

**Peran *Coding* dan *Non-Coding Region* dari Gen Polimerase Kompleks
Dalam Adaptasi Virus Avian Influenza**

*(THE ROLE OF CODING AND NON-CODING REGION OF POLYMERASE
GENE COMPLEX IN ADAPTATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS)*

Gusti Ayu Yuniati Kencana

Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Udayana

Jln. P.B. Sudirman, Denpasar, Tlp (0361) 223791

Email : yuniatikencana@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit avian influenza (AI) merupakan penyakit unggas yang sangat berbahaya karena bersifat zoonosis dan mematikan pada manusia. Agen penyebabnya adalah virus dari familia *Orthomyxoviridae* genus *influenzavirus* tipe A subtype H5N1. Patogenitas virus AI bersifat poligenik artinya virulensi virus AI ditentukan oleh semua gen. Peranan *non-coding* dan *coding region* dari gen polimerase kompleks dikaji dalam tulisan ini. Asam amino posisi 627 gen PB2 merupakan faktor adaptasi virus AI pada mamalia. Protein PB1 berperan sebagai pusat aktivitas katalisasi enzim polimerase virus. Polimerase basik-1 berikatan pada ujung terminal dari vRNA dan cRNA serta menunjukkan aktivitas endonuklease, telah diidentifikasi pada E508, E519, dan D522. Protein PA berperan dalam menunjang aktivitas biologi gen polimerase kompleks namun mekanisme kerjanya dalam transkripsi, replikasi, dan poliadenilasi belum diungkapkan sejelas PB1 dan PB2. Peran lain dari protein PA adalah sebagai kompleks polimerase RNA karena mempunyai peran proteolitik protein-protein sel sehingga menekan pembelahan sel. Gen PA juga mempunyai aktivitas serin protease yang telah diidentifikasi pada posisi S624. Hasil analisis sekuens *non-coding region* (NCR) dan *coding-region* (CR) ujung-5' gen gen polimerase kompleks virus AI subtype H5N1 asal unggas dan babi di Indonesia menunjukkan bahwa NCR gen PB2, PB1 dan PA adalah homogen sedangkan pada gen PB1 ada varian dari isolat asal itik A/Duck /Badung 2006. Terjadinya *delesi*, *insersi*, dan *mutasi* pada NCR maupun CR gen polimerase kompleks berpeluang untuk memicu timbulnya perubahan genetik virus yang berpotensi terhadap perubahan sifat biologi virus AI. Peranan *non-coding* atau *coding region* ujung-3' dari gen polimerase kompleks perlu dikaji lebih lanjut.

Kata kunci: *non-coding region*, *coding-region*, Gen polimerase kompleks,

avian influenza.

ABSTRACT

Avian influenza (AI) is an avian diseases that can cause deadly human infection. The disease is caused by Orthomyxoviridae virus, genus influenzavirus type A, subtype H5N1. Pathogenicity of AI virus is polygenic, which means AI virus is determined by all the genes. Here the role of coding region (CR) and non-coding region (NCR) of polymerase gene complex is critically reviewed. The coding region of the polymerase genes can be explained as follows. The amino acid position 627 PB2 gene is a factor adaptation of AI viruses in mammals. Polymerase basic-1 (PB1) protein acts as a central activity of the enzyme catalyzing the viral polymerase. Polymerase Basic-1 binds to the terminal end of the vRNA and the cRNA and shows endo-nuclease activity. The activity has been identified on the E508, E519, and D522. Polymerase Acid (PA) proteins play a role in supporting the biological activity of the polymerase gene complex, but its mechanism of action in transcription, replication has not been disclosed as clear. Another role of the PA protein is forming a complex of RNA polymerase and express an proteolytic role of cell proteins that suppress cell division. Polymerase acid gene has also serine protease activity has been identified at position S624. The non-coding region might also play role in the pathogenecity of influenza virus. The results of sequence analysis of non-coding region (NCR) at 5'-end of polymerase gene complex of AI virus subtype H5N1 from poultry and pigs in Indonesia showed that the NCR genes PB2, PB1 and PA are homogeneous, whereas there are variants of the PB1 gene isolates from ducks A / Duck / Badung, 2006. Occurrence of deletions, insertions, and mutations in the NCR and CR polymerase complex genes may likely lead to genetic changes in viruses which potentially also change the nature of biology of AI virus. The study on the 3'-end of the genes needs to be carried out.

