

Variasi *Non-Coding Region* dan *Coding Region* Ujung-5' cRNA Polimerase Basik 1 Virus Avian Influenza Subtipe H5N1

(VARIATION OF NON-CODING REGION AND CODING REGION OF 5'-TERMINAL CRNA
OF POLYMERASE BASIC 1 OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1)

Gusti Ayu Yuniati Kencana^{1✉}, Widya Asmara²,
Charles Rangga Tabbu², I Gusti Ngurah Kade Mahardika¹

¹Laboratorium Virologi, Fakultas kedokteran Hewan Universitas Udayana Denpasar,
Jl. PB Sudirman Denpasar Telp. 0361-223791 / Mahasiswa Pascasarjana UGM,

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
Email : yuniatikencana@yahoo.co.id

ABSTRACT

The sequence of the *Non-Coding Region* (NCR) and *Coding Region* (CR) of 5'-terminal cRNA of the polymerase basic 1 (PB1) gene as a major factor for the species adaptation of avian influenza virus subtype H5N1 (AIV H5N1) has been analysed. The information could be a virological signal for the emergence of a new strain with pandemic potential. Total RNA from twenty six (26) avian influenza subtype H5N1 isolates were amplified using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with a universal forward primer for influenza virus and specifically designed backward primers. Fifteen (15) PB1 gene fragments could be amplified. RT-PCR products were sequenced and analyzed using Mega4 software. The length of NCR of PB1 gene was found to be 24 bases and mostly shows conserved sequence, with an exception of Dk/Badung/2006 isolate which has C-7T substitution. A/T composition of PB1 NCR was 54,2%, while the Dk/Badung/2006 isolate was 58,3%. Species and geographical specificity could not be found in the genetic distance, the amino acid polymorphism, as well as the phylogenetic analysis of the CR. The C-7T substitution and RNA sequencing are discussed and recommended to be studied further.

Key words : Non coding region, coding region, 5'- terminal cRNA, PB1 gene, avian influenza, H5N1, Indonesia

PENDAHULUAN

Pengetahuan tentang faktor-faktor utama dalam adaptasi spesies *virus avian influenza* subtipe H5N1 (VAI H5N1) – yang secara populer disebut juga virus flu burung – sangat penting dilakukan. Informasi tersebut dapat menjadi sinyal virologis bagi kemunculan galur virus yang berpotensi pandemi. VAI-H5N1 masih menunjukkan potensi pandeminya. Sampai saat ini, virus itu semakin menyebar di seluruh dunia dan secara sporadis menyebabkan kematian pada manusia. Sampai 11 Maret 2009, kasus konfirmasi VAI-H5N1 pada manusia di seluruh dunia telah mencapai 411 kasus di 15 negara, 256 diantaranya meninggal dunia (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_03_11/en/index.html). Di Indonesia, VAI-H5N1 masih endemik dengan letupan-letupan wabah yang masih tetap terjadi.

Jumlah kasus flu burung mencapai 141 orang, 115 meninggal. Kasus AI pada manusia di Indonesia bersumber dari virus asal hewan. Setidak-tidaknya 79% dari kasus manusia menunjukkan sejarah kontak langsung atau tidak langsung dengan unggas yang sakit (Kandun *et al.*, 2008).

Gabungan semua fragmen gen (*genetic make-up*) virus AI tampaknya secara bersama-sama menentukan apakah suatu galur dapat menginfeksi manusia atau mamalia. Secara umum dikatakan bahwa rentang inang dan patogenesis VAI bersifat poligenik, yaitu faktor determinan untuk rentang inang dan patogenesis terdapat pada semua fragmen gen (Wright dan Webster, 2001). Virulensi dan VAI dipengaruhi oleh beberapa fragmen gen, antara lain gen hemaglutinin (HA), gen-gen polimerase yaitu polimerase basik-1 (PB1), polimerase basik-2 (PB2) dan polimerase asidik (PA), gen

neuraminidase (NA), dan gen non struktural (NS) (Wright dan Webster, 2001).

Dari berbagai informasi, gen polimerase kompleks tampaknya merupakan faktor penentu yang penting. Protein polimerase VAI membentuk heterotrimer (PB2, PB1, PA) dan berperan dalam banyak tahap replikasi virus dan berinteraksi dengan berbagai protein sel, sehingga berperan dalam spesifisitas induk semang (Taubenberger *et al.*, 2005). Dalam kasus virus AI H5N1, Salomon *et al.*, (2006) dapat membuktikan bahwa barier spesies VAI H5N1 berlokasi pada gen-gen polimerase.

