

Analisis Hemagglutinin Virus Flu Burung (*Avian Influenza*) Subtipe H5N1 Asal Pasar Unggas Hidup di Jakarta Timur 2014

**(HEMAGGLUNIN ANALYSES OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES SUBTYPE H5N1
ISOLATED FROM LIVE BIRD MARKETS IN EAST JAKARTA 2014)**

Risza Hartawan^{1*}, Ni Luh Putu Indi Dharmayanti¹

¹Laboratorium Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. RE Martadinata 30, Kotak Pos 151, Bogor,
Jawa Barat, Indonesia 16114
Telp. +622518330148, *Email: rjoss.dvm@gmail.com

ABSTRAK

Hemagglutinin merupakan glikoprotein permukaan virus influenza yang dikode oleh segmen 4 yang berperan penting dalam penempelan pada reseptor sel inang. Hemagglutinin merupakan salah satu marka molekuler penting terhadap karakter patogenitas atau virulensi virus. Selanjutnya, hemagglutinin mempunyai tingkat mutasi yang ekstensif karena mempunyai epitop yang terpapar dengan lingkungan sehingga banyak muncul banyak varian virus. Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk melakukan analisa bioinformatika pada sekuen hemagglutinin dari virus flu burung (*avian influenza*) subtipe H5N1 asal pasar unggas hidup di Jakarta Timur tahun 2014. Hasil analisa molekuler menunjukkan adanya sirkulasi clade 2.1.3 maupun 2.3.2 yang bersifat patogenik dengan beberapa mutasi pada sekuen hemagglutininnya. Isolat-isolat virus tersebut masih menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap reseptor unggas. Prediksi struktur 3D hemagglutinin menunjukkan adanya perbedaan konformasi protein terutama pada domain HA2 dan *cleavage site*. Prediksi-prediksi molekuler ini masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut, terutama dengan uji tantangan *in vivo* pada hewan coba.

Kata-kata kunci: flu burung; avian influenza; H5N1; hemagglutinin; bioinformatika

ABSTRACT

Hemagglutinin is a surface glycoprotein of the influenza virus encoded by segment 4, which has the main function to attach to the host cell receptor. This glycoprotein is one of the most important markers for determining viral pathogenicity and virulence. Furthermore, hemagglutinin also has experienced massive mutations since its epitopes exposed to the external environment resulting in various variants in the field. The main objective of this study was to characterize molecularly the avian influenza virus subtype H5N1 isolated from live bird markets in East Jakarta in 2014 using a bioinformatics approach. As a result, this study identified the circulation of the highly pathogenic virus from both clade 2.1.3 and 2.3.2 with several mutations in the hemagglutinin sequence. These viruses still displayed a high affinity for the avian receptor. Subsequently, the prediction of the 3D structural model of hemagglutinin demonstrated differences in the protein conformations, especially in the HA2 domain and cleavage site. These molecular predictions require further investigation studies, especially *in vivo* experiments with animal models.

Keywords: avian influenza; H5N1; hemagglutinin; bioinformatics

PENDAHULUAN

Wabah penyakit flu burung atau *avian influenza* (AI) subtipe H5N1 *Asian lineage* yang mulai mewabah di Indonesia sejak 2003 telah menimbulkan dampak kerugian sosial ekonomi yang signifikan, terutama pada industri perunggasan (Wiyono *et al.*, 2012). Penyakit ini juga menimbulkan dampak zoonosis serius pada aspek kesehatan masyarakat dengan adanya sejumlah korban meninggal akibat infeksi virus pada manusia (Sedyaningsih *et al.*, 2007). Dinamika perkembangan virus AI subtipe H5N1 senantiasa menunjukkan perubahan yang signifikan seperti adanya evolusi clade (2.1.1-2.1.3), mutasi virus, perubahan patogenitas, fenomena *escape mutant*, *reassortant* sampai dengan introduksi jenis baru dari clade 2.3.2 (Dharmayanti *et al.*, 2011; 2014).

Secara taksonomi, virus influenza termasuk dalam famili Orthomyxoviridae yang mempunyai delapan genus yaitu Influenza tipe A, B, C, D, Isavirus, Thogotovirus, Quarantivirus dan Wellfleet Bay (Allison *et al.*, 2015; Collin *et al.*, 2015; Shaw dan Palese, 2013). Kelompok virus Influenza A dianggap yang paling penting karena mempunyai sebaran induk semang yang sangat beragam baik dari unggas hingga mamalia (Suarez, 2016). Selanjutnya, Influenza A diklasifikasikan menjadi beberapa subtipe berdasarkan pada kombinasi glikoprotein permukaan yaitu hemagglutinin (HA/H) dan neuraminidase (NA/N). Sejauh ini, terdapat 18 jenis hemagglutinin (H1-18) dan 11 jenis neuraminidase (N1-11) yang telah teridentifikasi (Tong *et al.*, 2013). Subtipe H1-H16 mempunyai induk semang utama pada unggas sedangkan sebaran induk semang pada mamalia sangat terbatas (Suarez, 2016).

Virus influenza memiliki genom berupa RNA berpolaritas negatif yang terbagi menjadi delapan segmen gen yang terpisah dan mengkode beberapa protein yang berbeda yaitu hemagglutinin dan neuraminidase sebagai glikoprotein permukaan, *polymerase* kompleks (*polymerase base 1*, *polymerase base 2*, *polymerase acidic*), nukleokapsid, matrix dan protein non-struktural (Suarez, 2016). Karakter virus influenza secara keseluruhan dipengaruhi ekspresi oleh berbagai banyak gen (*polygenic*), namun hemagglutinin merupakan salah satu penanda/marka penting dalam menentukan sifat biologi virus influenza (Suarez, 2016).

