

# ANALISIS MOLEKULER FILOGENETIK DAN STRUKTUR ANTIGENIC VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 ISOLAT LAMPUNG TAHUN 2008-2013

## *Phylogenetic Molecular and Antigenic Structure Analysis of Avian Influenza Virus of Subtype H5N1 Lampung Isolate Collected in 2008-2013*

Eko Agus Srihanto<sup>1</sup>, Widya Asmara<sup>2</sup>, dan Michael Haryadi Wibowo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner (BVet) Lampung, Bandar Lampung

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

E-mail: eko\_dvm@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melakukan karakterisasi molekuler *antigenic site* terhadap isolat virus *avian influenza* (AI) Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Lampung dari tahun 2008-2013. Amplifikasi RNA dilakukan dengan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan 4 pasang primer referensi dari *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL) Geelong Australia (HA10, HA20, dan HA30) dan dilanjutkan dengan proses pengurutan. Analisis hasil pengurutan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA versi 5.05 yang meliputi *multiple alignment*, *deductive amino acids prediction*, dan *phylogenetic tree analysis* diperoleh hasil perbedaan genetik antar isolat Lampung dari tahun 2003-2013 ditemukan berkisar 1,1-9,1% dengan tingkat homologi mencapai 90,9-98,9%. Variasi genetik ditemukan adanya substitusi pada posisi 53 (R53K), 126 (D126E), 136 (P136), 138 (H138Q, dan H138L), 140 (R140K, R140S, dan R140N), 141 (S141P), dan 189 (K189R). Berdasarkan analisis *filogenic tree* isolat Lampung tahun 2008-2011 termasuk ke dalam *clade* 2.1.3. Analisis filogenik isolat AI tahun 2012-2013 yang menginfeksi unggas air mempunyai homologi sekitar 98,5-99,1% dibandingkan dengan isolat AI yang menginfeksi unggas air asal Jawa dan termasuk ke dalam *clade* 2.3.2.1.

Kata kunci: virus AI, analisis gen HA, *antigenic site*, substitusi

### ABSTRACT

*This study aims to characterize the HA gene of AI virus from DIC Region III Lampung from 2008-2013. RNA amplification technique was performed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using 4 pairs of primer references from the Australian Animal Health Laboratory (AAHL) Geelong, Australia (HA10, HA20, and HA30) and followed by a sequencing process. Analysis of the results of sequencing by using the MEGA software version 5.05 that covered multiple alignment, deductive amino acids prediction and phylogenetic tree analysis showed some genetic differences between Lampung isolates collected from 2003-2013 was ranged from 1.1 to 9.1% with homology to reach 90.9 to 98.9%. Genetic variation was identified in the antigenic site with the substitution at position 53 (R53K), 126 (D126E), 136 (P136), 138 (H138Q and H138L), 140 (R140K, R140S and R140N), 141 (S141P) and 189 (K189R). Based on the analysis of phylogenetic tree in 2008-2011 isolates belonging to the clade 2.1.3. Analysis of phylogenetic tree of 2012-2013 AI isolates that infect waterfowl had approximately 98.5 to 99.1% homology compared with AI isolates that infect waterfowl of Javanese origin and belonged to the clade 2.3.2.1.*

*Key words: AI virus, HA gene analysis, antigenic site, substitution*

### PENDAHULUAN

*Avian influenza* (AI) merupakan penyakit unggas menular yang disebabkan oleh virus AI tipe A dari famili *Orthomyxoviridae*. Berdasarkan patogenisitas virus AI dibedakan menjadi *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI) (Alexander, 1982). Virus AI tipe A dapat menginfeksi unggas, manusia, babi, kuda, dan mamalia tingkat rendah seperti anjing laut dan paus (Webster *et al.*, 1981; *et al.*, 1987; Guo *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2000; Cardona *et al.*, 2009). Sejak pertama dilaporkan di Hongkong tahun 1997, wabah dilaporkan menyebar di negara kawasan Asia Timur dan Asia Tenggara seperti Thailand, Vietnam, Kamboja, dan Indonesia (Peiris *et al.*, 2007; Lupiani dan Reddy, 2009).

