

## ***Non Coding Region dan Amino Terminus Gen Polimerase Asidik Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Hewan Indonesia***

*(NON CODING REGION AND AMINO-TERMINUS OF POLYMERASE ACIDIC OF AVIAN INFLUENZA VIRUS OF H5N1 SUBTYPE ISOLATED FROM ANIMAL IN INDONESIA)*

**Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1</sup>, Widya Asmara<sup>2</sup>  
Charles Rangga Tabbu<sup>2</sup>, I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana  
Jl. Sudirman Telp. 0361. 223791 Denpasar, Email : gnmahardika@indosat.net.id.*

*<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,*

*<sup>3</sup>Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar.*

### **ABSTRACT**

The knowledge on the species adaptation factor of avian influenza virus of H5N1 subtype (AIV H5N1) is very important as a signal for the emergence of a new strain with pandemic potential. This research was conducted to find out the sequence variation of the *Non-Coding Region* (NCR) and *Coding Region* (CR) of 5'-terminal cRNA of the polymerase acidic (PA). Total RNA from twenty six (26) avian influenza virus 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. Nineteen (19) gene fragments of PA could be amplified. RT-PCR products were sequenced and analyzed using Mega 4 software. The length of NCR of PA gene was found to be 24 bases and conserved. A/T composition of PA NCR 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. RNA sequencing is discussed and recommended to be studied further.

Key words : Non coding region, amino terminus gen PA , avian influenza, H5N1, Indonesia

### **PENDAHULUAN**

Pemahaman tentang faktor adaptasi spesies virus avian influenza subtipe H5N1 (VAI H5N1) merupakan informasi penting sebagai sinyal bagi kemunculan galur pandemi. Di Indonesia, VAI-H5N1 masih endemik dengan letupan-letupan wabah yang terjadi sepanjang tahun. Jumlah kasus terkonfirmasi telah mencapai 141 orang, 115 fatal. Kasus AI pada manusia di Indonesia bersumber dari virus asal hewan. Setidak-tidaknya 79% dari kasus manusia menunjukkan sejarah adanya kontak langsung atau tidak langsung dengan unggas yang sakit (Kandun *et al.* 2008). Sampai 11 Maret 2009, kasus konfirmasi VAI-H5N1 pada manusia di seluruh dunia mencapai 411 kasus di 15 negara, 256 meninggal dunia (WHO, 2009).

Berdasarkan informasi yang ada, gen polimerase kompleks tampaknya merupakan faktor penentu yang penting. Polimerase asidik

(PA) membentuk kompleks heterotrimer bersama-sama dengan polimerasi basik 1 dan 2 (PB1 dan PB2). Kompleks itu berfungsi dalam berbagai tahap replikasi virus dan berinteraksi dengan berbagai protein sel, sehingga berperan dalam spesifisitas induk semang (Taubenberger *et al.*, 2005; Salomon *et al.* 2006). Di samping itu, PA juga berperan dalam aktivitas proteolitik protein seluler (Sanz-Esquerro *et al.*, 1995; 1996; Naffakh *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2001)

Fokus penelitian ini adalah *non-coding region* (NCR) ujung 5' dan amino terminus dari gen PA. Bukti ilmiah bahwa daerah *non-coding region* berpengaruh pada efisiensi replikasi virus influenza 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 membuktikan bahwa *non-coding region* gen Non Struktural (NS) ikut mempengaruhi transkripsi pada virus influenza A. Publikasi oleh Gulyaev *et al.*, (2007) mengungkapkan bahwa mutasi gen NS pada posisi 563 dari G menjadi C yang terjadi setelah tahun 2000 memperkokoh *hairpin loop* RNA, yang dihipotesiskan meningkatkan kapasitas VAI H5N1 untuk menyebar ke seluruh dunia dan menginfeksi manusia. Di samping perubahan pada tingkat protein, perubahan pada struktur skunder RNA juga berpengaruh terhadap evolusi virus influenza yang terjadi sejak tahun 2004, oleh karena 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. Sedangkan pada gen PB1 (Kencana *et al.*, 2009), panjang NCR adalah 24 basa dengan sekuens seragam, kecuali substitusi C-7T pada satu isolate 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. Artikel ini membahas tentang analisis ujung-5' cRNA gen PA yang meliputi NCR bagian proksimal CR gen tersebut.