Hemagglutinin merupakan protein penting yang sangat berperan dalam penempelan virus

pada reseptor sel inang. Glikoprotein ini dikode oleh segmen 4 mempunyai panjang sekitar 566 peptida atau sekitar 1778 basa (Hay, 1998). Lebih lanjut, hemagglutinin (HA0) terbagi menjadi dua domain yaitu HA1 dan HA2 yang dipisahkan oleh bagian *cleavage site* yang dapat dipotong oleh enzim protease (Suarez, 2016). Protein hemagglutinin mempunyai epitop yang terpapar dengan sistem kekebalan inang sehingga mengalami banyak modifikasi atau mutasi yang menyebabkan terbentuknya banyak varian di lapangan (Plotkin dan Dushoff, 2003).

Marka molekuler pada hemagglutinin yang sering dihubungkan karakter patogenitas atau virulensi virus antara lain adalah motif *polybasic* asam amino pada bagian *cleavage site*, *receptor binding site* (RBS) dan profil sequon situs glikosilasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis molekuler dengan pendekatan bioinformatika pada sekuen gen hemagglutinin dari isolat virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi dari lingkungan pasar unggas hidup di Jakarta Timur pada tahun 2014 sehingga diharapkan dapat memberikan prediksi sifat karakter biologi virus berdasarkan marka-marka molekuler yang sudah dikarakterisasi pada penelitian sebelumnya.

METODE PENELITIAN

Surveilans Avian Influenza pada Pasar Unggas Hidup di Jakarta Timur

Pengambilan sampel lapang berupa *swab* kloaka dan *swab* lingkungan dilakukan pada tiga pasar unggas hidup di wilayah Jakarta Timur, meliputi Pasar Pagi Rawamangun, Pasar Perumnas Klender dan Pasar Jatinegara pada bulan Juli 2014 bekerjasama dengan Suku Dinas Peternakan dan Perikanan Jakarta Timur. *Swab* unggas dengan spesies yang sama digabungkan menjadi *pool* sampel. *Swab* lingkungan diambil pada beberapa titik di lingkungan pasar sesuai dengan kondisi yang ada. Sampel dipreservasi dalam media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung antibiotik dan antijamur dan dijaga pada suhu 4°C selama transportasi ke Laboratorium Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.

Identifikasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1

Identifikasi virus AI subtipe H5N1 pada sampel lapang dilakukan dengan uji *reverse*

transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Tahapan awal adalah isolasi materi genetik virus dengan menggunakan kit QIAamp[®] Viral Mini Kit (Qiagen) sesuai dengan prosedur penyedia kit. Tahapan selanjutnya adalah amplifikasi gen target dengan RT-PCR pada *thermal cycler* AB9700 menggunakan kit *SuperScript[®] III one step RT-PCR system with Platinum[®] taq DNA polymerase* (Invitrogen). Uji tapis (*screening test*) dilakukan pada semua sampel untuk identifikasi kelompok Influenza A dengan target gen matrix menurut Fouchier *et al.* (2000). Selanjutnya, sampel yang positif terhadap Influenza A dianalisis lebih lanjut untuk identifikasi subtipe H5 dengan tiga jenis set primer yang berbeda untuk mengantisipasi mutasi virus yang sering kali menyebabkan kesalahan diagnosis penyakit di lapangan. (Dharmayanti *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2001). Sekuen set primer yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Isolasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1

Isolasi virus dilakukan terhadap sampel yang positif terhadap virus AI subtipe H5 dengan cara inokulasi pada telur ayam bertunas (TAB) *specific negative antibody* (SAN) berumur 11 hari. Inokulum sebanyak 0,1-0,2 mL disuntikkan ke telur ayam bertunas (TAB) melalui ruang allantois. Telur berembrio tersebut diinkubasi pada suhu 37^oC dengan pengamatan selama empat hari. Telur dengan embrio mati segera disimpan pada suhu 4^oC sedangkan telur dengan embrio hidup sampai hari terakhir dikorbankan hidupnya dengan cara ditempatkan pada suhu 4^oC selama satu malam. *Screening* dilakukan dengan melihat aktivitas hemagglutinasinya cairan allantois pada sel darah merah ayam 10%. Cairan allantois yang positif

kemudian dikonfirmasi ulang dengan uji RT-PCR dan disimpan pada *freezer* -20^oC untuk analisis lebih lanjut.

Sekuensing Gen Hemagglutinin

Sekuensing gen hemagglutinin dilakukan pada isolat virus AI yang ditumbuhkan dari sampel lapang sesuai dengan penelitian terdahulu (Dharmayanti *et al.*, 2013). Fragmen DNA hasil amplifikasi dipurifikasi dengan QIAquick PCR purification kit (Qiagen) dengan kuantifikasi menggunakan Nanodrop ND1000 Spectrophotometer (Thermofisher). Proses sekuensing dilakukan dengan Big Dye terminator mix version 3.1 (Applied Biosystems) pada mesin *Genetix Analyzer* (ABI-3130 PE Applied Biosystems).

Analisis Molekuler Gen Hemagglutinin

Analisis molekuler terhadap sekuen gen hemagglutinin dilakukan dengan metode bioinformatik yang sesuai. Analisis kemiripan sekuen gen dilakukan dengan program blast-n pada genom database NCBI Genbank. Analisis bioinformatika yang bersifat genomik seperti *multiple sequence alignment* dan pohon filogenetika dilakukan dengan program BioEdit versi 7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>) dan MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net>). Sementara itu, analisis bioinformatika yang bersifat proteomik dilakukan dengan program analisis berbasis *website*. Analisis domain/motif protein dilakukan dengan PredictProtein (<https://www.predictprotein.org>) dan prediksi struktur struktur 3D protein dilakukan dengan Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>) dan visualisasinya dilakukan dengan program Edu PyMOL V.1.7.4 (<https://pymol.org/2/>).