Keywords: coding region, non-coding region , polymerase gene complex,
Avian influenza

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penyakit *Avian Influenza* (AI) di Indonesia lebih dikenal dengan nama “ flu burung”. Agen penyebab flu burung adalah virus AI sub tipe H5N1 yang sangat ganas (*highly pathogenic avian influenza*=HPAI) dari famili *Orthomyxoviridae*, genus influenza tipe A (Webster *and* Hulse, 2004). Kasus flu burung pada unggas di Indonesia telah terjadi sejak tahun 2003 (OIE, 2004; WHO, 2005; Smith *et al.*, 2006) bahkan tahun 2003 sampai 2006 telah ditetapkan sebagai kejadian luar biasa (KLB) kasus flu burung. Penyakit flu burung sangat berbahaya karena bersifat zoonosis dan mematikan, baik

pada unggas maupun pada manusia. Derajat keparahan penyakit sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai fatal dan multisistemik (Swayne, 2000).

Di Indonesia, kasus flu burung pertama kali muncul pada peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Wabah penyakit kemudian menyebar ke Jawa Tengah, Jawa Barat, Jawa Timur, Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), Lampung, Bali, serta beberapa daerah di Sumatra dan Kalimantan. Unggas yang terserang juga sangat beragam, diantaranya ayam petelur, ayam pedaging, ayam buras, itik, entog, burung puyuh, burung merpati, dan burung merak (WHO, 2005). Kasus AI pertamakali dilaporkan di Bali pada ayam ras (Mahardika *et. al* 2004).

Virus AI ganas subtipe H5N1 telah menyebabkan sampar ayam (*fowl plague*) pada unggas di Eropa, Afrika, dan Asia seperti Vietnam, Thailand, Cina, Jepang, Korea Selatan, Kamboja, Laos, Mesir, Nigeria, dan lain sebagainya (WHO, 2005). Selain menyebabkan kerugian ekonomi yang besar, virus HPAI juga telah terbukti dapat melompati barrier spesies unggas-manusia (Fouchier *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Hulse-Post *et.al.*, 2005; de Jong *and* Hien, 2006). Kasus AI H5N1 pada manusia di Indonesia yang pertama kali telah dikonfirmasi pada bulan Juli 2005 (Kandun *et. al* (2008), bahwa kasus tersebut sumbernya dari virus AI asal unggas, dan 79% dari kasus manusia di Indonesia menunjukkan sejarah kontak langsung maupun tidak langsung dengan unggas yang sakit.

Para ilmuwan sebelum tahun 1997 berpendapat bahwa ada *host-specific barrier* yang akan mencegah virus AI menginfeksi manusia. Penyebabnya diduga karena hospes alami dan reservoir virus AI adalah unggas air liar. Namun fakta yang ada di Indonesia dan berbagai laporan dari berbagai negara di dunia menunjukkan bahwa virus AI subtipe H5N1 dapat menginfeksi serta menimbulkan penyakit pada berbagai jenis unggas. Disamping itu, terjadi pula penularan yang terbatas pada manusia (WHO., 2005; Smith *et al.*, 2006). Peristiwa tersebut menunjukkan bahwa virus AI subtipe H5N1 telah mampu menembus barrier spesies antar hewan unggas, mamalia dan manusia.

Salomon *et al.* (2006) menemukan bahwa pada virus AI subtipe H5N1 asal ayam yang gen PB2-nya disubstitusi dengan gen PB2 dari virus AI subtipe H5N1 asal manusia, konstruksi tersebut menghasilkan virus AI yang spesifitasnya telah berubah dari virus *avian* ke virus AI mamalia. Hasil penelitian tersebut telah membuktikan bahwa gen

polimerse kompleks daerah *coding-region* (CR) berperan penting dalam adaptasi virus influenza asal unggas. Perubahan asam amino gen PB2 pada posisi 627 telah digunakan pula sebagai tanda adanya perubahan virus AI asal unggas ke virus AI mamalia (Naffakh *et al.*, 2000). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa selain pada *coding region* (CR) daerah *non-coding* (NCR) juga berpengaruh terhadap virulensi dan spesifitas hospes virus, misalnya Fujii *et al.* (2005) telah membuktikan bahwa *non-coding region* pada gen NS ikut mempengaruhi transkripsi virus influenza A.