## METODE PENELITIAN

Isolat virus yang dipelajari dalam penelitian ini ditampilkan pada Tabel 1. Cara perbanyakan virus, isolasi RNA, RT-PCR, sekuensing, dan analisis sekuens dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilakukan Kencana *et al.*, (2008). Propagasi isolat virus AI H5N1 dilakukan pada telur ayam bertunas umur 10 hari, kemudian hasil panen cairan alantois selanjutnya diuji dengan uji HA/HI, dan dikonfirmasi dengan uji RT-PCR dengan primer standar WHO (2005). Primer yang digunakan untuk amplifikasi fragmen gen PA adalah primer depan universal PA virus influenza (Hoffman *et al.*, 2001) dan disebut PAF dengan sekuens 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAA-GCAGGTAC-3' dan primer belakang yang didisain khusus yaitu PAR471 (5'-AACAGCCT-

GGTTTTA ATTCTTGCC-3') dan PAR200 (5'-CGTTCGGTCTCTTCCTTCAA-3') berdasarkan panduan Mahardika (2003). Primer PAR 471 akan mengamplifikasi 471 bp + NCR dan primer PAR 200 akan mengamplifikasi 200 bp + NCR.

## 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 reagen 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. 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*.

## Uji RT-PCR

Uji RT-PCR dilakukan dengan *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). RT-PCR dilakukan dalam kondisi 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO<sub>4</sub>, dengan buffer yang disediakan oleh produsen. Sebanyak 1 µl RNA dimasukkan ke dalam tabung PCR volume 10 µl kemudian ditambahkan primer depan dan belakang masing-masing sebanyak 0,6 µl lalu ditambah enzim super script, 0,25 µl. Tabung PCR tersebut kemudian dimasukkan kedalam *thermocycler eppendorf mastercycler personal* atau *PTC-100™ Programmable Thermal Controller MJ Research Inc. Thermo-cycler* 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 *transluminator* yang dilengkapi dengan lampu ultraviolet (UV), kemudian didokumentasikan dengan kamera dan film polaroid.

**Sekuensing dan analisis**

Sekuensing dilakukan di *Eijekman Institute for Molecular Biologi* (Jakarta). Produk PCR dikirim bersama-sama dengan kedua primernya. Data yang diperoleh dianalisis dengan program Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007). Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan BLAST (*basic local alignment search tool*) pada *GeneBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), analisis filogenetik dengan data nukleotida 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. 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* 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*) (Tamura *et al.*, 2007).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Sebanyak 26 isolat yang dipelajari, tujuh di antaranya tidak dapat diamplifikasi. Hal ini terjadi tampaknya karena variasi sekuens masing-masing isolat yang tidak sepadan dengan primer yang digunakan. Hasil sekuensing yang dapat dibaca dengan baik ditampilkan pada Tabel 1. Fragmen gen PA-dari 19 isolat dapat diamplifikasi, sekuens yang terbaca adalah 24

Tabel 1. Kode Isolat dan Posisi Sekuens Fragmen Gen PA yang Dapat Dianalisis

No.	Isolat	PA
1	Ck/Badung/2004	-24 – 461
2	Ck/Denpasar/2004	6 – 461
3	Ck/Klungkung/2005	TAD
4	Ck/Klungkung/2006	10 – 461
5	Ck/Klungkung/2007	-24 – 190
6	Ck/Nusa_Penida/2007	-24 – 190
7	Ck/Badung/2007	TAD
8	Ck/Denpasar/2007	TAD
9	Ck/Klk/2006	TAD
10	Q/Solo/2006	-24 – 190
11	Q/Demak/2006	-24 – 190
12	Q/Klaten/2003	-24 – 190
13	Q/DIY/2005	-24 – 190
14	Q/Sleman/2006	TAD
15	Dk/Badung/2005	10 – 190
16	Dk/Badung/2006	TAD
17	Dk/Klungkung/2006	-24 – 190
18	Dk/Tulikup/2006	-24 – 190
19	Dk/IPB_3_RS/2006	-24 – 190
20	Dk/IPB_6_RS/2006	-24 – 190
21	Dk/IPB_8_RS/2006	-24 – 190
22	Sw/Tabanan/2006	10 – 461
23	Sw/Gianyar/2006	TAD
24	SW/Surakarta_B3A/2006	-24 – 190
25	Sw/Surakarta_B3A1/2006	-24 – 190
26	Sw/Karanganyar_B1W28/2006	-24 – 190

