Virus Influenza tipe A termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* selain tipe B, dan tipe C. Pembagian ketiga tipe ini berdasarkan sifat antigenik yang terdapat pada gen *matrix* (M) dan *nucleoprotein* (NP) pada virus tersebut (Horimoto and Kawaoka, 2001). Virus Influenza A selain menginfeksi unggas dapat juga menginfeksi mamalia, dan hanya virus Influenza A yang dapat menyerang unggas. Sedangkan yang bertindak sebagai *host* alamiah dan *reservoir* adalah unggas air liar yang

termasuk di dalam ordo *Anseriformes* dan *Charadriiformes* (Capua and Alexander, 2009). Virus AI mempunyai rentang hospes yang sangat luas dan dapat menginfeksi beberapa jenis unggas, manusia, babi, kuda dan mamalia tingkat rendah seperti anjing laut dan paus (Cardona *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2000). Lee *et al.* (2009) menemukan anjing yang memiliki titer antibodi terhadap virus Influenza A di Korea. Hewan karnivora lainnya pernah dilaporkan terinfeksi oleh virus Influenza tipe A seperti kucing dan harimau. Selain pada hewan liar, virus avian ini juga peka terhadap hewan laboratorium. Beberapa peneliti melakukan penelitian dan mengisolasi virus Influenza tipe A pada hewan laboratorium diantaranya pada tikus (Diskell *et al.*, 2010), ferret (Maines *et al.*, 2011), *cynomolgus macaques* (*Macaca fascicularis*) (Itoh *et al.*, 2010).

Virus Influenza tipe A dan B mempunyai kesamaan yaitu sama-sama mempunyai delapan macam fragmen gen yang dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu gen eksternal dan gen internal. Gen eksternal terdiri dari gen *haemagglutinin* (HA) dan gen *neuraminidase* (NA) yang banyak berfungsi untuk perlekatan dengan sel inang dan bersifat antigenik. Gen internal terdiri dari gen *polymerase basic-2* (PB2); *polymerase basic-1* (PB1); *polymerase acidic* (PA); *nucleoprotein* (NP); *matrix* (M) dan *non structural* (NS). Gen internal ini berfungsi dalam replikasi dan transkripsi virus. Kedelapan fragmen ini akan menghasilkan sepuluh macam protein. Masing-masing fragmen akan menghasilkan satu macam protein, kecuali fragmen M dan NS yaitu masing-masing menghasilkan dua macam protein yaitu protein M1 dan

M2, serta protein NS1 dan NS2 seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Rantam, 2003).



Gambar 2.1. Fragmen gen yang membentuk virus AI (Rantam, 2003).

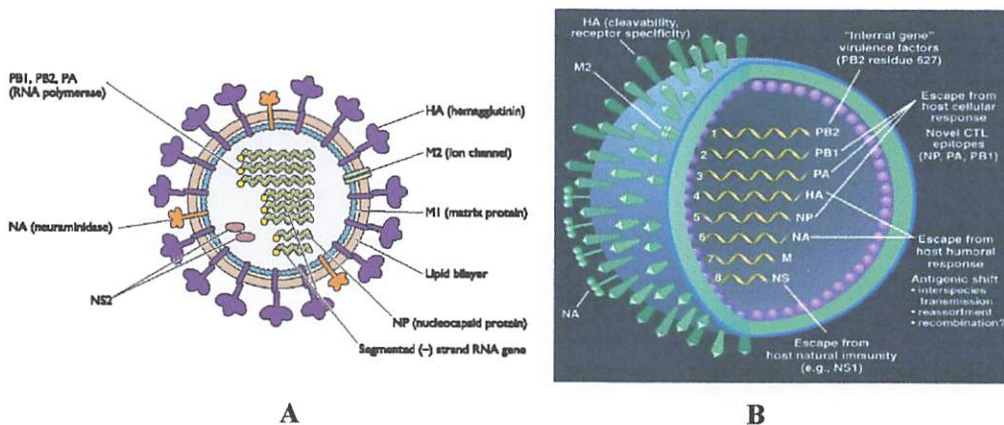
Virus Avian Influenza (AI) termasuk dalam klasifikasi virus Influenza tipe A dimana pembagian sub-tipe selanjutnya didasarkan pada struktur antigen dua glikoprotein eksternal virus, yaitu *haemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA) (Suarez, 2008). Virus AI sampai saat ini telah dapat diidentifikasi ada 16 subtipe HA (H1 - H16) dan 9 NA (N1 - N9) (Harimoto and Kawaoka, 2005; De jong and Hien, 2006; OIE, 2008). Di antara subtipe virus influenza A, subtipe H5, H7 dan H9 telah diketahui mempunyai patogenitas yang tinggi/*High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan sering menimbulkan penyakit serius pada ternak unggas. Subtipe H5 dan H7 dapat menginfeksi unggas, tetapi tidak semua kombinasi subtipe tersebut merupakan subtipe yang virulen (Swyne and Suarez, 2000; Asmara, 2006; Pattnaik *et al.*, 2006; Alexander, 2007).

Virus AI tipe A subtype H5N1 atau lebih dikenal dengan flu burung adalah virus *single stranded* (ss)-RNA famili *Orthomyxoviridae* berbentuk *pleomorfik* dengan diameter 80-120 nm dan panjang 200-300 nm. Virus ini berbentuk *spheris* atau longitudinal, memiliki dua protein permukaan yang merupakan variabel perlekatan utamanya (Murphy *et al.*, 2008; Suarez, 2008). Asam nukleat berantai tunggal dengan kutub negatif, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 segmen gen yang mengkode sekitar 10 jenis protein yaitu PB-2 (*Polymerase Basic-2*), PB-1 (*Polymerase Basic-1*), PA (*Polymerase Acidic*), HA (*Haemaglutinine*), NP (*Nucleoprotein*), NA (*Neuraminidase*), M2 (*Matrix-2*), M1 (*Matrix-1*), NS2 (*Non Structural-2*), , NS1 (*Non Structural-1*) (Ghedini *et al.*, 2005; Rantam dkk, 2007).

Tabel 2.1. Beberapa Fungsi Protein pada Virus AI Subtipe H5N1 (Whitaker, 2001).

Segmen	Protein	Nukleotida	Fungsi
1	PB2 (<i>Polymerase Basic 2</i>)	2341 bp	Transcriptase, cap binding
2	PB1 (<i>Polymerase Basic 1</i>)	2342 bp	Transcriptase, elongasi, polimerisasi mRNA, menghambat respon imun selluler
3	PA (<i>Polymerase Acidic</i>)	2233 bp	Transcriptase, aktifitas protease, menghambat respon imun selluler
4	HA (<i>Haemaglutinine</i>)	1704 bp	Berikatan dengan reseptor, target netralisasi antibodi
5	NA (<i>Neuraminidase</i>)	1413 bp	Pelepasan virus, memotong ujung asam sialat dari reseptor sel hospes sehingga progeni virion lepas dari sel, target netralisasi antibodi
6	NP (<i>Nucleoprotein</i>)	1565 bp	RNA binding, transportasi vRNA antara

			nukleus/sitoplasma, menghambat respon imun seluler
7	M (<i>Matrix</i> 1 dan 2)	1027 bp	Komponen utama virion, perakitan (<i>assembly</i>) progeni virus (M1), tanda isyarat transpor ke permukaan sel, kanal ion (M2)
8	NS (<i>Non Struktural</i> 1 dan 2)	890 bp	Splicing, translasi, Ekspor mRNA virus dari nukleus , menghambat pemotongan dan penyambungan (<i>splicing</i>) pre mRNA seluler, menghambat ekspor mRNA seluler, menghambat respon anti virus interferon (IFN), menginduksi badai sitokin (<i>sitokines storm</i>) (NS1), bersama-sama dengan M1 sebagai tanda isyarat ekspor vRNP dari nukleus (NS2)



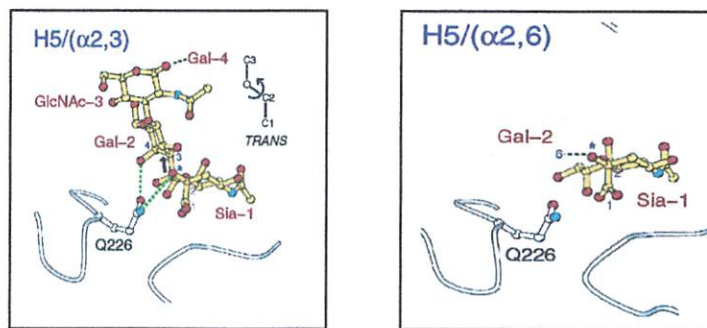
Gambar 2.2. Struktur virus AI A). Delapan segmen gen yang mengkode sekitar 10 jenis protein (Sumber : Avian Influenza, Molecular Diagnosis of Infectious Disease. CSIRO Modul. Australia.

B). Struktur dan segmen genom virus Influenza A (Webster, 2001).

Protein PB2, PB1 dan PA adalah protein pembentuk enzim RNA polimerase yang berperan pada proses transkriptase dan replikasi pada saat komponen virus di dalam nukleus sel inang. Protein NP bersama dengan protein PB1, PB2 dan PA menyusun ribonukleoprotein yang dikeluarkan oleh virus pada saat prekursor HA (HA0) diaktifasi oleh enzim protease sel inang. Protein HA adalah glikoprotein permukaan yang berikatan dengan reseptor sel inang. Protein NA adalah glikoprotein yang berfungsi melepaskan virion yang baru terbentuk dari sel inang. Protein M1 merupakan protein penyusun struktur virion, sedangkan protein M2 adalah penyusun saluran ion. Protein NS1 berperan pada transport mRNA keluar dari nukleus sel inang dan proses translasi bersama dengan protein NS2 yang dibentuk pada saat di nukleus dan sitoplasma sel inang (Steven *et al.*, 2007).

Infeksi virus AI pada sel inang dapat terjadi karena adanya kecocokan antara virus dengan reseptor spesifik pada permukaan sel inang. Untuk dapat terjadinya

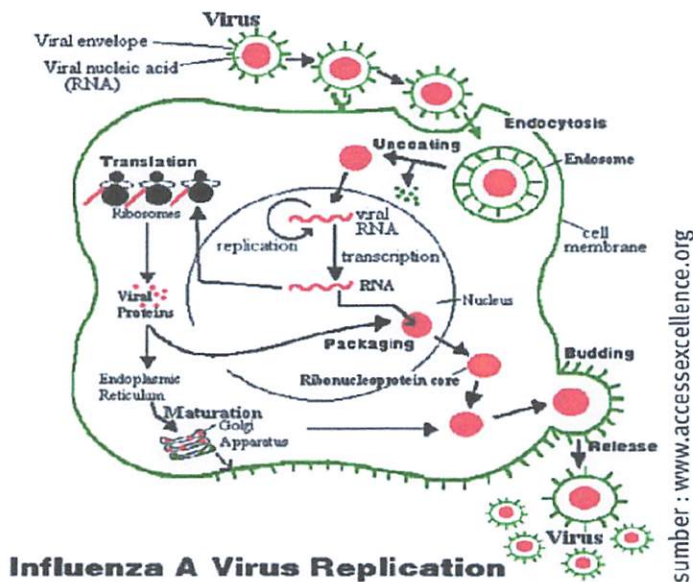
infeksi virus AI ini berikatan dengan glikoprotein atau glikolipid permukaan sel yang mengandung gugus terminal *sialyl-galactosyl* α 2-3NeuAcGal atau α 2-6NeuAcGal. Reseptor spesifik α 2-3NeuAcGal merupakan reseptor yang mendominasi jaringan epitel endodermis intestinal dan paru-paru pada unggas yang menjadi target virus tersebut. Sedangkan virus Influenza pada manusia umumnya berhubungan dengan reseptor α 2-6NeuAcGal yang mendominasi sel epitel tidak bersilia pada saluran pernapasan. Kondisi ikatan ini ikut berperan dalam spesifitas virus dengan inang (Suzuki and Nei, 2002; Matrosovich, 2004; Gambaryan, *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005).



Gambar 2.3. Struktur *sialyl-galactosyl* α 2-3NeuAcGal dan α 2-6NeuAcGal (Ha Ya *et al.*, 2001).

Proses replikasi virus Influenza A didalam sel inang diawali dengan terjadinya infeksi protein HA menempel pada reseptor sel inang, penetrasi melalui endositosis, virus membuka amplopnnya dan masuk ke dalam nukleus sel inang. Di dalam nukleus sel inang terjadi *splicing* dan *transcriptase* membentuk mRNA selanjutnya mRNA keluar dari nukleus. Pada proses *translasi* RNA membentuk PB2, PB1, PA, NS1, NS2 dan M1 dimana protein ini masuk kembali ke dalam nukleus menjadi virion. Protein HA, NA dan M2 yang terdapat di sitoplasma

dibentuk di endoplasmik retikulum melalui golgi aparatus dibawa ke permukaan sel inang untuk menempel pada virion yang baru terbentuk (Bateman *et al.*, 2008)



Gambar 2.4. Replikasi virus Influenza A (www.accessexcellence.org)

2.3 Gen *Haemagglutinin* Virus AI subtype H5N1

Protein *haemagglutinin* (HA) merupakan faktor patogenitas virus AI. Protein ini berperan sebagai pengikat reseptor sel, fusi membran serta target utama netralisasi antibodi sel inang (Cross *et al.*, 2001; Hulse *et al.*, 2004; Hoofman *et al.*, 2005; Gambaryan *et al.*, 2006).

Protein *haemagglutinin* (HA) disusun oleh 568 asam amino dengan berat molekul 56 kDA. *Haemagglutinin* (HA) merupakan glikoprotein pada amplop virus yang mampu berikatan dengan reseptor *sialic acid* pada permukaan sel hospes (De jong and Hien, 2006). Molekul HA terdiri dari subunit HA1 dan HA2. Protein HA1

mempunyai berat molekul 45 kDA berperan dalam mediator kontak awal dengan membran sel dan protein subunit HA2 bertanggungjawab terhadap fusi membran (Nwe, 2006). Protein HA terdiri dari glikoprotein *homotrimer*, pada permukaannya berbentuk seperti jamur. Gen HA terdiri atas sekitar 1704 nukleotida, pada bagian ujung dari gen HA terdapat tempat melekatnya virus pada reseptor yang disebut *receptor binding site* (Stevens *et al.*, 2007).

Pada awal infeksi, protein HA akan berikatan dengan reseptor sel inang dan melepaskan ribonukleoprotein. Aktivasi prekursor polipeptida tunggal HA oleh protease sel inang mengakibatkan protein akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Daerah *cleavage site* pada protein HA menentukan patogenesis virus AI. Proteolisis HA pada *cleavage site* bersifat spesifik dan spesifitas jenis protease membatasi jaringan yang dapat difeksi virus ini sehingga proteolisis HA ini sangat diperlukan untuk infektivitas virus (Croos *et al.*, 2001; Munch *et al.*, 2001). Pada protein HA1 mempunyai domain-domain penting seperti daerah antigenik, posisi glikolisasi dan *reseptor binding pocket*. Daerah antigenik berkaitan dengan pertahanan terhadap respon imun sel inang. *Reseptor binding pocket* berkaitan dengan kemampuan adaptasi virus pada inang dan patogenitas strain. Sedangkan posisi glikosilasi ikut menentukan afinitas ikatan reseptor serta pengenalan daerah antigenik oleh antibodi sedangkan *reseptor binding site* adalah asam amino yang berikatan secara langsung dengan reseptor sel inang (Hulse *et al.*, 2004; Gambaryan *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006; Steven *et al.*, 2006). Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama dalam menimbulkan respon imun, sedangkan

protein HA2 akan membantu fusi membran dengan amplop virus pada inang bersama protein M2. Protein HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Nwe *et al.*, 2006; Suwarno, 2009). Protein HA merupakan protein penentu terjadinya infeksi virus (Suzuki and Nei, 2002)

Asam amino pada *cleavage site* protein HA digunakan untuk membedakan virulensi virus Influenza. Virus Influenza mempunyai asam amino Arginine (R) pada ujung karboksil HA1 dan asam amino Glycine (G) pada ujung amino HA2. Asam amino pada regio HA1 berperan sebagai antigenitas merupakan faktor pembeda antar sub tipe. Perbedaan sub tipe pada regio ini minimal sebesar 30%. Pada virus dengan patogenitas tinggi mempunyai sekuens *multiple basic amino acid residue* yang terletak di bagian *upstream* (ujung 5') dari hemaglutinin *cleavage site*, sedangkan virus dengan patogenitas rendah hanya memiliki asam amino dasar tunggal (Arginine/R) yang berefek pada terbatasnya pemecahan *haemaglutinin* (Horimoto and Kawaoka, 2001). Sekuen HA dengan *polybasic cleavage site* memungkinkan proses proteolitik oleh protease lain seperti furin yang terdapat di aparatus Golgi semua sel. Sub tipe AI dengan *polybasic cleavage site* mempunyai jaringan distribusi yang tidak terbatas dan menyebabkan infeksi sistemik yang fatal (Whittaker, 2001).

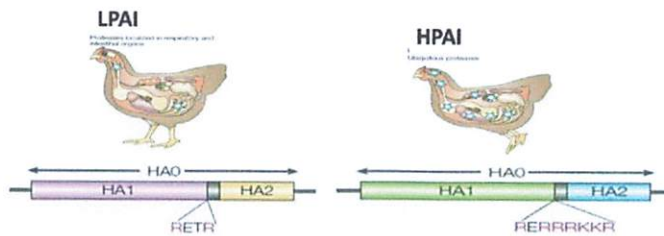
2.4 Patogenitas Virus AI sub tipe H5N1

Virus AI bersifat patogen intraseluler mempunyai mekanisme untuk menghindari respon imun dari inang sehingga virus dapat bertahan hidup dan bereplikasi dalam tubuh sel inang. Peningkatan kemampuan virus untuk menghindari

dari sistim imun inang secara langsung berkorelasi dengan peningkatan patogenitas virus. Virus AI mempunyai berbagai mekanisme untuk menghindar dari sistim imun bawaan dan respon imun perolehan (adaptif) dari sel inang (Coleman, 2007).

Patogenitas virus AI subtipe H5N1 secara molekuler dapat ditentukan berdasarkan pada sekuen asam amino daerah pemotongan (*cleavage site*) pada HA (Plotkin and Dushof, 2003; Hulse *et al.*, 2004; Horimoto and Kawaoka, 2005). Berdasarkan patogenitas virus AI dibedakan menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Di antara subtipe virus influenza A, subtipe H5, H7 dan H9 telah diketahui mempunyai patogenitas yang tinggi/*High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan sering menimbulkan penyakit serius pada ternak unggas (Asmara, 2006; Pattnaik *et al.*, 2006). Analisa molekuler menunjukkan adanya perbedaan susunan asam amino pada regio *cleavage site* gen *hemagglutinin* antara virus AI yang berpatogenitas tinggi (HPAI) dengan virus yang berpatogenitas rendah (LPAI). Pada HPAI ditemukan adanya regio *multiple basic amino acids* dengan dominasi Arginine (Arg/R) dan atau Lysine (Lys/K), sedangkan pada LPAI hanya mempunyai satu atau dua asam amino basa pada *cleavage site* (Horimoto and Kawaoka, 2005). Virus AI non-virulen atau *low pathogenic* mempunyai *monobasic cleavage site* (contoh: HA1-PSIQVR-GL-HA2), namun strain *highly pathogenic* mempunyai *polybasic cleavage site* (contoh: HA1-KKREKR-GL-HA2). *Cleavage site* bersifat spesifik dan spesifitas jenis protease membatasi distribusi jaringan yang dapat diinfeksi virus ini (Munch *et al.*, 2001).

Penelitian terhadap virus HPAI di Indonesia dan Vietnam memperlihatkan perbedaan susunan asam amino pada regio *cleavage site* dibandingkan virus dari negara lain. Virus H5N1 yang menginfeksi manusia mempunyai suatu konsensus PQRESRRKKR (CDC, 2007). dan sekuen yang khas pada virus strain patogenik yaitu PQRERRRKKR untuk virus-virus yang menginfeksi unggas (Smith *et al.*, 2006; Steven *et al.*, 2006).



Gambar 2.5. Perbedaan susunan asam amino pada *cleavage site* antara LPAI dan HPAI (Harimoto and Kawaoka, 2005).

2.5 Daerah Antigenik (*Antigenic site*)

Pada glikoprotein HA terdapat lima epitop daerah antigenik sebagai daerah target netralisasi antibodi (Smith *et al.*, 2004). Penentuan lima epitop (A sampai E) daerah antigenik berdasarkan pada struktur HA virus Influenza A sub tipe H3N2 penyebab pandemi flu di Hongkong tahun 1968. Daerah antigenik tersebut bersifat tidak linier, masing-masing epitop terbentuk pada struktur tersier molekul HA sehingga asam amino yang berjauhan akan bersama-sama membentuk satu epitop. Menurut Duvvuri *et al.*, 2009 virus H5N1 mempunyai lima epitop (A sampai E), dan daerah antigenik terletak pada asam amino dengan posisi 36, 48, 53, 115, 124, 126, 128, 136, 138, 140, 141, 152, 153, 182, 185, 189, 412 dan 446. Substitusi asam

amino pada daerah antigenik merupakan salah satu pendorong terjadinya evolusi pada gen *haemagglutinin* (Shih *et al.*, 2007). Perubahan pada epitop dapat terjadi secara terus menerus, pada jangka waktu dua sampai lima tahun biasanya perubahan terjadi pada satu epitop saja sehingga setiap dua sampai lima tahun terjadi dominasi perubahan pada epitop (Plotkin, 2002).

2.6 Karakteristik Virus AI subtipe H5N1

Karakteristik khusus dari virus AI adalah memiliki kemampuan untuk mutasi di dalam genom RNA. Kemampuan mutasi ini dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Pada faktor internal, enzim polimerase yang berperan dalam proses replikasi virus tidak dilengkapi dengan sistem *proofreading* menjadi faktor utama yang mendorong virus AI bermutasi. *Proofreading* merupakan kemampuan polimerase DNA untuk membaca rangkaian DNA dan memperbaiki kesalahan penyusunan bagian dari salinan untaian DNA. Pada virus AI jika terjadi kesalahan pembacaan susunan asam amino dalam rantai RNA, kesalahan tersebut tidak dapat terdeteksi sehingga akan mengakibatkan munculnya varian baru virus AI. Faktor internal lain yang berperan dalam proses mutasi yaitu proses multiplikasi virus AI yang terjadi dalam inti sel.

Proses mutasi AI secara umum dibedakan menjadi 2 yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. Respons imun yang timbul dalam tubuh baik oleh alam, maupun akibat program vaksinasi dapat menimbulkan tekanan pada fragmen HA maupun fragmen NA yang akan menyebabkan terjadinya *antigenic drift*. Adanya infeksi virus

Influenza A di alam maupun penggunaan vaksin Influenza diperlukan koreksi terhadap virus (*seed*) yang digunakan (Tamura and Kurata, 2004; Seo *et al.*, 2002; CDC, 2005). . Proses *Antigenic drift* terjadi secara perlahan dengan menghasilkan sedikit perubahan pada struktur antigen permukaan HA dan atau NA, sehingga dihasilkan virus strain baru (CDC, 2005). Determinan antigenik dari glikoprotein permukaan HA dan NA dipengaruhi oleh mekanisme yang dipicu oleh kekebalan (Fergusson *et al.*, 2003). Waktu yang diperlukan untuk proses mutasi ini relatif singkat, kira-kira 1 tahun. Perubahan terjadi secara dileksi, insersi atau substitusi, yaitu pergantian nukleotida pada satu atau beberapa asam amino yang disebabkan oleh perubahan lingkungan, perubahan inang, tekanan imunologis.

Mutasi *antigenic shift* terjadi karena suatu mekanisme yang menyebabkan perubahan struktur virus secara drastis yang diakibatkan oleh *genetic reassortment* pada saat dua atau lebih subtipe virus AI bercampur dalam satu inang membentuk subtipe. Proses *genetic reassortment* ini pula yang diduga menyebabkan virus mampu menembus *species barrier*. Proses mutasi ini dapat terjadi pada gen HA, NA atau gen lainnya sehingga mengakibatkan meningkatnya diversitas virus pada sifat antigenik maupun virulensinya. Proses ini membutuhkan waktu yang relatif lama, sekitar 8-10 tahun dengan efek yang ditimbulkan sangat berbahaya. (Hoffmann *et al.*, 2005; Harimoto and Kawaoka, 2005; Rantam dkk., 2007).

2.7 Klasifikasi Virus AI subtipe H5N1 di Indonesia

Virus AI subtipe H5N1 dari berbagai negara, secara *phylogenetic* terpisah menjadi 2 *clade*. *Clade* 1 adalah virus yang diisolasi dari unggas dan manusia di Kamboja, Thailand, Vietnam, Laos, Korea Selatan, dan Jepang tahun 2003-2004. *Clade* 2 terbagi menjadi 3 *subclade*. *Subclade* 1 adalah virus dari Indonesia tahun 2004-2006 dan isolat Hongkong tahun 2003. *Subclade* 2 adalah isolat virus dari Rusia, Turki, dan Timur Tengah tahun 2005-2006. *Subclade* 3 adalah isolat dari Laos, Thailand, Kamboja, dan Vietnam tahun 2005-2006 (WHO, 2005; Webster and Govorkova, 2006).

Menurut klasifikasi WHO/OIE/FAO, semua virus H5N1 yang diisolasi dari unggas dan manusia di Indonesia termasuk dalam *clade* 2.1. Virus H5N1 yang predominan ditemukan sejak tahun 2005 sampai saat ini berasal dari *clade* 2.1.3 (2.1.3.1, 2.1.3.2, dan 2.1.3.3). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi virus H5N1 *clade* 2.1 pada golongan ayam (*gallinaceous*) seperti ayam layer, ayam broiler, ayam kampung bersifat sangat pathogen, menyebabkan sakit perakut dan kematian dalam jumlah tinggi, sedangkan itik dan unggas air lainnya relatif lebih tahan terhadap infeksi virus-virus ini (Bingham *et al.*, 2009; Swayne, 2007; Wibawa *et al.*, 2012). Menurut Wibawa dkk. (2012), isolat virus H5N1 yang diisolasi dari itik muda di Jawa Tengah, Jogjakarta dan Jawa Timur merupakan *clade* baru di Indonesia dengan tingkat kekerabatan yang tinggi terhadap virus dari *clade* 2.3.2.1 (97-98%). Virus-virus dalam *clade* dan *subclade* terpisah mempunyai perbedaan struktur

antigenik, sehingga setiap *clade* atau *subclade* memerlukan vaksin yang berbeda (Smith *et al.*, 2006).

2.8 Vaksin Flu Burung

Vaksinasi terhadap penyakit flu burung bertujuan untuk: (i) perlindungan terhadap penyakit secara klinis, (ii) perlindungan terhadap virus yang virulen, (iii) perlindungan terhadap ekskresi virus. Perlindungan terhadap infeksi virus virulen masih kurang optimal, sehingga dapat menimbulkan masalah epidemiologik yang signifikan di daerah endemik yang sudah mendapat vaksinasi secara luas. Virus AI dalam *clade* dan *subclade* terpisah mempunyai perbedaan struktur antigenik sehingga setiap *clade* dan *subclade* memerlukan vaksin yang berbeda. Hasil penelitian pada feret menunjukkan bahwa vaksin terhadap satu *clade* tidak protektif terhadap *clade* yang lain (Webster and Govorkova, 2006).

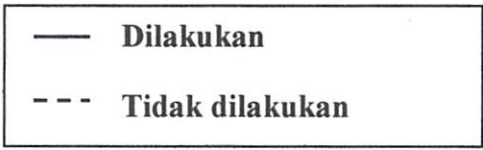
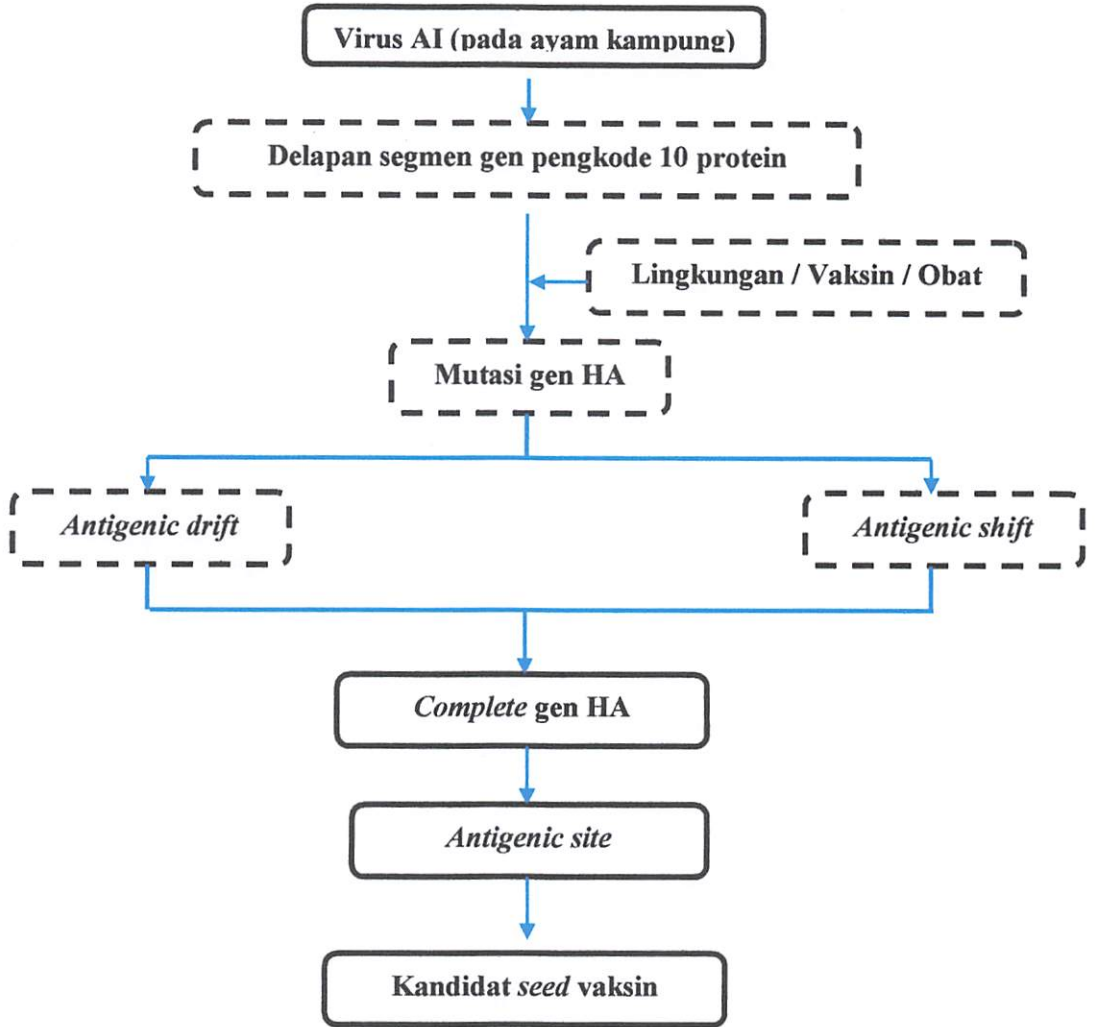
Vaksin yang terdaftar secara resmi di Indonesia tidak semuanya memberikan perlindungan yang memadai. Strain *seed* vaksin H5N1 yang akan digunakan harus secara antigenik dan genetik sesuai dengan virus lapang (strain homolog). *Seed* vaksin dari strain virus yang relevan secara epidemiologis dan antigen yang spesifik diperlukan agar dapat mencakup semua sektor produksi. Penanganan dan pelaksanaan vaksinasi yang tepat dengan vaksin yang berkualitas sebagaimana tercantum dalam petunjuk pemakaian dari produsen vaksin sangat penting agar diperoleh kekebalan yang optimal (OFFLU, 2010).