Fokus penelitian yang dilakukan selama ini oleh Salomon *et al.*, (2006), Taubenberger *et al.*, (2005), Naffakh *et al.*, (2000), Wright dan Webster (2001) adalah pada daerah *coding region* (CR) segmen gen VAI. Perubahan asam amino pada gen polimerase PB2 daerah *coding region* pada posisi 627 telah digunakan sebagai tanda perubahan VAI asal unggas ke VAI asal mamalia (Naffakh *et al.*, 2000). Temuan ini tidak konklusif, mengingat bahwa data yang tersedia di *GeneBank* menunjukkan banyak isolat AI subtipe H5N1 asal unggas yang mempunyai mutasi pada asam amino 627 PB2.

Dengan pertimbangan tersebut, penelitian tentang *non-coding region* (NCR) ujung 5' gen-gen polimerase VAI H5N1 diharapkan memberikan indikator adaptasi virus pada berbagai spesies. Bukti ilmiah bahwa daerah *non-coding region* berpengaruh pada efisiensi replikasi virus influenza telah pernah diungkap sebelumnya. Genom sebagian besar virus famili *Orthomyxoviridae* membentuk struktur seperti jepit rambut (*hairpin loop*) pada kedua ujung -5' dan -3' yang dibutuhkan untuk aktivitas endonuklease dari RNA polimerase virus influenza dalam proses *cap-snatching* (Leahy *et al.*, 2001). Fujii *et al.*, (2005) juga melaporkan bahwa *non-coding region* gen NS ikut mempengaruhi transkripsi pada virus influenza A. Publikasi oleh Gultayev *et al.*, (2007) mengungkapkan bahwa mutasi gen NS pada posisi 563 dari G menjadi C yang terjadi setelah tahun 2000 yang memperkokoh *hairpin loop* RNA, yang dihipotesiskan meningkatkan kapasitas VAI H5N1 untuk menyebar ke seluruh dunia dan untuk menginfeksi manusia. Di samping perubahan pada tingkat protein, perubahan pada struktur skunder RNA juga berpengaruh terhadap evolusi virus influenza yang terjadi sejak tahun 2004, sehingga itu perubahan struktur skunder harus diperhitungkan dalam mempelajari evolusi VAI.

Temuan sebelumnya (Kencana *et al.*, 2008) menunjukkan bahwa NCR gen PB2 VAI asal berbagai hewan sangat homogen dan sekuens asam amino protein itu pada ujung amino tidak menunjukkan motif yang khas spesies tertentu, kecuali satu isolat babi yang menunjukkan empat substitusi khas. Artikel ini membahas tentang analisis Ujung-5' cRNA PB1 yang meliputi NCR bagian proksimal CR gen tersebut.

METODE PENELITIAN

Isolat yang digunakan adalah isolat seperti yang ditampilkan pada Tabel 1. Cara perbanyak virus, isolasi RNA, RT-PCR, sekuensing, dan analisis sekuens dilakukan menurut Kencana *et al.*, (2008). Primer yang digunakan primer depan universal PB1 virus influenza (Hoffman *et al.*, 2001) dan disebut PB1F dengan sequence 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA-3' dan primer belakang yang didisain khusus yaitu PB1R418 (5'-CTATAGTGTTGGCCAAAGCA-GTTGC-3') dan PB1200 (5'-CCATTGCTTCCAA-TACACAAT-3') berdasarkan panduan Mahardika (2003). Hasil sekuensing yang dapat dibaca dengan baik ditampilkan pada Tabel 1. Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan BLAST (*basic local alignment search tool*) pada *GeneBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tamura *et al.*, 2004). Analisis filogenetik dilakukan dengan MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Perbanyakan Virus

Masing-masing isolat virus dipropagasi menggunakan telur ayam bertunas (TAB) umur 9-10 hari melalui ruang alantois, selanjutnya TAB diinkubasikan pada mesin tetas selama 24 jam. TAB kemudian dikeluarkan dari mesin tetas. Sebelum dipanen TAB dimasukkan ke dalam almari es selama 1 jam untuk menghindari terjadinya perdarahan. Hasil panen cairan alantois selanjutnya diuji dengan uji HA/ HI, kemudian dikonfirmasi dengan uji RT- PCR

Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan Trizol® (Invitrogen). Secara ringkas teknik tersebut adalah sebagai berikut. Sebanyak 0,25 ml sampel cairan alantois ditambahkan dengan 0,75 ml Trizol LS reagent dalam tabung eppendorf. Campuran tersebut

diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 menit, ditambahkan kloroform sebanyak 0,2 ml, kemudian dikocok sampai homogen dan diinkubasikan pada suhu kamar (15-30° C) selama 15 menit. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 RCF selama 15 menit. Bagian aquaeus diambil dan dimasukkan ke dalam tabung steril. Kedalam tabung tersebut ditambahkan isopropil alkohol sebanyak 0,5 ml, dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 RCF selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan alkohol 70 % sebanyak 1 ml dan divorteks kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.500 RCF selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet RNA dikeringkan, dan disuspensi kembali dengan *DEPC-treated water*.

RT-PCR

Uji RT-PCR dilakukan dengan SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). RT-PCR dilakukan dalam kondisi 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO₄, dengan buffer yang disediakan oleh produsen. Kedalam tabung PCR volume 10 µl dimasukkan 1 µl RNA dan ditambahkan primer depan dan belakang masing-masing sebanyak 0,6 µl lalu ditambah enzim super script, 0,25 µl, kemudian tabung PCR dimasukkan kedalam *thermocycler eppendorf mastercycler personal* atau PTC-100™ *Programable Thermal Controller MJ Research Inc.* Mesin penyiklus panas diprogram dengan kondisi 50°C selama 1 jam, 95°C selama 7 menit 45 siklus dengan kondisi 94°C selama 45 detik, 55 °C selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Pada bagian akhir diinkubasikan pada suhu 72°C selama 5 menit untuk memperoleh fragmen yang sempurna. Tabung PCR dimasukkan setelah *thermo-cycler* mencapai suhu 50°C. Langkah selanjutnya adalah, 3 µl dari produk PCR tadi ditambah dengan 1 µl *loading dye* (Bromphenol-blue dan Cyline Cyanol), dan selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi etidium bromide dengan konsentrasi 25 µg/ml bersama dengan marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) dengan tegangan 100V selama 30 menit. Visualisasi produk RT-PCR diamati dengan ultraviolet (UV), kemudian didokumentasikan dengan kamera dan film polaroid.

Tabel 1. Kode isolat dan posisi sekuens fragmen gen PB1 yang dapat dianalisis.

No.	Isolat	PB1
1	Ck/Badung/2004	-24 – 390
2	Ck/Denpasar/2004	TAD
3	Ck/Kelungkung/2005	TAD
4	Ck/Kelungkung/2006	TAD
5	Ck/Kelungkung/2007	-24 – 390
6	Ck/Nusa_Penida/2007	TAD
7	Ck/Badung/2007	TAD
8	Ck/Denpasar/2007	-24 – 238
9	Ck/Klk/2006	TAD
10	Q/Solo/2006	-24 – 390
11	Q/Demak/2006	-24 – 246
12	Q/Klaten/2003	-24 – 390
13	Q/DIY/2005	-24 – 390
14	Q/Sleman/2006	-24 – 234
15	Dk/Badung/2005	TAD
16	Dk/Badung/2006	-24 – 234
17	Dk/Kelungkung/2006	TAD
18	Dk/Tulikup/2006	-24 – 239
19	Dk/IPB_3_RS/2006	-24 – 239
20	Dk/IPB_6_RS/2006	-24 – 239
21	Dk/IPB_8_RS/2006	-24 – 239
22	Sw/Tabanan/2006	TAD
23	Sw/Gianyar/2006	-24 – 238
24	SW/Surakarta_B3A/2006	-24 – 238
25	Sw/Surakarta_B3A1/2006	TAD
26	Sw/Karanganyar_B1W28/2006	TAD

Posisi nomor 1 adalah Kodon pembuka ATG; TAD = tidak ada data, karena produk PCR tidak dapat dihasilkan dengan primer yang digunakan; Kode isolat diringkas dari nomenklatura baku, misalnya Virus Ck/Badung/2004 adalah A/Chicken/Badung/01/2004 (H5N1).