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).

basa sebelum kodon pembuka ATG, dan disebut sebagai posisi -24, dan tiga isolat mulai dari nukleotida no. 6 atau 10, sampai 190 atau 461 setelah kodon pembuka itu. Sekuens NCR isolat yang dapat dianalisis sera-gam (Tabel 2). Daerah NCR itu merupakan daerah yang kaya akan A/T dengan proporsi 58,3 %.

Analisis jarak genetik gen PA rata-rata 1,1% (SD 0,5%), dengan kisaran 0,0%-2,4%. Beberapa isolat mempunyai homologi 100% dengan isolat yang lain. Pasangan-pasangan yang homologi dapat didiskripsikan sebagai berikut. Pasangan isolat yang 100% homolog adalah Ck/Badung/2004 dengan isolat Dk/Badung/2005, Dk/Tulikup/2006, Dk/Tulikup/2006, Dk/IPB-3RS/2006, DK/IPB-6RS/2006, Dk/IPB-8/RS/2006, Sw/Surakarta B3A/2006. Isolat

Tabel 2. Hasil analisis *Non Coding Region* (NCR) gen PA

Nama Isolat	Posisi Nukleotida								
	222	211	111	111	11-	---	---	---	---
Ck/Badung/2004	ACG	AAA	GCA	GGT	ACT	GAT	TCA	AA	ATG
Ck/Nusa_Penida/2007	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ck/Kelungkung/2007	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Q/Solo/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Q/Demak/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Q/Klaten/2003	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Q/DIY/2005	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Dk/Kelungkung/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Dk/Tulukup/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Dk/IPB_3_RS/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Dk/IPB_6_RS/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Dk/IPB_8_RS/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Sw/Surakarta_B3A/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Sw/Surakarta_B3A1/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Sw/Karanganyar_B1W28/2006	...	...	...	...	...	...	...	...	...

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

Tabel 3. *Polimorfik sites* asam amino gen PA

Nama Isolat	Posisi Asam Amino Polimorfik	
	48	52
Ck/Badung/2004	Y	H
Ck/Denpasar/2004	S	P
CK/Kelungkung/2006	S	.
Ck/Nusa_Penida/2007	.	.
Ck/Kelungkung/2007	.	.
Q/Solo/2006	.	.
Q/Demak/2006	.	.
Q/Klaten/2003	.	.
Q/DIY/2005	.	.
Dk/Badung/2005	.	.
Dk/Kelungkung/2006	.	.
Dk/Tulukup/2006	.	.
Dk/IPB_3_RS/2006	.	.
Dk/IPB_6_RS/2006	.	.
Dk/IPB_8_RS/2006	.	.
Sw/Surakarta_B3A/2006	.	.
Sw/Surakarta_B3A1/2006	.	.
Sw/Karanganyar_B1W28/2006	.	.
Sw/Tabanan/2006	N	.