Dari informasi di atas, pemikiran bahwa *coding-region* dan *non-coding region* berperan penting dalam adaptasi virus avian influenza adalah logis. Informasi tentang peran gen polimerase kompleks dalam adaptasi virus influenza ditinjau secara kritis dalam tulisan ini.

VIRUS AVIAN INFLUENZA

Virus penyebab penyakit AI termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*, genus *influenzavirus*, tipe A, merupakan virus dengan materi genetik *single stranded ribo nucleic acid* (ss RNA), berpolaritas negatif, terpisah dalam delapan segmen, dan mempunyai amplop (Webster *and* Hulse, 2004). Virus familia ini dikelompokkan menjadi tiga tipe, yaitu A, B, dan C. Berdasarkan atas sifat antigenik nukleoprotein (NP) dan matriks (M), virus AI diklasifikasikan kedalam tipe A. Pembagian subtipe virus influenza A berdasarkan pada peran antigen permukaan virus yang disebut hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA), kemudian dikelompokkan menjadi 16 subtipe HA (1-16), dan sembilan subtipe NA (1-9) (Fouchier *et al.*, 2004; Webster *and* Hulse, 2004).

Virus AI mempunyai dua protein permukaan, yaitu HA dan NA, dua protein matriks (M1 dan M2), dua protein nonstruktural (NS1 dan NS2), satu nukleoprotein (NP), dan tiga protein polimerase kompleks (PB2, PB1 dan PA). Perbedaan sifat antigenik yang terdapat pada nukleoprotein (NP) dan pada protein matriks (M) dari virus influenza dijadikan dasar untuk mengklasifikasikan menjadi tiga tipe yaitu influenza tipe A, B, dan C (Wright *and* Webster, 2001). Virus influenza tipe A dan B memiliki delapan segmen RNA, sedangkan pada virus influenza C hanya memiliki tujuh segmen RNA. Semua virus AI diklasifikasikan kedalam influenza tipe A (Harimoto *and* Kawaoka, 2001).

PERANAN CODING REGION GEN POLIMERASE

Tiga segmen terbesar genom virus influenza menyandi protein polimerase kompleks (PB2, PB1 dan PA), segmen satu dan dua terdiri dari 2.341 nukleotida yang menyandi protein dengan 759 asam amino untuk PB2, dan 757 asam amino untuk PB1. Kedua protein tersebut merupakan polimerase basik, masing-masing polimerase basik-2 (PB2) dan polimerase basik-1 (PB1). Segmen ke-3 tersusun atas 2.333 nukleotida, menyandi 715 asam amino yang merupakan polimerase asidik (PA) (Neuman *et al.*, 2004).

Protein PB1 berperan sebagai pusat aktivitas katalisasi enzim polimerase virus. Gen PB1 mengandung motif *conserved* yang khas dari *RNA-dependent RNA polymerase* (Biwas and Nayak, 1994). Polimerase basik-1 berikatan pada ujung terminal dari vRNA dan cRNA dan menunjukkan aktivitas endonuklease (Cianci *et al.*, 1995; Gonzalez and Ortin, 1999a; 1999b; Li *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2003). Tiga asam amino yang esensial untuk aktivitas endonuklease telah diidentifikasi, yaitu E508, E519, dan D522 (Li *et al.*, 2001).

Protein PB2 berperan penting dalam sintesis mRNA dengan cara berikatan dengan *capped mRNA* hospes. Domain yang berikatan dengan struktur tudung mRNA telah dipetakan berlokasi pada asam amino 533-564 (Li *et al.*, 2001), serta wilayah antara asam amino 242-252 (Honda *et al.*, 1999). Fechter *et al.*, (2003), menunjukkan bahwa dua asam amino fenilalanin yaitu F363 dan F404 juga terlibat dalam pengikatan tudung mRNA. Gen PB2 juga mempunyai peran penting dalam replikasi virus, karena mutasi satu asam amino saja pada gugus N-terminalnya akan mempengaruhi replikasi virus influenza (Gastaminza *et al.*, 2003).

