

Tapak Perlekatan Reseptor Virus Flu Burung yang Diisolasi dari Berbagai Unggas Sejak tahun 2003 sampai 2008

(RECEPTOR BINDING SITE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1
ISOLATED FROM VARIOUS POULTRIES SINCE 2003 TO 2008)

Michael Haryadi Wibowo ¹⁾, Charles Rangga Tabbu ²⁾,
Widya Asmara ¹⁾, Heru Susetya ³⁾

Bagian Mikrobiologi ¹⁾, Bagian Patologi ²⁾, Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner ³⁾, Fakultas
Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Jl. Fauna 2, Karangmalang,
Yogyakarta 55281. Email: bowomikro@yahoo.com

ABSTRAK

Penyakit flu burung/ *avian influenza* adalah penyakit infeksius pada unggas yang disebabkan oleh virus influenza tipe A yang termasuk dalam keluarga *Orthomyxoviridae*. Virus tersebut mempunyai rentang inang yang luas, yaitu berbagai spesies burung, mamalia dan manusia. Dewasa ini beberapa peneliti melaporkan terjadinya peningkatan infeksi virus flu burung sub tipe H5N1 pada mamalia dan manusia. Kondisi tersebut telah menimbulkan dugaan bahwa virus flu burung yang bersirkulasi di lapangan mungkin mengalami mutasi asam amino yang bertanggung jawab dalam pengikatan reseptor yang disebut sebagai tapak perlekatan reseptor (TPR). Penelitian ini dirancang untuk melakukan karakterisasi molekuler pada fragmen gen HA yang terdapat TPR pada virus flu burung sub tipe H5N1 yang diisolasi dari berbagai spesies sejak tahun 2003 sampai 2008. Amplifikasi fragmen gen HA dilakukan dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Semua hasil RT-PCR positif selanjutnya disekuensing untuk mengetahui susunan nukleotida fragmen gen target. Hasil sekuensing tersebut kemudian dianalisis dengan program Mega 4.0, yang meliputi: *multiple alignment*, *deductive amino acid prediction*, dan *phylogenetic tree*. Hasil penelitian menunjukkan beberapa asam amino TPR yang bersifat lestari dan diindikasikan cenderung untuk berikatan dengan reseptor tipe unggas, yaitu asam sialat α 2, 3 galaktosa. Satu isolat virus flu burung yang diteliti, yaitu A/ layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008 mengalami delesi asam amino posisi 129 dan mutasi asam amino posisi 151 isoleusin menjadi treonin. Analisis pohon kekerabatan menunjukkan pengelompokan virus flu burung tersebut tidak menunjukkan pola distribusi tertentu dari spesies unggas mau pun sebaran geografis asal virus yang diteliti.

Kata-kata kunci : flu burung, haemagglutinin, asam amino, tapak perlekatan reseptor.

ABSTRACT

Avian Influenza (AI) is an infectious disease in poultry, caused by type A of avian influenza virus (AIV), in the family of *Orthomyxoviridae*. Almost all birds' species are sensitive to the AI. Beside the ability to infect various species of poultry. AIV type A has a wide range of host including all bird species, mammals, dan human. Today some scientists reported that the cases of AI in mammals, including humans are increasing. This condition suggests that the AI virus circulated in the field may have some mutations in the amino acid determinants responsible receptor binding site (RBS). A research was therefore designed to investigate the molecular level of HA gen fragment responsible for receptor binding site of AIV isolated from various poultry since 2003 to 2008. Molecular characterization was based on the amplification of receptor binding site of HA gene by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). All RT-PCR of HA gene positive products were sequenced to determine the nucleotide composition at the targeted fragment. Sequences yielded were analyzed by program Mega 4.0 versions, including multiple alignment, deductive amino acid prediction, and establishment of phylogenetic tree. The results show that all AIV isolates could be determined of some conserved amino acids residues responsible for RBS which indicate the binding preference of avian like receptor, sialic acid α 2, 3 galactose except isolate A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008 which could be found a deletion of amino acid at position of 129 dan mutation of 151 isoleucine into threonine. Phylogenetic study showed that clustering of AIV did not base on species of bird or geographic origin of AI viruses which were studied.

Key words: avian influenza, haemagglutinin, amino acid, receptor binding site

PENDAHULUAN

Penyakit flu burung/ *avian influenza* (AI) di Indonesia, pada awalnya diketahui sebagai penyebab kematian unggas yang cukup tinggi di sejumlah peternakan ayam petelur komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah, sejak tahun 2003. Penyebaran penyakit tersebut terus meluas ke berbagai propinsi lain, dan pada tahun 2007 hampir semua propinsi dilaporkan endemis penyakit AI pada unggas, kecuali Propinsi Maluku dan Gorontalo (Komnas FBPI, 2007). Dewasa ini perkembangan infeksi virus flu burung H5N1 dinilai mulai mengkuatirkan, karena mampu melewati sawar/ barrier pertahanan antar spesies. Beberapa laporan yang mendukung data tersebut di atas, antara lain kasus penyakit AI subtipe H5N1 pada dua harimau (*Panthera tigris*) dan dua *leopards* (*Panthera pardus*) pada sebuah kebun binatang di Thailand (Kheawacharoen *et al.*, 2004), pada kucing dan anjing (Songserm *et al.*, 2006-a dan Songserm *et al.*, 2006-b), pada babi (Takano *et al.*, 2009), dan pada manusia yang pertama kali dilaporkan pada bulan Mei 1997 di Hongkong (Subbarao *et al.*, 1998).

Kemampuan virus flu burung untuk dapat menginfeksi inang ditentukan oleh hemagglutinin (H/HA), yaitu *spike* glikoprotein terluar yang berbentuk suatu homotrimer dan dikode oleh segmen gen ke-4 dengan panjang 1778 nt. (Cox dan Kawaoka, 1998). Monomer H/HA terdiri dari bagian kaput yang berbentuk globulus yang dihubungkan dengan *fibrous stalk domain* dan terdiri dari dua segmen polipeptida, yaitu H1 dan H2. Kedua segmen tersebut terbentuk dengan cara pemecahan (*cleavage*) oleh enzim inang di daerah *cleavage site* (CS) (Horimoto dan Kawaoka, 1997; Horimoto dan Kawaoka, 2001; Horimoto dan Kawaoka, 2005).