Sejak Indonesia dinyatakan sebagai daerah endemik penyakit AI, berbagai program pengendalian dan pemberantasan dilakukan. Salah satu program pengendalian adalah vaksinasi. Vaksin yang digunakan diharapkan mampu memberikan kekebalan kepada unggas terhadap infeksi virus AI. Netralisasi antibodi

terhadap suatu gen hemagglutinin (HA) tergantung pada sub tipe HA tersebut. Virus AI seperti virus golongan *Ribonucleic acid* (RNA) lainnya tidak mempunyai *proofreading mechanism* sehingga akan terjadi banyak kesalahan pada waktu transkripsi. Hal ini akan menyebabkan terjadinya mutasi yang tinggi. Tingginya mutasi akan mengakibatkan adanya perubahan asam amino yang berpengaruh pada perubahan virus dan sinyal regulatori pada saat replikasi virus. Terjadinya mutasi pada daerah *antigenic* akan menyebabkan perbedaan dalam netralisasi antibodi (Suarez, 2008). Mutasi virus akan menyebabkan perubahan *antigenic drift* atau *antigenic shift*.

*Antigenic drift* merupakan perubahan struktur *antigenic* yang bersifat minor. Perubahan ini bersifat progresif sebagai akibat aktivitas netralisasi antibodi terjadi di permukaan gen HA atau neuramidase (NA). Perbedaan spesifisitas antibodi akan memengaruhi reaksi pada *antigenic site*. *Antigenic shift* berhubungan dengan perubahan struktur *antigenic*. Perubahan ini bersifat dominan yang terjadi pada gen permukaan dan gen internal. *Antigenic shift* ditimbulkan karena mutasi

dan *reassortment* gen antar virus. Proses ini dapat menyebabkan munculnya galur virus baru yang berbeda antigenisitasnya dengan virus *ancestral* (Suarez, 2008).

Perubahan *antigenic* pada virus AI kebanyakan ditemukan pada 2 gen glikoprotein permukaan yaitu gen HA dan NA (Duvvuri *et al.*, 2009). Pada glikoprotein HA dikenal 5 epitop daerah *antigenic* sebagai target netralisasi antibodi. Penentuan 5 epitop tersebut (A sampai E) daerah *antigenic* tersebut didasarkan pada struktur HA virus AI subtipe H5N1 (A/goose/Guangdong/1996) yang dipetakan oleh Duvvuri *et al.* (2009). Pemetaan gen HA pada virus AI subtipe H5N1 yang dilakukan oleh Duvvuri *et al.* (2009) menyebutkan posisi *Antigenic site* terletak pada T36, K48, R53, Q115, N124, D126, S128, P136, H138, R140, S141, K152, N182, A185, K189, dan K412 (nomenklatur untuk H5). Perubahan epitop terjadi terus menerus dan pada jangka waktu 2-5 tahun biasanya hanya didominasi oleh satu epitop (Plotkin *et al.*, 2002). Penelitian ini bertujuan mengamplifikasi gen HA virus AI pada daerah *antigenic* yang diisolasi dari beberapa jenis unggas di wilayah kerja Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Lampung sebagai bahan informasi yang berkaitan dengan isolat asal Lampung dan dapat dijadikan acuan terhadap strategi program pengendalian dan pemberantasan penyakit AI yang berhubungan dengan program vaksinasi khususnya di wilayah Lampung.