Protein PA berperan dalam menunjang aktivitas biologi gen polimerase kompleks namun mekanisme kerjanya dalam transkripsi, replikasi, dan poliadenilasi belum diungkapkan sejelas PB1 dan PB2. Peran lain dari protein PA adalah sebagai kompleks polimerase RNA karena mempunyai peran proteolitik protein-protein sel sehingga menekan pembelahan sel (Sanz-Esquerro *et al.*, 1995; 1996). Polimerase A juga telah diidentifikasi mempunyai aktivitas serin protease dan pusat aktivitas itu telah diidentifikasi pada posisi S624 (Hara *et al.*, 2001). Informasi terbaru tentang peran gen PA dalam transkripsi dan replikasi virus RNA ditemukan pada kajian terminal karboksi

molekul itu. Asam amino H510 ternyata sangat *conserved* pada influenza A, B, dan C, serta Thogotovirus yang diduga sebagai ciri khas endonuklease untuk tudung mRNA (Fodor *et al.*, 2002). Polimerase A juga berperan dalam sintesis RNA karena mutasi asam amino arginin (R) pada posisi 638 menyebabkan terbentuknya RNA yang tidak sempurna (Fodor *et al.*, 2003). Residu asam amino pada ujung terminal N dari gen PA berperan penting dalam stabilitas protein, aktivitas endonuklease, *cap binding* dan *promoter binding* virus (Hara *et al.*, 2006).

Beberapa literatur menyatakan bahwa patogenitas virus AI bersifat poligenik, disebabkan karena virulensinya dipengaruhi oleh beberapa gen, antara lain gen hemagglutinin (HA), gen polimerase kompleks (gen PB2, PB1, dan gen PA), gen neuraminidase (NA), dan gen non struktural (NS). Gen polimerase merupakan faktor adaptasi virus AI pada mamalia (Gabriel *et al.*, 2005). Gen PB2 banyak diulas tentang perannya sebagai determinan *host range* (Kuiken *et al.*, 2006). Perubahan asam amino gen polimerase PB2 daerah CR posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan virus AI asal unggas ke virus AI asal mamalia (Naffakh *et al.*, 2000). Asam amino pada posisi 627 dari gen PB2 mempengaruhi efisiensi replikasi virus AI subtipe H5N1 juga telah dibuktikan oleh Hatta *et al.* (2007). Selain CR dari gen-gen tersebut diatas, Fujii *et al.* (2005) membuktikan bahwa NCR gen NS juga ikut mempengaruhi efisiensi transkripsi pada virus influenza A.

Gabriel *et al.* (2007) menyatakan bahwa akibat mutasi gen polimerase menyebabkan peningkatan aktivitas virus untuk menginfeksi sel yang merupakan faktor determinan dari spesies dan patogenitas hospes. Pendapat senada juga dikemukakan oleh Wasilenko *et al.* (2008) bahwa gen PB1, PB2 dan NP mempengaruhi replikasi virus AI subtipe H5N1 pada ayam. Penelitian tentang patogenitas virus AI subtipe H5N1 pada itik Mallard oleh Hulse-Post *et al.* (2007) menunjukkan bahwa gen PA dan PB1 berhubungan dengan derajat kematian itik.

Fragmen proksimal gen polimerase kompleks adalah NCR atau *up stream coding region*, letaknya diantara elemen *conserved* promotor dan kodon pembuka. Panjang dan komposisi wilayah antara promotor dan kodon pembuka beragam (Neumann and Hobom, 1995). Replikasi dan transkripsi virus dapat dipengaruhi oleh *delesi*, *insersi*, dan mutasi pada wilayah ini dengan cara berinteraksi dengan protein NP dan polimerase

kompleks (Neuman *and* Hobom, 1995). Sekuens motif didaerah NCR segment 7 menstimulasi ekspresi gen untuk menyandi protein (Enami *et al.*, 1994). Hal ini membuktikan bahwa NCR mempengaruhi proses translasi virus. Analogi tersebut diatas menimbulkan pertanyaan apakah NCR dari gen-gen tertentu virus AI subtipe H5N1 diantaranya gen polimerase kompleks juga ikut berpengaruh terhadap efisiensi replikasi virus AI asal mamalia.