Segmen H1 juga mengdanung semua pendana sifat antigenik yang bersifat protektif dan *receptor binding cavity* (RBC). Segmen tersebut sebagai kantong yang terletak pada ujung distal HA1 yang membentuk tempat untuk mengikat asam sialat dan menjadi perantara untuk perlekatan HA dengan permukaan sel inang, (Roger *et al.*, 1983, sitasi oleh Naeve *et al.*, 1984). Dalam RBC tersebut terdapat asam amino yang bertanggung jawab pada *receptor binding site* (RBS) atau tapak perlekatan reseptor (TPR) (Cox dan Kawaoka, 1998; Kovacova *et al.*, 2002). Asam amino pada TPR berperan penting untuk berikatan dengan asam sialat pada ujung terminal oligosakarida,

antara lain α 2,6 *sialyl lactosa*, *N-acetylneuraminic acid* α 2,6 *Galactosa* dan α 2,3 *sialyllactosa*, *Neuraminic acid* α 2,3 *Galactosa* (Suzuki *et al.*, 2000). Pada umumnya semua struktur HA virus flu burung mempunyai konfigurasi RBC yang mirip, terdiri dari tiga elemen struktural, yaitu α -heliks (190-heliks, HA1 : 188 sampai 190), dan dua *loops*, yaitu 130-*loops* (HA1:134 sampai 138) serta 220-*loops* (HA1: 221 sampai 228). Pemberian nomor tersebut berdasarkan sistem penomoran virus *influenza* subtipe H3. Menurut Zhou *et al.*, (2007) beberapa asam amino penting yang bertanggung jawab pada TPR dan bersifat lestari pada virus flu burung subtipe H5N1, yaitu pada posisi Y 91, W 149, I 151, H 179, N 182, E 186, 190 L dan 192 Q (*H5 numbering system*). Residu asam amino pada RBC tersebut merupakan *conserved* residu yang penting dalam spesifitas pengikatan reseptor pada virus flu burung subtipe H1 dan H5 (Kovacova *et al.*, 2002; Steven *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007), disamping asam amino tersebut, residu posisi 191 (Kovacova *et al.*, 2002), posisi 132 (Muramoto *et al.*, 2006), dan posisi 129 (Smith *et al.*, 2006) juga merupakan asam amino penting pada TPR. Asam amino tersebut pada umumnya bersifat lestari dalam spesifitas pengikatan reseptor virus *influenza* subtipe H1 dan H5 (Kovacova *et al.*, 2002; Steven *et al.*, 2006; Zhou *et al.* 2007).

Proses infeksi virus flu burung, tidak semata-mata ditentukan oleh patogenisitas virus flu burung saja, tetapi juga oleh kemampuan virus tersebut untuk berikatan dengan reseptor inang. Untuk itu diperlukan kesesuaian TPR yang ada pada virus flu burung dengan reseptor pada permukaan sel inang. Sejauh ini diketahui bahwa asam sialat (SA) α 2,3 galaktosa merupakan reseptor untuk virus *influenza* asal unggas dan hewan, sedangkan reseptor α 2,6 galaktosa merupakan reseptor untuk virus *influenza* asal manusia. Naeve *et al.*, (1984) dan Gambaryan *et al.*, (2006) melaporkan bahwa kemampuan virus *influenza* dalam menembus barrier pertahanan spesies, diduga erat berhubungan dengan pergeseran preferensi virus tersebut untuk berikatan dengan reseptor SA α 2,3 galaktosa ke AS α 2, 6 galaktosa atau sebaliknya.

Kasus penyakit flu burung pada unggas masih terjadi secara sporadis di beberapa wilayah di Indonesia. Dewasa ini telah dilaporkan banyak kasus penyakit flu burung yang terjadi pada mamalia termasuk manusia. Kondisi tersebut menimbulkan dugaan bahwa

peningkatan kasus infeksi virus flu burung pada mamalia dan manusia tersebut mungkin berhubungan dengan perubahan domain penting pada TPR virus flu burung asal unggas. Untuk menjawab permasalahan tersebut diperlukan penelitian pada tingkat molekuler khususnya pada fragmen gen HA yang terdapat TPR, pada virus flu burung subtipe H5N1 asal berbagai unggas yang diisolasi sejak tahun 2003 sampai 2008.

METODE PENELITIAN

Virus yang diteliti

Materi utama penelitian ini berupa isolat virus flu burung asal beberapa spesies unggas yang dikoleksi sejak tahun 2003 sampai 2008 dari Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Barat, Jawa Timur, dan Lampung. Isolat tersebut telah diidentifikasi secara serologis dan molekuler sebagai virus flu burung subtipe H5N1 oleh penulis. Isolasi, propagasi, dan teknik molekuler dikerjakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM dengan fasilitas biosafety cabinet level III. Sekuensing dilakukan di Laboratorium Biotechnology, (PT. Charoen Pockphan Indonesia, Jakarta).

Tabel 1. Daftar isolat virus flu burung yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Isolat Virus Flu Burung
1	A/NC/Jogja/MHW-RBS-01/2008
2	A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008
3	A/Broiler/SMG/MHW-RBS-05/2008
4	A/NC/Jogja/MHW-RBS-06/2008
5	A/Quail/Solo/MHW-RBS-11/2007
6	A/MD/MTL/Pokja-RBS-15/2007
7	A/Layer/Solo/MHW-RBS-23/2007
8	A/Layer/Solo/MHW-RBS-25/2007
9	A/Quail/Solo/MHW-RBS-26/2007
10	A/MD/MTL/Pokja-RBS-16/2007
11	A/Quail/Jogja/MHW-RBS-30/2007
12	A/Layer/Jatim/MHW-RBS-AL1/2007
13	A/MD/Jogja-PST/RBS-UA1/2006
14	A/MD/MGL/UGM-RBS-UA2/2006
15	A/Duck/Jogja-PST/UGM/RBS-UA3/2006
16	A/Duck/Jatim/UGM/RBS-UA4/2005
17	A/Layer/MGL/MHW-RBS-AL2/2005
18	A/Layer/Jogja-KP/MHW-RBS-AL3/2004
19	A/Layer/Jogja/MHW-RBS-/2004
20	A/Duck/Jatim/MHW-RBS-8/2003
21	A/Layer/Purwokerto/MHW-RBS-12/2003

Perbanyakkan Virus.

Propagasi isolat virus flu burung dilakukan secara *in ovo* menggunakan telur ayam berembrio *spesific pathogen free* (SPF) umur 11 hari. Adanya pertumbuhan virus flu burung ditentukan dengan uji hemaglutinasi (HA) dan dilanjutkan dengan uji hambatan hemaglutinasi (*hemagglutination imhibition*/HI) menggunakan anti serum spesifik virus flu burung subtipe H5N1. Hasil propagasi secara *in ovo* tersebut kemudian diperiksa secara molekuler. Prosedur isolasi dan identifikasi tersebut mengacu pada *manual on animal influenza diagnosis dan surveillance* (WHO, 2002).