Tabel 1. Set primer yang digunakan dalam identifikasi virus AI subtipe H5N1

Target Gen	Kode Primer	Sekuen Nukleotida (5'-3')*	Amplikon	Pustaka
Matrix	M52C	CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	244 bp	Fouchier <i>et al.</i> , 2000
	M253R	AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA		
H5	H5-lee155F	ACACATGCYCARGACATACT	545 bp	Lee <i>et al.</i> , 2001
	H5-lee699R	CTYTGRTTYAGTGTTGATGT		
	H5-nlp86F	CAGAGCAGGTTGACACAATC	377 bp	
	H5-nlp463R	CCAGGTATGGACATGCTGAG		
	H5-id252F	CGAATTCACCAATGTGCCAG	637 bp	
	H5-id889R	GAGTCTGACACCTGGTGTTC		Dharmayanti <i>et al.</i> , 2016
				Dharmayanti <i>et al.</i> , 2016

*Kode universal untuk kombinasi basa nukleotida berdasarkan IUPAC, yaitu R=A/G, Y=C/T, K=G/T

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pasar unggas hidup mempunyai peranan yang sangat penting dalam penyebaran virus AI subtipe H5N1 di berbagai wilayah di dunia, termasuk Indonesia. Penelitian sebelumnya mengindikasikan adanya sirkulasi virus AI subtipe H5N1 pada unggas yang berada di pasar unggas hidup sekaligus cemarannya pada lingkungan sekitar pasar (Hartawan dan Dharmayanti, 2014; Indriani *et al.*, 2010). Hasil identifikasi dan isolasi virus AI subtipe H5N1 pada unggas dan lingkungan pasar unggas hidup di Jakarta Timur tahun 2014 disajikan pada Tabel 2.

Penelitian ini mendeteksi keberadaan virus influenza A berdasarkan gen matrix dengan persentase sebesar 35,89% dari seluruh sampel dan sebagian besar hasil positif didapatkan dari sampel lingkungan tempat pemotongan. Meskipun telah menggunakan tiga jenis set primer yang berbeda, penelitian ini hanya mampu mendeteksi keberadaan subtipe H5 dengan persentase sekitar 35,71% dari sampel yang positif terhadap gen matrix. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya sirkulasi virus subtipe selain H5 di lingkungan pasar. Kemungkinan lain adalah adanya mutasi gen H5 pada situs-situs penempelan primer yang mengakibatkan perangkat uji deteksi berbasis RT-PCR menjadi tidak sensitif lagi. Fenomena ini didukung dengan adanya mutasi virus AI subtipe H5N1 yang bersirkulasi Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2011). Perlu dilakukan evaluasi secara berkelanjutan mengenai uji diagnostik terhadap virus AI subtipe H5N1 berbasis RT-PCR untuk menyesuaikan dinamika mutasi dan evolusi virus di lapangan. Penggunaan lebih dari satu jenis protokol diagnostik berbasis RT-PCR perlu dipertimbangkan untuk meningkatkan sensitivitas uji sekaligus mengurangi terjadinya kesalahan diagnosis penyakit (Dharmayanti *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini, sebanyak 8 isolat virus AI subtipe H5N1 berhasil diisolasi dari sampel lingkungan di Pasar Pagi Rawamangun dan Pasar Perumnas Klender yang mengindikasikan adanya potensi bahaya zoonosis transmisi virus ke manusia seperti riwayat kasus AI manusia sebelumnya yang berkaitan dengan kunjungan ke pasar unggas hidup (Wang *et al.*, 2006). Sekuensing gen hemagglutinin berhasil dilakukan pada tiga isolat virus yang ditumbuhkan yaitu JTT.46 asal Pasar Pagi Rawamangun, JTT.60 dan

JTT.61 asal Pasar Perumnas Klender. Analisis pohon filogenetika menunjukkan bahwa isolat JTT.46 tergabung dalam kelompok clade 2.3.2 sedangkan isolat JTT.60 dan JTT.61 termasuk dalam clade 2.1.3 (Gambar 1).