## MATERI DAN METODE

### Isolat Virus

Isolat virus AI yang digunakan berasal dari beberapa daerah di wilayah kerja BPPV Regional III Lampung. Isolat tersebut berasal dari berbagai macam spesies (ayam *layer*, ayam *broiler*, ayam buras, itik, entok, dan burung puyuh). Isolat diisolasi ke dalam telur ayam bertunas (TAB) spesifik antibodi negatif (SAN) AI umur 10 hari. Isolat penelitian yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

Materi untuk pengujian molekuler menggunakan bahan: *Purelink viral RNA/DNA minikit* (Invitrogen), *SuperScript III One Step RT-PCR Platinum Taq HiFi* (Invitrogen®), primer *forward* dan *reverse*. Proses amplifikasi dilakukan dengan *reverse transcriptase*

*polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan primer *forward* dan *reverse* untuk mengamplifikasi gen HA didesain oleh *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL) Geelong Australia. Purifikasi produk PCR digunakan *QIAquick Purification kit* (QIAGEN®), *isopropanol* (Merck) dan *nuclease free water* (NFW). Proses pengurutan menggunakan reagen *BigDye X Terminator Purification kit* (ABI).

### Amplifikasi

Proses amplifikasi gen HA dilakukan dengan RT-PCR menggunakan program RT (suhu 48° C selama 30 menit); pre denaturasi (suhu 94° C selama 4 menit); denaturasi (suhu 94° C selama 30 detik); *annealing* (suhu 50° C selama 40 detik); *elongasi* (suhu 68° C selama 40 detik); *post elongasi* (suhu 68° C selama 5 menit) sebanyak 40 siklus. Program pengurutan gen HA menggunakan program sebagai berikut: predenaturasi (suhu 96° C selama 1 menit); denaturasi (suhu 96° C selama 10 detik); *annealing* (suhu 50° C selama 5 detik); *elongasi* (suhu 60° C selama 4 menit) sebanyak 25 siklus. Program tersebut disesuaikan dengan manual standar laboratorium untuk teknik pengurutan gen HA dari AAHL Geelong, Australia.

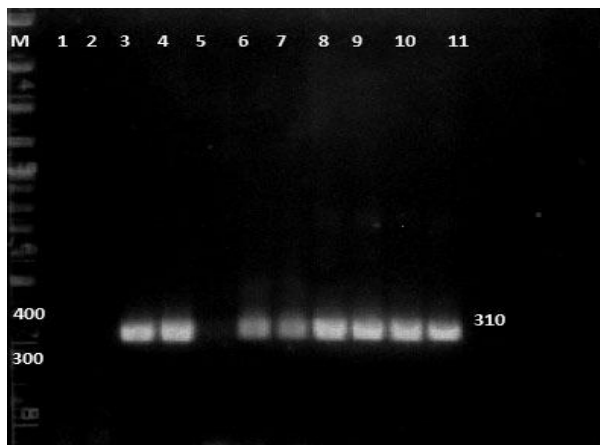
Analisis data hasil pengurutan menggunakan perangkat lunak *molecular evolution genetics analysis* (MEGA) versi 5.05 meliputi *multiple alignment* dengan *clustal W*, *deductive amino acids prediction* dan *phylogenic tree analysis*. Data disusun dengan menggunakan perangkat lunak *bio edit sequence alignment editor*. Konstruksi pohon filogenik dianalisis dengan metode *neighbor-joining*. Persentase replikasi pohon filogenik yang membentuk *clade* di setiap percabangan diuji menggunakan tes *bootstrap* dari 1000 replikasi (WHO, 2008; Tamura *et al.*, 2011).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen HA yang mengandung *antigenic site* diamplifikasi oleh primer HA10, HA20, dan HA30 yang didesain oleh AAHL Geelong, Australia. Hasil amplifikasi dengan menggunakan primer HA10 dihasilkan ampikon sepanjang 310 bp seperti yang disajikan pada Gambar 1. Hasil tersebut sama dengan posisi primer yang terletak fragmen HA1 pada 1-310.