Isolasi RNA

Isolasi RNA virus AI dilakukan dengan *micro-to Midi RNA isolation kit* (Invitrogen, USA) sesuai dengan prosedur standar yang disarankan oleh Invitrogen. Pada prinsipnya, sejumlah 0,2 ml isolat virus flu burung dalam cairan korioalantois ditambahkan ke dalam 0,2 ml larutan pelisis yang mengandung 0,002 ml *â-mercaptoethanol*. Campuran tersebut, kemudian disentrifugasi pada 12.000 x g selama 2 menit suhu 25°C (*refrigerated microcentrifuge*, model 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Supernatan dipindahkan ke dalam tabung bersih dan ditambah dengan 0,2 ml etanol absolut. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *RNA spin cartridge*, dan disentrifugasi pada 12.000 x g selama 15 menit 25°C. *Cartridge* dicuci 1 x dengan 0,7 ml *wash buffer* I dan 1 x dengan 0,5 *wash buffer* II. *Cartridge* tersebut kemudian dipindahkan ke dalam *RNA recovery tube*. Sejumlah RNA diperoleh dengan melakukan elusi *cartridge* tersebut dengan 0,03 ml *RNAse-free water* dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 12.000 x g selama 2 menit 25°C. Suspensi RNA yang diperoleh, kemudian dipakai untuk *template* pada reaksi *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Amplifikasi Gen HA yang Terdapat TPR.

Amplifikasi fragmen gen HA yang terdapat TPR dengan primer Lee *et al.*, (2001) RBS Forward: -5' aca cat gcy car gac ata ct-3' dan Reverse: -5'cty tgr tty agt gtt gat gt 3'- dengan target amplifikasi posisi 155 sampai 699, dan produk hasil amplifikasi sekitar 545 bp. Reaksi dilakukan dengan kit *Superscript III-one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen) menggunakan *Gene-Amp PCR System 2400* (Applied Biosystem, USA). *Master mix*

amplifikasi adalah sebagai berikut: 2x *reaction mix* 25 μ l, primer *forward* 2 μ l, primer *reverse* 1 μ l (konsentrasi primer 40 pM/ μ l), *Superscript III/RT-Platinum Taq Mix* 2 μ l, *RNA-se free water* 10 μ l dan *template RNA* 10 μ l, sehingga total volume reaksi adalah 50 μ l. Siklus amplifikasi tersebut adalah: *RT reaction* 50°C selama 30 menit, *Initial hot start* 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 43,5°C selama 1 menit, *extension* 68°C selama 90 detik dan *final extension* 68°C selama 4 menit. Reaksi tersebut dilakukan sebanyak 40 siklus.

Produk PCR divisualisasi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dan pewarnaan dengan *ethidium bromide* (0,5 μ g/ml). Pita DNA yang teramplifikasi diamati di dalam ruangan gelap menggunakan *UV transluminator*, untuk selanjutnya didokumentasi.

Sekuensing dan Analisis Hasil Sekuens

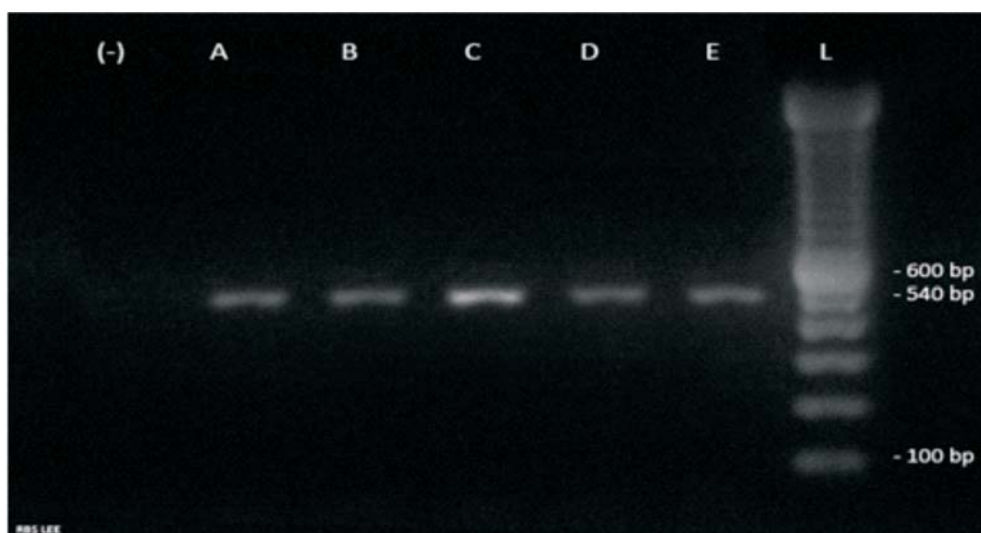
Secara prinsip sekuensing dilakukan sebagai berikut: produk PCR dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan kit purifikasi *Exo SAP-IT (USB Corporation)* sebelum dilakukan sekuensing, sesuai metode yang direkomendasikan oleh produsen. *Master mix* terdiri atas: *Big Dye Terminator Cyler Sequencing* kit 8 μ L, primer μ L (10 μ M), dan DNA *template* disesuaikan dengan panjang yang mencapai 20 ng/kb, dan volume akhir mencapai 20 μ l. Siklus sekuensing dilakukan dengan

mesin PCR yang meliputi pre-denaturasi pada suhu 96°C selama 5 menit, dan siklus PCR selama 25 kali dengan program: denaturasi pada suhu 96°C selama 30 detik, *annealing* 43,5°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 60°C selama 1 menit. Hasil siklus sekuensing selanjutnya dimurnikan dengan *Big Dye X Terminator Purification* kit, sesuai protokol produsen. Produk yang telah murni tersebut selanjutnya *dirunning* dengan alat DNA *sequencer*.