BAB 3

**KERANGKA KONSEPTUAL
DAN HIPOTESIS**

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

3.1 Penjelasan Kerangka Konseptual

Virus AI tipe A subtipe H5N1 adalah termasuk virus *single stranded* (ss)-RNA famili *Orthomyxoviridae*. Virus AI mempunyai panjang kurang lebih 13.588 nukleotida, yang tersusun dalam 8 segmen gen yang mengkode sekitar 10 jenis protein yaitu PB-2 (*Polymerase Basic-2*), PB-1 (*Polymerase Basic-1*), PA (*Polymerase acidic*), HA (*Haemagglutinin*), NP (*Nucleo Protein*), NA (*Neuraminidase*), M2 (*Matrix-2*), M1 (*Matrix-1*), NS2 (*Non Structural-2*), , NS1 (*Non Structural-1*).

Virus AI secara alami menyerang unggas terutama ayam kampung yang hidup secara bebas tidak dikandangkan, sehingga ayam-ayam ini sulit dikontrol terhadap penyebaran penyakit. Keadaan ini berpengaruh dalam upaya penanganan dan pencegahan kasus AI di lapangan karena kebanyakan ayam kampung tidak mendapatkan vaksinasi AI secara teratur sehingga rentan terhadap penularan virus H5N1 dan mudah tertular.

Virus AI selalu melakukan adaptasi terhadap respon imun maupun adaptasi terhadap inang dengan kondisi tertentu. Adaptasi merupakan kekuatan utama pada virus AI untuk berevolusi dengan melakukan mutasi. Faktor tekanan respon imun tubuh inang yang disebabkan oleh infeksi alam, vaksinasi atau penggunaan obat-obatan misalnya antibiotik yang secara langsung akan mempengaruhi proses imunitas oleh sel-sel imun dan turut memberikan tekanan pada virus AI khususnya pada gen eksternal HA yang akan menyebabkan terjadinya *antigenic drift*. Secara umum proses mutasi dapat dibedakan menjadi dua yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. Mutasi pada fragmen HA berakibat

pada perubahan genetik dan karakter fenotip. Analisis *phylogenic* dan homologi yang dibandingkan dengan data nukleotida ataupun asam amino di GenBank dapat melihat perubahan karakter atau keragaman genotip dengan melihat pada perubahan urutan nukleotida atau asam aminonya.

Analisis molekuler terhadap protein HA keseluruhan (*complete gen HA*) sangat diperlukan. Protein *haemagglutinin* (HA) merupakan faktor patogenitas virus AI. Protein ini berperan sebagai pengikat reseptor sel, fusi membran serta target utama netralisasi antibodi sel inang. Patogenitas virus AI sub tipe H5N1 secara molekuler dapat ditentukan berdasarkan pada sekuen asam amino regio *cleavage site* pada gen HA, disamping itu pada gen HA yang harus diperhatikan adalah daerah antigenik/*antigenic site*, dimana daerah antigenik berkaitan dengan pertahanan terhadap respon imun sel inang. Daerah antigenik adalah asam amino dimana sebagai target pengenalan dan netralisasi antibodi dari sel inang. Substitusi asam amino pada daerah *antigenic site* meningkatkan potensi terjadinya *antigenic drift*, karena berkaitan dengan mekanisme virus dalam menghindari respon imun dari inang dan antibodi yang terbentuk akibat vaksinasi. Substitusi asam amino yang berjauhan membentuk satu epitop pada daerah antigenik merupakan salah satu pendorong terjadinya evolusi pada gen *haemagglutinin*. Perubahan pada epitop dapat terjadi secara terus menerus, pada jangka waktu dua sampai lima tahun, biasanya perubahan terjadi pada satu epitop saja sehingga setiap dua sampai lima tahun perlu dilakukan koreksi terhadap virus (*seed*) yang digunakan. Vaksin AI yang selama ini beredar di pasaran masih belum memberikan perlindungan secara sempurna sehingga harus secara terus menerus dilakukan pengkajian.

Berdasarkan sifat virus AI yang mudah mengalami mutasi pada gen HA maka diperlukan koreksi dan pemilihan *seed* vaksin yang tepat dengan melihat urutan nukleotida dan asam amino terutama pada daerah antigenik/*antigenic site* pada gen HA. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi secara ilmiah tentang perkembangan genetik dan antigenik virus AI H5N1 yang dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk menentukan kandidat *seed* vaksin, sehingga dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan pemerintah dalam pengambilan kebijakan pada penentuan strain *seed* vaksin yang akan digunakan.



BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yaitu menganalisa nukleotida gen *haemagglutinin* (HA) pada virus avian influenza (H5N1) yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Jl. A. Yani 68-70 Surabaya. Penelitian dilakukan mulai dari tanggal 3 Agustus 2011 sampai April 2013.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel adalah isolat hasil usapan/swab yang menunjukkan reaksi positif dengan menggunakan uji reaksi cepat (*rapid test* antigen) dan organ dari ayam kampung yang mati dalam kondisi tersangka penyakit flu burung. Sampel-sampel tersebut memenuhi kriteria untuk diidentifikasi dengan menggunakan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) terhadap virus AI (H5N1).

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : *QIAamp Viral Mini Kit* (250) (Qiagen, Cat. 52906), *SuperScriptTM III One-Step RT-PCR*

Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, Cat. 12574-035), *1 kb DNA Ladder* (Biolabs, N3232L), *Agarose LE* (Roche, Cat. 11685678001), *Red Safe* (Intron, Cat. 21141), *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Cat. 28704), *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Cat. 4336915), *Big Dye Terminator v3.1 5X Cycle Sequencing Buffer* (Applied Biosystems, Cat. 4336697), *Big Dye X Terminator Purification Kit* (Applied Biosystems, Cat. 4376486), *DNase & RNase freewater* (MP Bio 821932), *Loading Dye Solution* (Fermentas 00020337).

4.4.2 Alat Penelitian

Alat yang dipakai pada penelitian ini meliputi : *Micropipet* (BioRad), *PCR Cabinet* (Esco), *BioSafety Cabinet* (Kojair), *Sentrifuge* (Hermle Z 233 MK-2), *Vortex* (Maxi Mix II Barnstead Thermolyne), *Spindown* (Hermle Z 100 M), *Thermocycler* (9700 Gene Amp, Applied Biosystems), *Gel Documentation/High Performance Ultraviolet Tranluminator* (UVP), *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.5 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel ayam kampung dilakukan di berbagai daerah yang terjadi wabah penyakit flu burung di daerah Kabupaten Lembata (Nusa Tenggara Timur), Kota Mataram (Nusa Tenggara Barat), Kota Situbondo (Jawa Timur) dan Kabupaten Sinjai (Sulawesi Selatan).

Virus AI didapatkan dengan melakukan usapan/swab pada bagian kloaka unggas atau organ (saluran pernafasan dan saluran pencernaan) dari ayam kampung yang mati kemudian dimasukkan dalam media transport yang telah dicampur dengan

antibiotik penisilin dan streptomisin dengan dosis 3.000 IU/ml. Selanjutnya usapan kloaka tersebut diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB) *Specific Antibody Negative* (SAN) produksi Pusvetma berumur antara 9-11 hari dan diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 2-5 hari. Satu sampel ditanam pada TAB sebanyak 3 butir dan diamati perkembangannya setiap hari dengan cara *candling* apabila terdapat TAB yang embrionya mati setelah hari ke 2 maka dimasukkan kedalam *refrigerator* dengan suhu 4°C. Pada hari ke 5 semua telur dimasukkan ke dalam *refrigerator*, semua cairan alantois dari TAB dipanen dan kemudian disimpan di dalam *refrigerator* 4°C.

4.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.6.1 Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA virus avian influenza dilakukan dengan menggunakan *QIAamp Viral Mini Kit* (WHO, 2007). Langkah ekstraksi adalah dengan memasukkan 560 µl *Buffer AVL (viral lysis buffer)* yang mengandung carrier RNA dengan perbandingan : volume *Buffer AVL* 0,56 ml + carrier RNA-AVE 5,6 µl. Kemudian dimasukkan 140 µl sampel dan *spin* selama 30 detik, ditambahkan 560 µl Ethanol absolut, divortex 15 detik, lalu *dispin down* 30 detik. Selanjutnya dimasukkan 630 µl ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Cairan pada bagian bawah, dibuang dan ditambahkan 500 µl *Buffer AW1 (washing buffer)* dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Kemudian dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 500 µl *Buffer AW2* disentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit dan dipindahkan ke tube 1,5

ml, kemudian ditambahkan 60 μ l *Buffer AVE*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.

4.6.2 Deteksi Virus AI sub tipe H5N1 dengan PCR

Deteksi terhadap virus Avian Influenza sub tipe H5N1 menggunakan primer spesifik sesuai Lisa, *et al.* 2006 sebagaimana terlihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Urutan Nukleotida Primer Spesifik Deteksi Virus AI Sub tipe H5N1.

Primer	Sekuen	Ukuran (bp)
Forward	5' ACTATGAAGAATTGAAACACCT 3'	456
Reverse	5' GCAATGAAATTCCATTACTCTC 3'	

Uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan dengan metode *One Step* PCR menggunakan *SuperScriptTM III One-Step RT-PCR Platinum[®] Taq High Fidelity* dari Invitrogen (Trani *et.al*,2006; Gall *et.al*, 2008). Pelaksanaan *One Step* PCR dilakukan dengan cara mencampurkan ke dalam tabung PCR bahan komponen *One Step* PCR yang terdiri dari *2X Reaction Mix* 12,5 μ l, template RNA (1 pg–1 μ g) 2 μ l, sense primer (10 μ M) 0,5 μ l, anti-sense primer (10 μ M) 0,5 μ l, *SuperScriptTM III RT/ Platinum[®] Taq High Fidelity Enzyme Mix* 1 μ l, lalu tambahkan *Rnase free water* sampai 25 μ l. Kemudian tabung PCR tersebut dimasukkan ke dalam mesin *Thermocycler* dengan siklus suhu di program dalam kondisi suhu 1) sintesis cDNA 50°C selama 30 Menit, 2) pre-denaturasi 94 °C selama 5 menit. 3) *denaturation* 94 °C selama 1 menit, *annealling* 50 °C selama 1 menit, dan *extention* 72 °C selama 1 menit, dimana no 3) dilakukan sebanyak 40 siklus. Suhu

untuk *final extention* adalah 72 °C selama 10 menit dengan hasil produk PCR 456 bp pada gel elektroforesis 1,2 % (Lisa FP. NG., et al. 2006).

4.6.3 PCR gen HA virus AI sub tipe H5N1

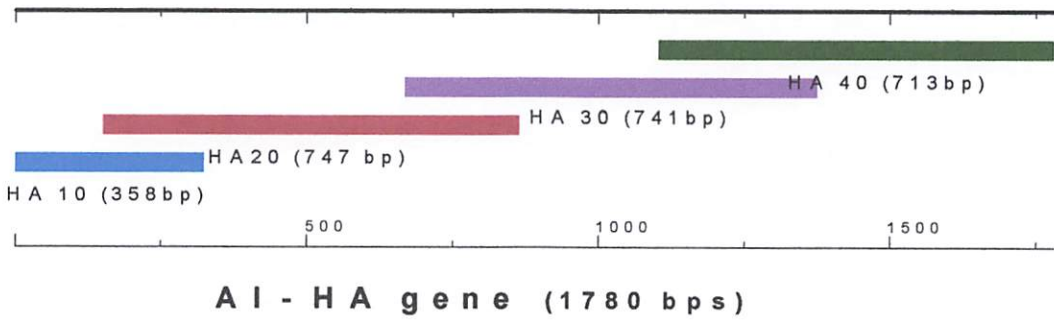
Pelaksanaan PCR terhadap gen HA virus avian influenza ini dilakukan dengan beberapa pasang primer yang mempertimbangkan kemampuan membaca panjang nukleotida oleh mesin sekuenser. Gen HA yang memiliki kurang lebih 1700 nukleotida, PCR gen HA menggunakan 4 pasang primer spesifik hasil desain dari *Australian Animal Health Laboratory (AAHL)* sebagaimana terlihat dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Urutan Nukleotida Primer Spesifik untuk PCR Gen HA (AAHL, 2010).

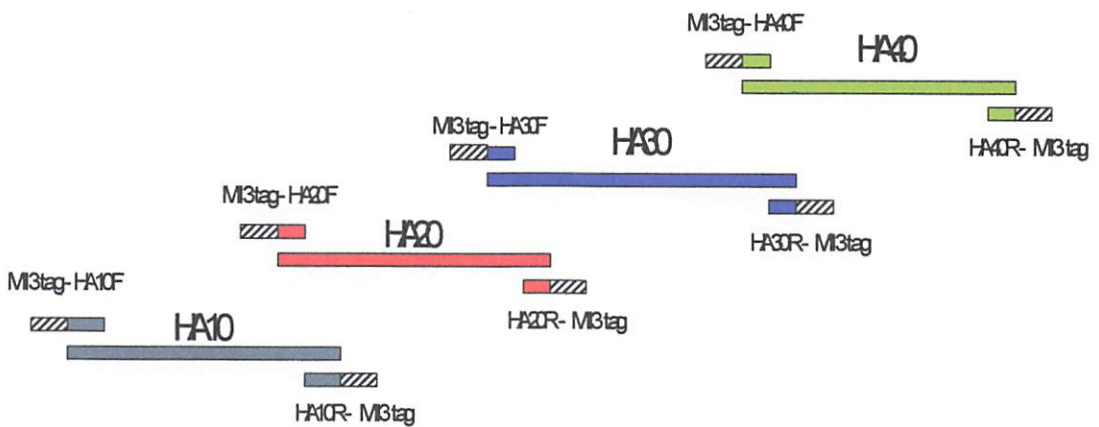
Primer	Sekuens	Ukuran (bp)
HA10F	5' GGCCAGTAGCAAAAAGCAGGGGT 3'	358
HA10R	5' CTTCTCCACTATGTAAGACCATTCCGGTACAT 3'	
HA20F	5' GTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTG 3'	747
HA20R	5' AATTGCTGAGTCCCCTTTCTTGACAATTTTGT 3'	
HA30F	5' CCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAA 3'	741
HA30R	5' CTTTTCCATGAGAACCAGAAGTTCAGCA 3'	
HA40F	5' GAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATG 3'	713
HA40R	5' CCAGTAGAAACAAGGGTGTT 3'	

Tabel 4.3. Urutan Nukleotida Primer untuk *Cycle Sequencing* (AAHL, 2010)

M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
M13R	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'



Gambar 4.1. Desain primer untuk amplifikasi/PCR gen HA virus AI subtype H5N1 (AAHL, 2010).



Gambar 4.2. Desain primer untuk cycle sequencing gen HA virus AI subtype H5N1 (AAHL, 2010).

Pelaksanaan *One Step* PCR untuk gen HA dilakukan dengan cara mencampurkan ke dalam tabung PCR bahan komponen *One Step* PCR yang terdiri dari *2X Reaction Mix* 12,5 μ l, template RNA (1 pg–1 μ g) 2 μ l, primer Forward (10 μ M) 0,5 μ l, primer Reverse (10 μ M) 0,5 μ l, *SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq High Fidelity Enzyme Mix* 1 μ l, lalu tambahkan *DNase & RNase freewater* sampai

25 μ l. Kemudian tabung PCR tersebut dimasukkan ke dalam mesin PCR *Thermocycler* dengan siklus suhu di program dalam kondisi suhu 1) sintesis cDNA 48°C selama 30 Menit, 2) pre-denaturasi 94 °C selama 2 menit. 3) *denaturation* 94 °C selama 30 detik, *annealling* 50 °C selama 40 detik, dan *extention* 68 °C selama 40 detik, dimana no 3) dilakukan sebanyak 40 siklus. Suhu untuk *final extention* adalah 68 °C selama 5 menit (FAO, 2010).

4.7 Elektroforesis

Sebanyak 5 μ l DNA hasil PCR ditambah dengan 2 μ l *Loading Dye Solution*, dimasukkan ke dalam well *Agarose LE* 1,2 % yang mengandung *Red Safe* 1mg/ml untuk proses *running*. Marker yang digunakan sebagai acuan adalah 1 kb *DNA ladder* dengan batas bawah 100 bp dan batas atas 1000 bp. Plat dijalankan dalam kondisi 100 V, 80 mA dalam waktu 30-45 menit. Kemudian gel hasil elektroforesis dibaca pada *Gel Documentation/Transluminator* dan didokumentasikan.

4.8 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan *QIAquick Gel Extraction Kit*, fragmen DNA dari gel agarose dipotong dengan menggunakan scalpel yang bersih dan tajam. Potongan gel kemudian dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml dan ditimbang dan selanjutnya ditambahkan 3x volume gel dengan *Buffer QG*. Tube berisi potongan gel dan buffer selanjutnya diinkubasi pada suhu 50 °C selama 10 menit pada *waterbath*. Setelah gel larut sempurna ditambah dengan isopropanol sebanyak 1x volume gel, kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam *QIAquick spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 17.900 rcf/g selama 1 menit. Cairan

pada bagian bawah kemudian dibuang dan selanjutnya ditambahkan 500 μ l *Buffer QG* ke dalam *QIAquick column* dan disentrifus dengan kecepatan 17.900 rcf/g selama 1 menit. Cairan pada bagian bawah kemudian dibuang dan selanjutnya ditambahkan 750 μ l *Buffer PE* ke dalam *QIAquick column* dan disentrifus dengan kecepatan 17.900 rcf/g selama 1 menit. Cairan pada bagian bawah kemudian dibuang dan disentrifus ulang dengan kecepatan 17.900 rcf/g selama 1 menit. *QIAquick column* dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml dan ditambahkan *Buffer EB* sebanyak 30 μ l dibiarkan dahulu selama 3 menit pada suhu ruang, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 17.900 rcf/g selama 1 menit.

4.9 Sekuensing

Sekuensing nukleotida merupakan teknik yang digunakan untuk menentukan urutan nukleotida secara langsung dari suatu fragmen DNA. Sekuensing nukleotida ini dilakukan melalui tiga tahap yaitu :

4.9.1 *Cycle Sequencing*

Pada tahap ini dilakukan *cycle sequencing* dengan memasukkan ke dalam tube PCR ukuran 0,2 ml *Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit* sebanyak 1,5 μ l, *5X Buffer cycle sequencing* 9 μ l, *DNase & RNase freewater* 6,5 μ l, *DNA pure* 2,5 μ l dan primer M13 F atau M13 R sebanyak 1 μ l sehingga jumlah volume menjadi 20 μ l. Tahapan selanjutnya tube tersebut dimasukkan ke dalam mesin *Thermocycler* dan mesin diprogram dalam keadaan suhu *initial denaturation* 96 °C selama 1 menit, lalu sebanyak 25 siklus pada 96 °C selama 10 detik, 50 °C selama 5 detik dan 60 °C

selama 4 menit. Pada tahapan ini dilakukan penambahan *Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing* yang berfungsi untuk pewarnaan pada produk sekuensing.

4.9.2 Purifikasi Hasil *Cycle Sequencing*

Purifikasi terhadap hasil *cycle sequencing* menggunakan *Big Dye X Terminator™ Purification Kit* yang mempunyai dua komponen reagen yaitu *X Terminator* yang berfungsi untuk menangkap *unincorporated dye terminator* yang ditambahkan pada saat dilakukan *cycle sequencing* dan *SAM™ Solution* berfungsi untuk meningkatkan performa reagen *Big Dye X Terminator* dan menstabilkan sampel setelah pemurnian sehingga hasil sekuensing berupa data *chromatopherogram* dan urutan nukleotida dapat terbaca dengan jelas. *BigDye X Terminator* dimix terlebih dahulu sampai homogen sebelum digunakan, kemudian sampel hasil *cycle sequencing* ditambah dengan *X Terminator* sebanyak 20 µl dan 90 µl *SAM Solution* dan dimix selama 30 menit, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 1000 rcf/g selama 3 menit.

4.9.3 Loading ke Mesin Sekuenser AB 3130 *Genetic Analyser*

Supernatan hasil purifikasi *cycle sequencing* diambil sebanyak 13 µl dimasukkan ke dalam sumuran plat khusus untuk mesin sekuenser. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan mesin sekuenser AB 3130 *Genetic Analyser 4* kapiler panjang 50 cm dengan kemampuan membaca panjang sekuens sampai 700 nukleotida dan hasil sekuensing berupa data *chromatopherogram*.

4.10 Pengolahan Data

Data hasil sekuensing berupa *chromatopherogram* dalam bentuk ABI file. Data diubah menjadi bentuk *fasta.file* (.txt) yang berisi susunan asam nukleat selanjutnya dilakukan uji *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) untuk memastikan bahwa sekuens tersebut sesuai dengan target gen H5 yang dianalisis. Hasil sekuensing diolah dengan menggunakan *software* DNA Star/ Lassergene 8 dan Mega 5 digunakan untuk *assembly* dan *editing* sekuen-sekuen gen HA untuk menggabungkan dan mendapatkan data hasil sekuensing nukleotida keseluruhan (*full length*).

4.11 Analisis Sekuen dan *Phylogenetic*

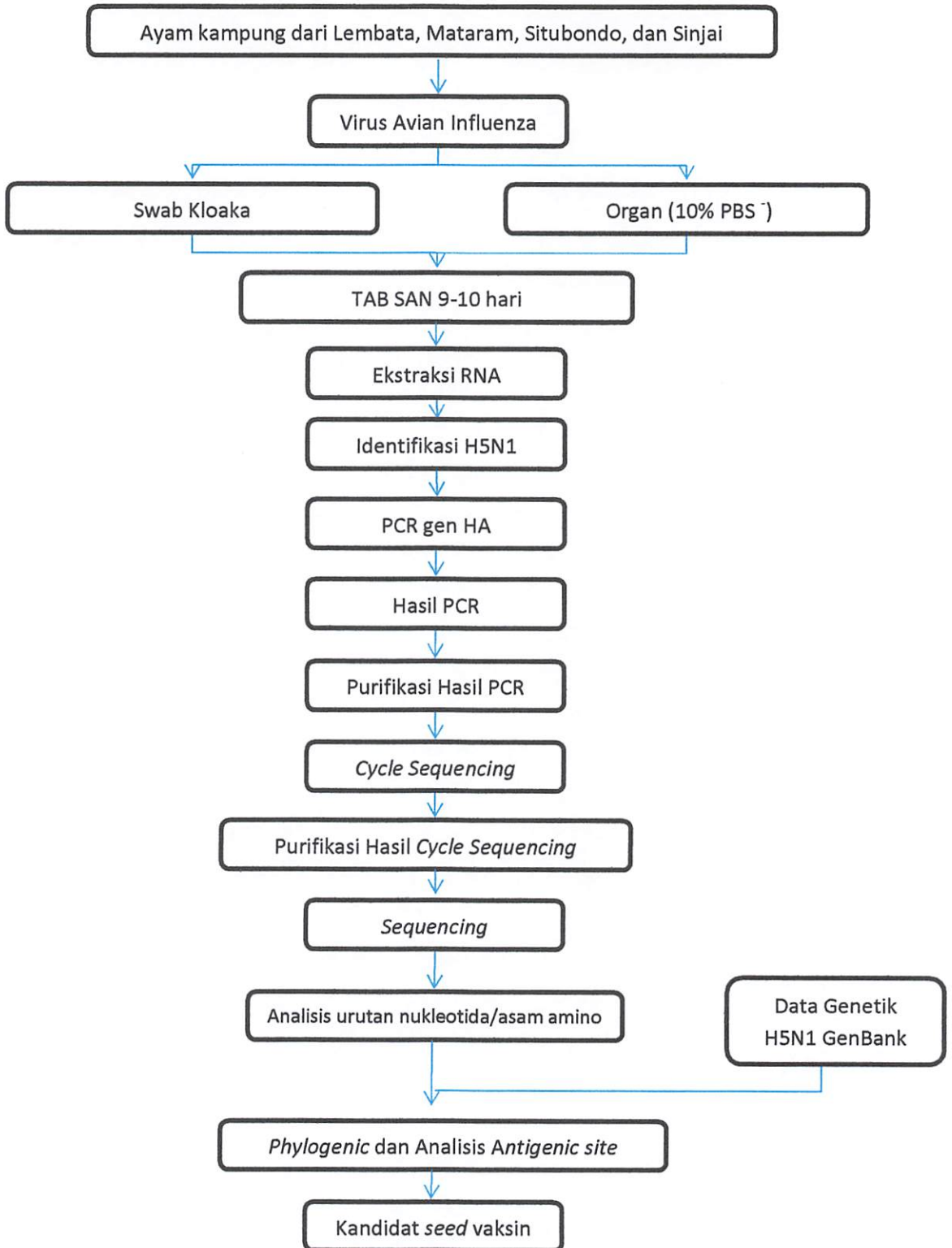
Data sekuen DNA hasil *assembly* yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis *multiple alignment* dengan *clustal W* diubah ke bentuk *mas.file*. Analisis data *mas.file* didapatkan nilai jarak genetik (*distance*), nilai homologi, jumlah perbedaan perubahan asam nukleat dan asam amino yang menyusun gen tersebut, substitusi asam nukleat dan asam amino serta gambaran pohon kekerabatan dilakukan dengan menggunakan program *software* Mega 5. Kalkulasi *distance matrix* digunakan model *p-distance* untuk mendapatkan nilai jarak genetik dan *no.of differences* untuk mendapatkan jumlah nukleotida dan asam amino yang mengalami perubahan. Konstruksi *phylogenic tree* dianalisis dengan metode *Neighbor-Joining* menggunakan model Kimura-2 parameter. Persentase replikasi pohon *phylogenic* yang membentuk *clade* di setiap percabangan diuji menggunakan tes *bootstrap* 1000 replikasi (Tamura *et al.*, 2011; WHO, 2008).

Data pembandingan diambil dari sekuen isolat Avian Influenza subtipe H5N1 yang sudah terdaftar di *National Center for Biotechnology Information* (ncbi/www.ncbi.nlm.gov) yang berada di GenBank.

4.12 Analisis Daerah Antigenik/*Antigenic site*

Berdasarkan susunan nukleotida dan asam amino selanjutnya dilakukan analisis asam amino pada daerah antigenik/*antigenic site* dengan menggunakan *software* Mega 5 untuk melihat keragaman asam aminonya.

4.13 Kerangka Operasional



HASIL PENELITIAN

BAB 5

BAB 5 HASIL PENELITIAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada sampel yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia menghasilkan hasil sebagai berikut :

5.1 Isolasi Virus

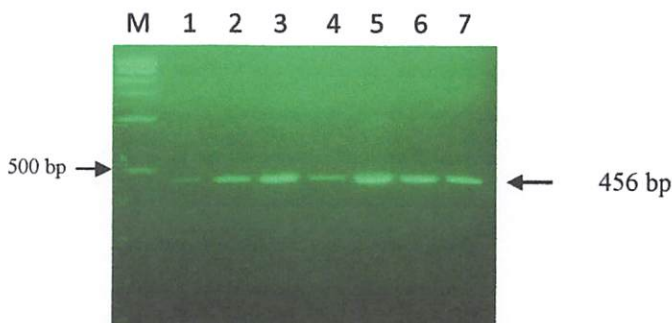
Sampel hasil usapan/swab yang menunjukkan reaksi positif dengan menggunakan uji reaksi cepat (*rapid test* antigen) dan organ dari ayam kampung yang mati dalam kondisi tersangka penyakit flu burung digunakan dalam proses isolasi virus AI. Pada penelitian ini dilakukan pengambilan sampel di berbagai daerah yaitu Kabupaten Lembata (Nusa Tenggara Timur), Kota Mataram (Nusa Tenggara Barat), Kota Situbondo (Jawa Timur) dan Kabupaten Sinjai (Sulawesi Selatan). Jumlah sampel yang diambil sebanyak 33 sampel swab dan 5 sampel organ.

Tabel 5.1. Hasil isolasi virus sampel di beberapa daerah di Indonesia

Daerah	Jumlah Sampel Swab	Jumlah Sampel Organ	Rapid Test Swab (+)	Rapid Test Swab (-)	Uji PCR	Hasil Uji PCR (+)	Sekuensing
Kab. Lembata (Nusa Tenggara Timur)	-	1	-		1	1	1
Kota Mataram (Nusa Tenggara Barat)	21	3	11	10	14	3	3
Kota Situbondo (Jawa Timur)	5	-	5	-	5	1	1
Kabupaten Sinjai (Sulawesi Selatan)	7	1	7	-	8	1	1
Jumlah	33	5	23	10	28	6	6

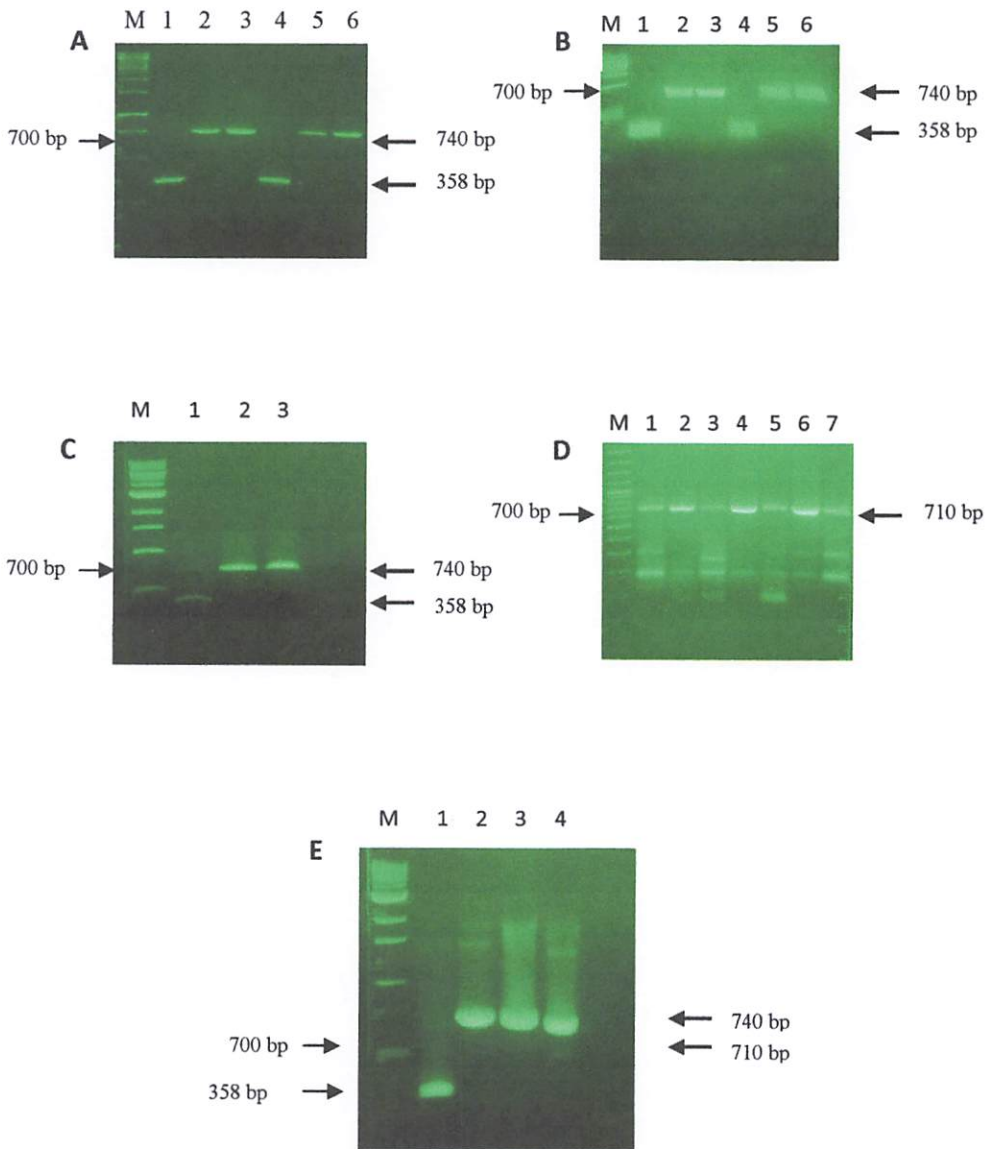
5.2. Analisis Hasil Uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Hasil seleksi sampel positif dengan uji reaksi cepat (*rapid test* antigen) pada swab sejumlah 23 sampel dan 5 sampel organ selanjutnya dilakukan proses ekstraksi RNA dan dilakukan uji identifikasi dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan primer spesifik H5N1. Hasil PCR terdapat 6 sampel positif dengan produk PCR 456 bp yang dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil elektroforesis DNA dengan primer spesifik gen HA virus H5N1, M) Marker, 1) Kontrol positif, 2) Lembata, 3) Mataram-O12, 4) Mataram O14, 5) Mataram O20, 6) Situbondo, 7) Sinjai.