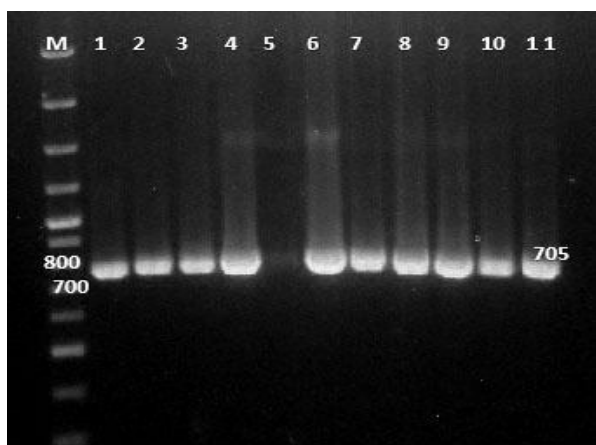
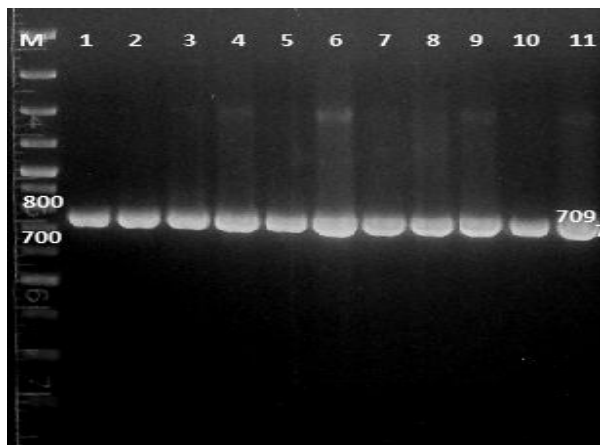
**Tabel 1.** Daftar isolat penelitian

No. Laboratorium	Jenis unggas	Asal isolat	Tahun
08.48/Ay/BPPV/03.08	Ayam buras	Muara Enim	2008
08.55/Ay/BPPV/03.08	Ayam buras	Waylaga	2008
09.50/Ay/BPPV/02.09	Ayam buras	Bangka	2009
09.151/Ay/BPPV/06.09	Ayam buras	Bandar Lampung	2009
09.219/Ay/BPPV/06.09	Ayam buras	Waylaga	2009
10.24/Ay/BPPV/01.10	Ayam breeder	Lampung Selatan	2010
10.67/Puyuh/BPPV/02.10	Puyuh	Metro	2010
10.291/Ay/BPPV/10.10	Ayam buras	Kepahyang	2010
11.234/Ay/BPPV/11.11	Ayam buras	Ogan Komering Ilir	2011
11.337/Ay/BPPV/05.11	Ayam broiler	Rejang Lebong	2011
12.1182/Itik/BPPV/12.12	Itik	Lampung Tengah	2012
13.36/Entok/BPPV/01.13	Entok	Pesawaran	2013
13.73/Entok/BPPV/01.13	Entok	Muara Enim	2013



**Gambar 1.** Amplifikasi DNA dengan menggunakan primer HA10 (M= *Marker*, 1= Muara Enim, 2= Way Laga (2008), 3= Bangka, 4= Bandar Lampung, 5= Waylaga (2009), 6= Lampung Selatan, 7= Metro, 8= Kepahyang, 9= Muara Enim (2013), 10= Ogan Komering Ilir, 11= Trimurjo)

Hasil amplifikasi dengan menggunakan primer HA20 dan HA30 dihasilkan produk amplifikasi sepanjang 709 bp dan 705 bp seperti pada Gambar 2. Hasil tersebut sama dengan posisi primer yang terletak fragmen HA1 pada 142- 850 untuk HA20 dan 657-1351 untuk HA30 yang didesain oleh AAHL Geelong.