Hasil sekuensing yaitu berupa urutan nukleotida fragmen gen HA target dianalisis dengan perangkat bioinformatik program *Mega 4.0* yang meliputi: *multiple alignment*, *deductive amino acid prediction*, *pair wise distance calculation* dan pohon kekerabatan (Tamura *et al.*, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi fragmen TPR dengan desain primer yang disusun oleh Lee *et al.*, (2001) sesuai target amplifikasi yaitu dengan produk akhir 545 bp. Pita DNA yang teramati cukup baik, tanpa teramati pita DNA yang bersifat non spesifik. Primer tersebut juga dipakai oleh peneliti Indonesia lainnya, seperti: Dharmayanti *et al.*, (2006); Dharmayanti dan Darminto, (2009), dengan hasil cukup baik. Contoh hasil amplifikasi dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Contoh hasil amplifikasi 545 bp fragmen gen H5 yang terdapat TPR dan tapak antigenik. Lane A, B, C, D, dan E merupakan isolat virus flu burung, lane (-) adalah kontrol negatif dan lane L adalah DNA ladder 100 bp

Hasil perbandingan asam amino penting domain TPR tersebut dapat diamati pada Tabel 1. Menurut Zhou *et al.*, (2007) beberapa domain penting yang bertanggung jawab pada tapak perlekatan reseptor dan bersifat lestari pada virus flu burung subtipe H5N1, terletak pada posisi Y 91, W 149, I 151, H 179, N 182, E 186, 190 L dan 192 Q. Konsensus sekuens untuk sisi kiri TPR adalah posisi asam amino ke 130-134, yaitu GVSSA dan untuk sisi kanan posisi 220-224 adalah NGQSG (Kovacova *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007). Kovacova *et al.*, (2002) melaporkan bahwa di antara asam amino tersebut, tujuh di

antaranya berinteraksi langsung dengan sel reseptor inang, yaitu Y 91, W 150, T 152, H 180, E 187, L 191, dan Y 192 (H1 numbering system). Posisi tersebut sesuai dengan H5 numbering system pada asam amino Y 91, W 149, I 151, H 179, E 186, L 190, dan Y 191. Posisi asam amino 152 T (H1 numbering system) tersebut merupakan asam amino yang pada umumnya ditemukan pada VAI subtipe H1, H2 dan H3. Posisi tersebut menurut Kovacova *et al.*, (2002) adalah *conerved residue* yang bersifat rendah, dan memungkinkan substitusi asam amino yang bersifat hidrofobik, misalnya: valin, leusin dan isoleusin.

Tabel 2. Analisis asam amino TPR gen HA virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi sejak tahun 2003 sampai 2008

Nama isolat	Tapak Perlekatan Reseptor (H5 numbering system)														Glikosilasi		
	91	129	130	131	132	133	134	149	151	182	186	190	191	192	154	155	156
#AF144305.1A/Goose/Guandong/1/1996	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#AF364334.1 A/Goose/Guandong/6/1997	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#AY741213.1 A/Blackbird/Human/2004	Y	L	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#DQ320912.1 A/Duck/Hunan/2005	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#GQ122385.1 A/Chicken/East-Java/2003	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#GQ122384.1 A/Chicken/West-Java/2003	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#GQ122389.1 A/Quail/Jogja/2004	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#DQ497657.1 A/Chicken/Jembrana/2004	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#EU124276.1 A/Chicken/West_Java/2006	Y	L	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#GQ122555.1 A/Chick/East_Java/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#EU124152.1 A/Chicken/JKT/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#EU124208.1 A/Chicken/GK/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#GQ122402.1 A/Chicken/Jatim/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	N	T
#EU124212.1 A/Chicken/MGL/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#EU124214.1 A/Chicken/SMG/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#CY014177.1 A/Human/CDC/Indo/2005	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#CY014199.1 A/Human/CDC/Indo/2005	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#CY014210.1 A/Human/CDC/Indo/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#CY014272.1 A/Human/CDC/Indo/2006	Y	L	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	N	T
#CY019360.1 A/Human/CDC/Indo/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#CY019400.1 A/CDC/Human/Indo/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/NC/Jogja/MHW/2008	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008	Y	-	G	V	S	S	A	W	T	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Broiler/SMG/MHW-RBS-05/2008	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/NC/Jogja/MHW-RBS-06/2008	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Quail/Solo/MHW-RBS-11/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#A/MD/MTL/Pokja-RBS-15/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/Solo/MHW-RBS-23/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/Solo/MHW-RBS-25/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Quail/Solo/MHW-RBS-26/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#A/MD/MTL/Pokja-RBS-16/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Quail/Jogja/MHW-RBS-30/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	-	-	-
#A/Layer/Jatim/MHW-RBS-AL1/2007	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/MD/Jogja-PST/RBS-UA1/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/MD/MGL/UGM-RBS-UA2/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Duck/Jogja-PST/UGM/RBS-UA3/2006	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Duck/Jatim/UGM/RBS-UA4/2005	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/MGL/MHW-RBS-AL2/2005	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/Jogja-KP/MHW-RBS-AL3/2004	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/Jogja/MHW-RBS-/2004	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Duck/Jatim/MHW-RBS-8/2003	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T
#A/Layer/Purwokerto/MHW-RBS-12/2003	Y	S	G	V	S	S	A	W	I	N	E	L	Y	Q	N	S	T

Catatan:

- Menurut Kovacova *et al.* (2002) Aa posisi: 91, 149, 151, 179, 186, 190 dan 191.
- Menurut Muramoto *et al.* (2006) Aa posisi: idemtito + 132 dan 182.
- Menurut Smith *et al.*(2006) Aa posisi: idemtito + 129
- Menurut Zhou *et al.* (2007) Aa posisi: 91, 149, 151, 179, , 182, 186, 190 dan 192.
- Receptor binding cavity sisi kanan: 130, 131, 132, 133 dan 134, dan Tapak Glikosilasi: 154, 155 dan 156 menurut, Kovacova *et al.* (2002) dan Zhou *et al.* (2007).
- Tercetak **bold** merupakan isolat yang diteliti.

Hasil senada disampaikan oleh Muramoto *et al.*, (2006) yang melakukan analisis virus AI subtype H5N1 isolat Vietnam pada tahun 2004 sampai 2005, menunjukkan bahwa asam amino penting pada TPR sesuai dengan laporan penelitian Kovacova *et al.*, (2002) dan Zhou *et al.*, (2007), meskipun Muramoto *et al.*, (2006) menyatakan selain tujuh asam amino tersebut, residu posisi 136 serin dan 186 asparagin (H3 numbering system) sesuai dengan S 132 dan N 182 (H5 numbering system) yang berperan penting pada TPR. Menurut Smith *et al.*, (2006) residu penting dalam TPR yang belum dilaporkan oleh peneliti sebelumnya adalah posisi 129 (H5 numbering system) yang pada umumnya ditempati oleh serin.

Asam amino posisi 91 adalah Y dan menurut hasil analisis terbukti posisi tersebut bersifat lestari yang teramati pada virus *ancestral* dan virus flu burung yang diteliti sejak tahun 2003 sampai 2008. Menurut Kovacova *et al.*, (2002) asam amino 91 Y merupakan asam amino yang bersifat lestari, bahkan di antara 15 subtype virus flu burung yang ada. Al-Majhdi (2007) melaporkan bahwa posisi asam amino Y 91, bersama sama dengan asam amino posisi H 179, W 149, dan I 151 menempati posisi pada permukaan *sialic acid binding site*. Studi dengan kristalografi menunjukkan bahwa asam amino tersebut berinteraksi dengan asam sialat melalui ikatan hidrogen.