PERANAN NON-CODING REGION GEN POLIMERASE

Disamping daerah *coding region*, *non coding region* juga berperan penting dalam adaptasi virus AI. Salomon *et al.* (2006) telah membuktikan bahwa gen plomerase kompleks daerah *coding region* merupakan faktor adaptasi spesies virus AI subtipe H5N1. Peneliti lain, Fujii *et al.* (2005) telah membuktikan bahwa *non-coding region* gen NS juga berperan penting dalam replikasi virus AI. Oleh karena itu penelitian tentang faktor genetik yang mempengaruhi spesifitas dan patogenitas hospes virus AI subtipe H5N1 perlu dilakukan untuk mengetahui keganasan virus flu burung. Posisi NCR dan CR ujung-’5 sampai posisi nukleotida nomor 200-400 setelah kodon pembuka gen penyandi protein polimerase kompleks diyakini berperan sebagai promoter untuk replikasi virus AI. *Ribo Nucleic Acid virus* (vRNA) diubah menjadi *complementary RNA* (cRNA) yang berpolaritas positif atau mRNA. Semua cRNA atau mRNA itu mempunyai komponen yang tidak menyandi protein (*non-coding region/NCR*) *up-stream* kodon pembuka serta fragmen yang menentukan susunan asam amino protein yang disandinya (*open reading frame* atau *coding region/CR*) dari kodon pembuka sampai kodon penghenti (*stop codon*). Dengan teknik RT-PCR, vRNA diubah menjadi cDNA.

Hasil analisis sekuens *non-coding region* dan *coding-region* ujung-’5 gen polimerse kompleks virus AI subtipe H5N1 pada unggas dan babi di Indonesia (Kencana *et al.*, 2008) pada gen PB2, (Kencana *et al.*, 2009) pada gen P1, dan (Kencana *et al.*, 2010) pada gen PA, menunjukkan bahwa NCR gen PB2, PB1 dan PA adalah homogen. Sekuens NCR gen PB2 adalah 5’-AGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAAT-3’. Sekuens NCR gen PA adalah 5’-AGCGAAAGCAGGTACTGATTCAAA-3’. *Non-coding region* gen PB1 pada sebagian besar isolat virus AI yang dianalisis juga stabil dengan sekuens 5’-AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGA-3’. Varian NCR gen PB1

ditemukan pada isolat virus AI asal itik A/Duck/ Badung/2006 dengan sekuens 5'-AGCGAAAGCAGGCAAACTATTTGA-3' (asam nukleat yang polimorfik dicetak miring dan digaris-bawahi)

Substitusi C-7T tersebut perlu dikaji lebih lanjut. Proporsi A/T pada semua isolat yang diteliti adalah 54,2%. Substitusi itu pada isolat Dk/Badung/2006 menyebabkan peningkatan komposisi A/T menjadi 58,3%. *Non Coding Region* gen PB2 mempunyai komposisi A/T yang lebih tinggi, yaitu 66,7%, sedangkan NCR gen PA mempunyai proporsi 58,3%. Wilayah antara promoter dan kodon pembuka (ATG) mempunyai panjang dan komposisi yang beragam. Wilayah antara promoter dan kodon pembuka mempunyai panjang yang seragam dengan sekuens yang juga sebagian besar homolog (*conserved*). Terjadinya *delesi*, *insersi*, dan *mutasi* pada wilayah ini akan dapat mempengaruhi replikasi dan transkripsi virus dengan cara berinteraksi dengan protein NP dan polimerase kompleks.