Sekuensing dan analisis

Sekuensing dilakukan di First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia). Produk PCR dikirim bersama-sama dengan primernya. Data yang diperoleh dianalisis dengan program Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Data yang dianalisis adalah konfirmasi hasil sequencing dengan program BLAST, analisis filogenetik dengan data nukletida dan asam amino yang tersedia di *GeneBank*. Hubungan evolusi ditentukan berdasarkan metode Neighbor-Joining (Saitou dan Nei, 1987) , Pohon yang optimum dengan total panjang cabang = 0.14 diperlihatkan. Nilai persentase replikasi pohon, dari taksa/isolat yang membentuk klaster yang sama pada *bootstrap test* dengan 1000 ulangan, dan diperlihatkan dekat cabang (Felsenstein ,1985). Pohon digambar menurut skala, dengan

panjang cabang unit yang sama seperti jarak evolusi yang digunakan untuk menentukan pohon filogenetik. Jarak evolusi dihitung menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood* (Tamura et al., 2004) dan jarak tersebut merupakan jumlah unit-unit basa substitusi untuk setiap lokasi. Posisi kodon meliputi posisi 1,2, dan 3. Seluruh posisi yang memiliki antara (gap) dan *missing data* dihilangkan dari dataset (*Complete deletion option*). Pada data set akhir secara keseluruhan ada 383 posisi. Analisis filogenetik dilakukan dengan MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 26 isolat yang tersedia, 11 di antaranya tidak dapat diamplifikasi. Hal ini terjadi karena variasi sekuens masing-masing isolat yang tidak sepadan dengan primer yang digunakan. Sebanyak 15 isolat dengan fragmen gen PB1-nya dapat diamplifikasi, sekuens yang terbaca adalah 24 basa sebelum kodon pembuka ATG, dan disebut sebagai posisi -24, sampai 234-390 setelah kodon pembuka itu. Sekuens NCR isolat yang dapat dianalisis seragam, dengan perkecualian substitusi C-7T pada isolat itik Dk/Badung/2006 (Tabel 2). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa NCR gen PB1 adalah 24 basa dengan sekuens yang homogen dengan variasi C-7T pada isolat itik Dk/Badung/2006. Komposisi A/T NCR PB1 adalah 54,2%, kecuali pada isolat Dk/Badung/2006 yaitu 58,3%. Data jarak genetik dan asam amino polimorfik di daerah amino terminus gen PB1 yang dianalisis ditampilkan pada Tabel 3 dan 4. Jarak genetik gen PB1 rata-rata 1,4% (SD 0,5%), dengan kisaran 0,0%-3,0%. Pasangan isolat yang 100% homolog adalah Dk/Tulikup/2006 dengan Dk/IPB-3 RS/2006 dan Q/Sleman/2006, serta Q/DIY/2005, Dk/IPB-6RS/2006, dengan Sw/Gianyar/2006. Pada data asam amino polimorfik, tampak bahwa ujung amino gen PB1 hanya menunjukkan tiga asam amino polimorfik. Kombinasi $V_{14}S_{44}L_{64}$ hanya terdapat pada 1 isolat yaitu Ck/Badung/2004. Kombinasi tersebut menjadi $V_{14}N_{44}S_{64}$ pada satu isolat, yaitu Ck/Denpasar/2007, dan $V_{14}N_{44}L_{64}$ pada Q/Solo/2006. Delapan isolat lain mempunyai sekuens $V_{14}N_{44}P_{64}$, sedangkan empat yang lain berpola $A_{14}N_{44}P_{64}$. Hasil BLAST (data tidak ditampilkan) dengan filter 500 data menunjukkan bahwa sekuens NCR mempunyai homologi 100% yang khas PB1 berbagai subtype virus influenza. Sedangkan sekuens CR mempunyai homologi

antara 94-98% yang khas PB1 berbagai subtype virus influenza.

Analisis filogenetik menunjukkan bahwa semua isolat yang dianalisis tidak menunjukkan pola geografis maupun spesies (Gambar 1). Isolat Dk/IPB-8 RS/2006, Ck/Klungkung/2007, Ck/Badung/2004, dan Q/Solo/2006 bergabung dalam satu kluster besar, sedangkan virus yang lain membentuk kluster yang terpisah.