Asam amino posisi 129 pada semua virus flu burung dalam penelitian ini adalah serin (S), kecuali virus A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008 yang menunjukkan delesi asam amino posisi 129. Secara umum hasil tersebut sesuai dengan laporan Wu *et al.*, (2008), yaitu secara umum virus asal Indonesia yang termasuk Group A, B, dan C adalah serin. Kondisi tersebut berbeda untuk virus yang diperoleh dari *gene bank*, yaitu A/Duck/Hunan/2005 dan dua virus Indonesia, yaitu A/Chicken/Jembrana/2004 dan A/Human/CDC/Indo/2006; posisi tersebut diisi oleh leusin. Menurut Smith *et al.*, (2006) beberapa virus yang diisolasi pada tahun 2004 sampai 2005, menunjukkan mutasi S 129 L yang teramati pada virus asal Vietnam dan Indonesia. Virus flu burung yang mengalami mutasi S 129 L di Indonesia dilaporkan teramati pada virus flu burung dari Group C, yaitu virus yang diisolasi di Sumatera Utara pada tahun 2005. Substitusi L 129 V dan A 134 V, juga ditemukan pada virus flu burung isolat Thailand Th 676 DQ 360835 (Auewarakul *et al.*, 2007). Substitusi tersebut cukup menarik karena posisi keduanya berada dalam *loops 130 receptor binding cavity*. Studi pola hemaglutinasi yang dilakukan dengan virus

mutan L 129 V dan A 134 V menunjukkan peningkatan preferensi AS α 2,6 Gal., namun jika mutasi tersebut hanya dilakukan pada L 129 V, virus mutan tersebut tidak menunjukkan perubahan preferensi reseptor.

Asam amino posisi 130, 131, 132, 133, dan 134 pada semua virus flu burung yang diamati dalam penelitian ini bersifat lestari, yaitu GVSSA. Menurut Kovacova *et al.*, (2002) posisi tersebut menyusun sisi kanan *receptor binding cavity* dan pada umumnya bersifat lestari, meskipun untuk virus flu burung dengan subtype yang berbeda mempunyai susunan asam amino yang berbeda pula. Sebagai contoh adalah virus *influenza* subtype H1 posisi 130 sampai 134 tersebut relevan dengan posisi 131 sampai 135 (H1 numbering system) mempunyai konsesus sekuen GVTAA. Posisi tersebut juga relevan dengan asam amino nomer 134 sampai 138 (H3 numbering system) dengan sekuen GGSNA. Mutasi asam amino posisi A 134 V bersama dengan asam amino posisi L 129 V mempunyai peran dalam menentukan preferensi reseptor inang (Auewarakul *et al.*, 2007).

Asam amino posisi 149 W pada virus flu burung dalam penelitian ini teramati lestari. Hasil tersebut sesuai dengan laporan penelitian terdahulu yang disampaikan oleh Kovacova *et al.*, (2002); Muramoto *et al.*, (2006); Zhou *et al.*, (2007), bahwa sejauh ini asam amino posisi tersebut selalu bersifat lestari. Menurut Al-Majhdi (2007) triptofan (W) posisi 153 (H3 numbering system) sesuai dengan W 149 (H5 numbering system) bersifat non-polar yang akan berinteraksi dengan asam sialat pada daerah yang bersifat hidrofobik dengan ikatan *van der Waals*.

Asam amino posisi 151 adalah isoleusin (I). Diantara virus flu burung yang diteliti terdapat satu isolat, yaitu A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008 yang mengalami mutasi nukleotida penyusun isoleusin posisi 151, yaitu CTT menjadi CCT sehingga menyebabkan mutasi asam amino isoleusin 151 menjadi threonine (T). Data pesejajaran di antara subtype virus *influenza* yang dilakukan oleh Kovacova *et al.*, (2002) menunjukkan bahwa asam amino T 151 pada umumnya dimiliki oleh virus *influenza* A subtype H1, H2, atau H3. Posisi tersebut bersifat kurang stabil dibandingkan residu asam amino lain pada domain TPR dan dapat bervariasi di antara subtype virus flu burung yang ada.

Menurut Zhou *et al.*, (2007) asam amino posisi 154, 155, dan 156 merupakan tempat potensial terjadinya glikosilasi. Secara umum potensi glikosilasi pada isolat virus flu burung yang diisolasi dari berbagai spesies unggas pada

sejak tahun 2003 sampai 2008 dengan variasi gejala klinis dan patologis serta yang diisolasi dari unggas dengan maupun tanpa vaksinasi mempunyai motif NST pada posisi 154, 155, dan 156. Menurut Shakin-Eshlemen *et al.*, (1996) *N-linked* glikosilasi pada umumnya terjadi pada sekuens dengan motif N-X-S atau N-X-T. Posisi X merupakan asam amino selain prolin. Kasturi *et al.*, (1995) melaporkan bahwa pada umumnya sekuens N-X-T merupakan motif yang lebih efisien untuk mengalami penambahan rantai samping karbohidrat (glikosilasi) dibandingkan sekuens N-X-S. Glikosilasi pada domain TPR juga terjadi pada virus influenza subtipe H3, terutama yang diisolasi selama dan setelah tahun 1975 (Schulze, 1997). Glikosilasi terjadi pada asam amino posisi 126, yang merupakan residu yang berdekatan dengan TPR dan dilaporkan sebagai tapak yang bertanggung jawab pada sifat antigenik virus tersebut. Iwatsuki-Horimoto *et al.*, (2004) melakukan analisis sekuens HA virus A/Ty/Ont/66 (H5N9), dan mendapatkan dua titik potensial glikosilasi pada posisi 131 dan 158 (H3 numbering system), namun pada virus flu burung HK/97 tidak terdapat glikosilasi. Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa perbedaan glikosilasi pada domain TPR tersebut tidak dapat menjelaskan perbedaan pengenalan reseptor, meskipun keberadaan karbohidrat pada posisi dekat domain TPR, dapat meningkatkan afinitas dan spesifitas ikatan dengan reseptor. Menurut WHO (2005) perubahan struktural HA dapat terjadi karena mutasi alanin posisi 156 menjadi treonin, sehingga terjadi glikosilasi. Proses tersebut diprediksi menurunkan afinitas terhadap reseptor.