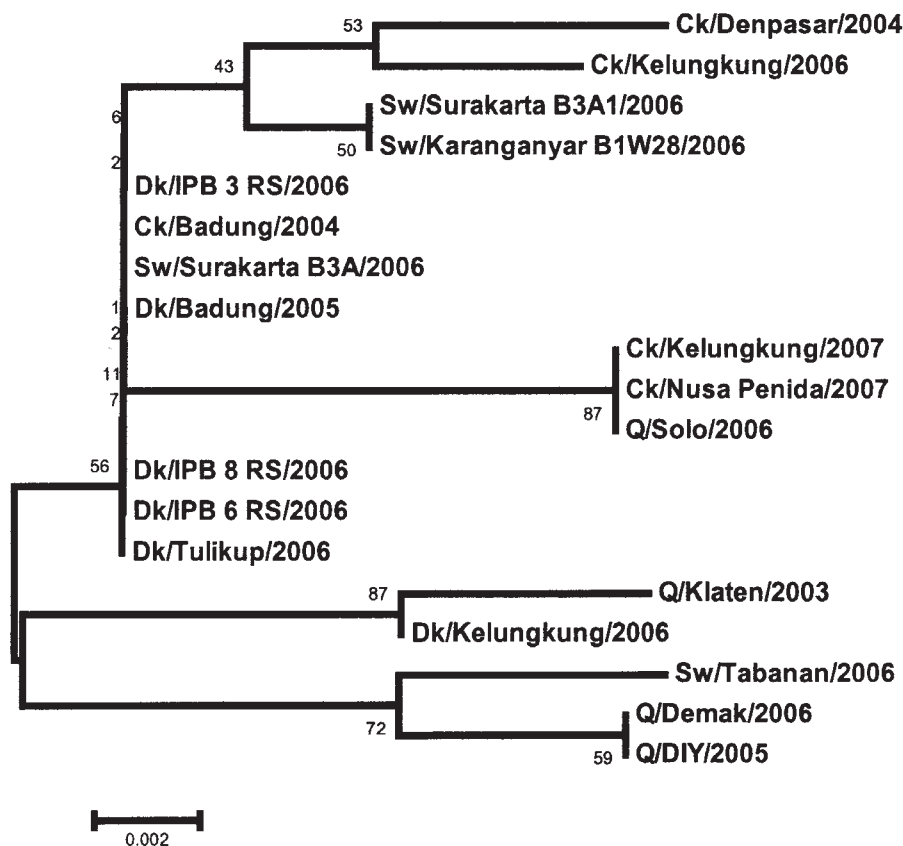
Keterangan : Posisi Asam Amino dibaca dari atas ke bawah. Titik berarti sekuen di posisi tersebut sama dengan isolat yang ditulis paling atas. Ck = isolat virus ayam, Q = isolat virus puyuh, Dk = isolat virus itik, Sw = isolat virus babi.

Ck Nusa Penida/2007 homolog dengan isolat Ck/Kelungkung/2007, Q/Solo/2006. Isolat Ck/Kelungkung/2007 homolog 100% dengan Q/Solo/2006. Isolat Q/Demak/2006 100% homolog dengan isolat Q/DIY/2005. Isolat Sw/Surakarta B3A1/2006 100% homolog dengan Sw/Karanganyar B1W28/2006.

Ujung amino gen PA cenderung stabil dan hanya menunjukkan dua asam amino polimorfik, yaitu pada posisi asam amino no. 48 dan 52 (Tabel 3). Sebagian besar isolat mempunyai kombinasi asam amino Y<sub>48</sub>H<sub>52</sub>. Varian S<sub>48</sub>P<sub>52</sub>, S<sub>48</sub>H<sub>52</sub>, dan N<sub>48</sub>H<sub>52</sub>, terjadi masing-masing pada satu isolat, yaitu berturut-turut Ck/Denpasar/2004, Ck/Kelungkung/2006, dan Sw/Tabanan/2006.

Hasil BLAST (data tidak ditampilkan) dengan filter 500 menunjukkan bahwa sekuens NCR mempunyai homologi 100% yang khas PA berbagai sub tipe virus influenza. Sedangkan sekuens CR mempunyai homologi antara 94-98% yang khas PA berbagai sub tipe virus influenza.

Analisis filogenetik menunjukkan bahwa semua isolat yang dianalisis tidak menunjukkan pola geografis mau pun spesies (Gambar 1). Isolat Q/Klaten/2003, Dk/Klungkung/2006, Sw/Tabanan/2006, Q/Demak/2006, dan Q/DIY/2005



Gambar 1. Hubungan kekerabatan gen PA dari virus avian influenza H5N1 yang dipelajari dalam penelitian ini asal isolat ayam, puyuh, itik dan babi di Indonesia.

bergabung dalam satu klaster besar, sedangkan virus yang lain membentuk klaster yang terpisah.