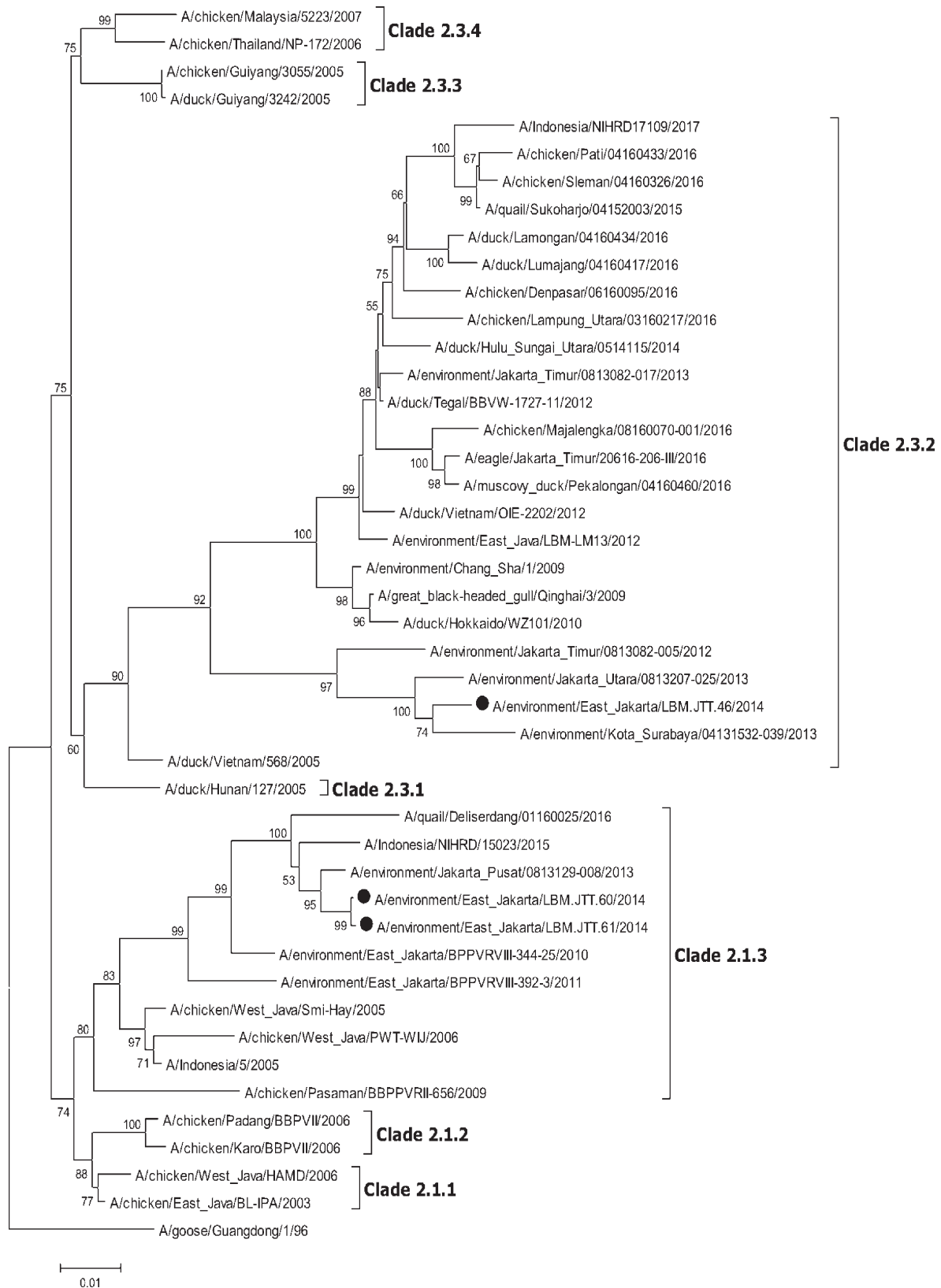
Kelompok virus clade 2.3.2 diprediksi masuk ke Indonesia pada akhir tahun 2012 dan diduga menyebabkan wabah penyakit yang mematikan pada peternakan itik (Dharmayanti *et al.*, 2013). Sampai dengan tahun 2014, sirkulasi virus AI clade 2.1.3 dan 2.3.2 di Indonesia masih berimbang. Namun, semenjak tahun 2015 clade 2.3.2 tampak menjadi lebih dominan bahkan kasus AI manusia tahun 2017 juga disebabkan oleh clade virus 2.3.2. Analisis *multiple sequence alignment* (MSA) menunjukkan bahwa meskipun isolat JTT.46, JTT.60 dan JTT.61 terkelompok dalam clade yang berbeda namun ketiganya mempunyai kemiripan sekuen asam amino pada bagian domain HA1 dengan satu perbedaan saja pada posisi 120 yaitu glisin dan serin (Gambar 2). Perbedaan yang lebih menonjol terjadi pada bagian HA2. Isolat JTT.46 lebih mirip dengan sekuen kelompok virus clade 2.3.2 sedangkan isolat JTT.60 dan JTT.61 lebih memiliki kesamaan dengan virus clade 2.1.3 (Gambar 2).

Lebih lanjut, isolat JTT.60 dan JTT.61 merupakan virus yang identik dengan satu perbedaan asam amino pada posisi P321L yaitu prolin menjadi leusin (Gambar 2). Isolat JTT.60 dan JTT.61 kemungkinan mempunyai tetua virus yang sama. Perbedaan sekuen asam amino terjadi akibat mutasi *missense* yang disebabkan oleh kurangnya mekanisme *proof reading* pada saat replikasi virus (Shaw dan Palese, 2013). Meskipun kedua asam amino tersebut sama-sama bersifat non-polar tetapi prolin bersifat netral sedangkan leusin bersifat hidrofobik sehingga perubahan ini kemungkinan dapat menyebabkan perubahan karakteristik sifat biologi virus.

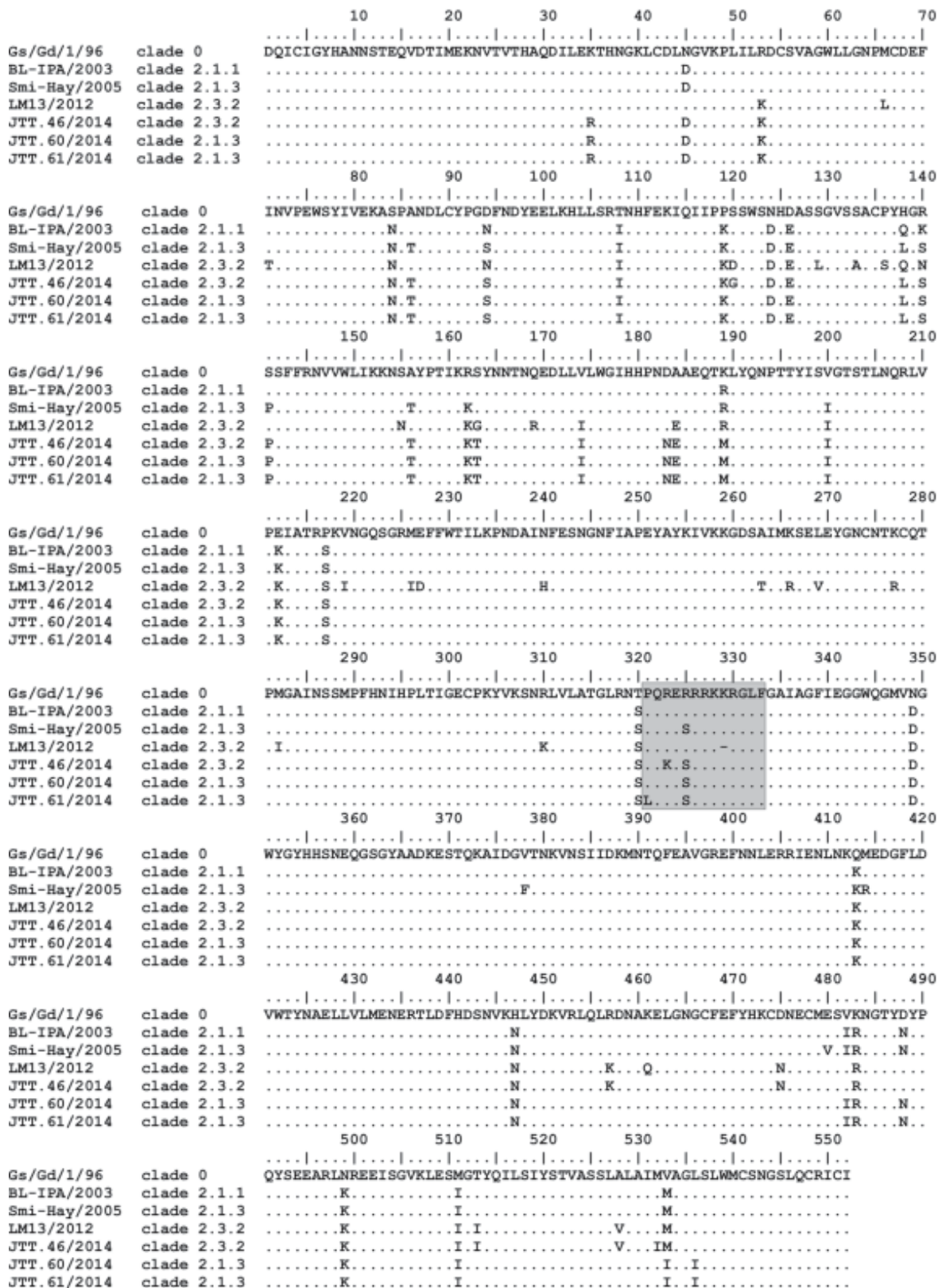
Pada Tabel 3, disajikan motif sekuen asam amino pada *cleavage site* baik pada isolat JTT.46, JTT.60 dan JTT.61 menunjukkan adanya motif *multiple* asam amino yang bersifat *basic* yaitu lisin dan arginin yang merupakan prediksi molekular untuk karakter *highly pathogenic* (Stieneke-Grober *et al.*, 1992). Pada virus yang bersifat *highly pathogenic*, bagian *cleavage site* mengandung banyak asam amino yang bersifat *basic* sehingga dapat dipecah oleh enzim sejenis furin yang terdapat di berbagai jaringan tubuh sehingga menimbulkan infeksi sistemik (Swayne *et al.*, 2013). Sementara itu, infeksi virus *low*