Enam sampel positif yang telah diidentifikasi dengan uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) selanjutnya dilakukan karakterisasi molekuler terhadap komplet gen HA virus AI subtipe H5N1 menggunakan empat pasang primer HA10, HA20, HA30 dan HA40. Primer ini dirancang dengan fragmen bertumpuk (*overlap primer*) untuk mendapatkan panjang gen sebanyak 1700 bp. Hasil PCR dengan primer HA10 sebesar 358 bp, dengan primer HA20 dan HA30 sebesar 740 bp dan dengan primer HA40 sebesar 710 bp. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. A). Hasil elektroforesis DNA
 M). Marker 1000 bp, 1).Sinjai HA10, 2).Sinjai HA20, 3).Sinjai HA30, 4).Lembata HA10, 5). Lembata HA20, 6). Lembata HA30.
 B). Hasil elektroforesis DNA
 M). Marker 1000 bp, 1).Mataram O12 HA10, 2).MataramO12 HA20, 3).Mataram O12 HA30
 4). Mataram O14 HA10, 5).Mataram O14 HA20, 6).Mataram O14 HA30.
 C). Hasil elektroforesis DNA
 M). Marker 1000 bp, 1).Mataram O20 HA10, 2).Mataram O20 HA20, 3).Mataram O20 HA30.
 D). Hasil elektroforesis DNA dengan primer HA 40
 M).Marker 1000 bp, 1).Kontrol positif, 2).Mataram O12, 3).Mataram O14
 4). Mataram O20, 5). Lembata, 6).Situbondo, 7).Sinjai
 E). Hasil elektroforesis DNA
 M).Marker 1000 bp, 1).Situbondo HA10, 2).Situbondo HA20, 3).Situbondo HA30, 4).Situbondo HA40.

5.3. Sekuensing gen HA virus Avian Influenza

Sekuensing terhadap DNA sampel yang telah murni dilakukan dengan bantuan primer M13F dan M13R dengan tujuan untuk menjangkau seluruh panjang gen, dengan menggunakan mesin *Genetic Analyser* AB tipe 3130. Mesin sekuenser AB 3130 *Genetic Analyser* ini mempunyai 4 kapiler panjang 50 cm dengan kemampuan membaca panjang sekuens sampai 700 nukleotida. Hasil sekuensing berupa data *chromatopherogram* terlihat pada Lampiran 1-12. Urutan nukleotida komplet gen HA virus AI sub tipe H5N1 yang didapat selanjutnya dilakukan *assembly* dan *editing* dengan *software* DNASTAR/Lassergene 8 atau Mega 5 sehingga dihasilkan urutan nukleotida dengan panjang sekitar 1659 bp (Lampiran 13) yang mengkode 553 asam amino dapat dilihat pada Lampiran 14. Hasil analisis *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) di GenBank menunjukkan kesamaan sekitar 97-99 % (Lampiran 15) dan jarak genetik menggunakan *software* Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011, WHO, 2008) menunjukkan bahwa keenam isolat H5N1 pada ayam kampung ini memiliki tingkat homologi nukleotida sebesar 95,2 – 96,1 % dibandingkan dengan isolat pembanding (Tabel 5.3). Keenam isolat memiliki kesamaan genetik yang tinggi antar isolat, yaitu 95,1 - 100 % pada tingkat homologi asam amino, hal ini ditunjukkan pada Tabel 5.4.

5.4 Hasil Analisis Perbedaan dan Homologi Antar Isolat

Analisis homologi dan perbedaan pada nukleotida maupun asam amino antar isolat dilakukan pada hasil sekuensing komplet gen HA virus AI untuk melihat adanya mutasi di beberapa regio. Data pembanding yang digunakan

adalah A/chicken/Legok/2003 (GU052426.1) dan A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 (EU124148.1). Analisis homologi dan perbedaan pada nukleotida maupun asam amino terhadap gen pengkode HA antar isolat menggunakan *software* Mega 5. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 5.2, 5.3 dan 5.4.

Tabel 5.2 Hasil Analisis Perbedaan Jumlah Nukleotida dan Asam Amino Antar Isolat

Kode Isolat	A	B	C	D	E	F	G	H
A		26	21	21	21	23	21	22
B	50		28	26	25	28	26	27
C	76	74		4	4	6	4	5
D	81	76	24		2	2	0	1
E	71	67	12	14		4	2	3
F	82	79	27	7	17		2	2
G	79	76	24	4	14	3		1
H	81	78	26	6	16	5	2	

Keterangan :

 Hasil analisis perbedaan jumlah nukleotida antar isolat

 Hasil analisis perbedaan jumlah asam amino antar isolat
A : A/chicken/Legok/2003
B : A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006
C : A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013
D : A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012
E : A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011
F : A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011
G : A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011
H : A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011

Tabel 5.3 Hasil Analisis Perbedaan dan Homologi Nukleotida Antar Isolat (x100 %)

Kode Isolat	A	B	C	D	E	F	G	H
A		0,971	0,955	0,952*	0,958	0,952*	0,954	0,952*
B	0,029		0,957	0,955	0,961*	0,954	0,955	0,954
C	0,045	0,043		0,986	0,993	0,984	0,986	0,985
D	0,048	0,045	0,014		0,992	0,996	0,998	0,996
E	0,042	0,039	0,007	0,008		0,990	0,992	0,991
F	0,048	0,046	0,016	0,004	0,010		0,998	0,997
G	0,046	0,045	0,014	0,002	0,008	0,002		0,999
H	0,048	0,046	0,015	0,004	0,009	0,003	0,001	

Keterangan : 0,952* adalah homologi nukleotida terkecil dibandingkan dengan isolat pembanding
0,961* adalah homologi nukleotida terbesar dibandingkan dengan isolat pembanding

 Hasil analisis perbedaan nukleotida antar isolat

 Hasil analisis homologi nukleotida antar isolat

Tabel 5.4 Hasil Analisis Perbedaan dan Homologi Asam Amino Antar Isolat (x100%)

Kode Isolat	A	B	C	D	E	F	G	H
A		0,954	0,963	0,963	0,963	0,959	0,963	0,961
B	0,046		0,951*	0,954	0,956	0,951*	0,954	0,952
C	0,037	0,049		0,993	0,993	0,989	0,993	0,991
D	0,037	0,046	0,007		0,996	0,996	1*	0,998
E	0,037	0,044	0,007	0,004		0,993	0,996	0,995
F	0,041	0,049	0,011	0,004	0,007		0,996	0,996
G	0,037	0,046	0,007	0,000	0,004	0,004		0,998
H	0,039	0,048	0,009	0,002	0,005	0,004	0,002	

Keterangan : 0,951* adalah homologi asam amino terkecil antar isolat

1* adalah homologi asam amino terbesar antar isolat

- Hasil analisis perbedaan asam amino antar isolat
 □ Hasil analisis homologi asam amino antar isolat

5.5 Hasil Analisis Asam Amino pada Daerah Antigenik/*Antigenic Site*

Untuk mengetahui sifat antigenesitas maka dilakukan analisis antigenesitas di daerah antigenik menggunakan *software* Mega 5 dibandingkan dengan isolat virus AI yang digunakan sebagai *seed* vaksin di Indonesia yaitu A/chicken/Legok/2003 dan A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 serta nenek moyang isolat virus AI yaitu A/Goose/Guandong/1/1996.

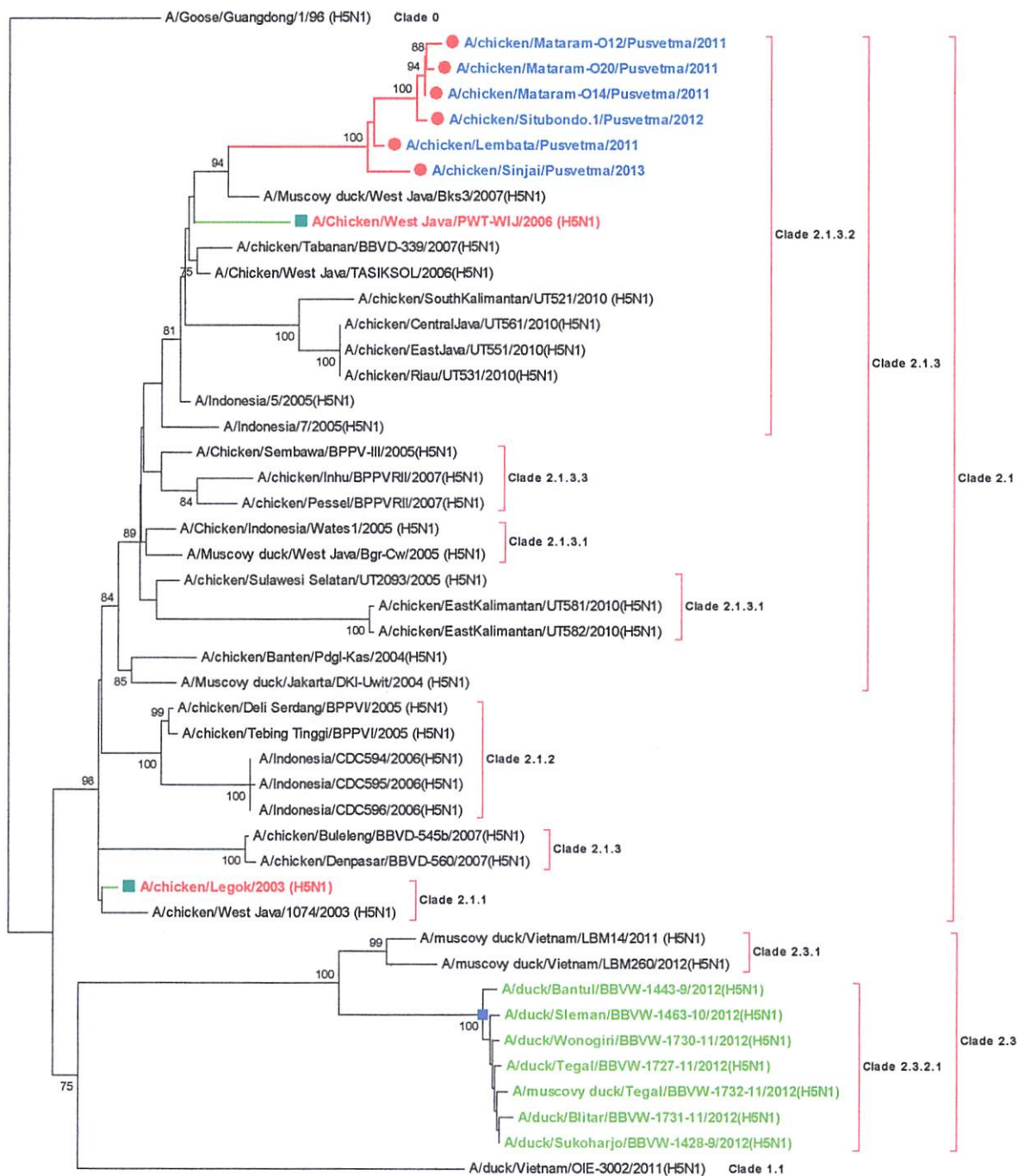
Tabel 5.5 Perbedaan Asam Amino pada Daerah Antigenik

Isolat	Posisi Asam Amino <i>Antigenic Site</i>									
	53	115	124	126	138	140	141	185	189	
A/Goose/Guandong/1/1996	R	Q	N	N	H	R	S	A	K	
A/chicken/Legok/2003	R	Q	D	E	Q	K	S	A	R	
A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006	R	R	D	E	L	S	P	E	R	
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	K	Q	D	E	L	S	P	A	M	
A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011	K	Q	D	E	L	S	P	A	M	
A/chicken/Mataram O14/Pusvetma/2011	K	Q	D	E	L	S	P	A	M	
A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011	K	Q	D	E	L	S	P	A	M	
A/chicken/Situbondo/Pusvetma/2012	K	Q	D	E	L	S	P	A	M	
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	K	Q	N	E	L	S	P	A	M	

Keterangan : R (Arginine), K (Lysine), Q (Glutamine), N (Asparagine), D (Aspartic acid), E (Glutamic acid), H (Histidine), L (Leucine), S (Serine), P (Proline), A (Alanine), M (Methionine).

5.6 Hasil Analisis *Phylogenic tree*

Pohon *phylogenetic* diroot-kan pada A/goose/ Guangdong/1/1996 (H5N1). Keenam isolat dari ayam kampung diberi warna biru, sedangkan isolat pembanding A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 sebagai *seed* vaksin yang beredar pada saat ini dan A/chicken/Legok/2003 yang dianggap sebagai virus AI pertama di Indonesia diberi warna merah. Ketujuh isolat dari itik diberi warna hijau merupakan isolat dengan *clade* baru di Indonesia yaitu 2.3.2.1, virus ini menyerang unggas air terutama itik muda (Gambar 5.3). Analisis *phylogenetic* dan keragaman genetik dengan menggunakan *software* Mega 5 menunjukkan bahwa rata-rata jarak pasangan nukleotida antar sesama isolat ayam kampung adalah 0.78 % yang berarti bahwa keenam isolat dari kasus ayam kampung ini masih berada dalam satu grup dalam *clade* 2.1.3.2.



Gambar 5.3. Hasil analisis *phylogenetic tree* Isolat Sinjai, Situbondo, Lembata, Mataram O12, Mataram O14 dan Mataram O20 dengan metode Neighbor-Joining model Kimura-2 parameter.

PEMBAHASAN

BAB 6

BAB 6 PEMBAHASAN

Virus AI yang beredar pada saat ini dikhawatirkan lebih berbahaya dibandingkan dengan sebelumnya, karena karakter dasar virus AI yang mudah mengalami mutasi. Berdasarkan sifat virus AI tersebut maka perlu dilakukan pemilihan *seed* vaksin yang akan digunakan mempunyai homologi genetik dan antigenik dengan virus lapang sehingga penelitian terhadap pemilihan *seed* vaksin sangat diperlukan.

Sebanyak 33 sampel swab yang diduga positif terhadap virus AI subtipe H5N1 menunjukkan reaksi positif dengan uji reaksi cepat (*rapid test* antigen) dan hanya 1 sampel positif dengan uji identifikasi dengan RT-PCR menggunakan primer gen HA virus AI subtipe H5N1. Hal ini kemungkinan disebabkan karena uji reaksi cepat (*rapid test* antigen) yang digunakan hanya sebagai *screening test* terhadap Influenza A dimana tidak spesifik untuk virus AI subtipe H5N1. Sedangkan pada 5 sampel organ dari ayam kampung yang mati dalam kondisi tersangka penyakit flu burung semua sampel menunjukkan hasil positif dengan uji identifikasi dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik virus AI subtipe H5N1. Produk PCR pada uji identifikasi ini sebesar 456 bp dan hasil elektroforesis DNA dapat dilihat pada Gambar 5.1 sesuai dengan Lisa, *et al.* 2006. Sementara hasil uji karakterisasi molekuler terhadap komplet (*whole*) gen HA virus AI subtipe H5N1 dengan uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan primer HA10, HA20, HA30 dan HA40 yang dirancang dengan fragmen bertumpuk (*overlap primer*) untuk mendapatkan panjang gen sekitar 1700 bp sehingga dapat tercakup seluruh daerah komplet gen

HA. Primer yang digunakan hasil rancangan *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL). Amplifikasi DNA dengan primer HA10 didapatkan produk PCR sebesar 358 bp, dengan primer HA20 didapatkan produk PCR sebesar 740 bp, dengan primer HA30 didapatkan produk PCR sebesar 740 bp dan dengan primer HA40 didapatkan produk PCR sebesar 710 bp yang dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Hasil sekuen DNA komplet gen HA dari keenam isolat menunjukkan bahwa ORF (*Open Reading Frame*) adalah 1659 bp yang mengkode 553 asam amino. Sementara hasil analisis *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) di GenBank menunjukkan bahwa keenam isolat tersebut adalah H5N1 dengan presentase kesamaan dengan isolat yang berada di GenBank sebesar 97 - 99 % terlihat pada Lampiran 15 dan jarak genetik menggunakan *software* Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) menunjukkan bahwa keenam isolat H5N1 pada ayam kampung ini memiliki tingkat homologi nukleotida sebesar 95,2 – 96,1 % dibandingkan dengan isolat pembandingan (Tabel 5.3) dan rata-rata jarak pasangan nukleotida antar sesama isolat adalah 0,78 % yang berarti bahwa keenam isolat dari kasus ayam kampung ini masih berada dalam satu grup *clade* 2.1.3.2. Menurut WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (WHO,2008; WHO, 2012) ketentuan klasifikasi H5N1 *clade* adalah : 1) Digolongkan sebuah *clade* baru jika memiliki rata-rata persentase jarak pasangan nukleotida antar spesies (*average pairwise distance*) lebih dari 1.5% dari *clade* yang telah ada dan terdefinisi sebelumnya, 2) Hasil analisis *phylogenetic* dan keragaman HA sequence menunjukkan sharing *common ancestral node* dengan nilai *bootstrap* > 60% (1000 *Neighbour-Joining bootstrap replicates*). Keenam isolat memiliki

kesamaan genetik yang tinggi antar isolat, yaitu 95,1 - 100 % pada tingkat homologi asam amino, hal ini ditunjukkan pada Tabel 5.4.

Hasil analisis sekuen DNA pada kompelet gen HA menunjukkan adanya dari heterogenitas nukleotida dan asam aminonya yang dibandingkan dengan A/chicken/Legok/2003 yang dianggap virus AI pertama di Indonesia dan A/chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 merupakan isolat yang digunakan sebagai *master seed* vaksin sesuai dengan Surat Edaran Menteri Pertanian Republik Indonesia No. 3345/kpts/LB450/7/2011 tentang Ketentuan Peredaran Vaksin Avian Influenza (AI) di Indonesia pada tanggal 13 Juli 2011. Adapun perbedaan jumlah nukleotida dan asam amino dapat dilihat pada Tabel 5.2, pada tabel ini terlihat perbedaan jumlah nukletida terbesar sebanyak 82 bp pada isolat A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 dengan A/chicken/ Legok /2003 sedangkan perbedaan jumlah asam amino sebanyak 23, sedangkan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 berbeda sebanyak 79 bp, jumlah asam amino yang berbeda sebanyak 28. Perbedaan jumlah nukleotida terkecil terdapat pada A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 dengan A/chicken/Legok/2003 dengan sebanyak 71 bp, dan perbedaan asam amino sebanyak 21, sedangkan A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 mempunyai perbedaan jumlah nukleotida sebanyak 67 bp, dan perbedan asam amino sebanyak 25.

Prosentase perbedaan nukletida terbesar terjadi antara A/chicken/Legok/2003 dengan A/chicken/Situbondo/Pusvetma/2012, A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 dan A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011 sebesar 4.8 %, sedangkan perbedaan terkecil dengan

A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 sebesar 4,2 %. Sedangkan perbedaan terbesar antara isolat A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 yang digunakan oleh pemerintah Indonesia sebagai *seed* vaksin AI terlihat dengan isolat A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 dan A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011 sebesar yaitu 4,6 %, sedangkan perbedaan terkecil dengan A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 sebesar 3,9 % (Tabel 5.3).

Hasil analisis homologi nukleotida antar isolat dapat dilihat pada Tabel 5.3, menunjukkan homologi terkecil antara A/chicken/Legok/2003 dengan A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 dan A/chicken/Situbondo/ Pusvetma/2012 sebesar 95,2 %, sedangkan homologi nukleotida terbesar dengan A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 sebesar 95,8 %. Homologi nukleotida terkecil antara A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 terjadi dengan A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011 sebesar 95,4 % dan A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 sebesar 95,4 %, dan homologi terbesar dengan A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 sebesar 96,1 %.

Hasil analisis perbedaan asam amino dapat dilihat pada Tabel 5.4. Perbedaan terbesar terdapat pada isolat A/chicken/Legok/2003 dengan A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 sebesar 4,1 %. Perbedaan terbesar antara A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 dengan A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 dan A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013 sebesar 4,9 %, dan perbedaan asam amino terkecil dengan A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 sebesar 4,4 %. Hasil analisis homologi asam amino antar isolat terbesar terdapat pada A/chicken/Legok/2003 dengan A/chicken/Mataram O14/Pusvetma/2011,

A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011, A/chicken/Situbondo/Pusvetma/2012, dan isolat A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013 sebesar 96,3 %, dan homologi terkecil dengan A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 sebesar 95,9 %. Analisis homologi asam amino antara A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 dengan A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011 mempunyai homologi asam amino terbesar yaitu 95,6 %, sedangkan antara A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 dengan A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011 dan A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013 mempunyai homologi terkecil sebesar 95,1 %. Sedangkan homologi asam amino terbesar antar isolat sebesar 100% terdapat antara A/chicken/Situbondo/Pusvetma/2012 dengan A/chicken/Mataram O14/Pusvetma/2011.

Perbedaan nukleotida dan asam amino di atas disebabkan oleh terjadinya perubahan-perubahan pada nukleotida dan menyebabkan terjadinya substistusi sinonim maupun substitusi nonsinonim. Pada substistusi sinonim terjadi perubahan nukleotida tidak diikuti perubahan ekspresi asam amino, substistusi ini menyebabkan kodon bias sehingga tidak mengubah fenotip produk ekspresi asam amino (Wu and Freeland, 2005), sedangkan substitusi nonsinonim adalah perubahan nukleotida yang diikuti perubahan ekspresi asam amino. Substitusi nonsinonim ini hanya terjadi pada bagian tertentu dari gen yang mengalami tekanan, semakin besar tekanan yang dialami oleh gen maka akan semakin tinggi tingkat substitusinya. Adanya tekanan seleksi yang tinggi akan menyebabkan varian dengan afektifitas yang tinggi (Plotkin and Dushoff, 2003). Adaptasi terhadap tekanan akibat pengaruh lingkungan maupun imun dari hospes dilakukan oleh virus AI untuk menghindar dari netralisasi antibodi dan sel T sititoksik.

Antibodi netralisasi terhadap protein HA bersifat protektif melawan infeksi, sehingga protein ini paling tinggi mengalami tekanan imun dibandingkan protein internal (Berkhoff *et al*, 2005). Mekanisme virus AI untuk menghindari dari tekanan akibat pengaruh lingkungan maupun imun dari hospes merupakan tekanan untuk mutasi secara gradual sehingga muncul strain-strain baru yang secara imunologik berbeda sehingga menyebabkan *antigenic drift* (Smith *et al*, 2004).

Hasil analisis asam amino pada daerah antigenik menunjukkan beberapa perubahan asam amino antara A/Chicken/West Java/PWT-WLJ/2006 dengan keenam isolat sampel penelitian, hal ini terlihat pada Tabel 5.6, dimana terjadi perubahan asam amino 53R → K (Arginine menjadi Lysine), 115R → Q (Arginine menjadi Glutamine), 124 D → N (Aspartic acid menjadi Asparagine) perubahan pada posisi asam amino 124 ini hanya terjadi pada daerah antigenik pada isolat A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013. Perubahan asam amino juga terjadi pada posisi 185E → A (Glutamic acid menjadi Alanine) dan 189R → M (Arginine menjadi Methionine). Variasi antigenik akibat adanya mutasi disebabkan karena adanya kumpulan perubahan pada RNA virus. Perubahan asam amino (substitusi asam amino) pada daerah antigenik merupakan salah satu pendorong terjadinya evolusi pada gen *haemagglutinin*, hal ini sesuai dengan pendapat Shih *et al.*, 2007. Menurut pendapat Plotkin and Dushoff t, 2003; Smith *et al.*, 2004 dan Campitelli *et al.*, 2006 bahwa perubahan asam amino yang terjadi pada daerah antigenik tersebut merupakan seleksi positif, seleksi ini disebabkan oleh tekanan seleksi untuk menghindari dari respon imun hospes, termasuk menghindari dari pengenalan antibodi akibat vaksinasi. Pada hasil penelitian ini,

perubahan asam amino yang terjadi kemungkinan akibat dari pengaruh lingkungan, bukan pengaruh dari vaksinasi karena sampel yang diambil berasal dari ayam kampung yang tidak pernah dilakukan vaksinasi.

Vaksinasi dan adaptasi virus ke sel hospes merupakan salah satu penyebab peningkatan *antigenic drift*. Pada posisi asam amino 138 dan 140 tidak mengalami perubahan apabila dibandingkan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 yang digunakan sebagai *seed* vaksin sehingga sifat antigenesitas virus tidak berubah. Posisi asam amino 138 dan 140 sangat berpengaruh dalam spesifisitas karbohidrat molekul gen HA sehingga mempengaruhi sifat antigenesitas virus, hal ini sesuai dengan pendapat Duvvuri *et al.*, 2009.

Untuk mengetahui asal virus dan klasifikasi virus (*clade* dan *subclade*), serta untuk mengetahui hubungan kekerabatan dengan virus lain dengan subtype yang sama maka dilakukan analisis *phylogenetic*. Virus Avian Influenza (VAI) subtype H5N1 dari berbagai negara, secara *phylogenetic* terpisah menjadi 2 *clade*. *Clade* 1 adalah virus yang diisolasi pada unggas dan manusia di Kamboja, Thailand, Vietnam, Laos, Korea Selatan, dan Jepang tahun 2003-2004. *Clade* 2 terbagi menjadi 3 *subclade*. *Subclade* 1 adalah virus dari Indonesia tahun 2004-2006 dan isolat Hongkong tahun 2003. *Subclade* 2 adalah isolat virus dari Rusia, Turki, dan Timur Tengah tahun 2005-2006. *Subclade* 3 adalah isolat dari Laos, Thailand, Kamboja, dan Vietnam tahun 2005-2006 (WHO, 2005; Webster and Govorkova, 2006). Menurut klasifikasi WHO/OIE/FAO, semua virus H5N1 yang diisolasi dari unggas dan manusia di Indonesia termasuk dalam *clade* 2.1. Pohon *phylogenetic* diroot-kan pada A/goose/ Guangdong/1/1996 (H5N1) terlihat pada Gambar 5.7. Hasil analisis *phylogenetic* dan keragaman genetik dengan

menggunakan *software* Mega 5 menunjukkan bahwa pada *phylogenetic tree* dari gen HA isolat A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O14/Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011, A/chicken/Situbondo/Pusvetma/2012 dan A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013 termasuk dalam *clade* 2.1.3.2 dimana mempunyai kedekatan kekerabatan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 sebagai *seed* vaksin yang beredar pada saat ini sesuai dengan peraturan pemerintah. Sedangkan dengan A/chicken/Legok/2003 yang termasuk dalam *clade* 2.1.1 terlihat jauh perbedaan kekerabatannya, hal ini menunjukkan bahwa keenam isolat tersebut mempunyai kemiripan sifat molekuler dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 sehingga dapat digunakan sebagai kandidat *seed* vaksin berdasarkan karakterisasi molekuler yang telah dilakukan. Menurut Webster and Govorkova, 2006 menyebutkan bahwa virus AI dalam *clade* maupun *subclade* yang berbeda mempunyai perbedaan pada struktur antigenik, sehingga setiap *clade* atau *subclade* memerlukan vaksin yang berbeda. Berdasarkan lokasi penyebarannya virus AI di Indonesia dimasukkan ke dalam 3 grup yaitu grup A, B dan C. Grup A mewakili virus yang ada di Jawa, Nusa Tenggara dan Sulawesi. Grup B mewakili virus Jawa, Bali, Flores dan Nusa Tenggara. Grup C mewakili virus dari Jawa, Sumatera dan Bangka. Keenam isolat penelitian tersebut termasuk dalam grup A. Penyebaran virus ini kemungkinan karena pola transportasi unggas pembawa virus yang tanpa kontrol.

The background of the page is a repeating pattern of a golden Garuda emblem. The Garuda is a mythical bird-like creature with a human face, wings, and a tail, standing on a circular base. The pattern is arranged in a grid across the entire page.

