Oral Presentation (KIVMP-2)

Analisis Patotipe Virus H5N1 *Clade* 2.3.2.1c yang Bersirkulasi di Provinsi Lampung Tahun 2016-2017

Arif Setiani Wahyuning Tyas[1], Hastari Wuryastuty[2], Raden Wasito[3], Eko Agus Srihanto[4], Iyan Kurniawan[1]

[1]Medik Veteriner Badan Karantina Pertanian
[2]Bagian Ilmu Penyakit Dalam, FKH UGM
[3]Bagian Patologi, FKH UGM
[4]Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung
*Coresponding author email: tyasdvm@gmail.com

Kata kunci : patogenesitas, virus *avian influeza.*

PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) merupakan penyakit infeksius disebabkan oleh virus influenza tipe A dari famili *Orthomyxoviridae* (Boyce *et al.,* 2009) yang berpotensi menyebabkan kerugian bagi dunia perunggasan di seluruh dunia termasuk Indonesia. Virus AI memiliki 8 segmen gen yang berbeda yang mengkode 10 jenis protein virus yang berbeda. Struktur protein dalam virion dewasa dapat dibagi menjadi protein permukaan dan protein internal. Termasuk ke dalam protein permukaan adalah hemaglutinin (HA), neuraminidase (NA), dan membran kanal ion (M2), sedangkan protein-protein internal meliputi nukleoprotein (NP), protein matriks (M1), dan kompleks polimerase yang tersusun dari polimerase basa 1 (PB1), polimerase basa 2 (PB2), dan polimerase asam (PA). Dua protein tambahan lainnya adalah protein nonstruktural 1 (NS1) dan nonstruktural 2 (NS2) (Lee dan Saif, 2009).

Virus influenza A dikelompokkan berdasarkan dua antigen permukaan virus, yaitu protein hemaglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA), yang sampai saat ini telah ditemukan 18 HA (H1-H18) dan 11 NA (N1-N11) (Tong *et al.,* 2013; Heider, 2015). Hemaglutinin (HA) memiliki fungsi utama untuk menginisiasi infeksi, berinteraksi dengan reseptor asam sialat sel hospes (Edinger *et al.,* 2014) serta menentukan patogenisitas virus AI H5N1 (Li *et al.,* 2011).

Wabah *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) subtipe H5N1 pertama kali dilaporkan pada unggas di Indonesia pada tahun 2003. Kejadian wabah penyakit antara periode 2003-2004, virus-virus H5N1 di Indonesia masih merupakan *clade* 2.1. Dua tahun kemudian setelah kejadian wabah pertama, clade 2.1 berkembang menjadi tiga *sublineage* virus, yaitu *clade* 2.1.1, 2.1.2 dan 2.1.3 (Anonim, 2008). Sub-*clade* 2.1.2 terdiri dari virus-virus yang menginfeksi unggas dan manusia. Sub-*clade* 2.1.3 berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari kasus fatal pertama H5N1 di manusia di Indonesia pada tahun 2005 (Parry, 2005). Sejak tahun 2008, virus-virus *clade* 2.1.1 dan 2.1.2 tidak lagi dijumpai baik pada unggas dan manusia, sedangkan virus-virus dari *clade* 2.1.3 terus berkembang menjadi tiga kelompok virus baru, hasil evolusi dari sub-*clade* 2.1.3 membentuk sub-*clade* baru yang masih termasuk dalam sub clade 2.1.3 (Takano *et* al., 2009) yaitu sub-sub-*clade* 2.1.3.1, 2.1.3.2 dan 2.1.3.3 (Wibawa *et al.,* 2014). Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan analisis *clade* dan patotipe pada virus AI clade 2.3.2.1c yang bersirkulasi di Lampung pada tahun 2016-2017.

MATERIAL DAN METODE

Pada penelitian ini digunakan 3 sampel positif virus AI H5N1 yang berasal dari Provinsi Lampung tahun 2016-2017, yaitu A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016, A/Chicken/Metro/03.0074/2017 dan A/Chicken/Pesawaran/03.0042/2017. Sampel sudah dilakukan identifikasi subtipe H5N1 dengan metode rRT-PCR untuk gen H5 dan cRT-PCR untuk gen N1.