Tiga belas nukleotida ujung-5' dan 12 ujung-3' dari semua segmen (vRNA) virus influenza sangat stabil pada semua galur (Neumann et al., 2004). Kajian lebih lanjut menunjukkan bahwa 12-13 nukleotida pada ujung-3' vRNA atau ujung-5' cRNA dan 11-12 nukleotida pada ujung-3' cRNA merupakan elemen kunci promotor virus influenza (Parvin et al., 1989; Yamanaka et al., 1991; Li dan Palese, 1992; Seong dan Brownlee, 1992a; 1992b; Picone et al., 1993). Dengan kata lain, kompleks polimerase berinteraksi dengan kedua ujung vRNA untuk menghasilkan mRNA dan cRNA, serta sebaliknya dengan cRNA untuk menghasilkan vRNA. Elemen promotor meliputi ujung-5' dan -3' dari vRNA dan cRNA (Fodor et al., 1994; Neumann dan Hobom, 1995; Pritlove et al., 1995; Flick et al., 1996).

Untuk itu analisis promotor semestinya dilakukan terhadap kedua ujung vRNA atau cRNA. Kedua ujung RNA itu akan membentuk 'tuas yang melengkung' (model *panhandle*). Tuas tersebut dibentuk oleh nukleotida 1-9 ujung-5' dan -3' menjadi region I dan nukleotida 10-15 dan 11-16 menjadi region II serta dihubungkan oleh nukleotida no. 10 dari ujung-5' vRNA (Fodor et al., 1995; Flick et al., 1996; Neumann dan Hobom, 1995). Dalam cRNA, promotor tersebut berfungsi dalam konfigurasi "corkscrew" dengan cara yang sama seperti dalam vRNA (Azzeh et al., 2001).

Wilayah antara promotor dan kodon pembuka (AUG) mempunyai panjang dan komposisi yang beragam (Neumann dan Hobom, 2004). Temuan dalam penelitian ini adalah bahwa wilayah antara promotor dan kodon pembuka mempunyai panjang yang seragam dengan sekuens yang juga sebagian besar homolog. Varian C-7T ditunjukkan oleh isolat itik Dk/Badung/2006. Delesi, insersi, dan mutasi pada wilayah ini dapat mempengaruhi replikasi dan transkripsi virus dengan cara interaksi dengan protein NP dan polimerase kompleks (Neuman dan Hobom, 2004). Penelitian pada segmen 7 yang menyandi protein matriks (Enami et al., 1994) menunjukkan

Tabel 2. Hasil analisis Non Coding Region (NCR gen PB1

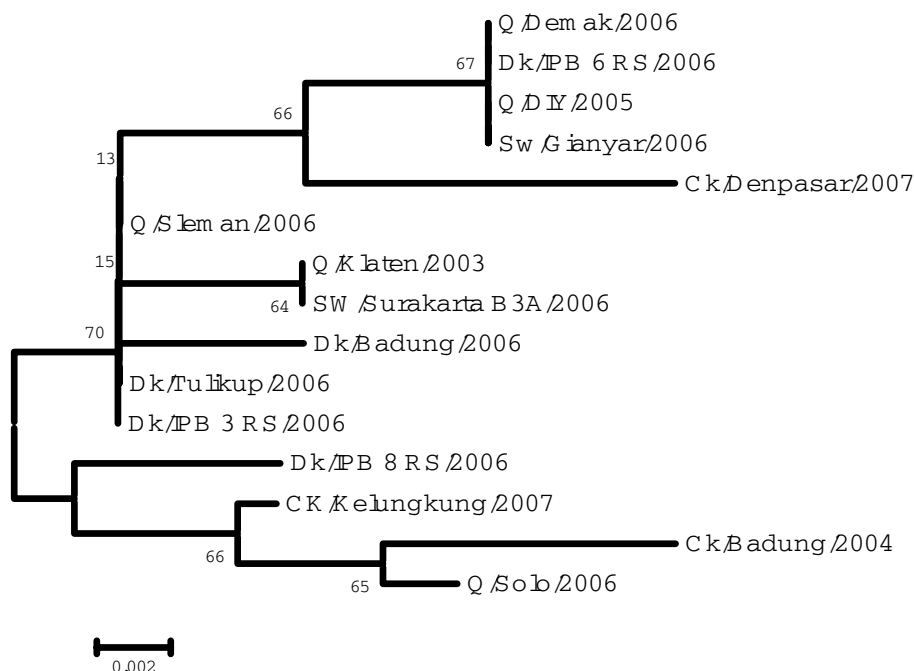
Nama Isolat	Pososi Nukleotida								
	222	221	111	111	111	---	---	---	---
Ck/Badung/2004	432	109	876	543	210	987	654	321	
Ck/Denpasar/2007	AGC	GAA	AGC	AGG	CAA	ACC	ATT	TGA	
CK/Kelungkung/2007
Q/Sleman/2006
Q/Solo/2006
Q/Demak/2006
Q/Klaten/2003
Q/DIY/2005
Dk/Badung/2006	T
Dk/Tulikup/2006
Dk/IPB_3_RS/2006
Dk/IPB_6_RS/2006
Dk/IPB_8_RS/2006
SW/Surakarta_B3A/2006
Sw/Gianyar/2006