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisa data di atas maka dapat diambil kesimpulan dan saran sebagai berikut :

1. Heterogenitas asam amino terlihat dengan adanya beberapa perbedaan pada asam amino antar isolat yaitu sebesar 0 - 4,9 % dan homologi sebesar 95,1 - 100%.
2. Variasi genetik ditemukan pada daerah antigenik dengan adanya beberapa substitusi asam amino pada posisi 53 (R53K), 115 (R115Q), 124 (D124N), 185 (E185A) dan 189 (R189M). Pada posisi asam amino 138 dan 140 tidak mengalami perubahan apabila dibandingkan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 yang digunakan sebagai *seed* vaksin sehingga sifat antigenesitas keenam isolat virus tidak berubah.
3. Hasil analisis terhadap pohon *phylogenic* menunjukkan bahwa keenam isolat mempunyai hubungan kekerabatan dengan virus lain di Indonesia dan rata-rata jarak pasangan nukleotida antar sesama isolat adalah 0,78 % yang berarti bahwa keenam isolat dari kasus ayam kampung ini masih berada dalam satu grup *clade* 2.1.3.2. Keenam isolat yaitu A/chicken/Lembata/ Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O12/Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O14/Pusvetma/2011, A/chicken/Mataram O20/Pusvetma/2011, A/chicken/Situbondo/ Pusvetma/2012 dan A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013 mempunyai kedekatan kekerabatan dengan A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006

sebagai *seed* vaksin yang beredar pada saat ini sehingga keenam isolat tersebut dapat digunakan sebagai kandidat *seed* vaksin berdasarkan karakterisasi molekuler yang telah dilakukan.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian kesimpulan diatas maka saran yang dapat diberikan adalah :

1. Perlu dilakukan uji reaktivitas terhadap keenam isolat tersebut untuk menentukan kelayakan sebagai kandidat *seed* vaksin, seperti ujiantang (*challenge test*) untuk mengetahui proteksinya terhadap isolat virus lapangan.
2. Secara terus menerus perlu dilakukan evaluasi terhadap *seed* vaksin yang digunakan pada produksi vaksin yang beredar di Indonesia.
3. Peningkatan upaya pencegahan penyebaran virus AI di Indonesia dengan adanya penyuluhan-penyuluhan terhadap masyarakat dan monitoring terhadap transportasi unggas.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J., 2007. Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, Africa, and Australia 2002–2006, *Avian Diseases* 51:161–166
- Asmara, W. 2006. Diversitas Genetik dan Potensi Penularan Virus Avian Influenza ke Manusia. *Makalah yang disampaikan dalam Seminar Ilmiah Avian Influenza : A Global New Life Threatening Disease tanggal 18 Juni 2006*. BEM FK UGM.
- Bateman, A.C., M.G. Bussch, I. Alexander, N. Bovin and C.W. Olsen. 2008. Amino acid 226 in Hemagglutinin H5N1 Influenza Virus Determines Binding Affinity for 2,6 Linked Sialic acid and infectivity level in Primary Swine and Human Respiratory Epithelial Cells. *Journal of Virology* August 2008 Vol 82 No. 16.
- Berkoff, E.G.M., E. Wit, M.M. Geelhoed-Mieras, A.C.M. Boon, J. Symons, R.A.M. Faouchier, A.D.M.E. Osterhaus and G.F. Rimmelzwaan. 2005. Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol* 79: 11239-11246.
- Bingham, J., D. J. Green, S. Lowther, J. Klippel, S. Burggraaf, D. E. Anderson, H. Wibawa, , D. M. Hoa, N. T. Long, , P. P. Vu, D. J. Middleton and P. W. Daniels. 2009. Infection studies with two highly pathogenic avian influenza strains (Vietnamese and Indonesian) in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*), with particular reference to clinical disease, tissue tropism and viral shedding. *Avian Pathol* 38(4): 267-278.
- Brown, E.G., H.Liu, L.C. Kit, S. Baird and M. Nesrallah. 2001. Patern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung, identification of functional themes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6883-6888.
- Campitelli, L., M. Ciccozzi, , M. Salemi, F. Taglia, S. Boros., I. Donatelli and G. Rezza. 2006. H5N1 Influenza virus evolution : a comparison of different epidecs in birds and humans (1997-2004). *J Gen Virol.* 87 : 955-960.
- Capua, I., J. Dennis and Alexander. 2009. Ecology, Epidemiology and Human Health Implication of Avian Influenza Virus Infection. *Virus Infuenza and Newcastle Disease. A field and laboratory Manual*.
- Cardona, C.J., Z. Xing, C.E.Sandroek, and C.E. Davis. 2009. Avian influenza in birds and mammals, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 : 255–273
- CDC. Control Disease Centers. 2007. Avian Influenza Infection in Humans. <http://www.cdc.gov>(30 Mei 2007)

- CDC. Control Disease Centers. 2005. Influenza Viruses. <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses.htm>.
- Coleman, JR., 2007. The PB1-F2 protein of Influenza A Virus : increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology* 4 : 1-5.
- Croos, K.J., S.A. Wharton, J.J. Shekel, Wiley D.C and D.A. Steinhaur. 2001. Studies on influenza haemagglutinin fusion peptide mutants generated by Reverse genetics. *EMBO J.* 20: 4432-4442.
- CuiLin, X., D. LiBo, X. Li, , L. Yu, C. YongKun, , Y. LiMei, and S. YueLong. 2009. Human avian influenza A (H5N1) virus infection in China
- Dharmayanti, N.L.P.I., R. Indriani, R. Damayanti dan A.Wiyono. 2005. Isolasi dan identifikasi wabah *avian influenza* pada bulan Oktober 2004–Maret 2005 diIndonesia. *J.Biol. Indones.* 3: 341-350.
- Driskell, E.A., C.A. Jones, D.E. Stallknecht, , E.W. Howerth, and S.M. Tompkins. 2010. Avian influenza virus isolates from wild birds replicate and cause disease in a mouse model of infection, *Virology* 399 : 280–289
- Duvvuri, V.R.S.K., B. Duvvuri, R.C. Wilfred, E.W. Gillian, and W. Jianhong. 2009. Role of Positive Selection Pressure on the Evolution of H5N1 Hemagglutinin. *Genomics Proteomics Bioinformatics* Vol. 7 No. 1–2.
- Ferguson, N.M., A.P. Galvani, and R.M. Bush. 2003. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422: 428-433.[http:// amedeo.com/lit.php?id=12660783](http://amedeo.com/lit.php?id=12660783)
- Gall, A., B. Hoffmann, T. Harder, C. Grund and M. Beer. 2008. Universal Primer Set for Amplification and Sequencing of HA0 Cleavage Sites of All Influenza A Viruses , *Journal of Clinical Microbiology*.
- Gambaryan, A., A. Tuzikov, G. Pazynina, N. Bovin, A. Balish, A. Klimov. 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) Viruses. *Virology* 344: 432-438.
- Gambaryan, A., S. Yamnikova, D. Lvov, A. Tuzikov, A. Chinarev, G. Pazynina, R. Webster, M. Matrosovich, and N. Bovin. 2005. Reseptor Specificity of Influenza Viruses from Birds and Mammals : New Data on Involvement of The Inner Fragments of Carbohydrat Chain. *Virology* 334: 276-283.
- Ghedin, E., A. Naomi, Sengamalay, M. Shumway, J. Zaborsky, T. Feldblyum, V.Subbu, D.J. Spiro, J. Sitz, H. Koo, P. Bolotov, D. Dernovoy, T. Tatusova, B. Yiming, K.S. George, J. Taylor, D.J. Lipman, C.M.

- Fraser, J.K. Taubenberger and S.L. Salzberg. 2005. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 437: 1162-1166
- Gutiérrez, R.A., M.J. Naughtin, S.V. Horm, S. San and P. Buchy. 2009. A(H5N1) Virus Evolution in South East Asia. *Viruses*, 1, 335-361; doi:10.3390/v1030335. ISSN 1999-4915 www.mdpi.com/journal/viruses
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Ha Ya, J.D. Stevens, J.J. Skehel and D.C. Wiley. 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. The National Academy of Sciences.
- Hayden, F., A. Croisier. 2005. Transmission of avian influenza viruses to and between humans. *J.Infect Dis.*;192: 1311-4.
- Hoffmann, E., AS. Lipatov, R.J. Webby, AE. Govorkova and RG. Webster. 2005. Role of Specific Hemagglutinin amino acids in the Immunogenicity and Protection of H5N1 influenza virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 12915-12920.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2005. Influenza : Lessons from Past Pandemics, Warnings from Current Incidents. *Nature Rev* 3: 591-598
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- Hulse, D.J., R.G. Webster, R.J. Russel, and D.R. Perez. 2004. Molecular Determinants within the Surface Proteins Involved in the Pathogenicity of H5N1 Influenza Viruses in Chickens. *J. Virol* 78: 9954-9964.
- Itoh, Y., H. Ozakie, H. Ishigaki, Y. Sakodaf, T. Nagataa, K. Soda, N. Isoda, T. Miyake, H. Ishida, K. Okamoto, M. Nakayama, H. Tsuchiya, R. Torii, H. Kida and K. Ogasawara. 2010. Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques, *Vaccine* 28 : 780–789
- Jong, M.D. and T.T. Hien. 2006. Review Avian Influenza (H5N1), *Journal of Clinical Virology* 35 : 2-5
- Kawaoka, Y. 2009. Avian Influenza in Indonesia : Control, Prevention, and Sueveillance. Surabaya. 19 Maret 2009.

- Kaye, D., CR. Pringle. 2005. Avian influenza viruses and their implication for human health. *Clin Infect Dis*; 40: 108-12. Epub 2004 Dec 7. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=15614699>
- Kim, J.A., S.Y. Ryu, and S.H. Seo. 2005. Cells in the Respiratory and Intestinal Tracts of Chicken Have Different Proportions of Both Human and Avian Influenza Receptors. *J. Microbiol.* 43: 366-369.
- Klempner, MS., DS. Shapiro. 2004. Crossing the species barrier – one small step to man, one giant leap to mankind. *N Engl J Med*; 350: 1171-2. Epub 2004 Feb 25. <http://amedeo.com/lit.php?id=14985471>
- Koopmans, M., B. Wilbrink, , M. Conyn, et al. 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*; 363: 587-93. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=14987882>
- Lee, C., D. Song, B. Kang, D. Kang, J. Yoo, K. Jung, G. Na, K. Lee, B. Park and J. Oh. 2009. A serological survey of avian origin canine H3N2 influenza virus in dogs in Korea, *Veterinary Microbiology* 137 : 359–362
- Lee, D.C.W., C.Y. Cheung, A.H.Y. Law, C.K.P. Mok, M. Peiris and A.S.Y. Lau. 2005. p38 mitogen activated protein kinase dependent hyperinduction of TNF α expression in response to avian influenza virus H5N1. *J. Virol.* 79 (16) : 10147 – 10154.
- Leung, F.C. 2007. Avian H5N1 is still an animal viruses. Di dalam : Zhou, J. Dan Yan, H. Editor. The 15 th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book. Beijing 11-14 September 2007. 42-52.
- Li, C., M. Hatta C.A. Nidom, Y. Muramotod, S. Watanabe, G. Neumann, and Y. Kawaoka, Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912807107 PNAS Early Edition
- Lisa, F.P.N, I. Barr. T.Nguyen, S.M. Noor, R.S.P. Tan, L.V. Agathe, S. Gupta, H. Khalil, T.L To, S. S. Hassan and E. Ren. 2006 . Specific detection of H5N1 avian influenza A virus in field specimens by a one-step RT-PCR assay. *BMC Infectious Diseases*.
- Lupiani, B. and S.M. Reddy. 2009. Review The History of Avian Influenza, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 : 2-5
- Maines, T. R., L.M. Chen, J. A. Belser, N. Van Hoeven, E. Smith, R.O. Donis, T. M. Tumpey, and J. M. Katz. 2011. Multiple genes contribute to the

virulent phenotype observed in ferrets of an H5N1 influenza virus isolated from Thailand in 2004, *Virology* 413 : 226–230

- Martindah, E., A. Priyanti dan I.S. Nurhayati. 2007. Kajian Pelaksanaan Kebijakan Pengendalian Penyakit Avian Influenza di Lapang, disampaikan pada Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi Dalam Mendukung Usaha Ternak Unggas Berdaya Saing
- Matrosovich, M.N., T.Y. Matrosovich, T. Gray, N.A. Roberts, and H-D. Klenk. 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS*. 101 (13) : 4620-4624.
- Munch, M., L.P. Nielsen, K.J. Handberg and P.H. Jorgensen. 2001. Detection and Subtyping (H5 and H7) of Avian Type A Influenza Virus by Reverse Transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.* 146: 87-97.
- Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek, and M.J. Studdert, 2008, Orthomyxoviridae dalam *Veterinary Virology*, 3th edition, 525 B Street , Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA : 459-468.
- Nidom, C.A., S. Yamada, V. N. Reviany, K. Rahmawati, M.Y. Alamudi, Kholik, S. Indrasari, R.S. Hayati, K.I. Horimoto dan Y. Kawaoka, (2012). Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. *Virus Genes*. 44:459–465
- Nidom, C.A., Y. Priyatna dan K. Zarkasie. 2006. Surveilans Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 yang Menginfeksi Kucing Jalanan pada Uji Hemaglutinasi dengan Sel darah Merah Ayam dan Sel darah Merah Kuda [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga
- Nwe, N., H. Qigai, S. Damrongwatanapokin, Q. Du1, I. Manopo, Y. Limlamthong, B. J. Fenner, L. Spencer and J. Kwang. 2006.: Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology* 2006, 6:16 doi:10.1186/1471-2180-6-16.
- OFFLU/AAHL Workshop, 2009. Serology and virus typing for Antigenic Cartography.
- Office International des Epizooties, 2010. High Pathogenicity Avian Influenza. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University
- Office International des Epizooties, 2008. Manual of Standards For Diagnostics Tests and Vaccines.

- Office International des Epizooties, 2004. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. World Organisation for Animal Health 4: 258 – 269
- Pattnaik, B., A.K. Pateriya, R. Khandia, C. Tosh, S. Nagarayan, S. Gounalan, H.V. Murugkar, B.P. Shankar, N. Shrivastava, P. Behera, S. Bhagat, J.S.M. Peiris and H.K. Pradhan. 2006. Phylogenetic Analysis Revealed Genetic Similarity of the H5N1 Avian Influenza Viruses Isolated from HPAI Outbreak in Chicken in Maharashtra, India with those Isolated from Swan in Italy and Iran 2006. *Current Science*. 91: 77-81.
- Peiris, J.S., M.D. de Jong, and Y. Guan. 2007. Avian Influenza Virus (H5N1) : A threat to human health, *Clinical of Microbiology Rev.* 20 : 243-267
- Perkins, L.E. and D.E. Swayne. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.* 2003; 47(3 Suppl):956-67. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=14575094>
- Pfeiffer, J., M. Pantin-Jackwooda, T.L. Tob, T. Nguyenb and D.L. Suarez. *Virus Research* 142 (2009) 108–120. Phylogenetic and biological characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses (Vietnam 2005) in chickens and ducks.
- Plotkin, J.B. and J. Dushoff. 2003. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 7152-7157.
- Plotkin, J.B., J. Dushoff, S.A. Levin. 2002. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6263-6268.
- Rantam, F.A., E.D. Poetranto, A.P. Rahardjo, Suwarno., N. Sianita, R. Ernawati dan J. Rahmahani, 2007. Kajian Burung Migrasi Sebagai Sumber Penularan Terhadap Pencegahan Penyebaran wabah Flu Burung. Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
- Rantam, F.A. 2003. Unpublished
- Seo, S., E Hoffman, and Webster. 2002. Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Anti-viral Cytokine Responses. *Nature Med.* 8: 950-954
- Shih, A.C.C., T.C. Hsiau, M.S. Ho, W.H. Li. 2007. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic site drive influenza A hemagglutinin evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6283-6288.

- Smith, G.D.J., A.S. Lapedes, J.C. Jong, T.M. Bastebroer, G.F. Rimmelzwaan, A.D.M.E. Osterhaus, R.A.M. Fouchir. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305: 371-375.
- Smith, G.D.J., T.S.P. Naipospos, T.D. Nguyen, M.D. Jong, D. Vijaikrishna, T.B. Usman, S.S. Hassan, T.V. Nguyen, T.V. Dao, N.A. Bui, Y.I.L.C. Leung, C.L. Cheung, J.M. Rayner, J.X. Zhang, L.J. Zhang, L.L.M. Poon, K.S. Li, V.C. Nguyen, T.T. Hien, J. Farrar, R.G. Webster, H. Chen, J.S.M. Peiris and Y. Guan. 2006. Evolution and Adaptation of H5N1 Influenza Virus in Avian and Human Hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 322.
- Steven, J., O. Blixt, T.M. Tumpey, J.K. Taunberger, J.C. Paulson, I.A. Wilson. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312: 404-410.
- Suarez, D.L. 2008. Avian Influenza dalam Avian Influenza, Blackwell Publishing Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA : 3-22
- Suwarno, 2009. Karakteristik Protein N1 Virus Avian Influenza A/Ck/BI/Indonesia/2003 sebagai Antigen Diagnostik pada Elisa Tak Langsung, Media Kedokteran Hewan Vol. 24. No. 3.
- Suzuki, Y., and M. Nei, 2002. Origin and Evolution of Influenza Hemagglutinin genes. *Molekul Biologi Evolution*. 19: 501-509.
- Suzuki, Y., T. Ito, T. Suzuki, R.F. Holland, T.M. Chambers, M. Kiso, H. Ishida, Y. Kawaoka. 2000. Sialic acid species as adterminant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol* 74: 11825-11831.
- Steven, J., O. Blixt, J.C. Paulson, I.A. Wilson. 2007. Structure and Receptor Specificity Avian Flu Antigen, ALS News Vol. 278.
- Swayne, D.E. 2007. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis* 51(1 Suppl): 242-249.
- Swayne, D.E. and D.L. Suarez. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *In: Diseases of Poultry: world trade and public health implications*. BEARD CW and MCNULTY MS (Eds.). *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19(2): 463-482.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (10) : 2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121 : 1-9.

- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. . *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Tamura, S.I. and T. Kurata. 2004. Defense Mechanisms Against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. *Jpn.J.Infect.Dis.*57:236-247.
- Taubenberger J.K¹, M. David, Morens². 2006. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Rev Biomed* 17:69-79. History of Medicine Armed Forces Institute of Pathology, Rockville, Maryland, USA. ²National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Trani, L.D., B. Bedini, I. Donatelli, L. Campitelli, B. Chiappini, M.A.D.Marco, M. Delogu, B. Canio and G.Vaccari. 2006. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control
- UGM. 2006. Kajian Avian Influenza tahun 2005-2006. www.avianinfluenza-ugm.ac.id
- Webster, R.G. and E.A. Govorkova. 2006. H5N1 influenza—continuing evolution and spread. *N Engl J Med* 355: 2174–2177.
- Webster RG, M. Peiris, H. Chen, Y. Guan. 2006. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis*; 12: 3-8 – Full text at <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1024.htm>
- Whittaker, GR. 2001. Intracellular Trafficking of Influenza Virus: Clinical implication for Molecular Medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. <http://www.expertreviews.org/> [6 Desember 2006].
- WHO. 2012. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness
- WHO, 2008. Toward a Unified Nomenclature System for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1), *Emerg Infect Dis* 14(7) : e1
- WHO. 2005. Avian influenza frequently asked questions. [http:// www.who.int/csr/disease/avian_influenza /avian_faqs/en/ index. Html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avian_faqs/en/index.html)
- Wibawa, H., J. Bingham, H. Nuradji, S. Lowther, J. Payne, J. Harper, F. Wong, R. Lunt, A. Junaidi, D. Middleton and J. Meers. 2012. The pathobiology of two Indonesian H5N1 avian influenza viruses representing different clade 2.1 sublineages in chickens and ducks *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. In Press.

- Wibawa, H., W.B. Priyono, N.L.P.I. Dharmayanti, S.H. Irianingsih, Y. Miswati, A. Rochmah, E. Andesyha, Romlah, R.S.D. Daulay, K. Safitria. 2012. Investigasi Wabah Penyakit pada Itik di Jawa Tengah, Jogjakarta dan Jawa Timur : Identifikasi Sebuah *Clade* Baru Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 di Indonesia. Buletin Laboratorium Veteriner Balai Besar Veteriner Wates Jogjakarta. Vol : 12 No. 4 : Tahun 2012 Edisi Bulan Oktober-Desember.
- Wu, G. and S. Freeland. 2005. Quanyifying unequal patterns of synonymous codon usage. The CAI calculator. <http://www.evolvingcode.net/codon/fag/CAI/10> February 2007.
- Zhou, N.N., D.A. Senne, J.S. Landgraf, , S.L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L. Liu, K.J. Yoon, S. Krauss, and R.G. Webster. 2000. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs, *Veterinary Microbiology* 74 : 47-58



LAMPIRAN

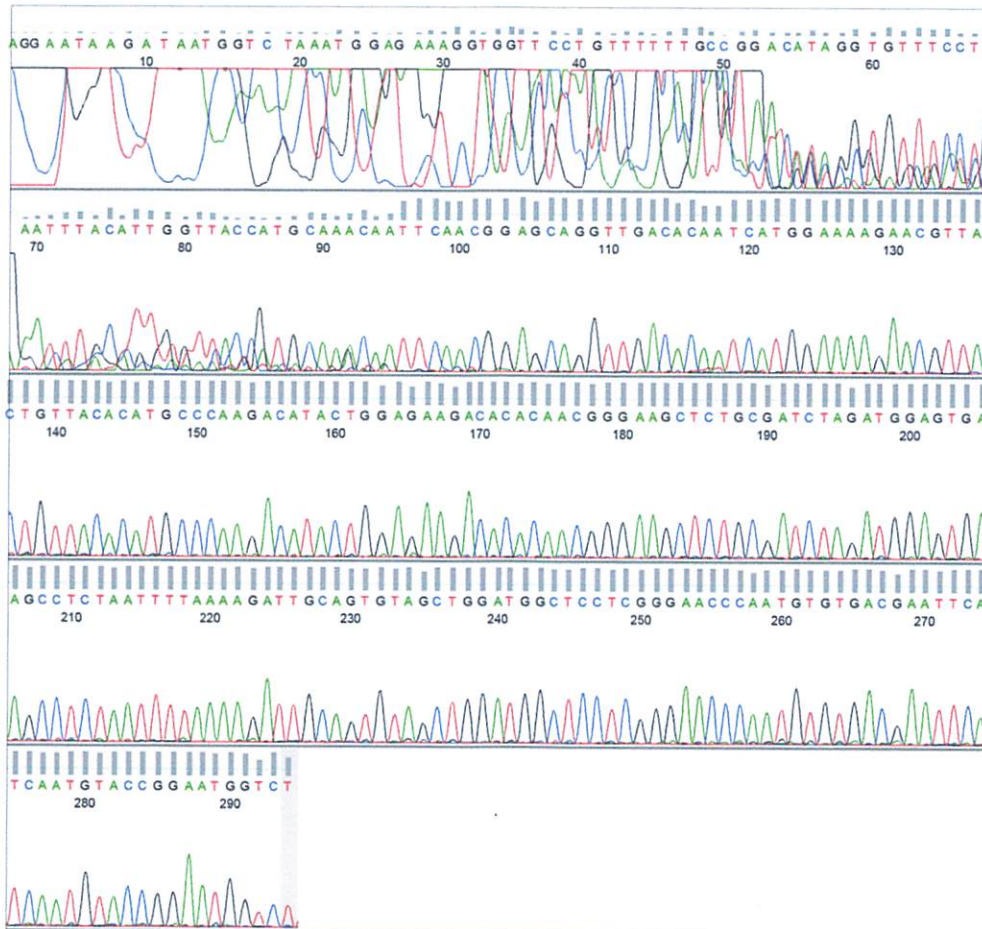
Lampiran 1. Hasil sekuensing isolat Lembata dengan primer Forward

File: 2013-04-05_AI_Lembata_HA10_F_001.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA10_F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13,3525
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 78, C = 54, G = 98, T = 73
Lane/Cap#: 1
Matrix: n/a
Direction: Native



Lanjutan Lampiran 1.

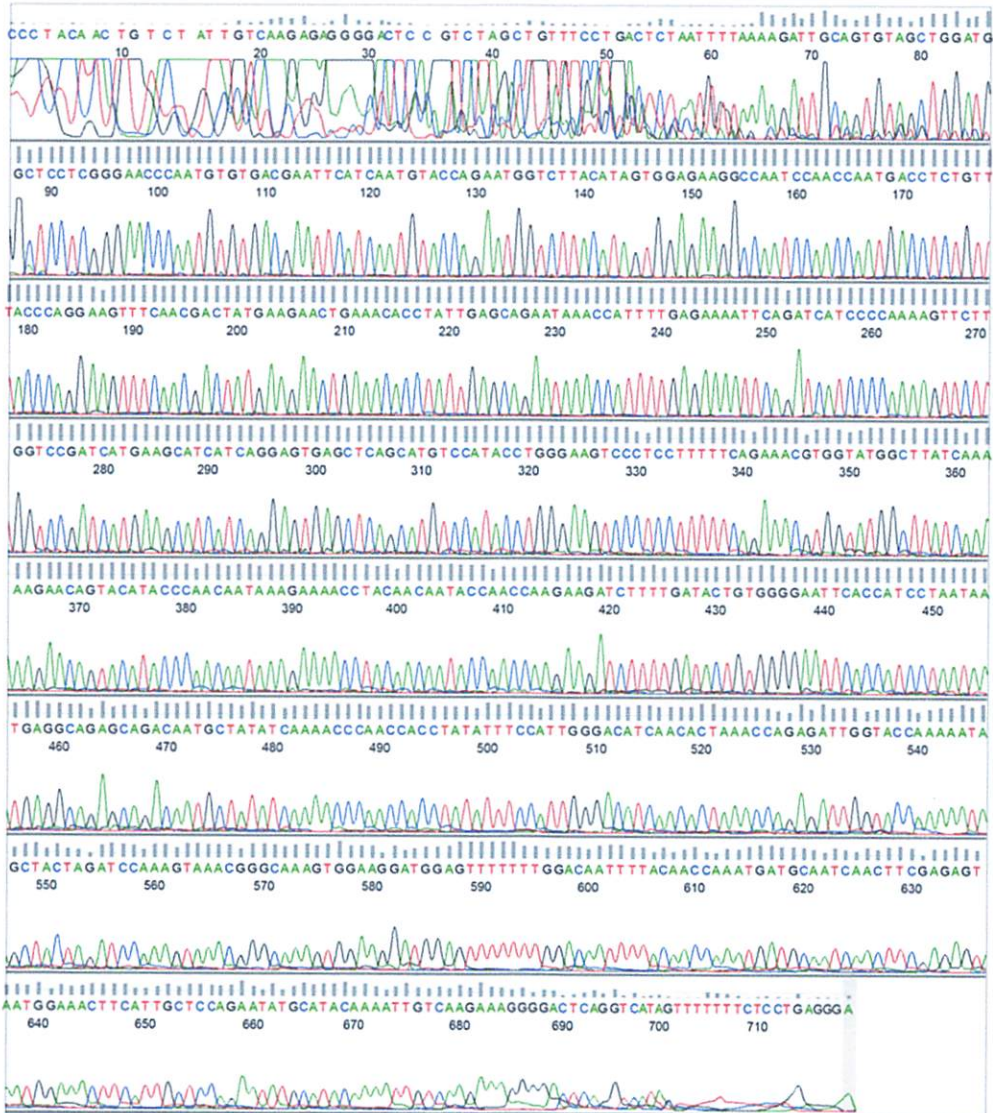
File: 2013-04-09_AI_Lembata_HA20_F_003.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA20_F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.6364
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1036, C = 723, G = 753, T = 783
 Lane/Cap#: 3
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:28PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Lanjutan Lampiran 1.

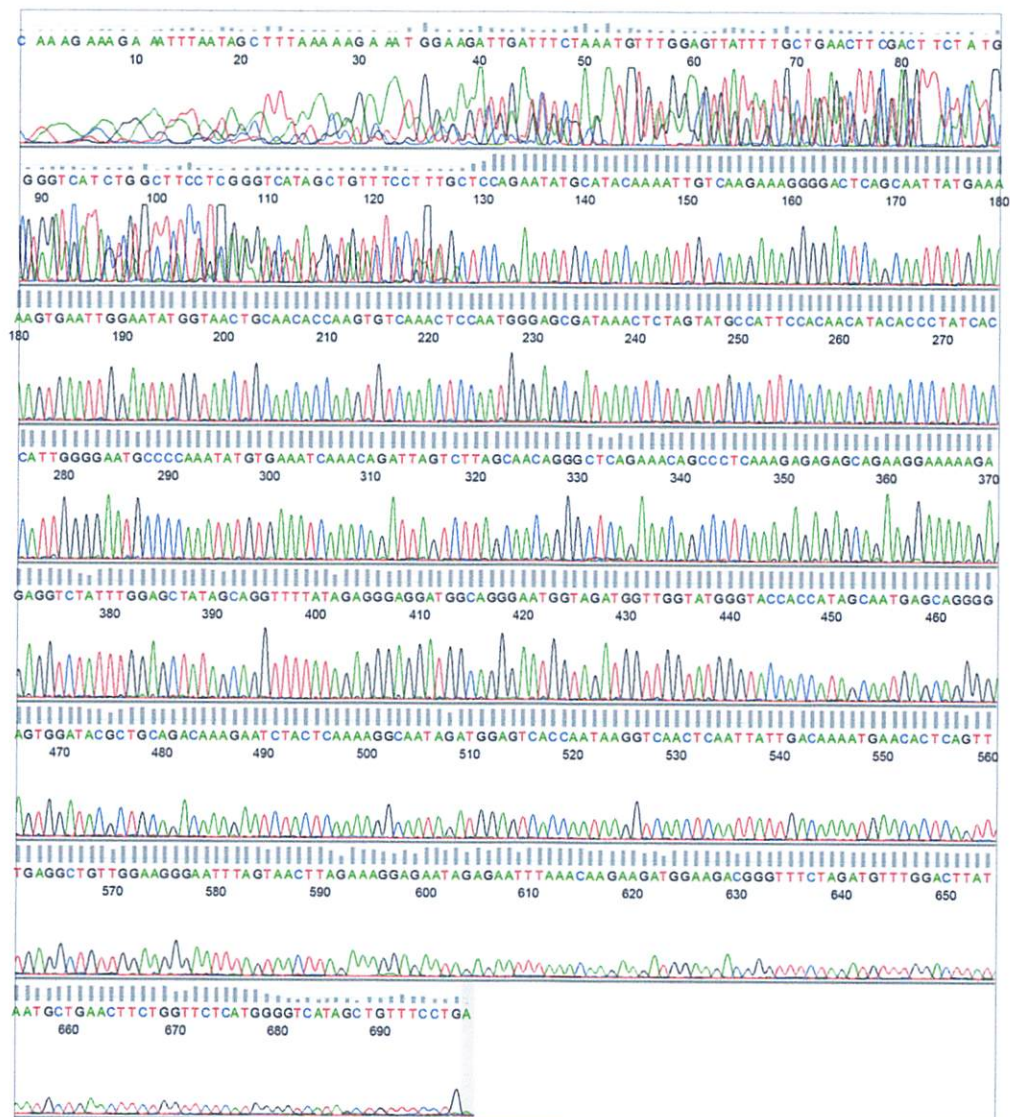
File: 2013-04-05_AI_Lembata_HA30_F_003.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA30_F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13,2063
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 191, C = 108, G = 143, T = 147
 Lane/Cap#: 3
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:21PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

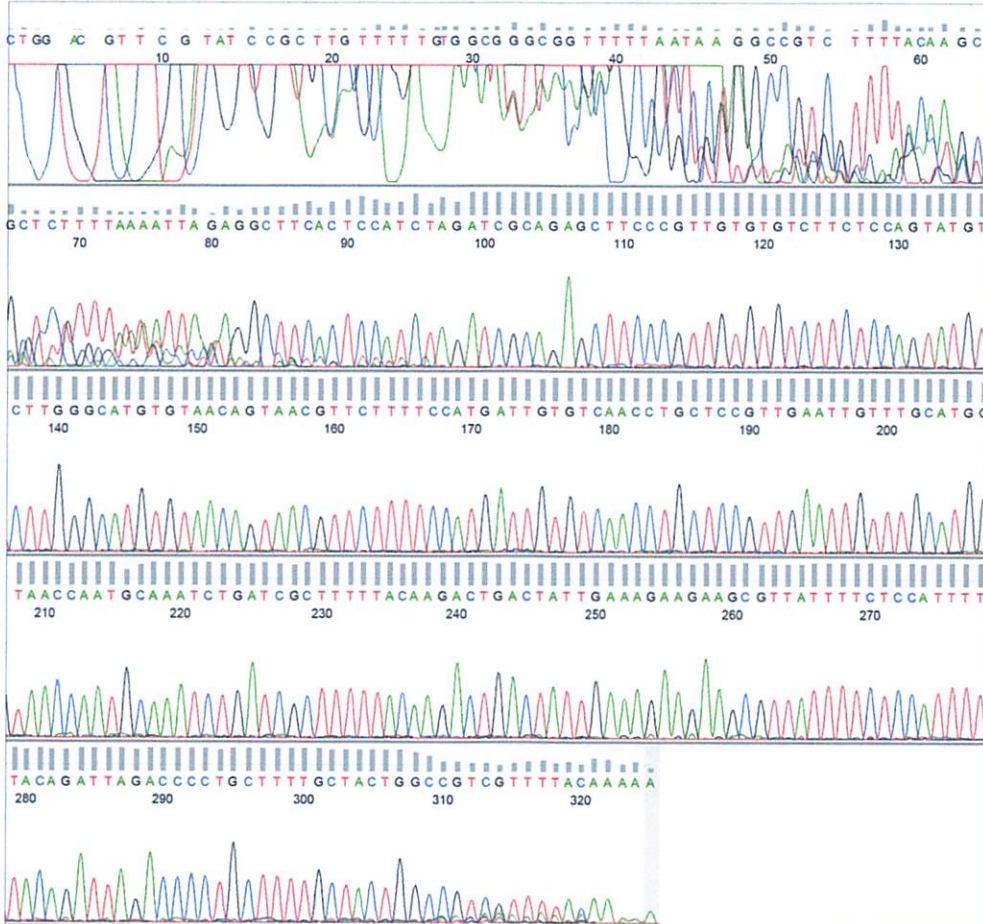
Lampiran 2. Hasil sekuensing isolat Lembata dengan primer Reverse

File: 2013-04-05_AI_Lembata_HA10_R_002.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA10_R
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 12.8068
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 226, C = 271, G = 242, T = 318
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:18PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Lanjutan Lampiran 2.