Komponen kunci promotor virus influenza telah diungkapkan yaitu pada posisi 12-13 nukleotida pada ujung-3' vRNA atau ujung-5' cRNA dan 11-12 nukleotida pada ujung-3' cRNA (Parvin *et al.*, 1989; Yamanaka *et al.*, 1991; Li and 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).

Penelitian ini hanya mencakup ujung-3' dari vRNA atau ujung-5' dari cRNA. 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 *et al.*, 2004). Temuan dalam penelitian ini adalah bahwa wilayah antara promotor dan kodon pembuka mempunyai panjang yang seragam dengan sekuens yang juga *conserved*.

Kajian NCR dalam penelitian ini dilakukan pada produk RT-PCR dengan forward primer universal (Hoffman *et al.*, 2001). Seperti diketahui dalam RT-PCR atau PCR, ketidaksesuaian (*miss-matching*) primer dengan cetakan (*template*) masih dapat diamplifikasi terutama jika ketidaksesuaian itu tidak berlokasi pada daerah ujung-3' dari primer. Dengan demikian, keragaman sekuens daerah promotor tidak dapat diketahui pada penelitian ini. Fenomena

ketidaksesuaian dengan primer ini juga yang kemungkinan besar menyebabkan bahwa gen PA dari 8 isolat tidak dapat diamplifikasi. 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.

Hasil penelitian ini mendukung temuan sebelumnya (Kencana *et al.*, 2008; Kencana *et al.*, 2009), bahwa 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 PA, baik dari data jarak genetik, polimorfisme asam amino, mau pun analisis filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus-virus yang beredar di Jawa dan Bali mempunyai kekerabatan yang tinggi, kemungkinan karena eratnya hubungan lalu lintas antara Jawa dan Bali sehingga virus AI yang bersirkulasi tidak berbeda antar kedua 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 PA adalah 24 basa dengan sekuens seragam. Proporsi A/T NCR gen PA adalah 58.3%. Kekhasan spesies dan geografis tidak dapat diungkapkan berdasarkan analisis jarak genetik, asam amino polimorfik, mau pun filogenetik dari CR gen PA. Sekuensing RNA dari NCR gen PA disarankan untuk dilakukan sebagai tindak lanjut.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dirjen Dikti yang telah mendanai penelitian ini. Disamping itu penulis juga mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada teman-teman di Lab Biomedik FKH UNUD : Dayu, Nana, Wirata, Naren dan Dibya, dan Pipit dari Lab Mikrobiologi FKH UGM yang telah membantu selama penelitian. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada drh. Michael Haryadi Wibowo, MP dari UGM dan Dr. drh. R. Susanti MP dari 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.
- 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.
- 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.
- Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hamada N, Mizoue K, Tsumura N, Kato H, 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
- 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, Wandra 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 subtipe H5N1 asal berbagai spesies hewan di Indonesia. *Jurnal Veteriner* 9 (3): 107-114.
- Kencana GAY, Asmara W, Tabbu CR, Mahardika IGNK. 2009. Variasi *Non Coding* dan *Coding Region* Ujung -5' cRNA Polimerase Basik-1 Virus Avian Influenza Subtipe H5N1. *Jurnal Veteriner* 10 (1) : 17-25.

- Kramer F, Mills DRM. 1978. RNA sequencing with radioactive chain-terminating ribonucleotides. *PNAS* 75 (11): 5334-5338.
- 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, Palese P. 1992. Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. *J Virol* 66:4331-4338.
- Mahardika, IGKN. 2003. Polymerase Chain Reaction. *Journal Veteriner* 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.
- Saitou N, Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 : 406-425.
- Salomon R, Franks J, Govorkova EA, Ilyushina NA, Yen, Post HL, Humberd DJH, Jennifer, Trichet M, Rehg JE, Webby RJ, Webster RG, 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.
- Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortin J, Nieto A. 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol* 69:2420-2426.
- Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortin J, 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.
- 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. *Journal of Virology*. 350: 258-268.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* 10:1093/molbev/msm 092.
- 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.
- WHO. 2005. Global Influence Program Surveillance Network Evolution of H5N1 Avian Influenza in Asia. *Emerge Infect Dis* 11:1515-1521
- WHO.2009.([http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2009\\_03\\_11/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_03_11/en/index.html)).
- 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.