Asam amino posisi 182 adalah asparagin (N). Sejauh ini posisi tersebut bersifat sangat lestari baik pada asam amino maupun nukleotida penyusunnya. Hasil yang sama dilaporkan oleh Kovacova *et al.*, (2002); Muramoto *et al.*, (2006); Zhou *et al.*, (2007). Asam amino pada posisi N 182 tersebut menunjukkan residu yang bersifat lestari di antara subtipe HA yang lain (Kovacova *et al.*, 2002). Menurut Yamada *et al.*, (2006) asam amino posisi N 182 dan glutamin (Q) 192 merupakan asam amino yang berperan untuk menjaga stabilitas interaksi dengan reseptor asam sialat. Mutasi residu N 182 menjadi L atau Q 192 menjadi R dianggap mampu menyebabkan perubahan spesifitas reseptor SA α 2,3 Gal., ke preferensi reseptor asam sialat α 2, 6 Gal. Secara alami virus yang mengalami mutasi pada posisi tersebut dilaporkan terjadi pada virus flu burung *clade-2* yang diisolasi dari orang di Azerbaijan dan Irak.

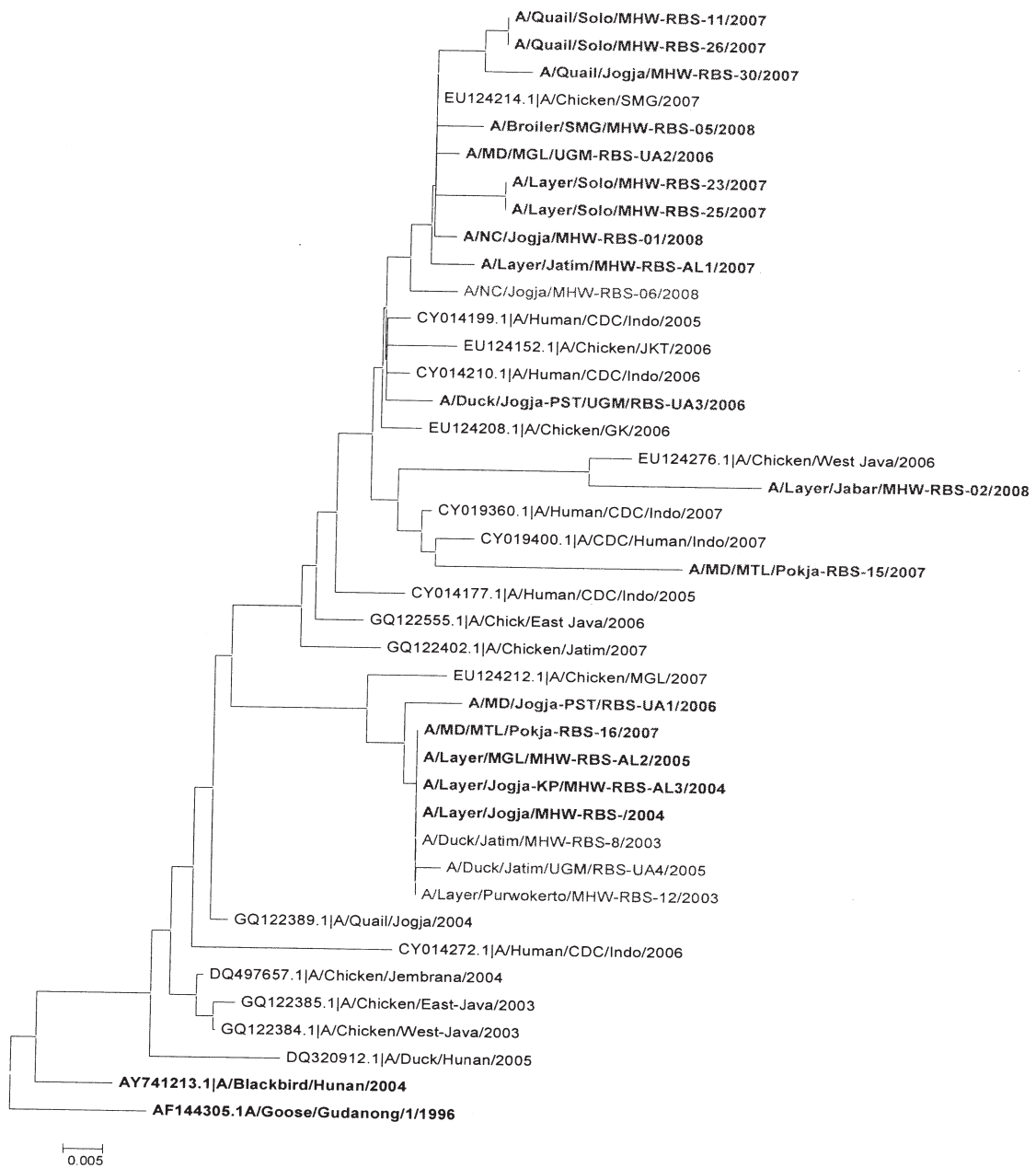
Struktur α -heliks yang terdiri atas asam amino posisi 186 glutamat (E), 190 leusin (L), dan 191 tirosin (Y) bersifat *conserved* (Kovacova *et al.*, 2002; Al-Majhdi 2007; Zhou *et al.*, 2007), bahkan di antara subtipe HA virus flu burung yang ada (Kovacova *et al.*, 2002). Asam amino dan nukleotida posisi 192 tidak menunjukkan adanya mutasi, baik isolat virus flu burung awal wabah sampai isolat tahun 2008. Menurut Yamada *et al.*, (2006) asam amino posisi N 182, dan Q 192 berperan untuk menjaga stabilitas ikatan dengan reseptor asam sialat inang.

Asam amino posisi *loops* 220 yang terdiri dari posisi 220, 221,223, dan 224 merupakan *receptor binding cavity* sisi sebelah kiri (Kovacova *et al.*, 2002). Beberapa peneliti melaporkan bahwa pada posisi tersebut, untuk virus flu burung subtipe H5N1 mempunyai motif NGQSG (Kovacova *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007). Posisi tersebut berbeda untuk virus *influenza* subtipe H1, yaitu mempunyai motif RGQAGR, sedangkan virus subtipe H3, mempunyai motif RGQSGR (Kovacova *et al.*, 2002). Menurut Naeve *et al.*, (1984) pada RBC tersebut terdapat residu asam amino penting yang berperan dalam preferensi pengikatan reseptor pada virus *influenza* manusia, yaitu asam amino posisi 226 dan 228 (H2 dan H3). Posisi tersebut bersesuaian dengan asam amino nomor 222 dan 224 pada virus H5. Mutasi asam amino posisi Gln 222 Leu dan Gly 224 Ser berperan meningkatkan kecenderungan pengikatan reseptor tipe unggas mengarah ke reseptor tipe manusia, namun demikian mutasi tersebut belum pernah dilaporkan pada virus flu burung subtipe H5N1 (Gutierrez *et al.*, 2009). Menurut Yamada *et al.*, (2006) mutasi asam amino Asn 182 Lys dan Gln 192 Arg pada virus flu burung subtipe H5N1 secara independen mampu menyebabkan perubahan preferensi reseptor tipe unggas SA α 2,3 Gal., ke tipe manusia SA α 2,6 Gal. Auewarakul *et al.*, (2007) melaporkan virus flu burung subtipe H5N1 yang mempunyai preferensi reseptor SA α 2,3 Gal., mengalami perubahan preferensi reseptor yang mengarah ke reseptor α 2,3 Gal., dan SA α 2,6 Gal., karena terjadi substitusi asam amino Leu 129 Val dan Ala 134 Val. Mutasi tersebut dapat menyebabkan stabilitas ikatan SA α 2,6 Gal., pada RBC dalam kondisi yang optimal karena terikat dalam konformasi *cis*.