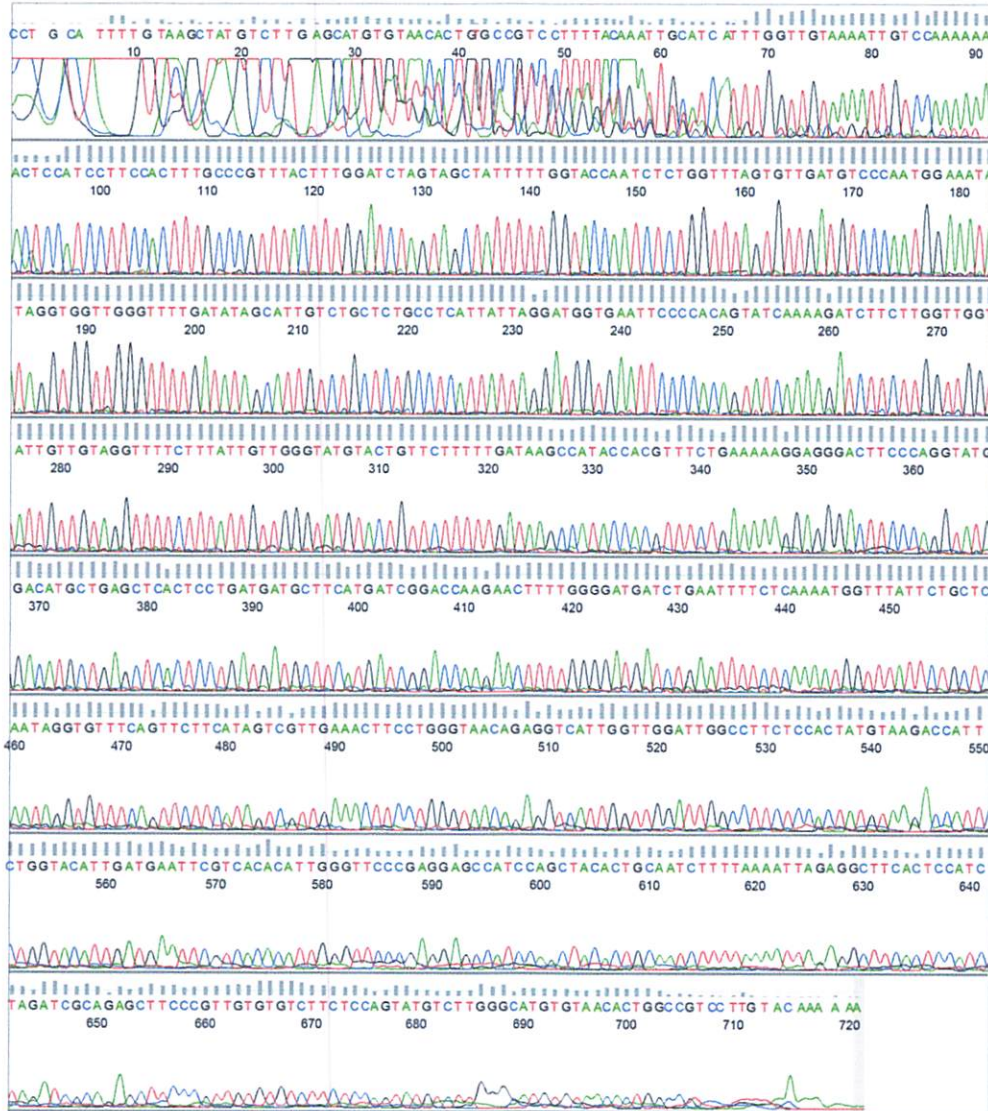
File: 2013-04-09_AI_Lembata_HA20_R_004.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA20_R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.3256
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 261, C = 208, G = 291, T = 322
 Lane/Cap#: 4
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:29PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Lanjutan Lampiran 2.

File: 2013-04-05_AI_Lembata_HA30_R_004.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA30_R

Signal Strengths: A = 63, C = 67, G = 61, T = 93

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

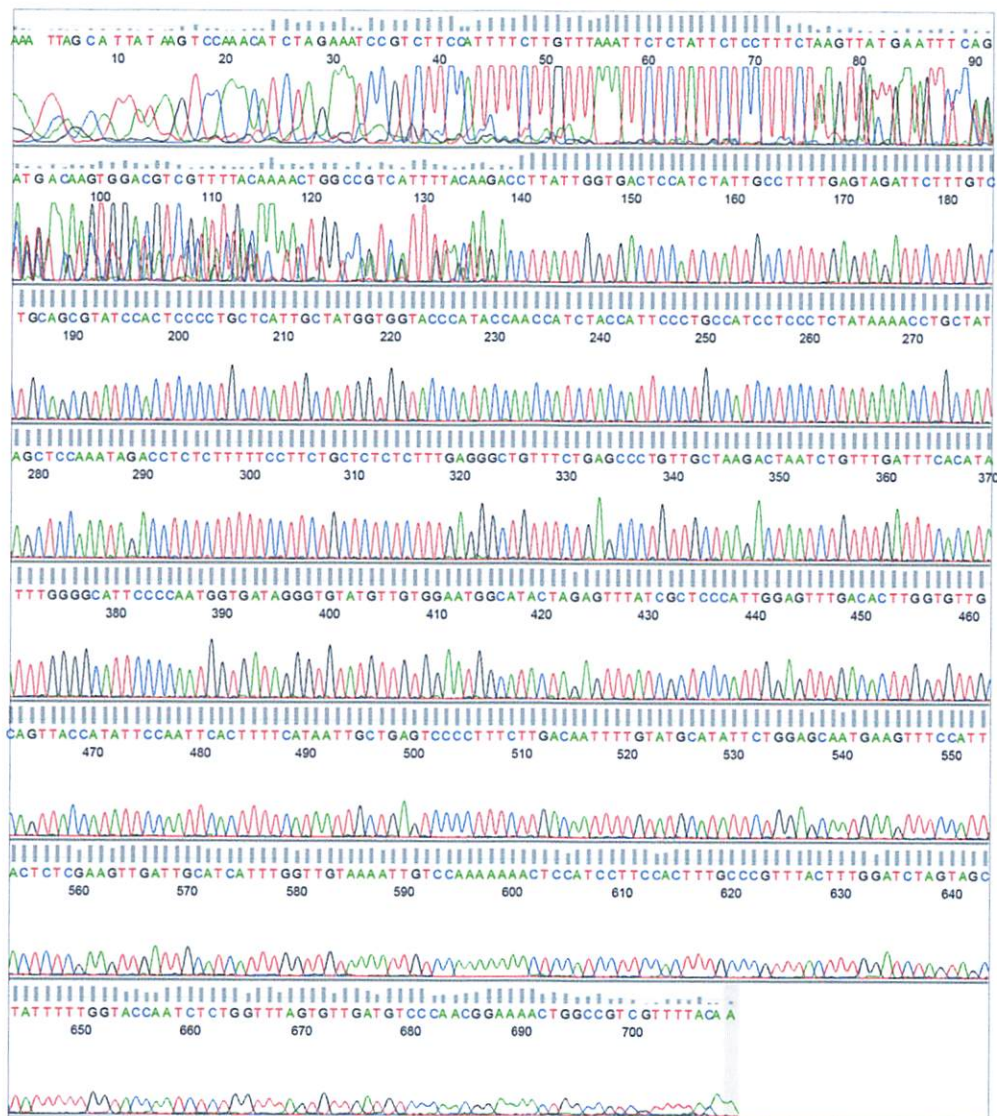
Lane/Cap#: 4

Spacing: 12.8995

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:24PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Lanjutan Lampiran 2.

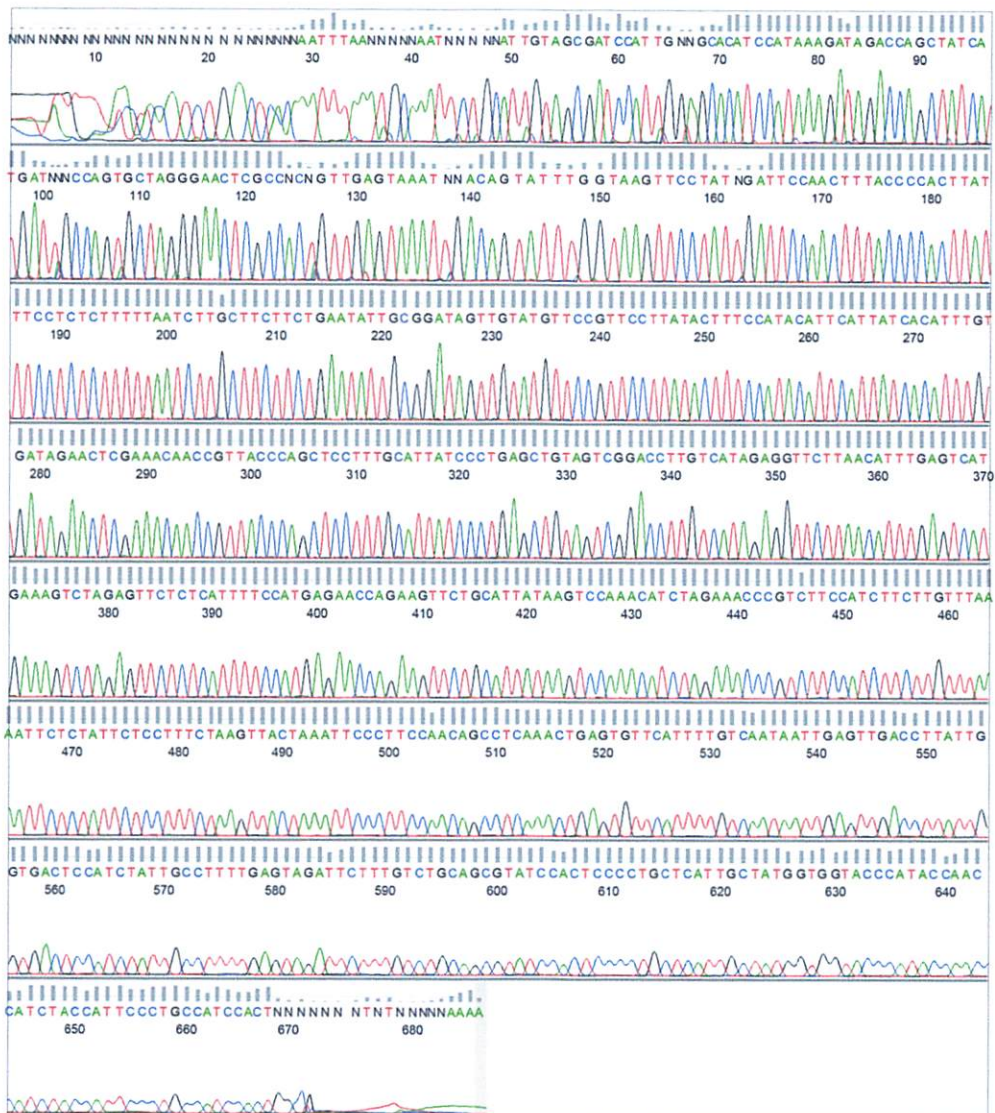
File: 2011-09-19_AI_Lembata_HA40_M13R_002.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Lembata_HA40_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.4352
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 2103, C = 2210, G = 1795, T = 2929
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:16PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

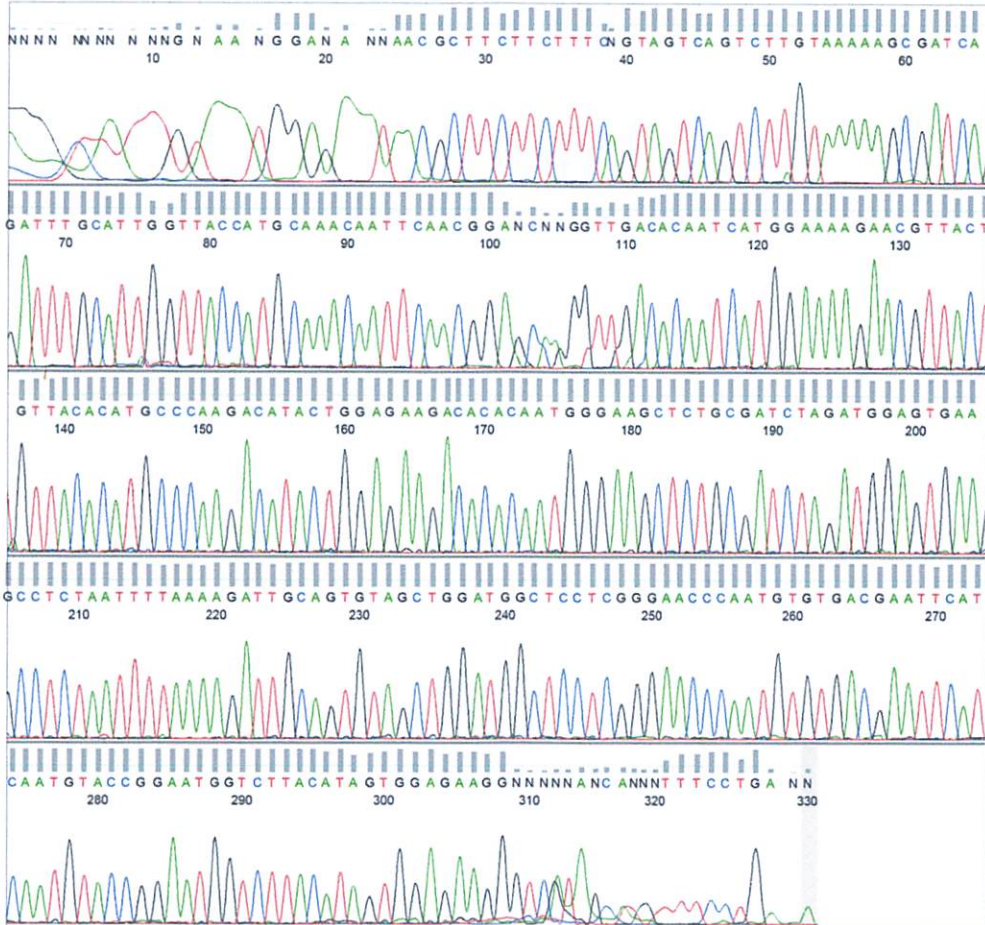
Lampiran 3. Hasil sekuensing isolat Mataram O12 dengan primer Forward

File: 2011-12-21_O12_HA10_M13F_001.ab1



Sample Name: O12_HA10_M13F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.7736
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 2719, C = 2322, G = 2885, T = 2674
Lane/Cap#: 1
Matrix: n/a
Direction: Native



Lanjutan Lampiran 3.

File: 2011-12-21_O12_HA20_M13F_003.ab1



Sample Name: O12_HA20_M13F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.0799
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 307, C = 255, G = 244, T = 293
Lane/Cap#: 3
Matrix: n/a
Direction: Native



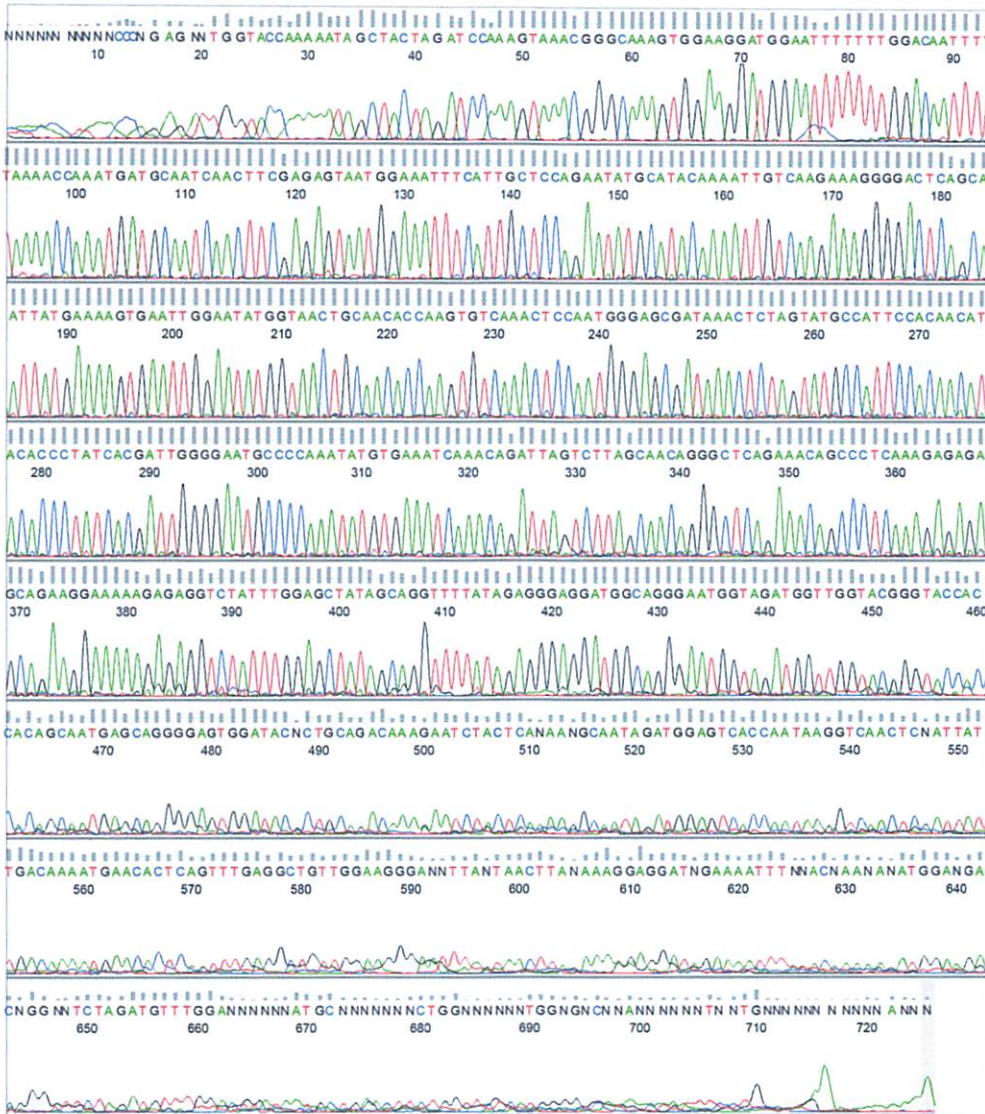
Lanjutan Lampiran 3.

File: 2011-12-21_O12_HA30_M13F_001.ab1



Sample Name: O12_HA30_M13F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.7399
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 66, C = 43, G = 64, T = 55
Lane/Cap#: 1
Matrix: n/a
Direction: Native



Lanjutan Lampiran 3.

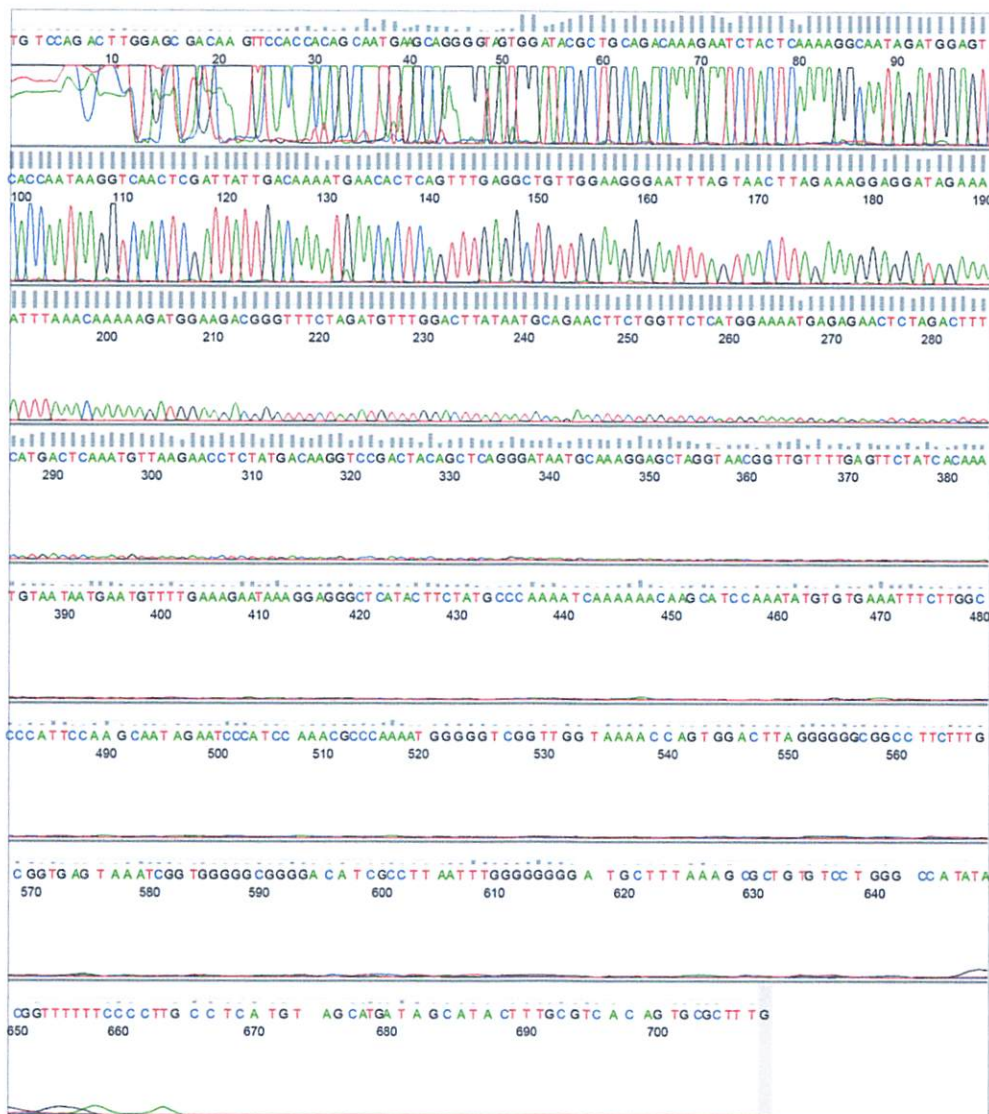
File: 2013-04-09_AI_Mataram_O12_HA40_F_004.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Mataram_O12_HA40_F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 12,1163
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 732, C = 477, G = 615, T = 463
 Lane/Cap#: 4
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 9:09PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

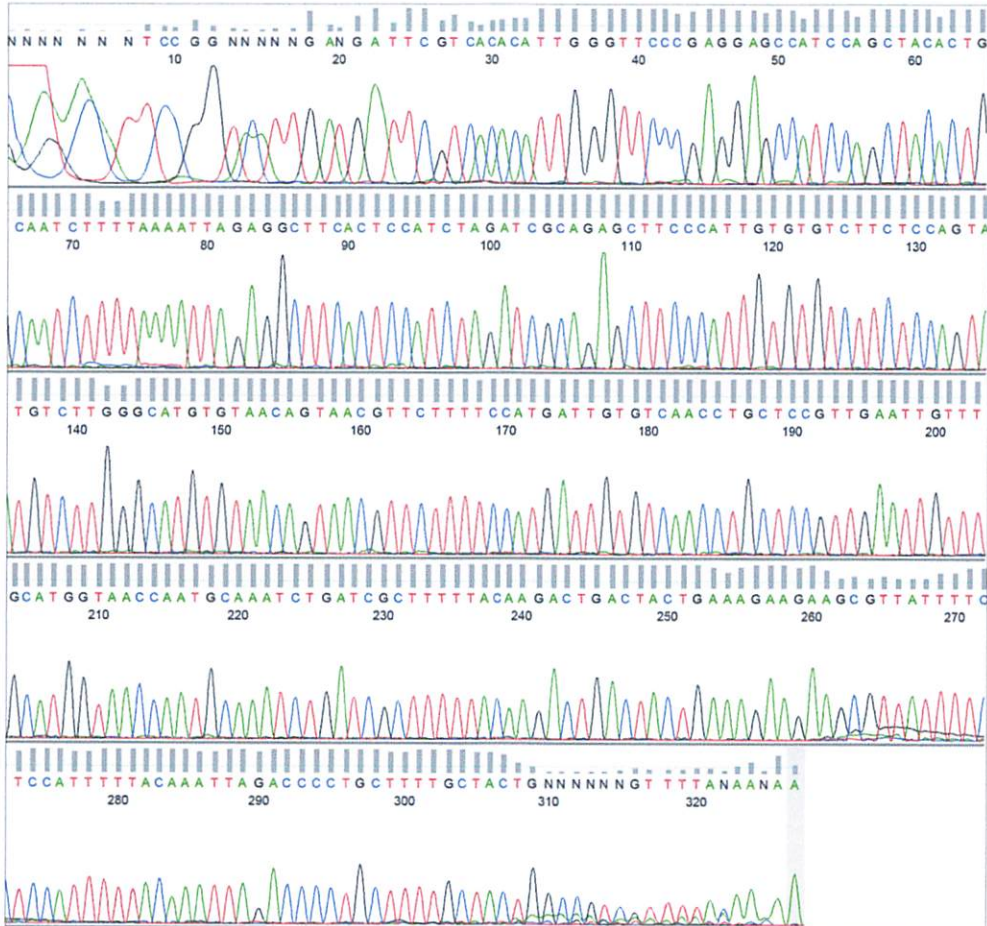
Lampiran 4. Hasil sekuensing isolat Mataram O12 dengan primer Reverse

File: 2011-12-21_O12_HA10_M13R_002.ab1



Sample Name: O12_HA10_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.7907
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 338, C = 413, G = 388, T = 518
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



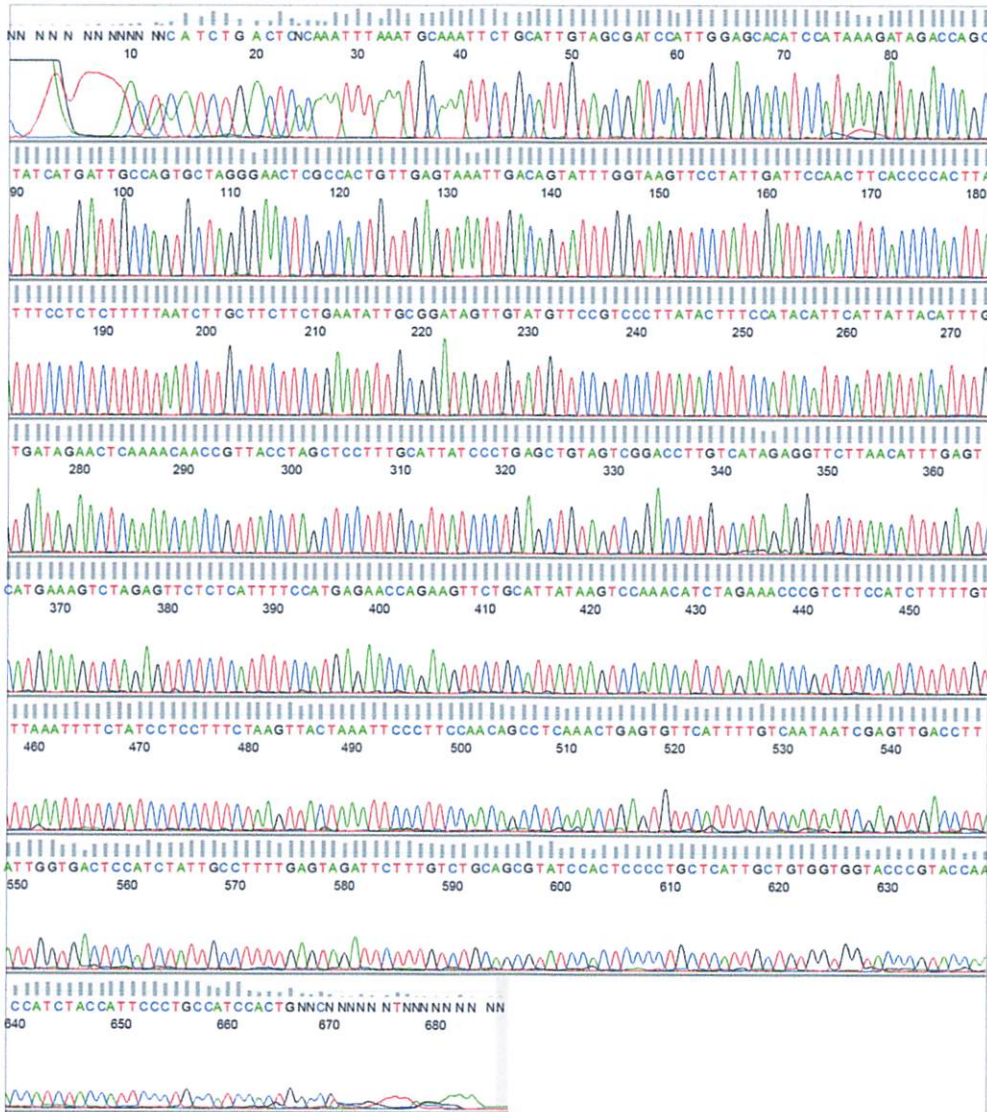
Lanjutan Lampiran 4.

File: 2011-12-27_O12_HA40_M13R_002.ab1



Sample Name: O12_HA40_M13R
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.2402
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 428, C = 411, G = 366, T = 553
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



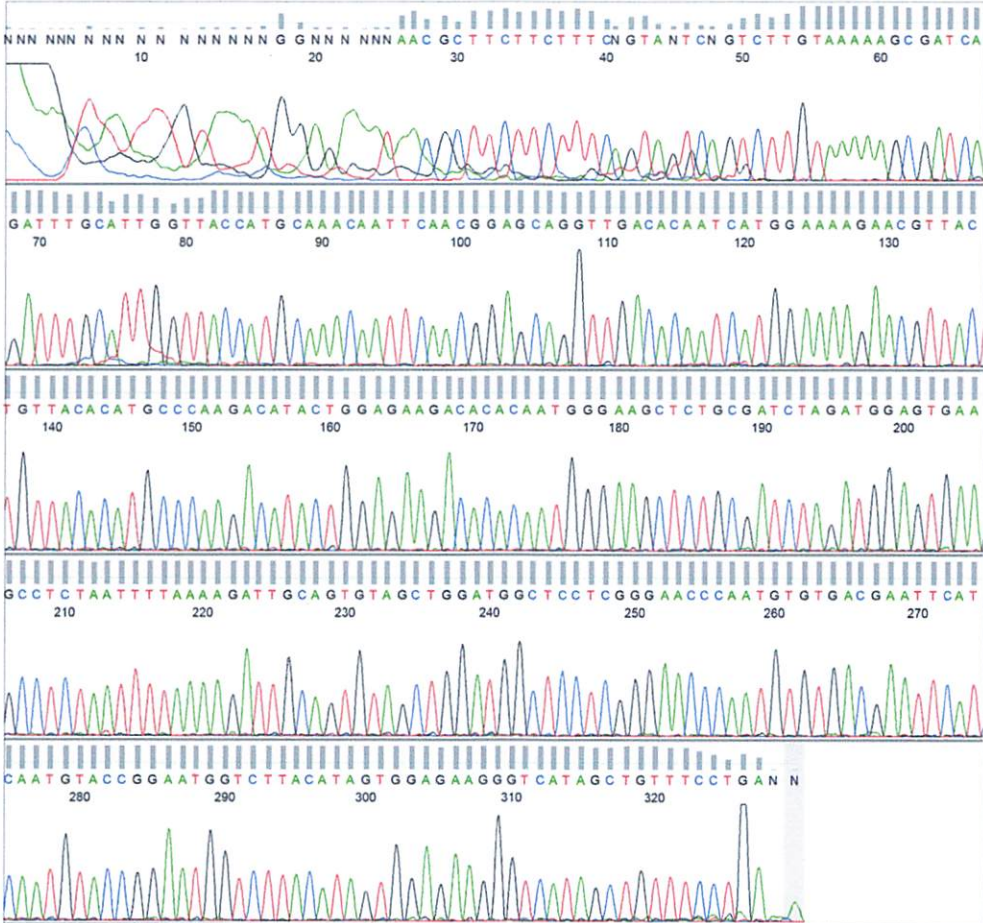
Lampiran 5. Hasil sekuensing isolat Mataram O14 dengan primer Forward

File: 2011-12-21_O14_HA10_M13F_003.ab1



Sample Name: O14_HA10_M13F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13,8079
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 170, C = 136, G = 165, T = 167
 Lane/Cap#: 3
 Matrix: n/a
 Direction: Native



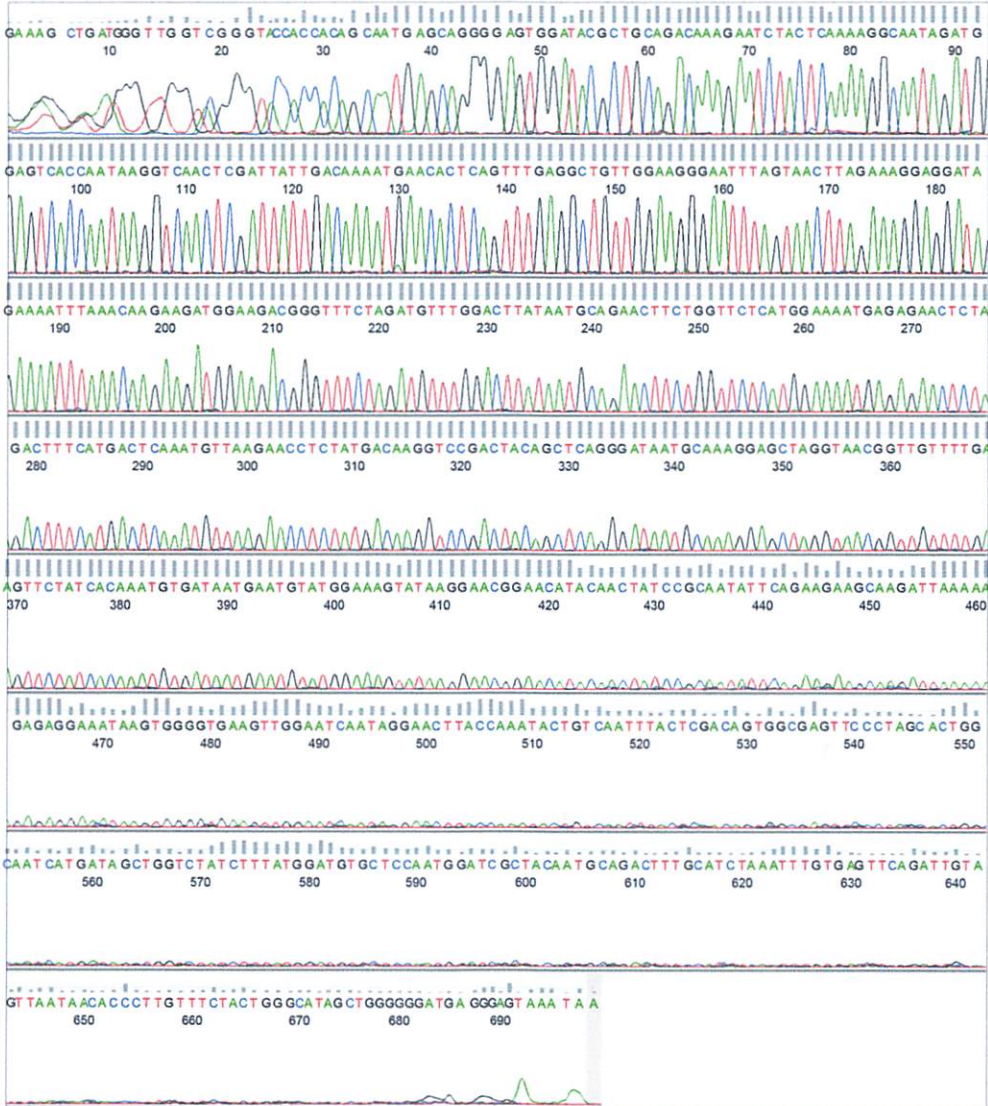
Lanjutan Lampiran 5

File: 2013-04-05_AI_Mataram_O14_HA40_F_002.ab1



Sample Name: AI_Mataram_O14_HA10_F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.514
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 84, C = 44, G = 60, T = 58
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Lanjutan Lampiran 6.