Keterangan : Penomoran dibaca dari atas ke bawah. Misalnya asam nukleat A yang pertama dibaca posisi -24. Posisi +1 diperhitungkan pada kodon pembuka (ATG)

Tabel 3. Hasil analisis Coding Region (CR) gen PB1

No	Nama isolate	Jarak genetik antar isolat (%)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Ck/Badung /2004	-														
2	Ck/Denpasar/ 2007	3,6	-													
3	Ck/Kelungkung/2007	1,5	2,5	-												
4	Q/Sleman/2006	2,0	1,5	1,0	-											
5	Q/Solo/2006	1,0	3,0	0,5	1,5	-										
6	Q/Demak.2006	3,0	1,5	2,0	1,0	2,5	-									
7	Q/Klaten/2003	2,5	2,0	1,5	0,5	2,0	1,5	-								
8	Q/DIY/2005	3,0	1,5	2,0	1,0	2,5	0	1,5	-							
9	Dk/Badung/2006	2,5	2,0	1,5	0,5	2,0	1,5	1,0	1,5	-						
10	Dk/Tulikup/2006	2,0	1,5	1,0	0	1,5	1,0	0,5	1,0	0,5	-					
11	Dk/IPB-3 RS/2006	2,0	1,5	1,0	0	1,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0	-				
12	Dk/IPB-6 RS/2006	3,0	1,5	2,0	1,0	2,5	0	1,5	0	1,5	1,0	1,0	-			
13	Dk/IPB-8 RS/2006	2,5	2,5	1,0	1,0	1,5	2,0	1,5	2,0	1,5	1,0	1,0	2,0	-		
14	Sw/Surakarta B3A/2006	2,5	2,0	1,5	0,5	2,0	1,5	0	1,5	1,0	0,5	0,5	1,5	1,5	-	
15	Sw/Gianyar/2006	3,0	1,5	2,0	1,0	2,5	0	1,5	0	1,5	1,0	1,0	0	2,0	1,5	-

Keterangan : Jarak genetik nol menunjukkan tingkat homologi yang sangat tinggi (100%)



Gambar 1. Hubungan kekerabatan fragmen ujung-5' gen PB1 dari virus avian influenza H5N1 yang dipelajari dalam penelitian ini asal isolat ayam, puyuh, itik dan babi di Indonesia.

Tabel 4. Analisis Gabungan PB2, PB1, dan PA

Gen	Sekuens NCR	Panjang NCR (basa)	Prosentase A/T NCR	Jarak Genetik CR rata-rata (sd)
PB1	AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGA atau AGCGAAAGCAGGCAAACACTATTTGA	24	54,2% 58,3%	0,014(0,005)

Keterangan : NCR=non-coding region, sebelum ATG yang pertama; CR= coding region, dari ATG;

bahwa wilayah antara promoter dan kodon pembuka menstimulasi ekspresi protein tersebut, walau pun kecepatan transkripsinya tidak dipengaruhi sama sekali. Temuan Enami *et al.*, (1994) menunjukkan bahwa wilayah dimaksud merupakan signal yang mempengaruhi stabilitas mRNA dan/atau inisiasi translasi.

Hal yang menarik dari polimorfisme NCR C-7T adalah bahwa substitusi itu menyebabkan NCR virus yang bersangkutan menjadi lebih kaya A/T. Daerah kaya A/T disebutkan mempunyai fungsi promoter pada sistem sel, misalnya untuk interleukin (Kube *et al.*, 1999), atau menjadi *origin of replication/ori* (Krueger dan Filutowicz, 2000), termasuk untuk sistem prokaryot pada *Borrelia spp.* (Sohaskey *et al.*, 1999) dan tanaman (Pwee *et al.*, 1994). Substitusi C-7T tersebut menarik untuk dikaji lebih lanjut.