Tabel 2. Identifikasi dan isolasi virus flu burung/avian influenza/AI subtype H5N1 pada pasar unggas hidup di Jakarta Timur, 2014

Pasar	Jumlah pedagang yang disampling	Jenis sampel	Jenis swab	Jumlah sampel	Positif uji RT-PCR			Positif isolasi virus
					Matrix	H5-lee	H5-nlp	
Pasar Pagi Rawamangun	4	ayam kampung	kloaka	3				
		ayam broiler	kloaka	2				
		lantai pemotongan	lingkungan	4	2	1		1
		wadah pemotongan	lingkungan	1				
		alat cabut bulu	lingkungan	4	2			
		meja	lingkungan	3	2			
		talenan	lingkungan	4	2	1		1
		pisau	lingkungan	4	2	1		1
		tempat sampah	lingkungan	4	1	1		1
		(jumlah positif/jumlah sampel yang diperiksa)			(11/29)	(1/11)	(3/11)	(0/11)
Pasar Perumnas Klender	4	ayam kampung	kloaka	3				
		ayam broiler	kloaka	1				
		itik	kloaka	1	1		1	
		kandang unggas	lingkungan	1	1		1	
		lantai pemotongan	lingkungan	3	2	1		
		wadah pemotongan	lingkungan	3	2			
		alat cabut bulu	lingkungan	3	1	1		1
		meja	lingkungan	3	1			
		talenan	lingkungan	3	3	1		1
		pisau	lingkungan	3	1			
		tempat sampah	lingkungan	3	2	1		1
		kain lap	lingkungan	1				
		(jumlah positif/jumlah sampel yang diperiksa)			(13/28)	(4/13)	(0/13)	(2/13)
Pasar Jatinegara	6	ayam kampung	kloaka	4				
		ayam broiler	kloaka	1				
		Itik	kloaka	2				
		Entok	kloaka	1	1			
		lantai pemotongan	lingkungan	2	1			
		wadah pemotongan	lingkungan	2	1			
		tempat jeroan	lingkungan	2	1			
		alat cabut bulu	lingkungan	2				
		talenan	lingkungan	1				
		pisau	lingkungan	2				
		tempat sampah	lingkungan	2				
(jumlah positif/jumlah sampel yang diperiksa)			(4/21)	(0/4)	(0/4)	(0/4)	(0/0)	



Gambar 1. Pohon filogenetika gen HA dikonstruksi dengan MEGA 6 menggunakan *Neighbour-Joining analysis* (1000 bootstraps) dan *Kimura 2 parameter*. Isolat virus JTT.46, JTT.60 dan JTT.61 ditandai dengan bulatan hitam.



Gambar 2. Multiple sequence alignment sekuen asam amino hemagglutinin isolat Gs/Gd/1/96, BL-IPA, Smi-Hay, LM13, JTT.46, JTT.60 dan JTT.61. Bagian cleavage site diperlihatkan dengan tanda kotak.

Tabel 3. Analisis profil asam amino pada sekuen hemagglutinin untuk *cleavage site*, *receptor binding site* dan situs glikosilasi

Isolat	Clade	Cleavage site	Receptor binding site		Jumlah situs glikosilasi (N ^[^P] [ST] ^[^P])
			222	224	
Gs/Gd/1/96	0	PQRERRRKKR/GL	Q	G	6
BL-IPA/2003	2.1.1	PQRERRRKKR/GL	Q	G	6
SMI-Hay/2005	2.1.3	PQRESRRKKR/GL	Q	G	7
LM13/2012	2.3.2	PQRERRRKR/GL	Q	G	7
JTT.46/2014	2.3.2	PQKESRRKKR/GL	Q	G	7
JTT.60/2014	2.1.3	PQRESRRKKR/GL	Q	G	7
JTT.61/2014	2.1.3	LQRESRRKKR/GL	Q	G	7

pathogenic terbatas pada organ-organ dengan sel epitel seperti saluran pernafasan, pencernaan, organ reproduksi dan ginjal karena bagian *cleavage site*-nya hanya dapat dipecah oleh enzim tripsin.