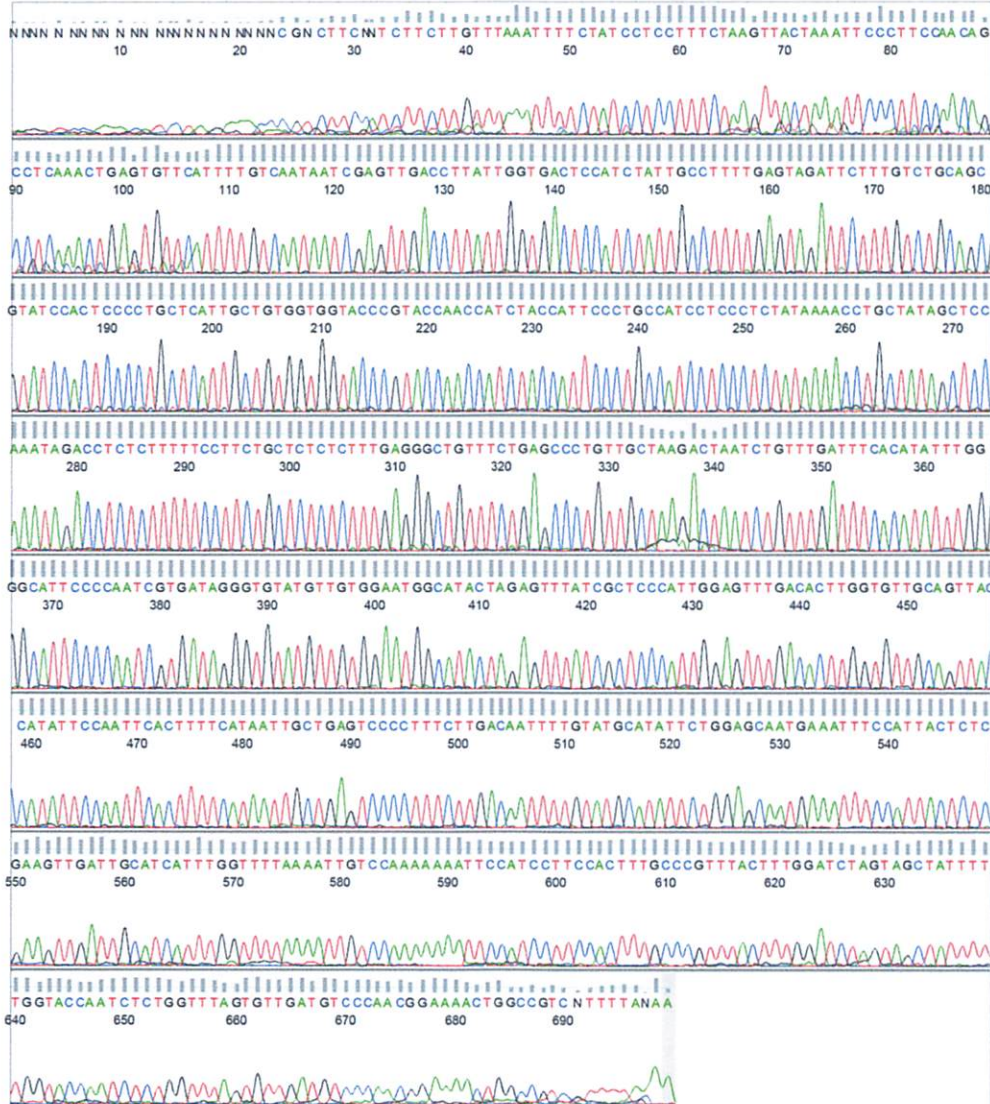
File: 2011-12-22_O14_HA30_M13R_002.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: O14_HA30_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.9293
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 62, C = 77, G = 70, T = 105
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 8:23PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

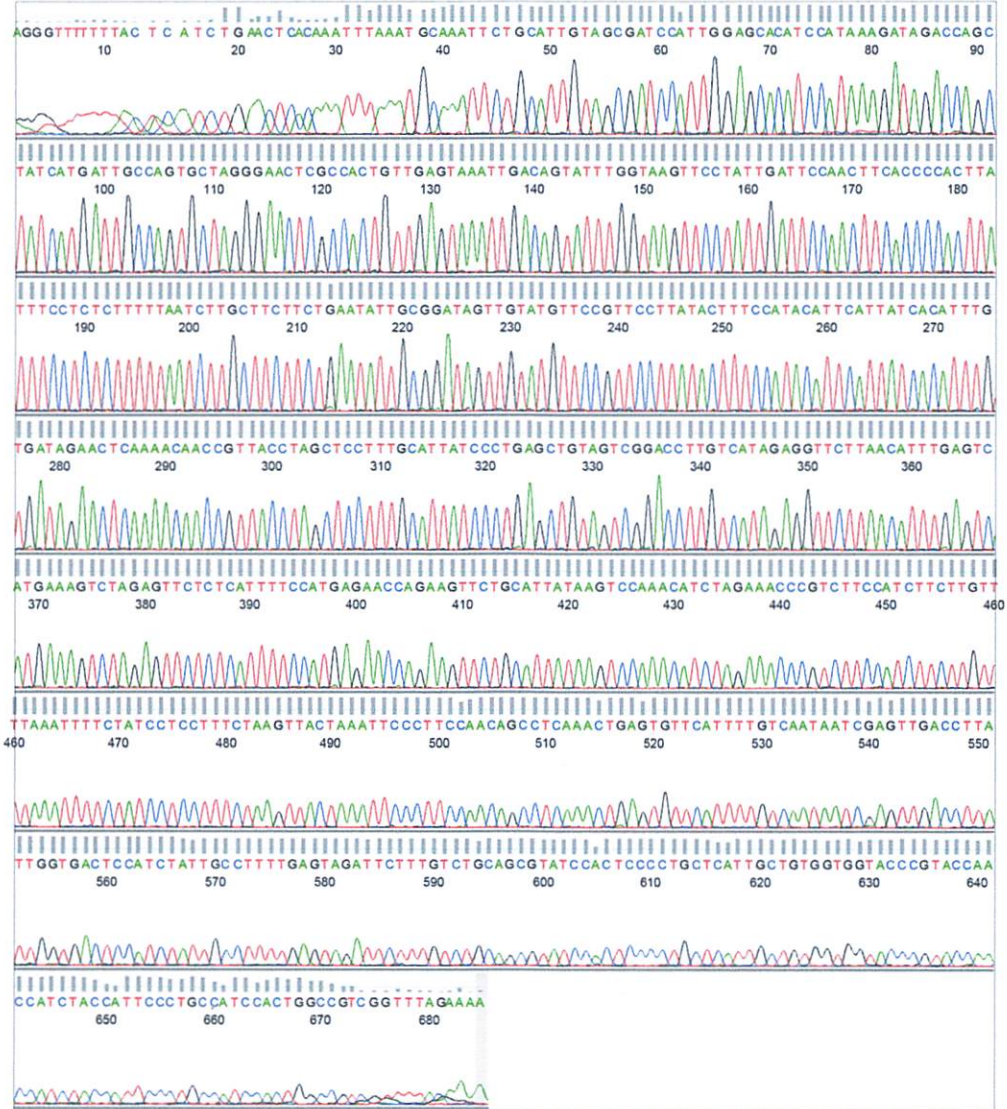
Lanjutan Lampiran 6.

File: 2013-04-05_AI_Mataram_O14_HA40_R_003.ab1



Sample Name: AI_Mataram_O14_HA10_R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.2159
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 79, C = 71, G = 59, T = 101
 Lane/Cap#: 3
 Matrix: n/a
 Direction: Native

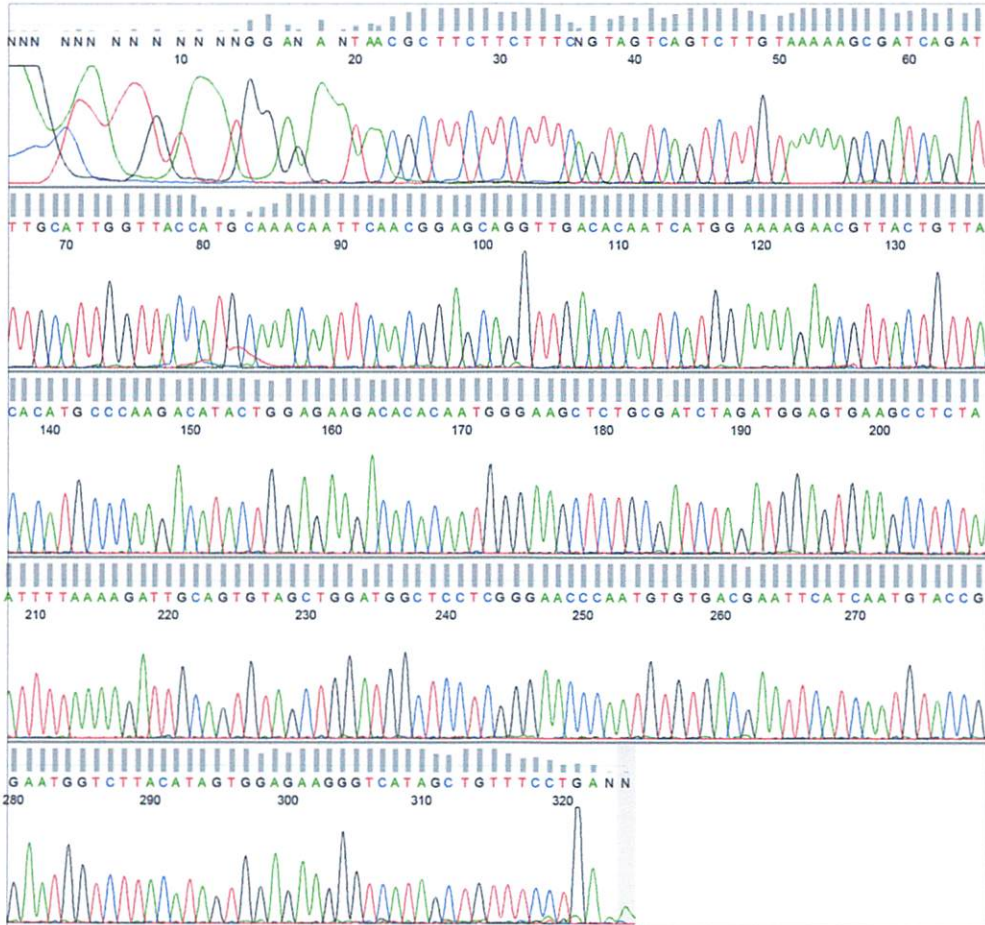


Lampiran 7. Hasil sekuensing isolat Mataram O20 dengan primer Forward

File: 2012-09-18_AI_Mataram_O20_HA10_M13F_18_09_2012_004.ab1



Sample Name: AI_Mataram_O20_HA10_M13F_18_09_2012 Signal Strengths: A = 402, C = 333, G = 412, T = 386
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob Lane/Cap#: 4
Spacing: 11.1707 Matrix: n/a
Comment: n/a Direction: Native



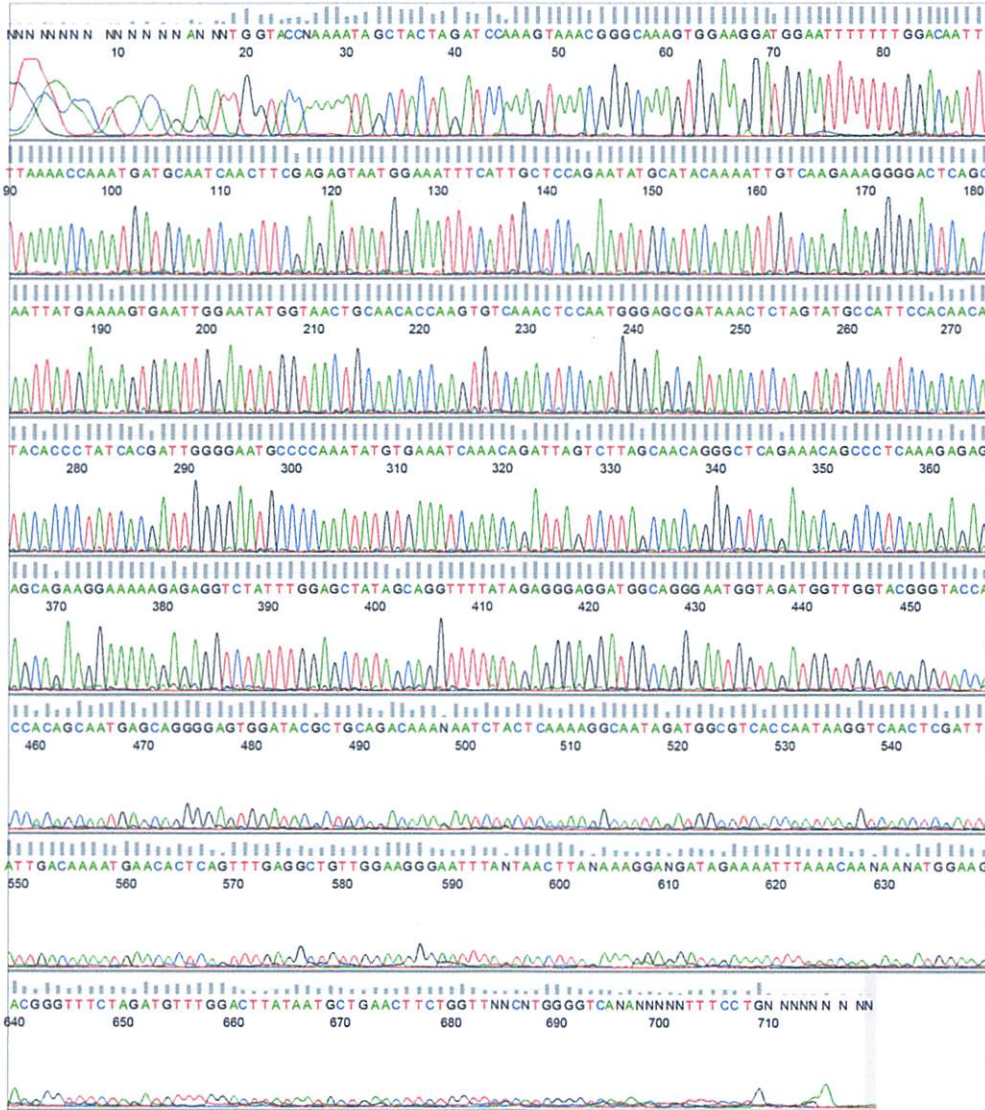
Lanjutan Lampiran 7.

File: 2011-12-22_O20_HA30_M13F_003.ab1



Sample Name: O20_HA30_M13F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.4261
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 224, C = 145, G = 207, T = 201
 Lane/Cap#: 3
 Matrix: n/a
 Direction: Native



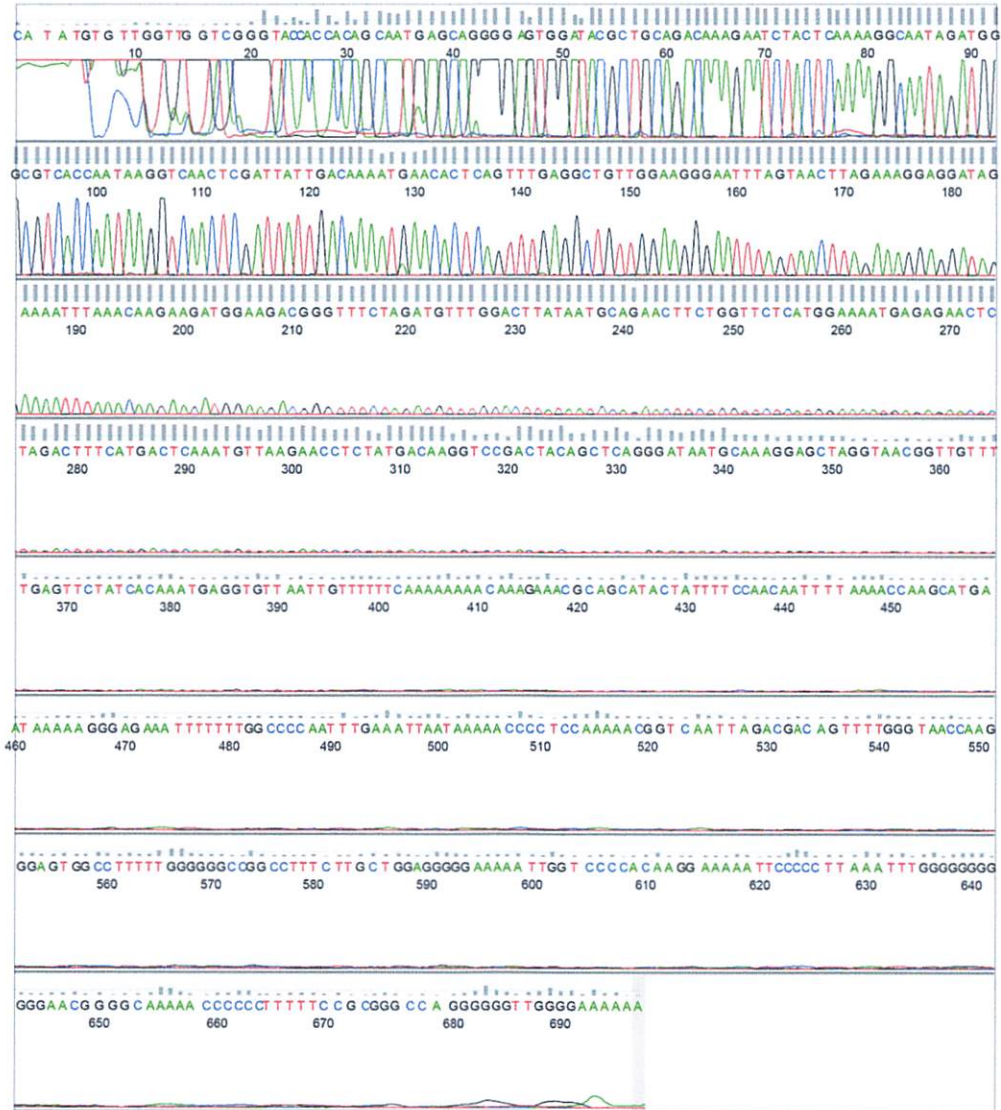
Lanjutan Lampiran 7.

File: 2013-04-09_AI_Mataram_O20_HA40_F_002.ab1



Sample Name: AI_Mataram_O20_HA40_F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.6122
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 506, C = 302, G = 475, T = 324
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



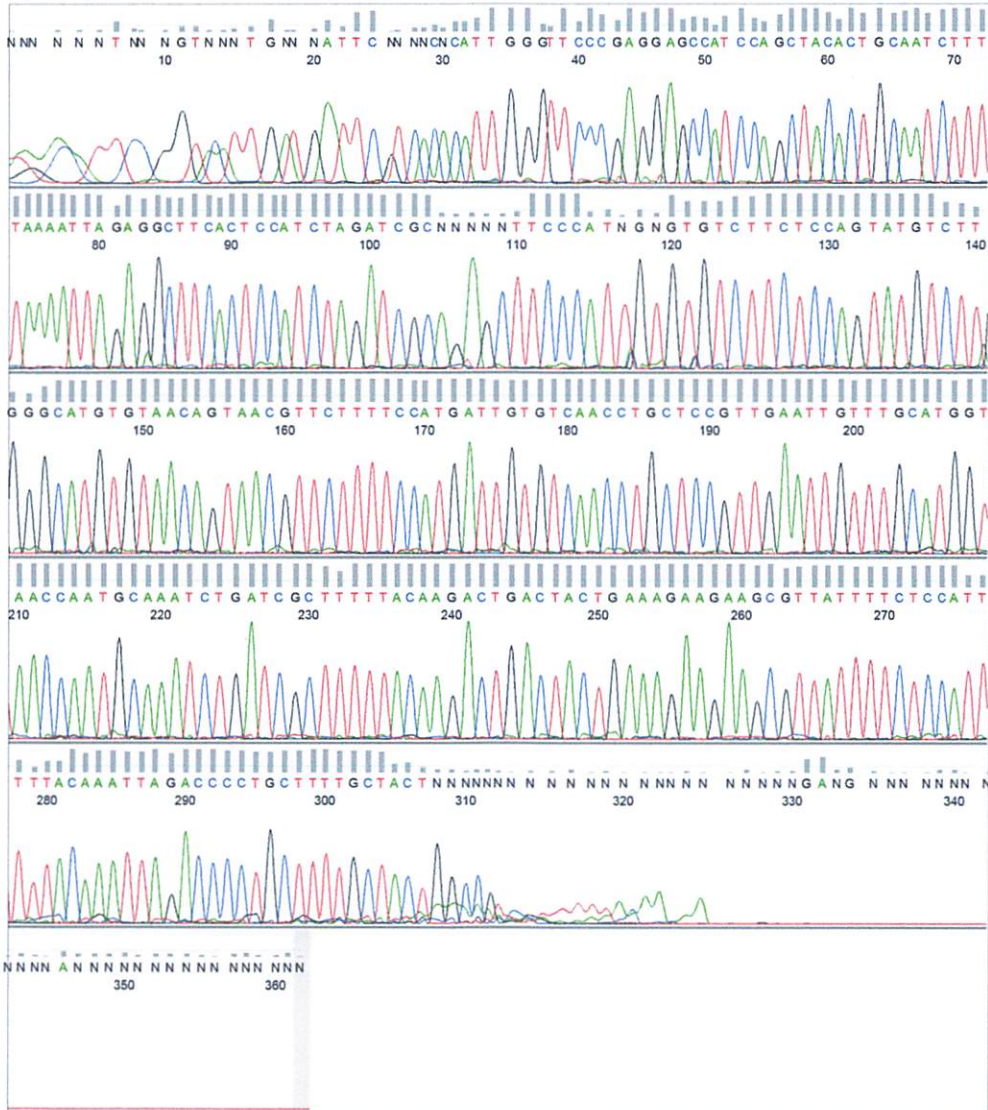
Lampiran 8. Hasil sekuensing isolat Mataram O20 dengan primer Reverse.

File: 2011-12-22_O20_HA10_M13R_004.ab1



Sample Name: O20_HA10_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 14.2081
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1868, C = 2370, G = 2132, T = 2904
 Lane/Cap#: 4
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Lanjutan Lampiran 8.

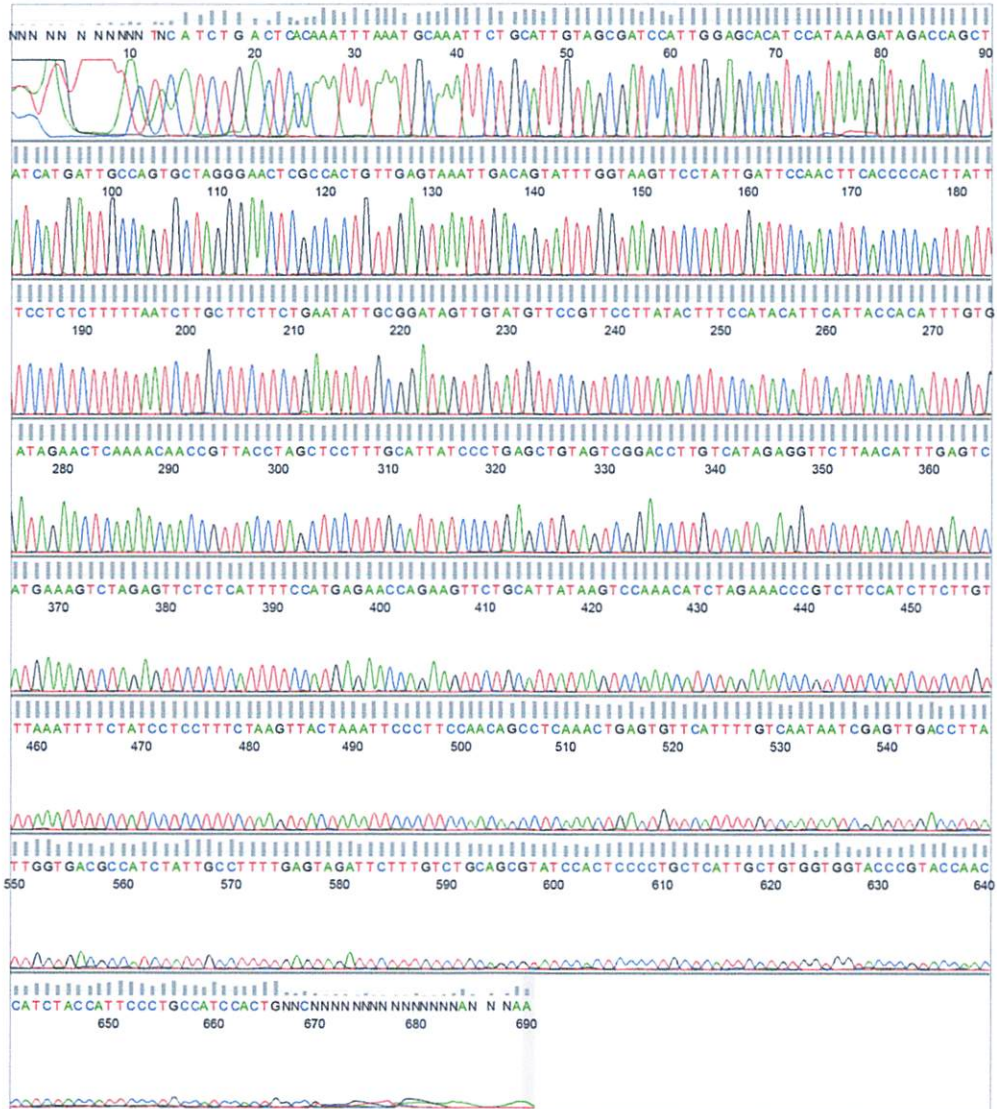
File: 2011-12-27_O20_HA40_M13R_002.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: O20_HA40_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 14.9506
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 838, C = 853, G = 768, T = 1120
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 7:49PM

 FinchTV v.1.4.0

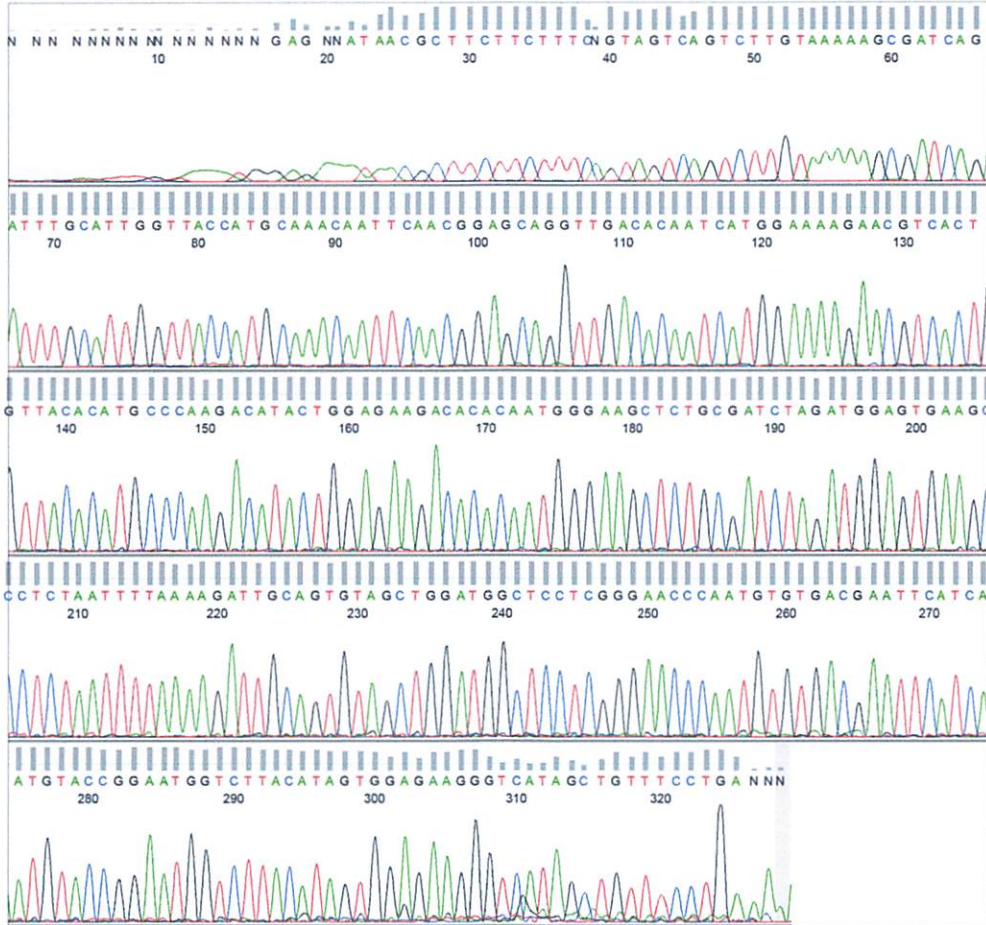
Page 1 of 1

Lampiran 9. Hasil sekuensing isolat Situbondo dengan primer Forward.