Selama ini kajian tentang gen polimerase virus avian influenza kebanyakan dilakukan pada daerah ujung -5' meskipun telah diketahui bahwa patogenitas virus AI bersifat poligenik, artinya virulensi virus AI ditentukan oleh semua gen. Akan tetapi, patogenitas lebih banyak dikaitkan dengan produk gen influenza atau *coding region* dari masing-masing gen. Bagian *non-coding* sangat sedikit mendapat perhatian. Apabila dilihat kembali tentang awal terjadinya kasus avian influenza adalah akibat terjadinya mutasi antigenik yang menyebabkan perubahan biologis dari sifat aslinya, seperti terjadinya peningkatan virulensi virus. Selain berpengaruh pada protein virus, mutasi juga berakibat pada perubahan konformasi dari virus RNA seperti pada virus influenza dimana ujung 5' dan ujung 3' membentuk konfigurasi skunder *panhandle* (Gulyaev *et al*, 2007). Perubahan konformasi tersebut berperan pada efisiensi translasi mRNA virus yang selanjutnya berpengaruh terhadap efisiensi replikasi virus yang dipercaya mengawali munculnya kasus avian influenza. Peranan *non-coding* dan *coding region* gen polimerase kompleks perlu dikaji lebih banyak lagi untuk mengungkap misteri penyakit avian influenza

SIMPULAN

Rentang inang virus avian influenza bersifat poligenik artinya semua gen berperan penting dalam penentu keganasan virus. Selain *coding region*, *non coding region* gen polimerase kompleks juga berperan sama pentingnya dalam adaptasi virus avian influenza. Terjadinya *delesi*, *insersi*, dan *mutasi* pada *non coding region* maupun *coding region* gen polimerase kompleks memicu timbulnya perubahan genetik virus yang berpotensi terhadap perubahan sifat biologis virus AI dari sifat aslinya, seperti terjadinya peningkatan virulensi virus.

DAFTAR PUSTAKA

- Biwas, S.K, Nayak, D.P., 1994. Mutational analysis of the conserved motif of influenza A virus polymerase basic protein. *J Virol* 72: 5493-5501.
- Cianci, C., Tiley, L., and Krystal, M. 1995. Differential activation of the Influenza Virus Polymerase via template RNA binding. *J. Virol.* 69: 3995-3999.
- de Jong, M.M., and Hien, T.T. 2006. Avian Influenza A (H5N1). *J. Clin. Virol.* 35: 2-13.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S., and Enami, M., 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol.* 68:1432-1437.
- Fechter, P., Mingay, L., Sharp, J., Chambers, A., Fodor, E., and Brownlee, G.G., 2003. Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap-binding. *J. Biol. Chem.* 278: 20381-20388.
- Fodor, E., Crow, M., Mingay, L.J., Deng, T., Sharps, J., Fechtr, P., and Brown Lee, G.G., 2002. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza RNA polymerase inhibits endonukleolytic cleavage of capped RNAs. *J. Virol* 76: 8989-9001.
- Fodor, E., Mingay, L.J., Crow, M., Deng, T., and Brown Lee, G. G., 2003. A single amino acid mutation in the PA subunit of the RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J. Virol.* 77: 5017-5020.
- Fouchier, R.A.M., 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (5) : 1356-1361
- Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Harimoto, T., and Kawaoka, Y., 2005. Importance of both the Coding and the Segment-Specific Noncoding region of the Influenza A Virus NS Segment for Its Efficient Incorporation into Virions. *J. Virol.* 79 (6): 3766 – 3774.

- Gabriel, G., Dauber, B., Wolf, T., Planz, O., Klenk, H.D., and Stech, J., 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *PNAS*. 102 (51) : 18590-18595.
- Gabriel, G., Abram, M., Keiner, B., Wagner, R., Klenk, H.D., and Stech, J., 2007. Differential Polymerase Activity in Avian and Mammalian Cells Determines Host Range of Influenza Virus. *J. Virol.* 81 (17): 9601 – 9604.
- Gastaminza, P., Perales, B., Falcon, A.M., and Ortin, J., 2003. Mutation in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J. Virol.* 77: 5098-5108.
- Gulyaev, A.P., Heus, H.A., and Olsthoorn, R.C.L., 2007. An RNA Conformational Shift in Recent H5N1 Influenza A Viruses. *Bioinformatics* 23 (3). 272-276.
- Gonzalez, S., and Ortin, J., 1999a. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA :two separate region of the protein contribute to the interaction domain. *J. Virol.* 73: 631-637.
- Gonzalez, S., and Ortin, J., 1999b. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase sub unit recognize vRNA and cRNA template. *J.EMBO.*18: 3767-3775.
- Gulyaev, A.P., Heus, H.A., and Olsthoorn, R.C.L., 2007. An RNA Conformational Shift in Recent H5N1 Influenza A Viruses. *Bioinformatics* 23 (3). 272-276.
- Guo, C.T., Takahashi, N., Yagi, H., Kato, K., Takahashi, T., Yi, S-Q., Chen, Y., Ito, T., Otsuki, K., Kida, H., Kawaoka, Y., Hidari, K.I-P.J., Miyamoto, D., Suzuki, T., and Suzuki, Y., 2007. The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology* . 17 (7): 713–724.
- Hai, L.J., Mei, Z.D., and Ling, W.G., 2006. Highlight the Significance of Genetic Evolution of H5N1 Avian Flu. *Chinese Med. J.* 119 (17): 1458-1464.
- Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H., and Toyoda, T., 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* 6: 87-97
- Hara, K., Schmidt, F.I., Crow, M., and Brownlee, G.G., 2006 Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding and virion RNA promoter binding. *J. Virol.* 80 : 7789-7798.
- Harimoto, T., and Kawaoka, Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (1) : 129-149.