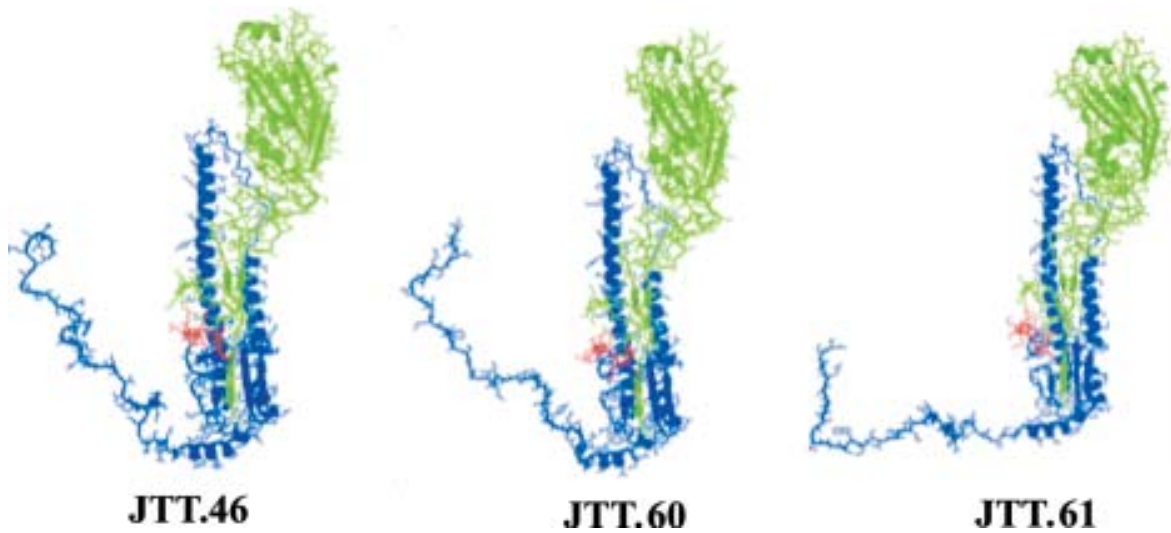
Perbedaan sekuen asam amino pada bagian *cleavage site* dari ketiga isolat tersebut disajikan pada Gambar 2 dan Tabel 3. Berbeda dengan isolat virus LM13 clade 2.3.2 yang diisolasi pada tahun 2012 yang mengalami delesi serin pada posisi 325 dan substitusi K328R (PQRERRRKR/GL), isolat JTT.46 yang juga merupakan clade 2.3.2 mempunyai motif *cleavage site* mirip dengan clade 2.1.3 (PQKESRRKKR/GL) namun dengan substitusi R323K. Sementara itu, isolat JTT.61 mempunyai mutasi pada motif *cleavage site* berupa substitusi P321L (LQRESRRKKR/GL).

Profil hemagglutinin ketiga isolat tersebut masih menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap reseptor unggas α -2,3 *linked sialic acid* dibandingkan dengan reseptor manusia asam sialat α -2,6 *linked sialic acid* yang ditandai dengan tidak adanya mutasi substitusi Q222L dan/atau G224S (Stevens *et al.*, 2006). Sementara itu, profil sequon situs glikosilasi hemagglutinin pada isolat yang dianalisis masih menunjukkan kesamaan dengan isolat virus clade 2.1.3 dan clade 2.3.2 yang dijadikan referensi yaitu sebanyak tujuh situs. Jumlah situs glikosilasi pada hemagglutinin bervariasi dari 3-9, dan perubahan situs glikosilasi dapat memicu perubahan karakter biologi hemagglutinin seperti maturasi dan transportasi protein. Perubahan ini juga dapat memengaruhi karakter virus secara keseluruhan seperti virulensi, *fitness* dan modulasi respons imun (Schultze, 1997; Tate *et al.*, 2014). Meskipun tidak memengaruhi netralisasi antibodi,