File: 2012-09-13_AI_Situbondo_HA10_M13F_13_09_2012_001.ab1



Sample Name: AI_Situbondo_HA10_M13F_13_09_2012 Signal Strengths: A = 405, C = 299, G = 451, T = 362
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob Lane/Cap#: 1
Spacing: 12.6456 Matrix: n/a
Comment: n/a Direction: Native



Lanjutan Lampiran 9.

File: 2012-09-13_AI_Situbondo_HA20_M13F_13_09_2012_003.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Situbondo_HA20_M13F_13_09_2012

Signal Strengths: A = 907, C = 712, G = 606, T = 777

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

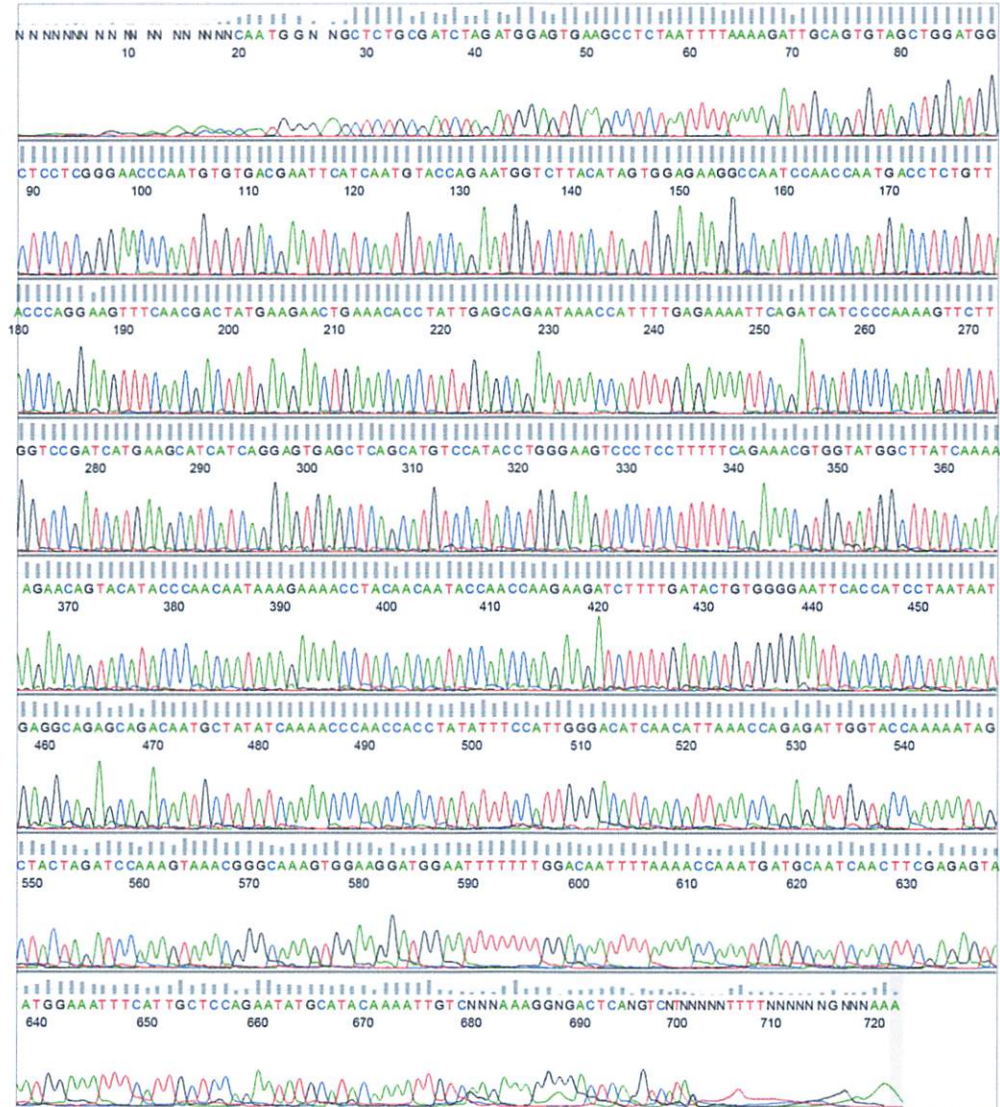
Lane/Cap#: 3

Spacing: 11.6198

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 7:18PM

 FinchTV v.1.4.0

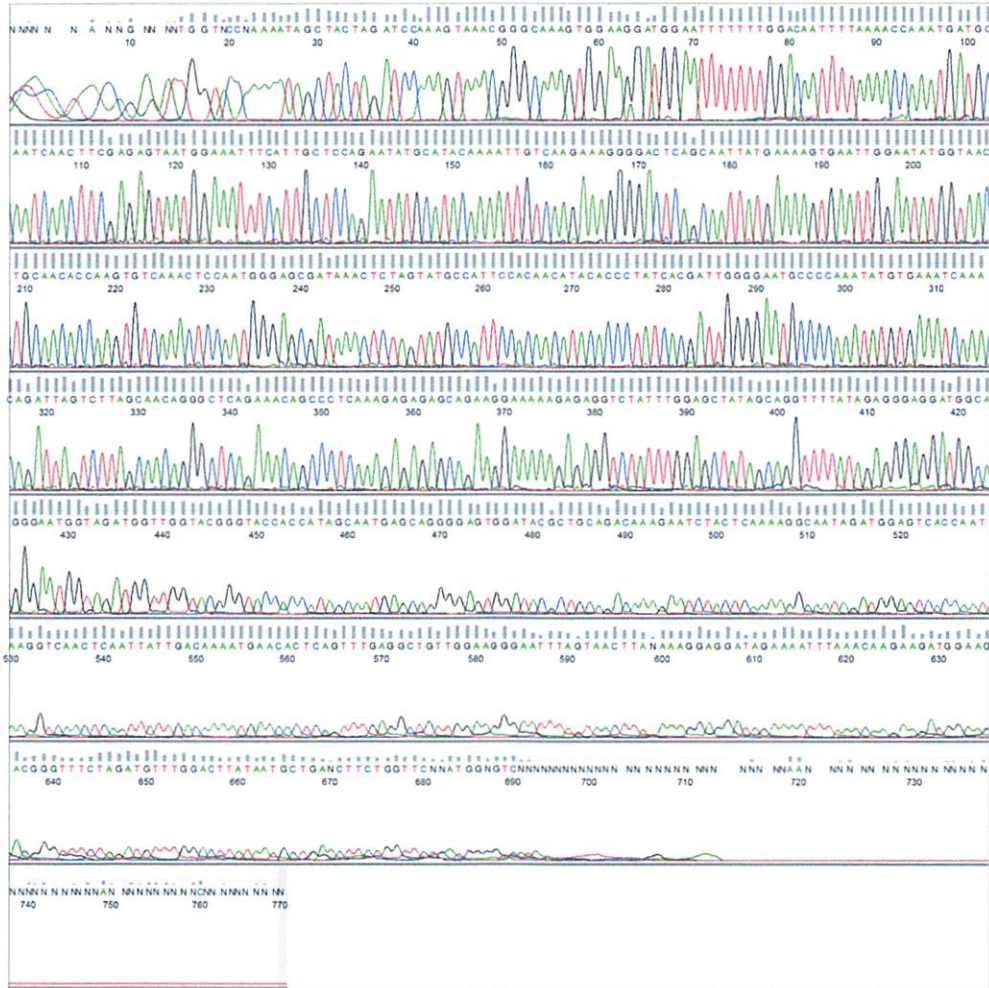
Page 1 of 1

Lanjutan Lampiran 9.

File: 2012-10-02_AI_Situbondo_HA30b_M13F_02_10_2012_003.ab1



Sample Name: AI_Situbondo_HA30b_M13F_02_10_2012 Signal Strengths: A = 1830, C = 1161, G = 1433, T = 1532
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob Lane/Cap#: 3
 Spacing: 11.7633 Matrix: n/a
 Comment: n/a Direction: Native



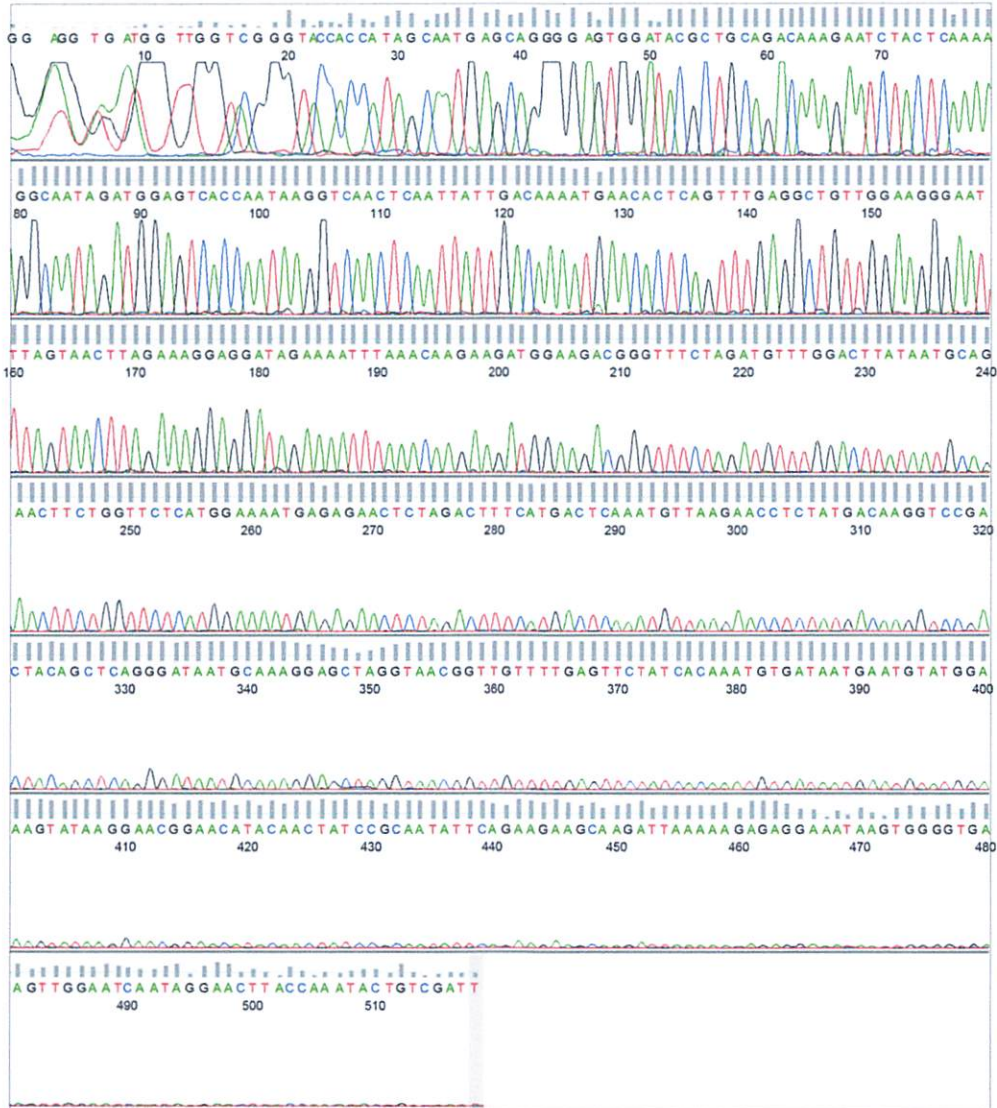
Lanjutan Lampiran 9.

File: 2013-04-03_AI_Situbondo_HA40_M13F_001.ab1



Sample Name: AI_Situbondo_HA40_M13F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.3449
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 70, C = 33, G = 61, T = 47
 Lane/Cap#: 1
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Lanjutan Lampiran 10.

File: 2013-04-09_AI_Situbondo_HA20_R_001.ab1



Sample Name: AI_Situbondo_HA20_R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.3875
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 131, C = 87, G = 139, T = 146
 Lane/Cap#: 1
 Matrix: n/a
 Direction: Native



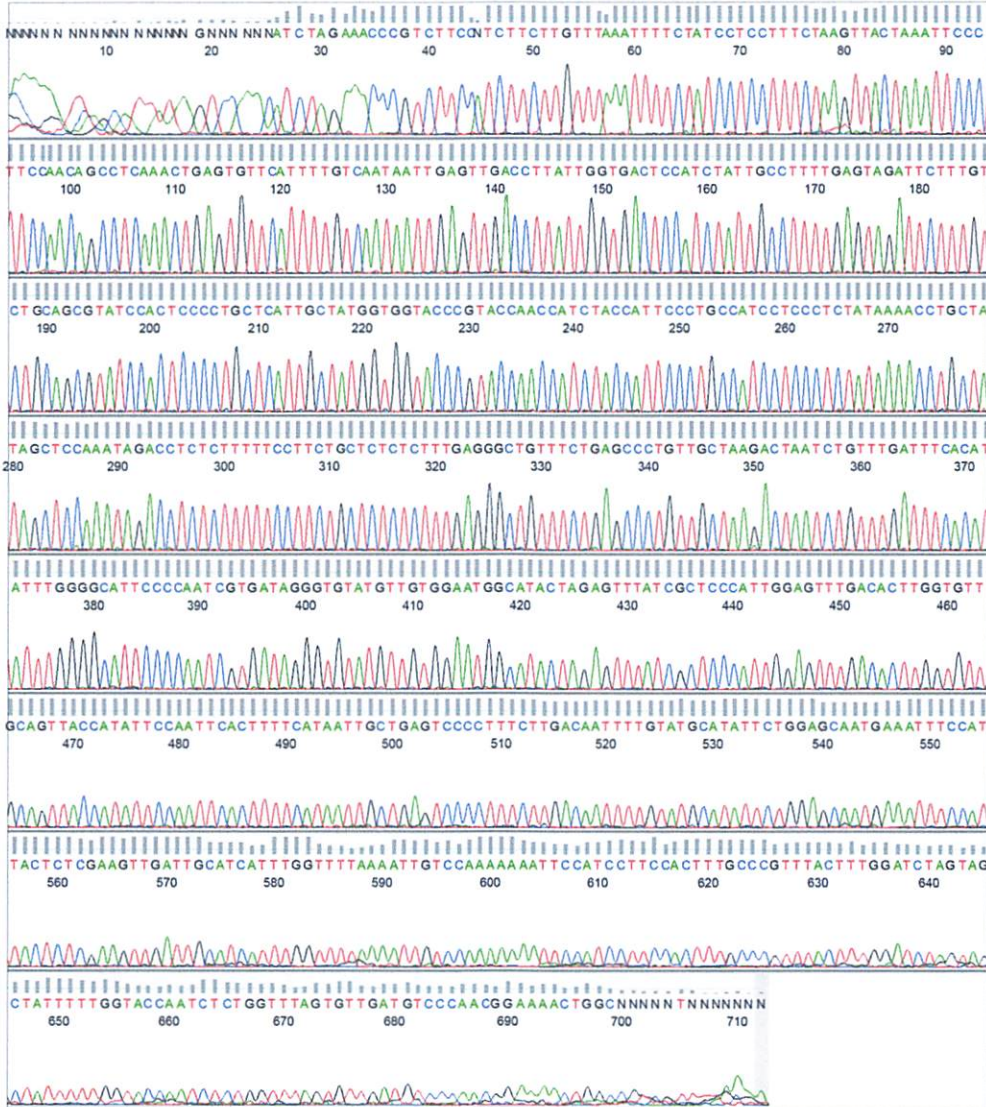
Lanjutan Lampiran 10.

File: 2012-09-05_AI_Situbondo_HA30_M13R_002.ab1



Sample Name: AI_Situbondo_HA30_M13R
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.0767
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 53, C = 58, G = 51, T = 78
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



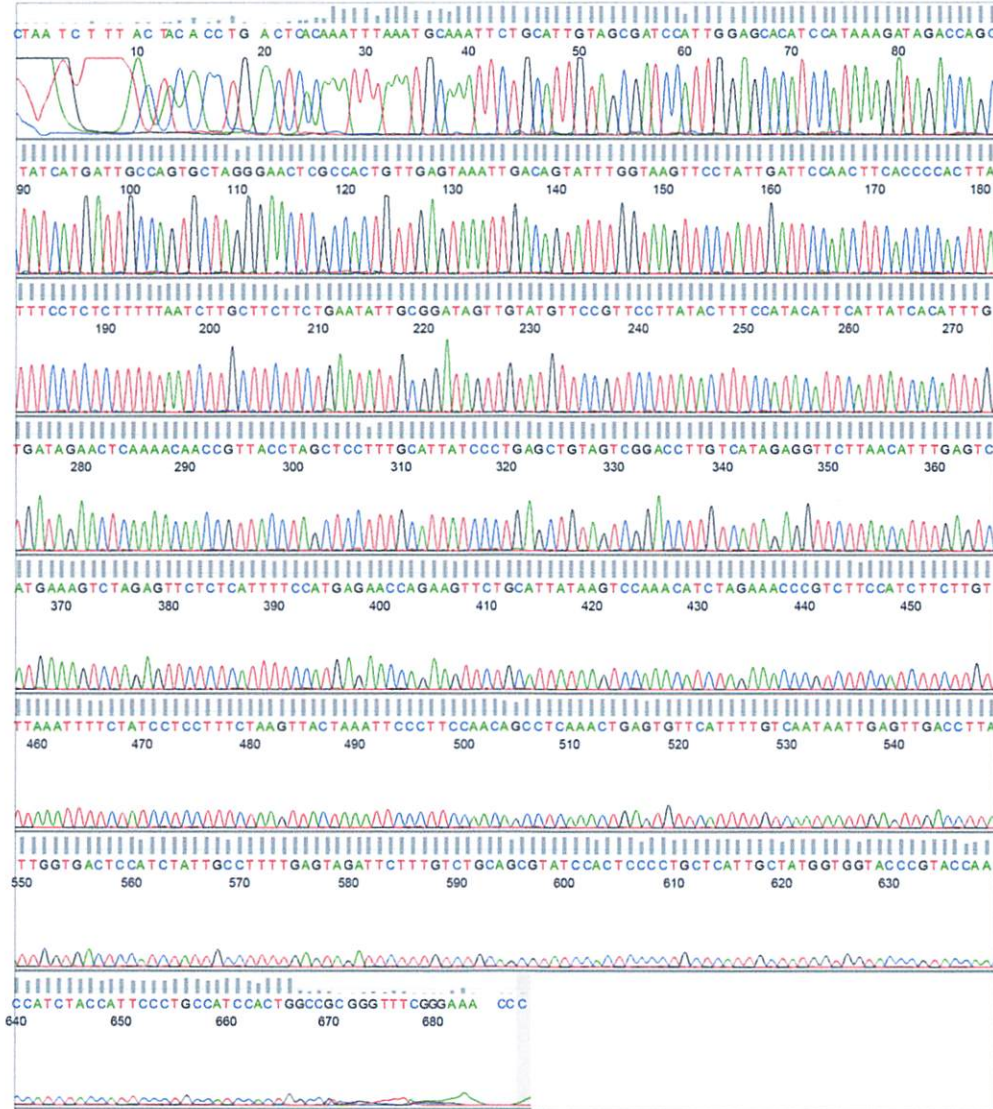
Lanjutan Lampiran 10.

File: 2013-04-03_AI_Situbondo_HA40_M13R_002.ab1



Sample Name: AI_Situbondo_HA40_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13,5233
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 710, C = 565, G = 593, T = 843
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



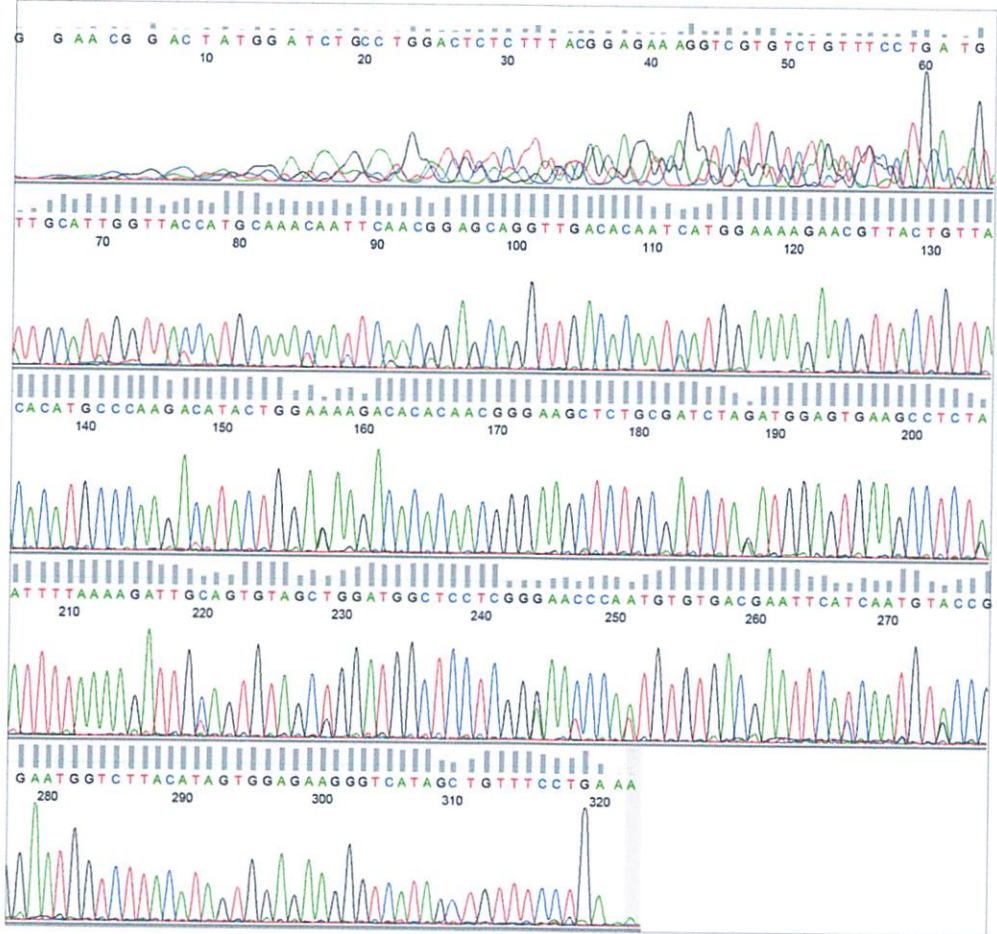
Lampiran 11. Hasil sekuensing isolat Sinjai dengan primer Forward.

File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA10_M13F_001.ab1



Sample Name: AI_Sinjai_HA10_M13F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 12.2679
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 810, C = 645, G = 827, T = 659
Lane/Cap#: 1
Matrix: n/a
Direction: Native



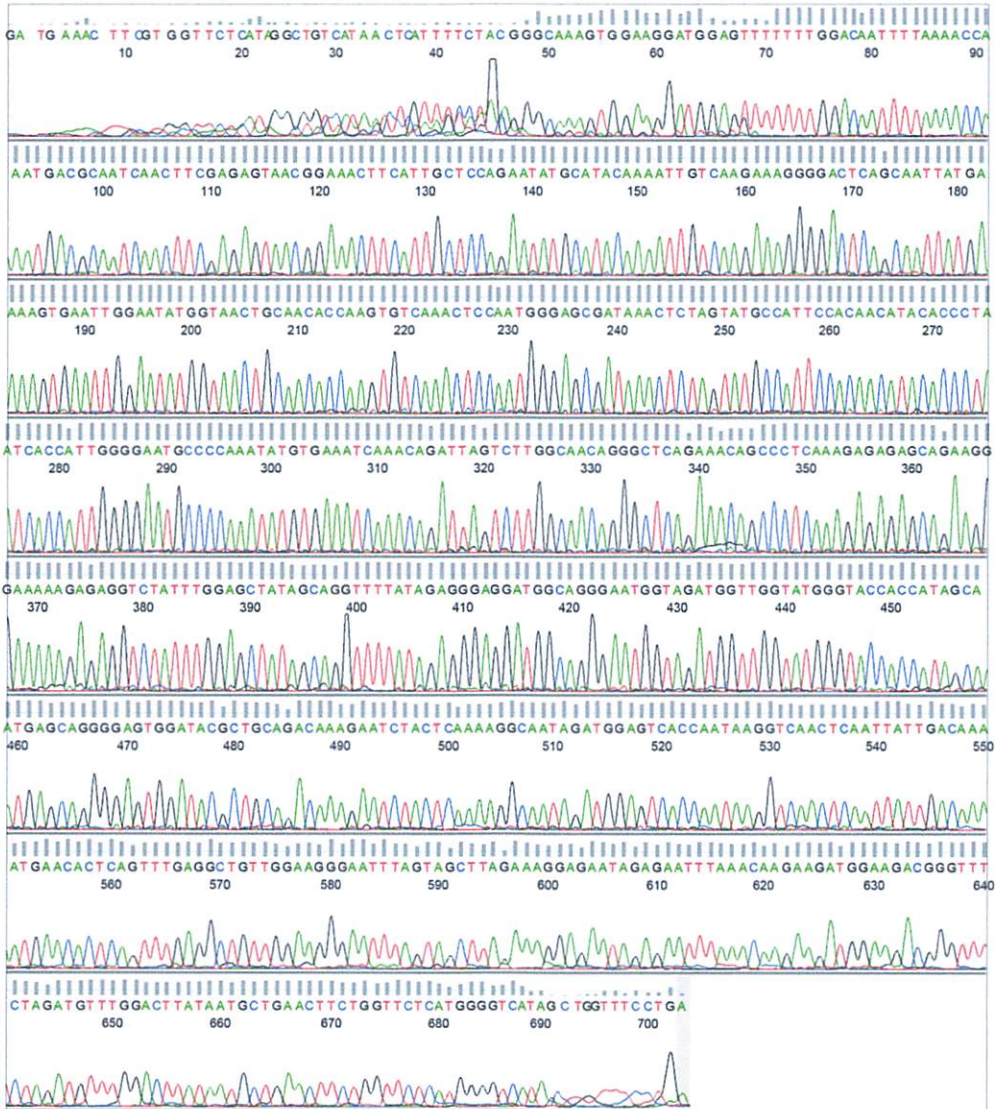
Lanjutan Lampiran 11.

File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA30_M13F_001.ab1



Sample Name: AI_Sinjai_HA30_M13F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 12.9757
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 275, C = 161, G = 217, T = 207
 Lane/Cap#: 1
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Lanjutan Lampiran 11.

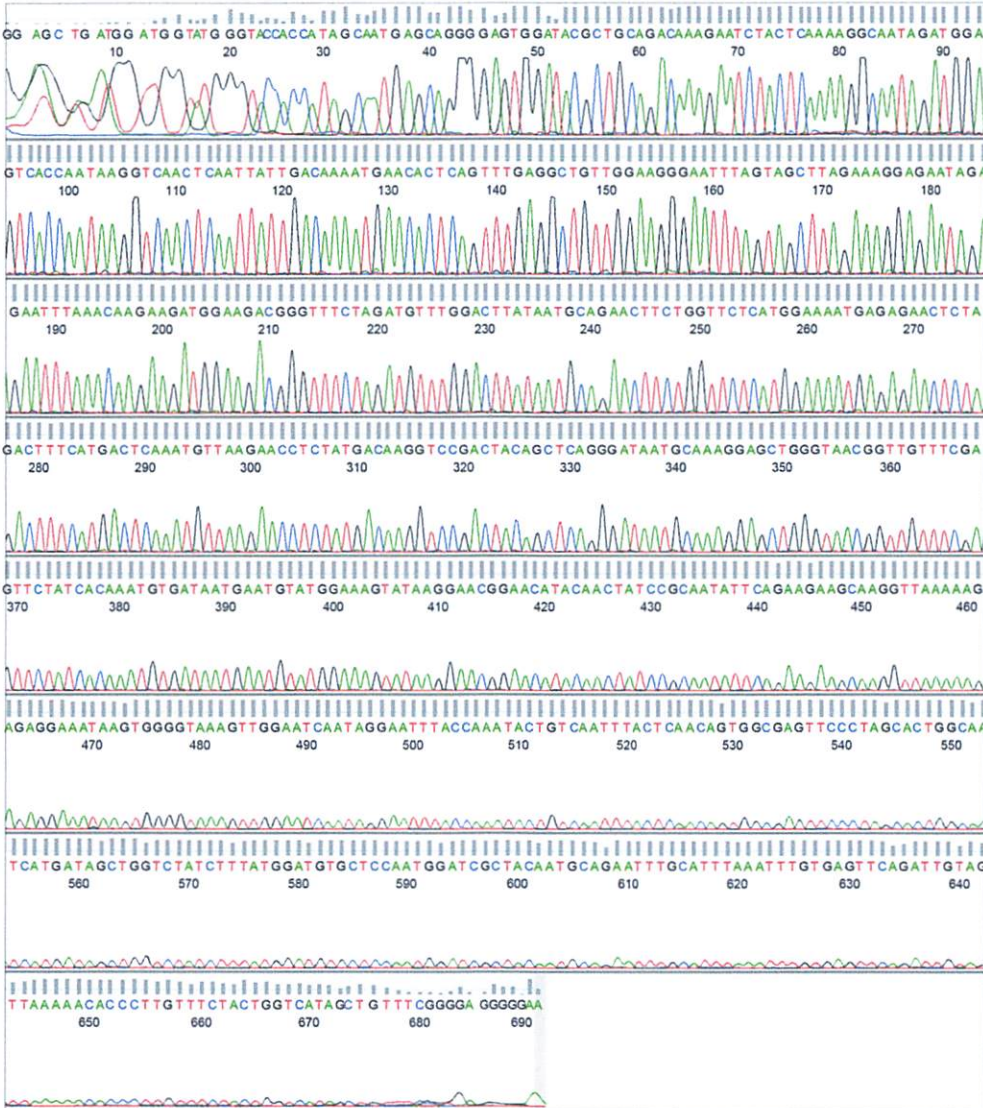
File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA40_M13F_003.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Sinjai_HA40_M13F
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 12.8808
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 561, C = 279, G = 400, T = 402
 Lane/Cap#: 3
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 7:02PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

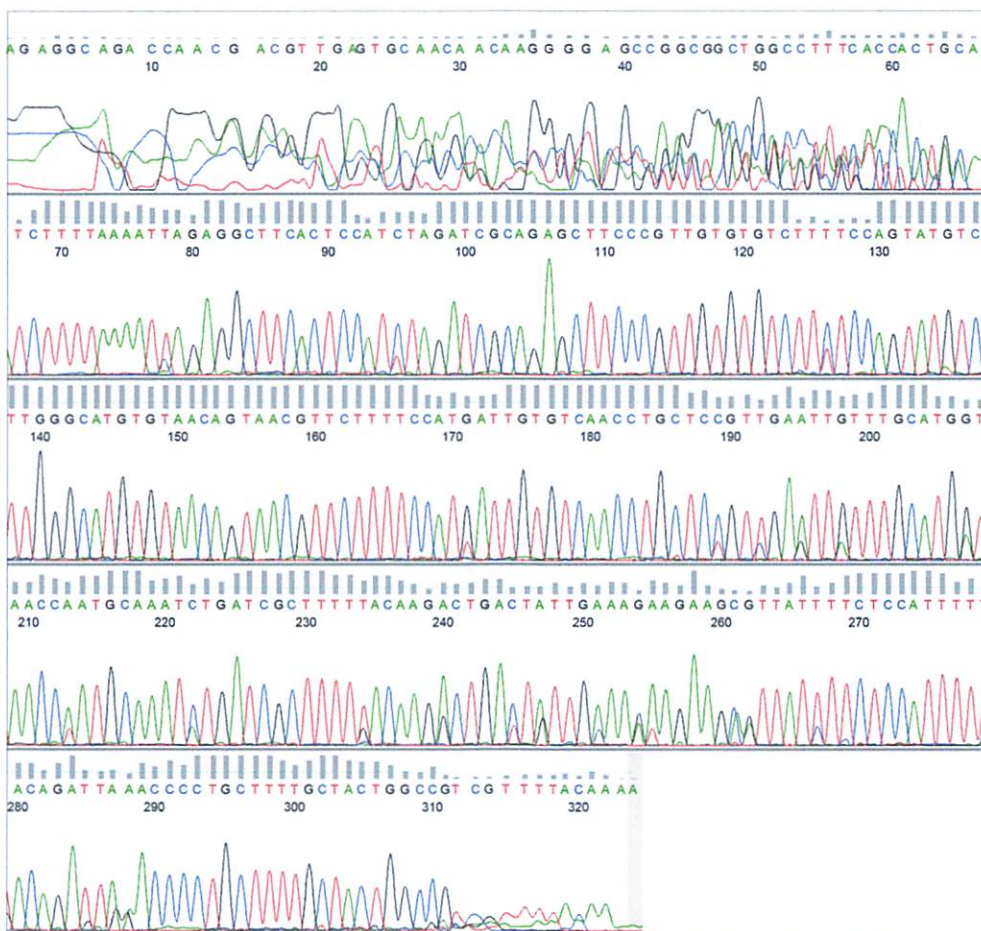
Lampiran 12. Hasil sekuensing isolat Sinjai dengan primer Reverse.