- Harimoto, K.I., Kanazawa, R., Sugii, S., Kawaoka, Y., and Harimoto, T., 2004. The index Influenza A Virus Subtype H5N1 Isolated From a Human in 1997 Differ in Its Receptor Binding Properties from a Virulent Avian Influenza virus. *J. Gen. Virol.* 85 : 1001-1005.
- Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A., 1999. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* 4: 475-485.
- Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seller, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Long, H.T., Naipospos, T.S.P., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., and Webster, R.G., 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *PNAS* 102 (30) : 10682-10687.
- Hulse-Post, D.J., Franks, J., Boyd, K., Salomon, R., Hoffmann, E., Yen, H.I., Webby, R.J., Walker, D., Nguyen, T.D., and Webster, R.G. 2007. Molecular Changes in the Polymerase Genes (PA and PB1) Associated with High Pathogenicity of H5N1 Influenza Virus in Mallard Ducks. *J. Virol.* 81 (16): 8515-8524.
- Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., Kawaoka, Y. 1997. Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J. Virol.* 71: 3357-3362
- Kandun, I.N., Tresnaningsih, E., Purba, W.H., Lee, V., Samaan, G., Harun, S., Soni, E., Septiawati, C., Setiawati, T., Sariwati, E., and Wandra T., 2008. Factors associated with case fatality of human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *The Lancet* 372: 744-749.
- Kencana, G.A.Y., Asmara, W., Tabbu, C.R., dan Mahardika, I.G.N.K., 2008. Amino terminus gen polimerase basik-2 virus avian influenza sub tipe H5N1 asal berbagai spesies hewan di Indonesia. *J. Vet.* 9 (3): 107-114
- Kencana, G.A.Y., Asmara, W., Tabbu, C.R., dan Mahardika, I.G.N.K., 2009. Variasi *non-coding* dan *coding region* ujung -5' cRNA polimerase basik-1 virus avian influenza sub tipe H5N1. *J.Vet.* 10 (1): 17-25.
- Kencana, G.A.Y., Asmara, W., Tabbu, C.R., dan Mahardika, I.G.N.K., 2010. *Non coding region* dan *amino terminus* gen polimerase asidik virus avian influenza sub tipe H5N1 asal hewan di Indonesia. *J.Vet.* 11 (3): 131-137.
- Kobasa D., Wells K., and Kawaoka Y., 2001. Amino acids responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase: relationship to growth in the duck intestine. *J. Virol* 75 : 11773-11780.