Identifikasi dan subtipe virus dengan *realtime* RT-PCR dan RT-PCR

Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan QIAamp Viral RNA Mini kit sesuai dengan petunjuk pabrik (Qiagen, Jerman). Real time RT-PCR untuk mengidentifikasi subtipe gen HA, dan RT-PCR untuk mengidentifikasi subtipe Nueraminidase (NA).

Amplifikasi dan sekuensing gen HA

Proses amplifikasi dilakukan dengan *reverse trancriptase Polymerase Chains Reaction (RT-PCR)* menggunakan *Superscript III One Step RT-PCR Platinum Taq High fidelity DNA Polymerase* dengan 4 pasang primer yang digunakan yaitu HA10, HA20, HA30 dan HA40 yang didesain oleh AAHL. Primer didesain secara *overlapping* untuk dapat mengamplikasi gen HA secara utuh yang memiliki panjang 1778bp. Produk RT-PCR hasil amplifikasi primer AAHL selanjutnya dilakukan proses sekuensing dengan cara dikirim ke Laboratorium *First Base* di Singapura, yang

memiliki fasilitas sekuensing. Data hasil sekuensing berbentuk elektroferogram dan ABI *file.*

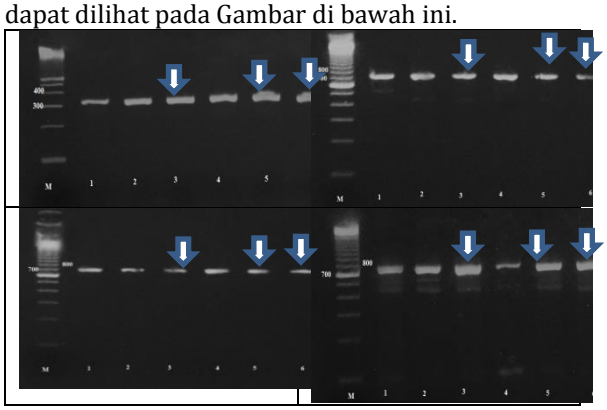
Analisis Data

Analisis data hasil sekuensing menggunakan perangkat lunak *Bioedit* untuk *assembly* dan *editing* sekuens gen HA. *Multiple alignment* dan konstruksi pohon kekerabatan (filogenetik) dilakukan menggunakan program MEGA 6 software. Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining*. Persentase replikasi pohon filogenik yang membentuk *clade* di setiap percabangan diuji menggunakan tes *bootstrap* dari 1000 replikasi. Data pembanding diambil dari sekuen isolat virus AI yang ada di *National Center for Biotechnology Information* (ncbi/www.ncbi.nlm.gov) serta data hasil sequensing milik Balai Veteriner Lampung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen Hemaglutinin

Gen HA yang memiliki panjang 1.778 bp dilakukan amplifikasi dengan menggunakan 4 pasang primer HA dari AAHL, yaitu HA10, HA20, HA30 dan HA40. Gambaran hasil amplifikasi gen HA dengan primer HA10, HA20, HA30 dan HA40 dapat dilihat pada Gambar di bawah ini.



Gambar Hasil elektroforesis gen HA10, HA20, HA30 dan HA40

Patotipe Virus AI

Analisis penjajaran ganda asam amino gen HA pada sampel menggunakan multiple aligment program *Clustal W* dari *software* MEGA. 6.0 diperoleh 551 asam amino. Posisi asam amino pada daerah *cleavage site* digunakan sebagai salah satu indikator patogenesitas virus AI. Pada sampel A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016 susunan asam amino cleavage site adalah PQRERRRKKRG. Virus AI tersebut memiliki susunan asam amino *multiple basic* PQRERRRKKRG pada region pemotongan gen HA yang merupakan karakteristik dari virus HPAI (Suguitan *et al.,* 2012). Susunan amino tersebut memiliki kesamaan dengan isolat tahun 2003-2005. Sampel A/Chicken/Metro/03.0074/2017 dan A/Chicken/Pesawaran/ 03.0042/2017 memiliki susunan asam amino PQRERRRK-RG (Tabel 3). Pola susunan asam amino tersebut merupakan ciri virus AI sub-sub-*clade* 2.3.2. Hal ini sesuai dengan laporan Li *et al*. (2011), yang melaporkan bahwa motif PQRERRRK-RG pada daerah tapak pemotongan enzim protease (*proteolitic cleavage site*) merupakan ciri virus AI sub-sub-*clade* 2.3.2 dan termasuk dalam kategori HPAI.