Analisis pohon kekerabatan yang dibentuk berdasarkan fragmen gen HA pada nukleotida posisi 208 sampai 612, membentuk beberapa kelompok virus flu burung (Gambar 2). Virus flu burung yang diisolasi pada tahun 2003, 2004, 2005, dan masing-masing satu virus flu burung

yang diisolasi pada tahun 2006 dan 2007 yang diteliti membentuk kluster virus tersendiri. Ke dalam kelompok tersebut berdekatan dengan kluster virus flu burung yang diisolasi pada awal wabah yang telah terdapat pada *gene bank* yang menunjukkan kedekatan genetik dengan virus A/Duck/Hunan/2005, A/Blackbird/Hunan/2004, dan virus induk. Analisis tersebut bersesuaian dengan laporan Wang *et al.*, (2008) yang melaporkan bahwa virus flu burung yang diisolasi di Indonesia mempunyai kedekatan genetik dengan virus asal Hunan, Cina Selatan.

Virus flu burung yang diisolasi pada tahun 2006, 2007, dan 2008 membentuk kluster tersendiri dengan percabangan yang lebih jauh. Dari kluster tersebut terbentuk sub-kluster yang terdiri atas isolat virus A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008, A/Chicken/West Java/2006, virus flu burung asal manusia tahun 2007, dan virus A/MD/MTL/Pokja-RBS-15/2007. Salah satu isolat, yaitu A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008, menunjukkan percabangan yang paling jauh. Kondisi tersebut diperkirakan karena banyaknya mutasi yang terjadi pada fragmen RBS pada virus flu burung tersebut.



Gambar 2. Pohon kekerabatan fragmen gen HA VAI subtipe H5N1 yang terdapat TPR di sepanjang nukleotida 208 – 612. Notasi dengan huruf tebal adalah isolat yang diteliti.

Gambaran pohon kekerabatan fragmen gen HA yang terdapat TPR dalam penelitian ini tidak menunjukkan pola distribusi tertentu dari spesies unggas maupun sebaran geografis, tetapi secara umum kluster virus flu burung tersebut cenderung berdasar pada tahun isolasi virus flu burung yang diteliti. Pola sebaran virus tersebut bersesuaian dengan hasil analisis Wang *et al.*, (2008) bahwa pola percabangan pohon kekerabatan yang digambarkan tidak teramati adanya virus yang berkelompok berdasarkan spesies dan sebaran geografis tertentu. Kondisi tersebut berbeda dengan laporan Lam *et al.*, (2008) bahwa analisis filogenetik gen HA virus flu burung asal Indonesia menunjukkan adanya kelompok spesies, terutama virus flu burung yang diisolasi dari manusia. Virus flu burung asal unggas membentuk kluster tersendiri meskipun tidak ada pola sebaran di antara spesies unggas yang diteliti.

SIMPULAN

Berdasarkan data persejajaran dalam penelitian ini diketahui bahwa virus flu burung subtype H5N1 yang diisolasi dari berbagai unggas sejak tahun 2003 sampai 2008, teramati beberapa asam amino penting TPR yang bersifat lestari dan menunjukkan kecenderungan berikatan dengan reseptor tipe unggas SA α 2,3 Galaktosa. Salah satu isolat yang diteliti yaitu A/Layer/Jabar/MHW-RBS-02/2008 (H5N1) menunjukkan delesi asam amino posisi 129 dan mutasi asam amino I 151 T, yang pada umumnya ditemukan pada virus *influenza A* subtype lain, yaitu H1, H2 atau H3. Analisis pohon kekerabatan tidak teramati kluster virus flu burung yang menunjukkan pola distribusi tertentu dari spesies unggas maupun sebaran geografis asal virus yang diteliti.

SARAN

Untuk mengetahui residu asam amino pada *receptor binding cavity* sisi kiri perlu dilakukan amplifikasi gen HA virus flu burung yang terdapat TPR pada posisi *loops* 220.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Prof Dr drh I Gusti Ngurah Kade Mahardika, Lab Biomedik dan Molekuler, drh I Wayan Suardana, MSi. Lab. Kesmavet, FKH. Universitas Udayana. Ir Jaka Widada, Mp.Ph.D Lab Bioteknologi PAU UGM atas *sharing* bioinformatik serta drh Khisdiana Putri, MP. Lab Mikrobiologi, FKH UGM, atas bantuan teknis laboratorium yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Majhdi FN. 2007. Structure of the Sialic Acid Binding Site in Influenza A Virus: Hemagglutinin. *J Biol Sci* 7 (1): 113-122.
- Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, Sangma C, Suzuki Y, Ungchasak K, Louisirirochanakul S, Lerdsamran H, Pooruk P, Thitithanyanont A, Pittayawonganon C, Guo CT, Hiramatsu H, Jampangern W, Chunsutthiwat S, dan Puthavathana P, 2007. An Avian Influenza H5N1 Virus that Bind to a Human-Type Receptor. *J Virol* 81 (18): 9950-9955.
- Cox N J, dan Kawaoka Y. 1998. *Orthomyxoviruses: Influenza*. Di dalam: Microbiology and Microbial Infection, (eds) Collier, L., Balows, A., dan Sussman, M., Vol. 1: Virology, New York. Oxford University Press, Inc. Pp.: 386-433.
- Dharmayanti NILP, Indriani, dan Adjid RMA. 2006. Identifikasi Virus Avian Influenza pada Beberapa Jenis Unggas di Taman Margasatwa Ragunan dan Upaya Eradikasinya. *Media Kedokteran Hewan* 22 (2): 79-83.
- Dharmayanti NILP, Darminto. 2009. Mutasi Virus AI di Indonesia: Antigenic drift Protein Hemagglutinin (HA) Virus Influenza H5N1 Tahun 2003-2006. *Media Kedokteran Hewan* 25 (1): 68-73.
- Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, dan Klimov A. 2006. Evolution of the Receptor Binding Phenotype of Influenza A (H5) Viruses. *Virology* 344: 432-438.
- Gutierrez RA, Naughtin MJ, Horm SV, San S, Buchi P. 2009. A (H5N1) Virus Evolution in South East Asia. *Viruses* 1, doi: 10.3390/v1030335: 335-361