Proporsi A/T pada semua isolat yang dipelajari adalah 54,2%. Substitusi itu pada isolat Dk/Badung/2006 menyebabkan peningkatan komposisi A/T menjadi 58,3%. NCR gen PB2 mempunyai komposisi A/T yang lebih tinggi yaitu 66,7% (Kencana *et al.*, 2008), sedangkan NCR gen PA mempunyai proporsi 58,3% (data belum dipublikasi).

Di samping itu, kajian NCR dalam penelitian ini dilakukan pada produk RT-PCR dengan forward primer universal (Hoffman *et al.*, 2001). Dalam RT-PCR atau PCR, ketidaksesuaian (*miss-matching*) primer dengan cetakan masih dapat diamplifikasi terutama jika ketidaksesuaian itu tidak berlokasi pada daerah ujung-3' dari primer (Mahardika, 2003). Dengan demikian, keragaman sekuens daerah promoter tidak dapat diketahui pada penelitian tersebut. Fenomena ketidaksesuaian dengan primer ini

juga yang kemungkinan besar menyebabkan bahwa gen PB1 dari 11 isolat tidak dapat diamplifikasi. Untuk itu, kajian yang menggunakan sekuensing langsung RNA perlu dilakukan. Teknologinya sudah tersedia (Kramer dan Mills, 1978), yaitu dengan memodifikasi DNA sekuensing tetapi cetakan yang disediakan adalah vRNA.

Jarak genetik CR ujung amino dan analisis filogeneik gen PB1 semua isolat menunjukkan bahwa virus tersebut berevolusi dari sumber yang sama. Kekhasan geografis dan spesies tidak dapat diidentifikasi dari gen PB1, baik dari data jarak genetik, polimorfisme asam amino, maupun analisis filogenetik. Hasil ini menunjukkan bahwa virus-virus yang tersebar di Jawa dan Bali mempunyai kekerabatan yang tinggi. Hal tersebut menunjukkan lalu lintas antara Jawa dan Bali menyebabkan virus yang bersirkulasi tidak berbeda antar pulau tersebut. Publikasi terdahulu (Smith *et al.*, 2006) melaporkan bahwa lalu lintas unggas bertanggungjawab pada pola penyebaran geografis virus AI di Indonesia.

SIMPULAN DAN SARAN

Panjang NCR gen PB-1 VAI subtype H5N1 adalah 24 basa dengan sekuens seragam, kecuali substitusi C-7T pada satu isolat Dk/Badung/2006. Komposisi A/T NCR PB1 adalah 54,2%, kecuali pada isolat Dk/Badung/2006 yaitu 58,3%. Kekhasan spesies dan geografis tidak dapat diungkapkan berdasarkan analisis jarak genetik, asam amino polimorfik, maupun filogenetik dari CR. Substitusi C-7T dan sekuensing RNA didiskusikan dan disarankan untuk dikaji lebih lanjut. Dengan demikian potensi isolat untuk menyebabkan pandemi atau adaptasi spesies tidak dipengaruhi oleh sekuens genetik fragmen yang diteliti dalam penelitian ini.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dirjen Dikti yang telah memberikan beasiswa BPPS untuk program Pascasarjana di UGM (2006), serta semua staf Biomedik FKH UNUD, dan staf Mikrobiologi FKH UGM yang telah membantu penelitian ini. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada drh. Michael Haryadi Wibowo, MP (FKH UGM) dan Dr. drh. R. Susanti MP (Universitas Negeri Semarang) atas sumbangan isolatnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Azzeh M, Flick R, Hobom G. 2001. Functional analysis of the influenza A virus cRNA promoter and construction of an ambisense transcription system. *Virology* 289:400-410.
- Enami K, Sato TA, Nakada S, Enami M. 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* 68:1432-1437.
- Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Neumeier E, Hobom G. 1996. Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* 2:1046-1057.
- Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG. 1994. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* 68: 4092-4096.
- Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG. 1995. Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol* 69: 4012-4019.
- Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Harimoto T, 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.
- Gulyaev AP, Heus HA, Olsthoorn RCL. 2007. An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses. *Bioinformatics* 23 (3). 272-276.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR, 2001. Universal primer set for full-length amplification of all influenza A Virus. *Arch Virol* 146 (12) : 2275-2289.
- Kandun IN, Tresnaningsih E, Purba WH, Lee V, Samaan G, Harun S, Soni E, Septiawati C, Setiawati T, Sariwati E, Wandura T. 2008. Factors associated with case fatality of human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *Lancet* 372 :744-9.
- Kencana GAY, Asmara W, Tabbu CR, Mahardika IGNK. 2008. Amino terminus gen polimerase basik 2 virus avian influenza subtype H5N1 asal berbagai spesies hewan di Indonesia. *J. Vet.* 9 (3): 107-114
- Kramer F and Mills DRM. 1978. RNA sequencing with radioactive chain-terminating ribonucleotides. *PNAS* 75 (11): 5334-5338