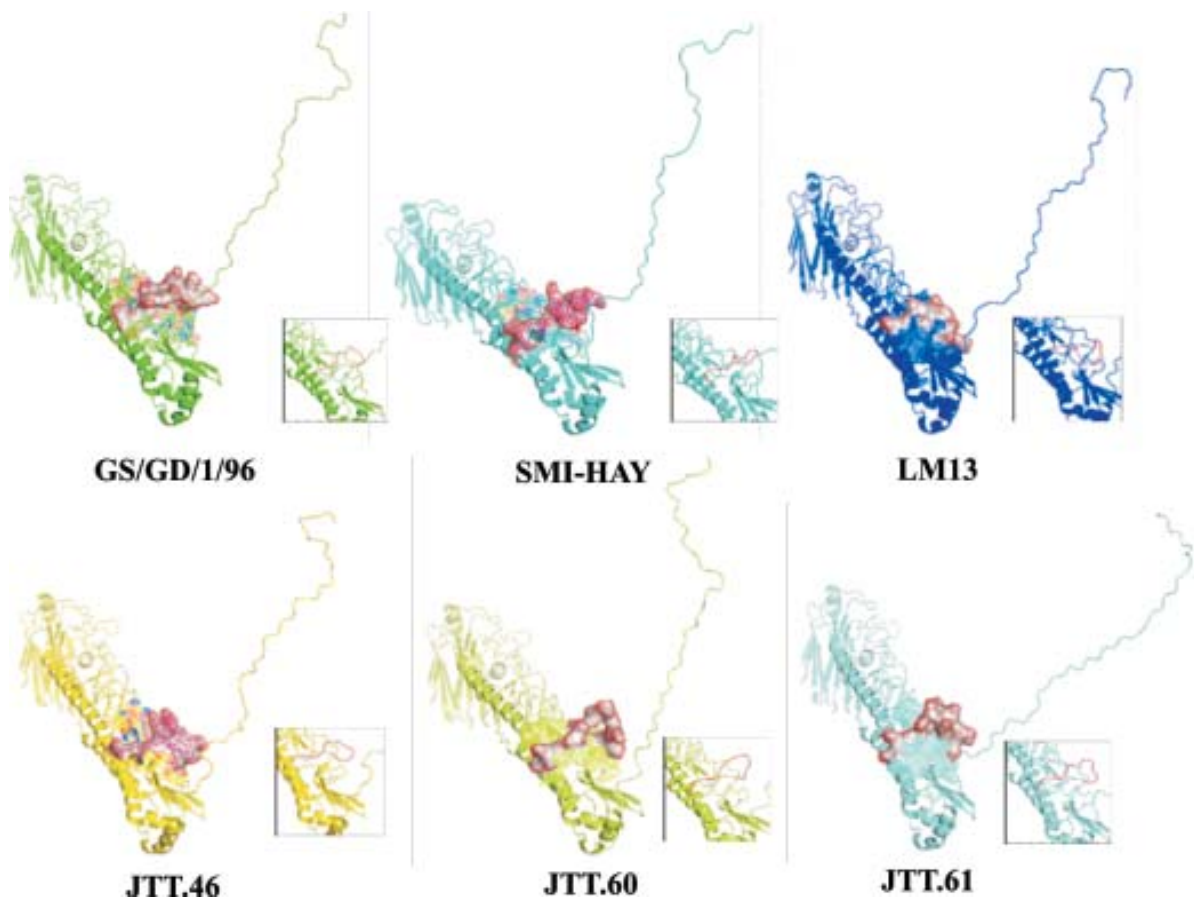
penambahan situs glikosilasi secara progresif pada hemagglutinin dapat menyebabkan perubahan karakter biologi virus baik secara *in vitro* seperti peningkatan replikasi virus, aktivitas neuraminidase, penyebaran virus dan *thermo-stability* maupun secara *in vivo* pada hewan coba seperti peningkatan virulensi, *tissue tropism*, replikasi dan transmisi virus (Abdelwhab *et al.*, 2016). Demikian juga halnya penurunan jumlah profil sequon glikosilasi juga dapat menyebabkan perubahan karakter virus secara signifikan, sebagai contoh adalah isolat virus A/Ck/Pennsylvania/1/87 (H5N2) yang mengalami satu mutasi berupa tidak adanya asparagin pada posisi 11 telah menyebabkan perubahan sifat dari tidak ganas menjadi ganas dengan mengakibatkan mortalitas pada unggas domestik mencapai 80% (Desphande *et al.*, 1987).

Prediksi struktur 3D protein hemagglutinin dengan program RaptorX untuk isolat virus yang dianalisis dikonstruksi berdasarkan acuan templat 2wr0A meskipun dengan nilai signifikansi (*p-value*) yang sedikit berbeda. Secara sekilas, struktur 3D protein hemagglutinin isolat virus yang dianalisis (JTT.46, JTT.60 dan JTT.61) yang menunjukkan adanya kemiripan pada bagian domain HA1 dan perbedaan yang cukup menonjol pada bagian domain HA2 sesuai dengan hasil analisis struktur primer protein hemagglutinin pada analisis molekuler sebelumnya (Gambar 3).

Selanjutnya, analisis struktur 3D protein yang lebih mendalam pada bagian *cleavage site* menunjukkan adanya perbedaan bentuk permukaan protein yang diekspresikan dari isolat virus GS/GD/1/96, SMI-Hay, LM13, JTT.46, JTT.60 dan JTT.61, meskipun keenam isolat virus tersebut mempunyai struktur



Gambar 3. Prediksi struktur 3D untuk isolat JTT.46, JTT.60 dan JTT.61 dengan RaptorX dan 2wr0A sebagai templat. HA1 ditandai dengan warna hijau, *cleavage site* dengan warna merah dan HA2 dengan warna biru.



Gambar 4. Visualisasi model struktur 3D dengan PYMOL pada cleavage site untuk isolat GS/GD/1/96, SMI-Hay, LM13, JTT.46, JTT.60 dan JTT.61.

protein yang sama pada posisi tersebut yaitu *loop* atau *coil* (Gambar 4). Selama ini *cleavage site* dianggap sebagai salah satu determinan virulensi yang penting untuk sifat patogenitas berkaitan dengan motif *polybasic* arginin dan lisin yang dapat dipecah enzim furin (*subtilisin-like endoprotease*) yang terdapat diberbagai jaringan/organ tubuh yang berakibat pada infeksi yang bersifat sistemik (Suarez, 2016). Namun, sesungguhnya motif *polybasic* asam amino tersebut bukanlah hal yang mutlak terhadap karakter patogenitas karena virus dengan motif serupa menunjukkan sifat patogenitas yang rendah pada unggas meskipun secara *in vitro* tidak memerlukan trypsin untuk replikasi (Stech *et al.*, 2009). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa struktur permukaan protein pada bagian *cleavage site* dapat berubah seiring dengan perubahan sekuen asam amino sehingga kemungkinan akan memengaruhi sensitivitas terhadap enzim furin yang berakibat pada perubahan karakter biologi virus. Tentu saja asumsi ini memerlukan analisis lanjutan yang lebih mendalam untuk membuktikan kebenarannya.

SIMPULAN

Analisis molekuler gen hemagglutinin menunjukkan adanya sirkulasi virus AI subtype H5N1 baik clade 2.1.3 dan clade 2.3.2 yang kemungkinan bersifat patogenik di lingkungan pasar unggas hidup di Jakarta Timur tahun 2014. Mutasi substitusi yang bersifat *drift* yang terjadi pada beberapa posisi merupakan bagian dari dinamika dan evolusi virus di lapangan. Dengan situs glikosilasi yang berjumlah tujuh, tiga isolat virus yang dianalisis masih menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap reseptor unggas alfa-2,3 *linked sialic acid*. Prediksi struktur 3D menunjukkan adanya kemiripan pada bagian domain HA1 tapi terdapat perbedaan pada bagian domain HA2. Bagian *cleavage site* dari ketiga isolat virus menunjukkan adanya perbedaan bentuk permukaan protein yang diekspresikan.