- Kuiken, T., Holmes, E.C., Mc Cauley, J., Rimmelzwaan, G.F., Williams, C.S., and Grenfell. 2006. Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 312 : 394-397.
- Li, M.L., Ramirez, B.C., and Krug, R.M., 1998. RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polimerase : Different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *EMBO J.* 17: 5844-5852.
- Li, M.L., Rao, P., and Krug, R.M., 2001. The active site of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J.* 20:2078-2086.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Raharjo, A. P., Puthawathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, AT., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H. T., Hanh, N.T., Webby, R. J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Webster, R. G., and Peiris, J. S., 2004. Genesis of a Highly Pathogenic and Potentially Pandemic H5N1 Influenza Virus in Eastern Asia. *Nature*, 430 : 209-213.
- Mahardika, I G. N. K., Sibang, M., Suamba, M., Adnyana, K.A., Dewi, N. M. S., Meidiyanti, K. A., dan Paulus, Y. A., 2004. Isolasi Virus Influenza pada Ayam Kampung di Bali. *J. Vet.* 5 (1): 35-45.
- Mahardika, I G.N.K., Wibawan, I W.T., Suartha, I N., Suartini, I G.A.A., 2008. Peningkatan Khasiat Vaksin untuk Penanggulangan Flu Burung di Indonesia. Laporan Akhir Program Riset Terapan, Kementerian Riset dan Teknologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar.
- Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., Bernadette, C.C., and Sylvic van der Werf. 2000. Genetic Analysis of The Compatibility Between Polimerase Protein from Human and Avian Strain of Influenza A Viruses. *J.Virol.* 81: 1283-1291.
- Neumann, G. and Hobom, G., 1995. Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *J Gen Virol* 76: 1709-1717.
- Neumann, G., Brownlee, G.G., Fodor, E., and Kawaoka, Y., 2004. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenilation. In Kawaoka Y (Ed) *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*. Springer Verlag Berlin Heidelberg: 121-143.
- Office International des Epizooties (OIE), 2004. Manual of Diagnostic test and vaccines for terrestrial animals: Avian Influenza. 5 th Ed. <http://www.oie.int/> (18 Okt 2006).

- Rao, P., Yuan, W., and Krug, R.M., 2003. Crucial role of CA cleave site in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J.* 22: 1188-1198.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E.A., Ilyushina, N. A., Yen., H.L., Post, D. J.H., Humbert, Jennifer., Trichet, M., Rehg, J. E., Webby, R.J., Webster, R. G., Hoffmann, E., 2006. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *NJEM.* 203 (3): 689-697.
- Sanz-Ezquerro, J.J., de la Luna, S., Ortin, J., and Nieto, A., 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* 69: 2420-2426.
- Sanz-Ezquerro, J.J., de la Luna S., Ortin, J., and Nieto, A., 1996. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J. Virol.* 70: 1905-1911.
- Smith, G.J.D., Naipospos, T.S.P., Nguyen, T.D., De Jong, M.D., Vijaykrishna, D., Usman, T. B., Hasan, S. S., Dao, T. V., Bui, N. A., Leung, Y. H. C., Cheung, C. L., Rayner, J. M., Zhang, J. X., Poon, L. L. M., Li, K. S., Nguyen, V.C., Hien, T. T., Farrar, J., Webster, R. G., Chen, H., Peiris, J.S.M., and Guan, Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 Influenza virus in avian and human host in Indonesia and Vietnam. *J. Virol.* 350: 258-268.
- Sturm-Ramirez, K.M., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrting, K., Rehg, J.E., Poon, L., Guan, Y., Peiris, M., and Webster, R.G., 2004. Reemerging H5N1 Influenza Viruses in Hongkong in 2002 Are Highly Pathogenic to Ducks. *J. Virol.* 78: 4892-4901.
- Swayne, D.E., and Suarez, D.L., 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 19 : 463-482.
- Tabbu, C.R., 2000. *Penyakit Ayam dan Penaggulangannya*. Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. 1 : 232-244. Kanisius, Yogyakarta.
- Wasilenko, J.L., Chang, W.L., Sarmiento, L., Spackman, E., Kapezynsky, D.R., Suarez, D.L., and Pantin-Jackwood, M.J., 2008. NP, PB1, and PB2 Viral Genes Contribute to Altered Replication of H5N1 Avian Influenza Viruses in Chickens. *J. Virol.* 82 (9): 4544-4553.
- Webster, R.G., and Hulse, D.J., 2004. Microbial Adaptation and Change Avian Influenza. *Rev. Sci. Tech Int. Epiz.* 23 (2): 453-465.

World Health Organization (WHO). 2005. Global Influenza Program Surveillance Network.. Evolution of H5N1 Avian Influenza in Asia. *Emer Infect Dis*.11: 1515-1521.

Wright, P.E., and Webster, R.G., 2001. Orthomyxoviridae. In *Fields Virology*, 4th ed. Edited by Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B., Straus, S.E., Lippincott Williams., and Wilkins., Philadelphia, USA: 1533 - 1568.