File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA10_M13R_002.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: AI_Sinjai_HA10_M13R
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.4746
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 2019, C = 2056, G = 2235, T = 2355
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



Lanjutan Lampiran 12.

File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA20_M13R_004.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Sinjai_HA20_M13R

Signal Strengths: A = 1445, C = 1326, G = 1525, T = 1704

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

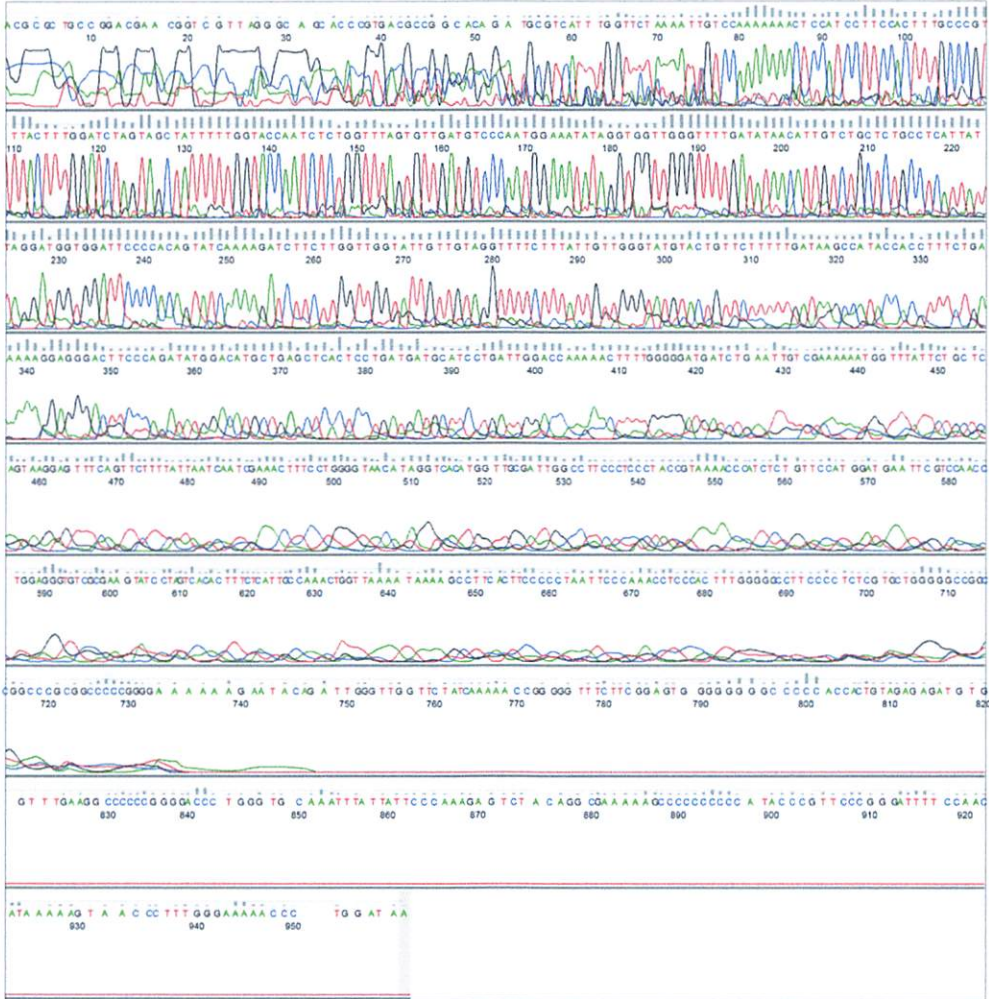
Lane/Cap#: 4

Spacing: 12.1979

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Lanjutan Lampiran 12.

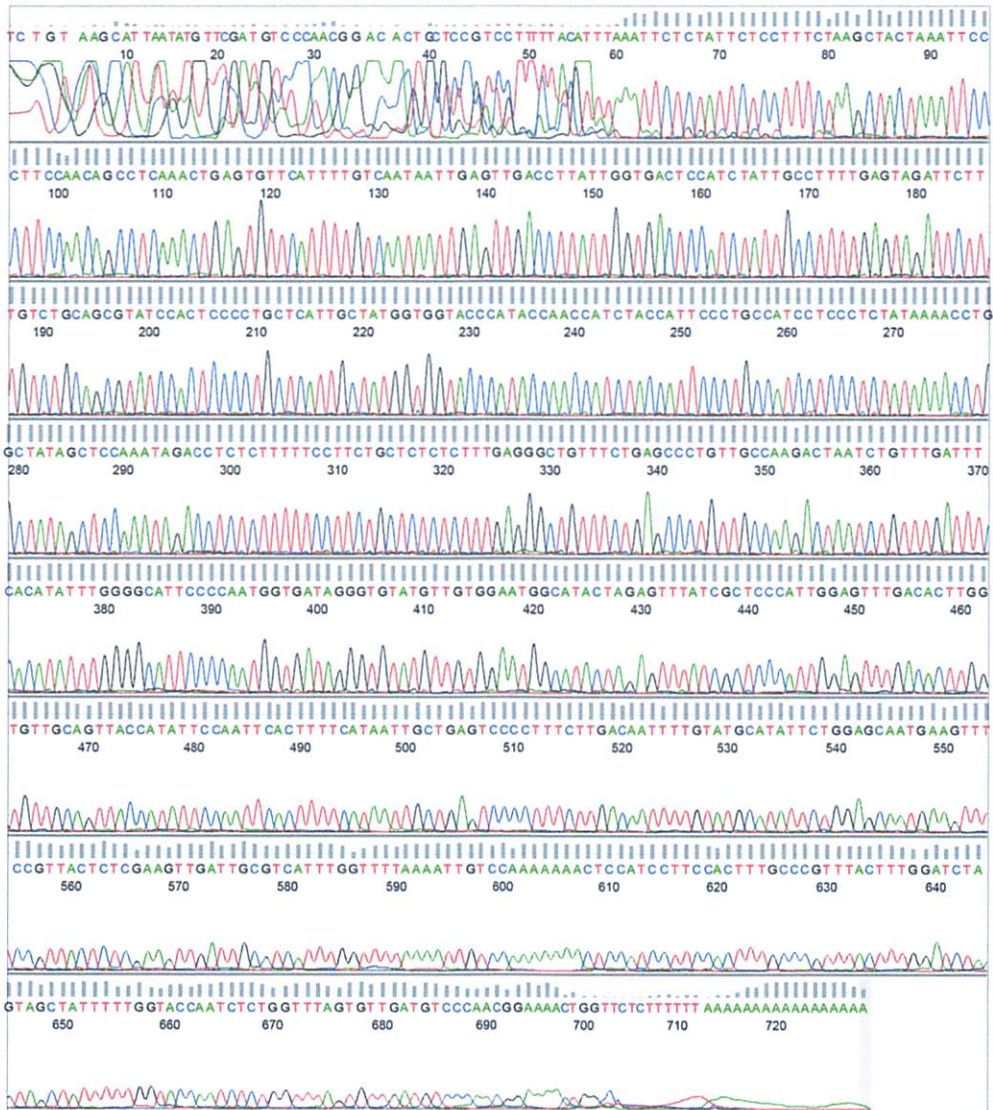
File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA30_M13R_002.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Sinjai_HA30_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 12.6838
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1129, C = 1290, G = 1065, T = 1586
 Lane/Cap#: 2
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 6:54PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Lanjutan Lampiran 12.

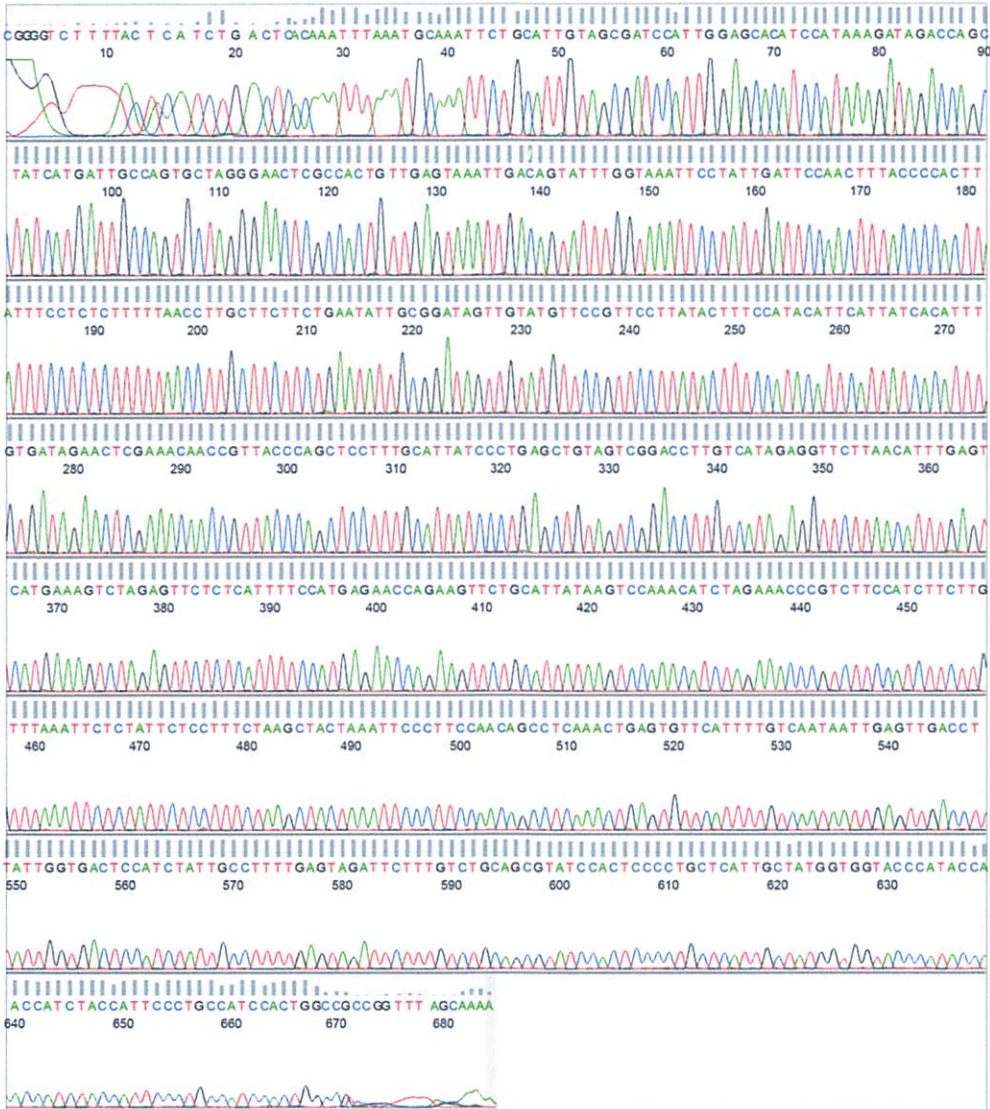
File: 2013-04-02_AI_Sinjai_HA40_M13R_004.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: AI_Sinjai_HA40_M13R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 12.6837
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 491, C = 459, G = 403, T = 580
 Lane/Cap#: 4
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Jul 15, 2013 7:06PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Lampiran 13. Data sekuen antar isolat

A/Goose/Guangdong/1/96	GAT	CAG	ATT	TGC	ATT	GGT	TAC	CAT	GCA	AAC	AAC	TCG	ACA	GAG	CAG	GTT	GAC	ACA	ATA	ATG	[60]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006T	..AC	...	[60]
A/chicken/Legok/2003T	..A	[60]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013T	..A	..GC	...	[60]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012T	..A	..GC	...	[60]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011T	..A	..GC	...	[60]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011T	..A	..GC	...	[60]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011T	..A	..GC	...	[60]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011T	..A	..GC	...	[60]
A/Goose/Guangdong/1/96	GAA	AAG	AAC	GTT	ACT	GTT	ACA	CAT	GCC	CAA	GAC	ATA	CTG	GAA	AAG	ACA	CAC	AAT	GGG	AAG	[120]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006C	[120]
A/chicken/Legok/2003C	[120]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013C	[120]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012CG	[120]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011G	[120]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011G	[120]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011G	[120]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011GC	[120]
A/Goose/Guangdong/1/96	CTC	TGC	GAT	CTA	AAT	GGA	GTG	AAG	CCT	CTC	ATT	TTG	AGA	GAT	TGT	AGT	GTA	GCT	GGA	TGG	[180]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	G..AA	[180]
A/chicken/Legok/2003	G..AA	[180]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	G..AA	..AC	[180]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	G..AA	..AC	[180]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	G..AA	..AC	[180]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	G..AA	..AC	[180]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	G..AA	..AC	[180]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	G..AA	..AC	[180]
A/Goose/Guangdong/1/96	CTC	CTC	GGA	AAC	CCT	ATG	TGT	GAC	GAA	TTC	ATC	AAT	GTG	CCG	GAA	TGG	TCT	TAC	ATA	GTG	[240]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006GAA	..A	..A	[240]
A/chicken/Legok/2003GAA	[240]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013GAA	..g	[240]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012GAA	..g	[240]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011GAA	..a	[240]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011GAA	..a	[240]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011GAA	..A	[240]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011GAA	..g	[240]

A/Goose/Guangdong/1/96	GAG	AAG	GCC	AGT	CCA	GCC	AAT	GAC	CTC	TGT	TAC	CCA	GGG	GAT	TTC	AAC	GAC	TAT	GAA	GAA	[300]
A/chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	AG	A	A	A	A	A	A	A	[300]
A/chicken/Legok/2003	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[300]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[300]
A/chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[300]
A/chicken/Mataram-012/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[300]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[300]
A/Goose/Guangdong/1/96	CTG	AAA	CAC	C1A	TTG	AGC	AGA	ACA	AAC	CAT	TTT	GAG	AAA	ATT	CAG	ATC	ATC	CCC	AAA	AGT	[360]
A/chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	GA	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Legok/2003	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Mataram-012/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[360]
A/Goose/Guangdong/1/96	TCT	TGG	TCC	AAT	CAT	GAT	GCC	TCA	TCA	GGG	GGG	AGC	TCA	GCA	TGT	CCA	TAC	CAT	GGG	AGG	[420]
A/chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	GA	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Legok/2003	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Mataram-012/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[420]
A/Goose/Guangdong/1/96	TCC	TCC	TTT	TTC	AGA	AAT	GTG	GTA	TGG	CTT	ATC	AAA	AAG	AAC	AGT	GCA	TAC	CCA	ACA	ATA	[480]
A/chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Legok/2003	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Mataram-012/Pusvetma/2011	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	[480]

Lanjutan Lampiran 13.

A/Goose/Guangdong/1/96	AAG	AGG	AGC	TAC	AAT	AAT	ACC	AAC	CAA	GAA	GAT	CTT	TTA	GTA	CTG	TGG	GGG	ATT	CAC	CAT	[540]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006AAGGA	[540]
A/chicken/Legok/2003AG	[540]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013AA	.C.CG	A..A	..C	[540]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012AA	.C.CG	A..A	[540]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011AA	.C.CG	A..A	[540]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011AA	.C.CG	A..A	[540]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011AA	.C.CG	A..A	[540]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011AA	.C.CG	A..A	[540]
A/Goose/Guangdong/1/96	CCT	AAT	GAT	GCG	GCA	GAG	CAG	ACA	AAG	CTC	TAT	CAA	AAC	CCA	ACC	ACT	TAC	ATT	TCC	GTT	[600]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	T..	...	A..	.T.	.A.G.	..AT.	..C	..T	A..	[600]
A/chicken/Legok/2003G.	..AC	..T	[600]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	A..	.A.T.	T.AC	..T	A..	...	[600]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	A..	.A.T.	..AC	..T	A..	...	[600]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	A..	.A.T.	..AC	..T	A..	...	[600]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	A..	.A.T.	..AC	..T	A..	...	[600]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	A..	.A.T.	..AC	..T	A..	...	[600]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	A..	.A.T.	..AC	..T	A..	...	[600]
A/Goose/Guangdong/1/96	GGA	ACA	TCA	ACA	CTG	AAC	CAG	AGA	TTG	GTT	CCA	GAA	ATA	GCT	ACT	AGA	CCC	AAA	GTA	AAC	[660]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	..GAA	...	A..	T..	C..	[660]
A/chicken/Legok/2003	..GAA	...	A..	T..	[660]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	..GAA	...	A..	T..	[660]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	..G	T.AA	...	A..	T..	[660]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	..GAA	...	A..	T..	[660]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	..GAA	...	A..	T..	[660]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	..GAA	...	A..	T..	[660]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	..GAA	...	A..	T..	[660]
A/Goose/Guangdong/1/96	GGG	CAA	AGT	GGA	AGA	ATG	GAG	TTC	TTC	TGG	ACA	ATT	TTA	AAG	CCG	AAT	GAT	GCC	ATC	AAT	[720]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006GTT	..T	A.A	..C	[720]
A/chicken/Legok/2003GAA	..C	[720]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013GT	..TA	..AC	..AC	[720]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012GA	..T	..TA	..AAC	[720]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011GA	..T	..TA	..AAC	[720]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011GA	..T	..TA	..AAC	[720]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011GA	..T	..TA	..AAC	[720]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011GT	..T	C.A	..AAC	[720]

[780]	A/Goose/Guangdong/1/96	TTC	GAG	AGT	AAT	GGA	AAT	TTC	ATT	GCT	CCA	GAA	TAT	GCA	TAC	AAA	ATT	GTC	AAG	AAA	GGG
[780]	A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006
[780]	A/Chicken/Legok/2003
[780]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013
[780]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2012
[780]	A/Chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011
[780]	A/Chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011
[780]	A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011
[840]	A/Goose/Guangdong/1/96	GAC	TCA	GCA	ATT	ATG	AAA	AGT	GAA	TTG	GAA	TAT	GGT	AAC	TGC	AAC	ACC	AAG	TGT	CAA	ACT
[840]	A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006
[840]	A/Chicken/Legok/2003
[840]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013
[840]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2012
[840]	A/Chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011
[840]	A/Chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011
[840]	A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011
[900]	A/Goose/Guangdong/1/96	CCA	ATG	GGG	GCG	ATA	AAC	TCT	AGT	ATG	CCA	TTC	CAC	AAC	ATA	CAC	CCC	CCT	ACC	ATC	GGG
[900]	A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006
[900]	A/Chicken/Legok/2003
[900]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013
[900]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2012
[900]	A/Chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011
[900]	A/Chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011
[900]	A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011
[960]	A/Goose/Guangdong/1/96	GAA	TGC	CCC	AAA	TAT	GTG	AAA	TCA	AAC	AGA	TTA	GTC	CCT	GCG	ACT	GGA	CTC	AGA	AAT	ACC
[960]	A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006
[960]	A/Chicken/Legok/2003
[960]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013
[960]	A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2012
[960]	A/Chicken/Mataram-020/Pusvetma/2011
[960]	A/Chicken/Mataram-014/Pusvetma/2011
[960]	A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011

A/Goose/Guangdong/1/96	CCT	CAG	AGA	GAG	AGA	AGA	AGA	AGA	AAA	AAG	AGA	GGA	GTA	TAT	GGG	TAC	CAC	CAT	AGC	AAT	GAG	CAG	[1020]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[1020]
A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011	[1020]
A/Chicken/Mataran-012/Pusvetma/2011	[1020]
A/Chicken/Mataran-014/Pusvetma/2011	[1020]
A/Chicken/Mataran-020/Pusvetma/2011	[1020]
A/Chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	[1020]
A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	[1020]
A/Chicken/Legok/2003	[1020]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[1020]
A/Goose/Guangdong/1/96	GGG	AGT	GGA	TAC	GCT	GCA	GAC	AAA	GAA	TCC	ACT	CAA	AAG	GCA	ATA	GAT	GGA	GTC	ACC	AAT			[1140]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[1140]
A/Chicken/Legok/2003	[1140]
A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	[1140]
A/Chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	[1140]
A/Chicken/Mataran-020/Pusvetma/2011	[1140]
A/Chicken/Mataran-014/Pusvetma/2011	[1140]
A/Chicken/Mataran-012/Pusvetma/2011	[1140]
A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011	[1140]
A/Goose/Guangdong/1/96	AAG	GTC	AAC	TGC	ATC	ATT	GAC	AAA	ATG	AAC	ACT	CAG	TTT	GAG	GCC	GTT	GGA	AGG	GAA	TTT			[1200]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[1200]
A/Chicken/Legok/2003	[1200]
A/Chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	[1200]
A/Chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	[1200]
A/Chicken/Mataran-020/Pusvetma/2011	[1200]
A/Chicken/Mataran-014/Pusvetma/2011	[1200]
A/Chicken/Mataran-012/Pusvetma/2011	[1200]
A/Chicken/Lembata/Pusvetma/2011	[1200]

Lanjutan Lampiran 13.

A/Goose/Guangdong/1/96	AGT	GTA	AAA	AAC	GGA	ACG	TAT	GAC	TAC	CCG	CAG	TAT	TCA	GAA	GAA	GCA	AGA	CTA	AAC	AGA	[1500]	
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	...	A..	.G.C	A..	..T	T..	..A	...	[1500]	
A/chicken/Legok/2003	...	A..	.G.	A..	T..	..G	...	[1500]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	...	A..	.GGA	..C	A..	..TAG	T..	..A	...	[1500]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	...	A..	.GGA	..C	A..	..TA	T..	..A	...	[1500]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	...	A..	.GGA	..C	A..	..TA	T..	..A	...	[1500]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	...	A..	.GGA	..C	A..	..TA	T..	..A	...	[1500]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	...	A..	.GG	G..A	..C	A..	..TA	T..	..A	...	[1500]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	...	A..	.GGA	..C	A..	..TA	T..	..A	...	[1500]
A/Goose/Guangdong/1/96	GAG	GAA	ATA	AGT	GGA	GTA	AAA	TTG	GAA	TCA	ATG	GGA	ACT	TAC	CAA	ATA	CTG	TCA	ATT	TAT	[1560]	
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006GA	[1560]
A/chicken/Legok/2003AT	[1560]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013GGATC	[1560]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012G	..G	..GAC	[1560]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011G	..G	..GAC	[1560]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011G	..G	..GAC	[1560]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011G	..G	..GAC	[1560]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011G	..GAC	[1560]
A/Goose/Guangdong/1/96	TCA	ACA	GTG	GCG	AGT	TCC	CTA	GCA	CTG	GCA	ATC	ATG	GTA	GCT	GGT	CTA	TCT	TTA	TGG	ATG	[1620]	
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	A.G	[1620]
A/chicken/Legok/2003	A.G	[1620]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	A..	[1620]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	A..	[1620]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	A..	[1620]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	A..	[1620]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	A..	[1620]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	A..	[1620]
A/Goose/Guangdong/1/96	TGC	TCC	AAT	GGA	TCG	TTA	CAA	TGC	AGA	ATT	TGC	ATT	TAA	[1659]								
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[1659]								
A/chicken/Legok/2003	[1659]								
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	C..	[1659]								
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	C..	[1659]								
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	C..	[1659]								
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	C..	[1659]								
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	C..	[1659]								
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	C..	[1659]								

Lampiran 14. Data asam amino antar isolat

A/Goose/Guangdong/1/96	DQICIGYHAN	NSTEQVDTIM	EKNVTVTTHAQ	DILEKTHNGK	LCDLNGVKPL	ILRDCSVAGW	[60]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006D.....	[60]
A/chicken/Legok/2003D.....	[60]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013D.....	..K.....	[60]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012D.....	..K.....	[60]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011D.....	..K.....	[60]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011D.....	..K.....	[60]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011D.....	..K.....	[60]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011D.....	..K.....	[60]
A/Goose/Guangdong/1/96	LLGNPMCDEF	INVPEWSYIV	EKASPANDLC	YPGDFNDYEE	LKHLLSRTNH	FEKIQIIPKS	[120]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006K.Q.....T....	...S.....IK.R.....	[120]
A/chicken/Legok/2003N.....	...N.....I..	[120]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013N.T...	...S.....I..	[120]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012N.T...	...S.....I..	[120]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011N.T...	...S.....I..	[120]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011N.T...	...S.....I..	[120]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011N.T...	...S.....I..	[120]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011N.T...	...S.....I..	[120]
A/Goose/Guangdong/1/96	SWSNHDASSG	VSSACPYHGR	SSFFRNVVWL	IKKNSAYPTI	KRSYNNNTNQE	DLLVLWGIHH	[180]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	D..D.E..L.L.S	P.....T....	.K..K.....	[180]
A/chicken/Legok/2003	..D.E....Q.KT....	[180]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	...E....L.S	P.....T....	.KT.....	..I.....	[180]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	..D.E....L.S	P.....T....	.KT.....	..I.....	[180]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	..D.E....L.S	P.....T....	.KT.....	..I.....	[180]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	..D.E....L.S	P.....T....	.KT.....	..I.....	[180]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	..D.E....L.S	P.....T....	.KT.....	..I.....	[180]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	..D.E....L.S	P.....T....	.KT.....	..I.....	[180]
A/Goose/Guangdong/1/96	PNDAAEQTKL	YQNPTYISV	GTSTLNQRLV	PEIATRPKVN	GQSGRMEFFW	TILKPNDAIN	[240]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	S.NVE...R.I...IK...S..HD...	...N...T..	[240]
A/chicken/Legok/2003R.K...S...	[240]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	..NE...M.IK...S...	[240]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	..NE...M.IK...S...	[240]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	..NE...M.IK...S...	[240]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	..NE...M.IK...S...	[240]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	..NE...M.IK...S...	[240]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	..NE...M.IK...S...Q.....	[240]

Lanjutan Lampiran 14.

A/Goose/Guangdong/1/96	FESNGNFIAP	EYAYKIVKKG	DSAIMKSELE	YGNCNTKCQT	PMGAINSSMP	FHNIHPLTIG	[300]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006D.....	[300]
A/chicken/Legok/2003	[300]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013I...	[300]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012I...	[300]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011I...	[300]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011I...	[300]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011I...	[300]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011I...	[300]
A/Goose/Guangdong/1/96	ECPKYVKSNR	LVLATGLRNT	PQRERRRKKR	GLFGAIAGFI	EGGWQGMVDG	WYGYHHSNEQ	[360]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006SS....	[360]
A/chicken/Legok/2003S	[360]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013SS....	[360]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012SS....	[360]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011SS....	[360]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011SS....	[360]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011SS....	[360]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011SS....	[360]
A/Goose/Guangdong/1/96	GSGYAADKES	TQKAIDGVTN	KVNSIIDKMN	TQFEAVGREF	NNLERRIENL	NKQMEDGFLD	[420]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006K.....	[420]
A/chicken/Legok/2003K.....	[420]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	SS.....	..K.....	[420]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	S.....	..K.....	[420]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	S.....	..K.....	[420]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	S.....	..K.....	[420]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	S.....	..K.....	[420]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	S.....	..K.....	[420]
A/Goose/Guangdong/1/96	VWTYNAELLV	LMENERTLDF	HDSNVKNLYD	KVRLQLRDNA	KELGNGCFEF	YHKCDNECME	[480]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[480]
A/chicken/Legok/2003	[480]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	[480]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	[480]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011G....	[480]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	[480]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011N....	[480]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	[480]

Lanjutan Lampiran 14.

A/Goose/Guangdong/1/96	SVKNGTYDYP	QYSEEARLNR	EEISGVKLES	MGTYQILSIY	STVASSLALA	IMVAGLSLWM	[540]
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	.IR....N..K.	I.....M.....	[540]
A/chicken/Legok/2003	.IR....N..K.	I.I.....M.....	[540]
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	.IR....N..K.	I.I.....I.....	[540]
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	.IR....N..K.	I.....I.....	[540]
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	.IR....N..K.	I.....I.....	[540]
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	.IR....N..K.	I.....I.....	[540]
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	.IRD...N..K.	I.....I.....	[540]
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	.IR....N..K.	I.....I.....	[540]
A/Goose/Guangdong/1/96	CSNGSLQCRI	CI*	[553]				
A/Chicken/West_Java/PWT-WIJ/2006	[553]				
A/chicken/Legok/2003	[553]				
A/chicken/Sinjai/Pusvetma/2013	[553]				
A/chicken/Situbondo.1/Pusvetma/2012	[553]				
A/chicken/Mataram-O20/Pusvetma/2011	[553]				
A/chicken/Mataram-O14/Pusvetma/2011	[553]				
A/chicken/Mataram-O12/Pusvetma/2011	[553]				
A/chicken/Lembata/Pusvetma/2011	[553]				

Lampiran 15. Hasil uji BLAST

Firefox v NCBI BlastA/chicken/Lembata/Puyetm... + blst.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments

	Max score	Total score	Query cover	E value	Accession
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/reef sparrow/indonesia/JA100132010(H5N1)) HA gene for hemagglutinin, complete cds	3110	3110	98%	0.0	AF621352.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/chicken/Banten/Stc-Fach/2008(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds	2955	2955	98%	0.0	GU183461.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC1031RE/2007(H5N1)) segment 4 sequence	2955	2955	98%	0.0	CY019376.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC887/2006(H5N1)) segment 4 sequence	2955	2955	100%	0.0	CY017688.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC938E/2006(H5N1)) segment 4 sequence	2955	2955	100%	0.0	CY017646.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC938/2006(H5N1)) segment 4 sequence	2955	2955	100%	0.0	CY017638.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/chicken/indonesia/D10014/2010(H5N1)) HA gene for hemagglutinin, complete cds	2939	2939	98%	0.0	AF621353.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/alluscov_duck/Vesi_Liga/Bas_3/2007(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds	2911	2911	98%	0.0	GU183455.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/TL012/2006(H5N1)) hemagglutinin gene, complete cds	2905	2905	98%	0.0	EU015113.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC523/2006(H5N1)) segment 4 sequence	2902	2902	98%	0.0	CY014311.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/52/005(H5N1)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds	2900	2900	100%	0.0	CY116546.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC1047S/2007(H5N1)) segment 4 sequence	2900	2900	98%	0.0	CY019432.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC1047/2007(H5N1)) segment 4 sequence	2900	2900	98%	0.0	CY019424.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC10461/2007(H5N1)) segment 4 sequence	2900	2900	98%	0.0	CY019416.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC835/2006(H5N1)) segment 4 sequence	2900	2900	100%	0.0	CY017662.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/52005(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds	2898	2898	99%	0.0	EU146922.1
<input type="checkbox"/> Influenza A virus (A/indonesia/CDC7F9/2006(H5N1)) segment 4 sequence	2896	2896	100%	0.0	CY014543.2

7236 20/07/2013