Tabel Susunan asam amino pada *cleavage site*

Isolat	Susunan asam amino pada *cleavage site*										
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331
1	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.

(1) AF144305.1|A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)
(2) GU052426.1|A/chicken/Legok/2003(H5N1)
(3) A/Chicken/Tanggamus/03.0872/2016
(4) A/Chicken/Metro/03.0074/2017
(5) A/Chicken/Pesawaran/03.0042/2017
Keterangan : tanda (-) adalah delesi asam amino

SIMPULAN

Berdasarkan pola asam amino pada daerah *cleavage site s*ampel virus AI *clade* 2.3.2.1c dalam penelitian ini masih mempunyai kesamaan dengan isolat virus AI subtipe H5N1 yang telah bersirkulasi di Indonesia sebelumnya dan tergolong virus dengan patogenesitas tinggi.

SARAN

Perlu dilakukan analisis secara antigenik dari virus AI untuk mengetahui perkembangan virus AI guna program pencegahan dan pembebasan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Badan Karantina Pertanian yang telah memberikan bantuan dana penelitian. Serta kepada Balai Veteriner Lampung yang telah memberikan fasilitas sampel dan laboratorium uji.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Anonim. 2008. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) Emerging Infectious Diseases. 2008;14:e1 doi: 10.3201/eid1407.071681.

[2] Boyce, W.M., Androck, C., Kreuder-Johnson C., Kelly T, dan Cardona C. 2009. Review Avian influenza viruses in wild birds: A moving

target. *Comp Immunol, Microb and Infect Dis* 32: 275-286.

[3] Edinger, T.O., M.O. Pohl, dan S. Stertz. 2014. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *Journal of General Virology* 95: 263-277.

[4] Heider, A., Mochalova, L., Harder, T., Tuziko, A., Bovin, A., Wolff, T., Matrosovich, M, dan Schweiger, B., 2015. Alteration in hemagglutinin receptor-binding specificity accompany the emergence of highly pathogenic avian influenza viruses. *J. Virol*, 89 (10): 5395-5405.

[5] Li, Z., Liu, Z., Ma, C., Zhang, L., Su, Y., Gao, G. F., Li, Z., Cui, L., dan He, W. 2011. Identification of amino acids in highly pathogenic avian influenza H5N1 virus hemagglutinin that determine avian influenza species specificity. *Arch.Virol*.156:1803-1812.

[6] Parry, J. 2005, WHO confirms four human cases of avian flu in Indonesia. *Bmj* 331: 796.

[7] Takano, R., Nidom, C.A., Kiso, M., Muramoto, Y., Yamada, S., Sakai-Tagawa, Y., Macken, C. dan Kawaoka Y. 2009. Phylogenic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. *Virology*.390: 13-21.

[8] Tong, S., X. Zhu,Y. Li, M. Shi, Z. Jing, M. Bourgeois, Y. Hua, X. Chen, R. Sergio, J. Gomes, L.M. Chen, A. Johnson, Y. Tao, C. Drefus, W. Yu, R.M. Bride, P.J. Carney, A.T. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C.T. Davis, J.C. Paulson, J. Steven, C.E. Rupprecht, E.C. Holmes, I.A. Wilson, dan R.O. Donis. 2013. New world bats harbor diverse influenza a viruses. *PloS Pathog*. 9(10):e1003657.

[9] Suguitan, A.L., Matsuoka, Y., Lau, Y.F., Santos, C.P., Vogel, L., Cheng, L.L., Orandle, M. dan Subbarao, K. 2012. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence facyor in a host-specific manner in mammals. *J. Virol, 86(5)*: 2706-2714.

[10] Wibawa, H., Bingham, J., Nuradji, H., Lowther, S., dan Payne, J., 2014. Experimentally infected domestic ducks show efficient transmission of Indonesian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus, but lack persistent viral shedding. *PLoS ONE* 9(1): e83417.