- Horimoto T, Kawaoka Y. 1997. Biologic Effect of Introducing Additional Basic Amino Acid Residue into the Hemagglutinin Cleavage Site of a Virulent Avian Influenza Virus. *Virus Research* 50: 35-40.
- Horimoto T, dan Kawaoka Y. 2001. Pdanemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 129-149.
- Horimoto T, dan Kawaoka Y. 2005. Influenza: Lessons from Past Pdanemics Warnings from Current Incidens. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3:591-600.
- Iwatsuki-Horimoto K, Kanazawa R, Sugii S, Kawaoka Y, dan Horimoto 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 Ge. Virol* 85: 1001-1005.
- Kasturi L, Eshleman JR, Wunner WH, dan Shakin-Eshlemen SH. 1995. The Hydroxy Amino Acid in an Asn-X-Ser/Thr Sequon Can Influence N-Linked Core Glycosylation Efficiency dan The Level of Expression of a Cell Surface Glycoprotein. *J of Biol Chem* 270 (24): 14756-14761.
- Kheawcharoen, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S. 2004. An Avian Influenza H5N1 in Tiger dan Leopard. *Emerg Infect Dis* 10: 2189-2191.
- Komnas FBPI. 2007. Data Perkembangan Penyakit Avian Influenza di Indonesia, 1 Januari 2007 sampai dengan November 2007. Komisi Nasional Pengendalian Flu Burung dan Kesiapsiagaan Menghadapi Pdanemi Influenza (Komnas FBPI). <http://www.komnasfbpi.go.id>.
- Kovacova A, Ruttkay-Nedecky G, Haverlik IK, Janecek S. 2002. Sequence Similarities dan Evolutionary Relationships of Influenza Virus A Hemagglutinins. *Virus Genes* 24 (1): 57-63.
- Lam TTY, Hon CC, Pybus OG, Kosakovsky Pond SL, Wong RTY, Yip CW, Zeng F, Leung FCC. 2008. Evolutionary dan Transmission Dynamics of Reassortant H5N1 Influenza Virus in Indonesia. *PLoS Pathog* 4(8): e 1000130. Doi:10.1371/journal.ppat.1000130.
- Lee M, Chang P, Shien J, Cheng M, dan Shieh HK. 2001. Identification dan Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcription-PCR. *J Virol Method* 97:13-22.
- Muramoto Y, Le TQM, Phuong LS, Nguyen T, Nguyen TH, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y. 2006. Molecular Characterization of the Hemagglutinin dan Neuraminidase Genes of H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Poultry in Vietnam from 2004 to 2005. *J Vet Med Sci* 6 (5): 527-531.
- Naeve CW, Hinshaw SV, Webster R G. 1984. Mutations in the Hemagglutinin Receptor Binding site Can Change the Biological Properties of Influenza Virus. *J Virol* 51.: 567-569.
- Schulze IT. 1997. Effect of Glycosylation on the Properties dan Fuctions of Influenza Virus Hemagglutinin. *J of Infect Dis* 176 (Suppl 1): S24-28.
- Shakin- Eshlemen SH, Spitalnik SL, dan Kasturi L. 1996. The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequon is an Important Determinant of N-Linked Core-Glycosilation Efficiency. *J of Biol Chem* 271 (11): 6363-6366.
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishnan D, Usman TB, Hassan S S, Nguyen TV, 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 dan Adaptation of H5N1 Influenza Virus in Avian dan Human Hosts in Indonesia dan Vietnam. *Virol* 350: 258-268.
- Songserm T, Alongkorn A, Rungroj J, Namdee SH, Noppodal M, Nuananong P, Sunchai P, Apiradee T, Yong P. 2006-a. Avian Influenza H5N1 in Naturally Infected Domestic Cat. *Emerg Infect Dis* 12 (4): 681-683.
- Songserm T, Alongkorn A, Rungroj J, Namdee SH, Nuananong P, Sunchai P, Apiradee T, Salin S, Roongrejo T, Yong P. 2006-b. Fatal Avian Influenza A H5N1 in a Dog. *Emerg Infect Dis* 12 (1100): 1744-1747.
- Steven J, Blixt O, Tumpey TC, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson I. 2006. Structure dan Receptor Specifity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Research Article*. 312 : 404-410. www.sciencemag.org.
- Subarrao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. 1998. Characterization of an Avian influenza A (H5N1) virus Isolated from a Child with Fatal Respiratory Illness. *Science* 279: 393-396.

- Suzuki Y, Ito I, Suzuki T, Holtdan KE Jr, Chambert TM, Kiso M, Ichida H, Kawaoka Y. 2000. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *J Virol* 74 (24): 11825-11831.
- Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. 2009. A Comparison of the Pathogenicity of Avian dan Swine H5N1 Influenza Viruses in Indonesia. *Arch Virol* 154: 677-681.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology dan Evolution* 10. 1093/molbev/msm092.
- Wang J, Vijaykrishna D, Duan L, Bahl J, Zhang JX, Webster RG, Peiris JSM, Chen H, Smith GJD, Guan Y, 2008. Identification of the Progenitors of Indonesian dan Vietnamese Avian Influenza A (H5N1) Viruses from Southern China. *J Virol* 28 (7): 3405-3414.
- WHO. 2002. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis dan Surveillance. Department of Communicable Disease Surveillance dan Respon. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev.1.
- WHO. 2005. Global Influenza Surveillance Network, 2005: Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. *Emerg Infec Dis* 11 (10): 1515-1521.
- Wu WL, Chen Y, Wang P, Song W, Lau SY, Rayner JM, Smith GJD, Webster RG, Peiris JSM, Lin T, Xia N, Guan Y, Chen H. 2008. Antigenic Profile of Avian H5N1 Viruses in Asia from 2002 to 2007. *J Virol* 82 (4): 1798-1807.
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Harimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevevs DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y. 2006. Haemagglutinin Mutations Responsible for the Binding of H5N1 Influenza A Viruses to Human Type Receptors. *Nature* 444 (16): 378 - 382.
- Zhou JJ, Fu J, Fang DY, Yan HJ, Tian J, Zhou JM, Pao JP, Liang Y, Jiang LP. 2007. Molecular Characterization of the Surface Glycoprotein Genes of an H5N1 Influenza Virus Isolated from Human in Gudanong, China. *Arch Virol* 152: 1515 – 1521.