SARAN

Analisis molekuler sangat bermanfaat untuk memprediksikan karakter biologi virus berdasarkan marka-marka genetik namun

masih perlu konfirmasi lanjutan dengan uji tantang secara *in vivo* pada hewan coba yang sesuai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Penelitian Balai Besar Penelitian Veteriner 2014-2015. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Suku Dinas Peternakan dan Perikanan Jakarta Timur atas bantuannya untuk kegiatan lapangan. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Nana Suryana, Teguh Suyatno dan Ace Endang Supriatna atas bantuan teknisnya untuk kegiatan lapangan maupun laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwhab EM, Veits J, Tauscher K, Ziller M, Grund C, Hassan MK, Shaheen M, Harder TC, Teifke J, Stech J, Mettenleiter TC. 2016. Progressive glycosylation of the haemagglutinin of avian influenza H5N1 modulates virus replication, virulence and chicken-to-chicken transmission without significant impact on antigenic drift. *J Gen Virol* 97(12): 3193-3204.
- Allison AB, Ballard JR, Tesh RB, Brown JD, Ruder MG, Keel MK, Munk BA, Micklely RM, Gibbs SE, Travassos da Rosa AP, Ellis JC, Ip HS, Shearn-Bochsler VI, Rogers MB, Ghedin E, Holmes EC, Parrish CR, Dwyer C. 2015. Cyclic avian mass mortality in the northeastern United States is associated with a novel orthomyxovirus. *J Virol* 89(2): 1389-1403.
- Collin EA, Sheng Z, Lang Y, Ma W, Hause BM, Li F. 2015. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *J Virol* 89(2): 1036-1042.
- Despande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG. 1987. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulate virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(1): 36-40.
- Dharmayanti NLPI, Samaan G, Ibrahim F, Indriani R, Darminto, Soebandrio A. 2011. The genetic drift of Indonesian avian influenza AH5N1 viruses during 2003-2008. *Microbiol Indones* 5(2): 68-80.

- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA, Hardiman, Wibawa H, Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik molekuler dan patogenesitas virus H5N1 *clade* 2.3.2. asal Indonesia. *JITV* 18(2): 99-113.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Pudjiatmoko, Wibawa H, Hardiman, Balish A, Donis R, Davis CT, Samaan G. 2014. Genetic characterization of *clade* 2.3.2.1 avian influenza A (H5N1) viruses, Indonesia, 2012. *Emerg Infect Dis* 20(4): 671-674.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA. 2016. Pengembangan sejumlah primer untuk reverse transcriptase polymerase chain reaction guna melacak virus flu burung di Indonesia. *Jurnal Veteriner* 17(2): 183-196.
- Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 38(11): 4096-4101.
- Hartawan R, Dharmayanti NLPI. 2014. Sirkulasi virus avian influenza H5N1 di pasar tradisional di Jawa Timur tahun 2012. *Berita Biologi* 13(1): 97-106.
- Hay AJ. 1998. The Virus Genome and Its Replication. In: KNicholson KG, Webster RG, Hay AJ (Eds). *Textbook of Influenza*. Oxford. Blackwell Science. Hlm. 43-53.
- Indriani R, Samaan G, Gultom A, Loth L, Indryani S, Adjid RMA, Dharmayanti NLPI, Weaver J, Mumford E, Lokuge K, Kelly PM, Darminto. 2010. Environmental sampling for avian influenza virus A (H5N1) in live bird markets, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 16(12): 1889-1895.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97(1-2): 13-22.
- Plotkin JB, Dushoff J. 2003. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(12): 7152-7157.
- Schulze IT. 1997. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis* 176(Suppl 1): S24-S28.
- Sedyaningsih ER, Isfandari S, Setyawati V, Rifati L, Harun S, Purba W, Imari S, Giriputra S, Blair PJ, Putnam SD, Uyeki TM, Soendoro T. 2007. Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. *J Infect Dis* 196(4): 522-527
- Shaw ML, Palese P. Orthomyxoviridae. In: Knipe DM, Howley PM (Eds). *Fields Virology*. 6 ed. Baltimore. Wolter Luwer. Hlm. 1151-1185.
- Suarez DL. 2016. Influenza A Virus. In: Swayne DE (Eds). *Animal Influenza*. 2nd ed. Iowa. A John Wiley & Sons, Inc. Hlm. 3-30.
- Stech O, Veits J, Weber S, Deckers D, Schröer D, Vahlenkamp TW, Breithaupt A, Teifke J, Mettenleiter TC, Stech J. 2009. Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *J Virol* 83(11): 5864-5868.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11(7): 2407-2414.
- Stevens A, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312(5772): 404-410.
- Swayne DE, Suarez DL, Sims LD. 2013. Influenza. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, LK Nolan, DL Suarez and V Nair (Eds). *Disease of Poultry*. 13th ed. Iowa. A John Wiley & Sons, Inc. Hlm. 181-218.
- Tate MD, Job ER, Deng YM, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. 2014. Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* 6(3): 1294-1316
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson J, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC,

- Wilson IA, Donis RO. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9(10): e1003657.
- Wang M, Di B, Zhou DH, Zheng BJ, Jing H, Lin YP, YF YF, Wu XW, Qin PZ, Wang YL, Jian LY, Li XZ, Xu JX, Lu EJ, Li TG, Xu J. 2006. Food Markets with Live Birds as Source of Avian Influenza. *Emerg Infect Dis* 12(11): 1773-1775.
- Wiyono A, Indriani R, Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Darminto. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus highly pathogenic avian Influenza subtipe H5 dari ayam asal wabah di Indonesia. *JITV* 9(1): 61-71.