- Krueger R and Filutowicz M. 2000. Dimers of p protein bind the A/T-rich region of the R6K g origin near the leading-strand synthesis start sites: regulatory implications. *J Bacteriology* 182 (9): 2461–2467.
- Kube D, Laser H, von Knethen A, Tesch H. 1999. The AT-rich region between -54 to -66 is important for the promoter activity of interleukin-10 in Epstein-Barr virus positive Burkitt's lymphoma cells. *Genes and Immunity* 1: 105–114
- Leahy MB, David C, Pritlove L L, Poon M, Brownlee GG. 2001. Mutagenic analysis of the 5' arm of the Influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *J Virol* 75 (1): 134-142.
- Li X and Palese P. 1992. Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. *J Virol* 66:4331-4338.
- Mahardika, I G N K. 2003. Polymerase chain reaction. *J Vet* 4 (1): 20-36.
- Naffakh N, Massin P, Escriou N, Bernadette CC, van der Werf S. 2000. Genetic analysis of the compatibility between polymerase protein from human and avian strain of influenza A viruses. *J Gen Virol* 81: 1283-1291.
- Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y. 2004. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. In Kawaoka Y (Ed) *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 121-143.
- Neumann G, Hobom G. 1995. Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *J Gen Virol* 76: 1709-1717.
- Parvin JD, Palese P, Honda A, Ishihama A, Krystal M. 1989. Promoter analysis of influenza virus polymerase. *J Virol* 63: 5142-5152
- Piccone ME, Fernandez-Sesma A, Palese P. 1993. Mutational analysis of the influenza virus vRNA promoter. *Virus Res* 28:99-112.
- Pritlove DC, Fodor E, Seong BL, Brownlee GG. 1995. In vitro transcription and polymerase binding studies of the termini of influenza A virus cRNA: evidence for a cRNA panhandle. *J Gen Virol* 76:2205-2213.
- Pwee KH, Webster CI, Gray JC. 1994. HMG protein binding to an A/T-rich positive regulatory region of the pea plastocyanin gene promoter. *Plant Molecular Biology* 26 (6): 1907-1920
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evolution* 4: 406-425.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E.A., Ilyushina, N. A., Yen., H.L., Post, D. J..H., Humberd, 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. *JEM*. 203 (3) : 689-697.
- Seong BI, Brownlee GG. 1992a. A new method for reconstituting influenza polymerase and RNA in vitro : a study of the promoter elements for cRNA and vRNA synthesis in vitro and viral rescue in vivo. *Virology* 186:247-260.
- Seong BI, Brownlee GG. 1992b. Nucleotides 9 to 11 of the influenza A virion RNA promoter are crucial for activity in vitro. *J G Virol* 73:3115-3124.
- Smith, GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hasan SS, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 Influenza virus in avian and human host in Indonesia and Vietnam. *J Virol*. 350: 258–268.
- Sohaskey CD, Zueckert WR, Barbour AG. 1999. The extended promoters for two outer membrane lipoprotein genes of *Borrelia* spp. uniquely include a T-rich region. *Mol Microbiol* 33(1): 41-51
- Tamura K, Nei, M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101:11030-11035.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S., 2007
MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
Analysis (MEGA) software version 4.0.
Molecular Biology and Evolution 10.1093/
molbev/msm092.
- Taubenberger, JK., AH Reid, RM Lourens, R
Wang, G Jin, dan TG Fanning, 2005.
Characterization of the 1918 influenza virus
polymerase genes. *Nature* 437, 889- 893
- Wright PE, Webster RG. 2001. *Orthomyxo-
viridae*. In Knipe DM, Howley PM, Griffin
DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B,
Straus SE (Eds) *Fields Virology*. 4th ed.
Philadelphia : Lippincott Williams and
Wilkins, Pp :1533 - 1568.
- Yamanaka K, Ogasawara N, Yoshikawa H,
Ishihama A, Nagata K. 1991. In vivo analysis
of the promoter structure of the influenza
virus RNA genome using a transcription
system with an engineered RNA. *Proc Natl
Acad Sci USA* 88:5369-5373.