**Gambar 2.** Amplifikasi DNA dengan menggunakan primer HA20 dan HA30 (M= *Marker*, 1= Muara Enim, 2= Waylaga (2008), 3= Bangka, 4= Bandar Lampung, 5= Waylaga (2009), 6= Lampung Selatan, 7= Metro, 8= Kepahyang, 9= Muara Enim (2013), 10= Ogan Komering Ilir, 11= Trimurjo)

Hasil penjarangan berganda urutan nukleotida gen HA isolat Lampung yang sudah terdaftar di *genebank* dari tahun 2004-2006 dengan tahun 2008-2013 didapatkan jarak genetik antara 1,15- 9,06 % dengan homologi antar isolat hasil penelitian antara 90,94-98,85%. Tiga isolat tahun 2012-2013 mempunyai nilai homologi antara 97,8-98,3%. Nilai homologi antara isolat tahun 2008-2011 dengan isolat tahun 2012-2013 antara 90,9-92,2%. Menurut Lee dan Saif (2009), perubahan nukleotida dan asam amino akan menyebabkan terjadinya mutasi pada virus AI. Dalam setiap tahun diketahui perubahan rata-rata nukleotida pada virus AI sebanyak 7,8 dan 4,9 asam amino per 1000 nukleotida pada gen HA (Suarez dan Senne, 2000; Spackman *et al.*, 2003). Menurut Lee dan Saif (2009), tingginya angka perubahan/mutasi akan menyebabkan peningkatan *genetic drift*. Perubahan ini disebabkan karena banyaknya perubahan nukleotida pada unit HA1. Perubahan yang terjadi disebabkan karena adanya tekanan evolusi sebagai respons virus terhadap aktivitas imunitas hospes (Kovacova *et al.*, 2002).

Hasil penjarangan ganda asam amino penting pada domain *antigenic site* disajikan pada Tabel 2. Menurut Duvvuri *et al.* (2009), beberapa domain penting yang bertanggung jawab pada *antigenic site* bersifat lestari yang terletak pada posisi T36, K48, R53, Q115, N124, D126, S128, P136, H138, R140, S141, K152, N182, A185, K189, dan K412 (nomenklatur untuk H5). Substitusi beberapa asam amino ditemukan pada *antigenic site*. Perubahan asam amino R36K ditemukan pada isolat-isolat asal Waylaga, Kepahyang, Ogan Komering Ilir, Rejang Lebong, Trimurjo, Pesawaran, dan Muara Enim. Pada posisi asam amino ke-53 semua isolat hasil penelitian dan isolat Lampung tahun 2004-2007 mengalami substitusi dari asam aspartat (D) ke asam glutamat (E). Isolat asal Sumatera diklasifikasikan ke dalam *clade* 2.1.3 (Smith *et al.*, 2004; Takano *et al.*, 2009). Isolat Lampung dimasukkan ke dalam isolat yang berasal dari Sumatera. Substitusi di posisi P136S ditemukan pada isolat-isolat AI yang menginfeksi itik dan entok di daerah Trimurjo, Pesawaran, dan Muara Enim di tahun 2012-2013 yang merupakan isolat dari *clade* 2.3.2. Substitusi H138Q dan H138L ditemukan pada isolat-isolat Lampung dari tahun 2004-2013. Asam amino ke-140 ditemukan adanya variasi substitusi berupa lisin (K), serin (S), dan asparagin (N). Substitusi S141P ditemukan di isolat Muara Enim (2008), Waylaga (2008 dan 2009), Rejanglebong, Bangka, Bandar Lampung, Metro, Lampung Selatan dan Ogan Komering Ilir. Pada posisi asam amino ke-189 semua isolat hasil penelitian dan isolat pembandingan ditemukan substitusi dari lisin (K) ke arginin (R). Variasi *antigenic* akibat adanya mutasi disebabkan karena adanya kumpulan perubahan pada RNA virus (Lee dan Saif, 2009). Substitusi asam amino pada *antigenic site* merupakan salah satu pendorong terjadinya mutasi pada gen HA (Duvvuri *et al.* 2009). Menurut Plotkin *et al.* (2002), substitusi asam amino pada *antigenic site*

menyebabkan terjadinya seleksi positif. Seleksi positif *antigenic site* disebabkan karena tekanan seleksi untuk menghindari dari respon imun hospes termasuk penghindaran pengenalan antibodi. Adaptasi virus ke sel hospes merupakan salah satu penyebab peningkatan *antigenic drift* (Steinhauer, 1999).

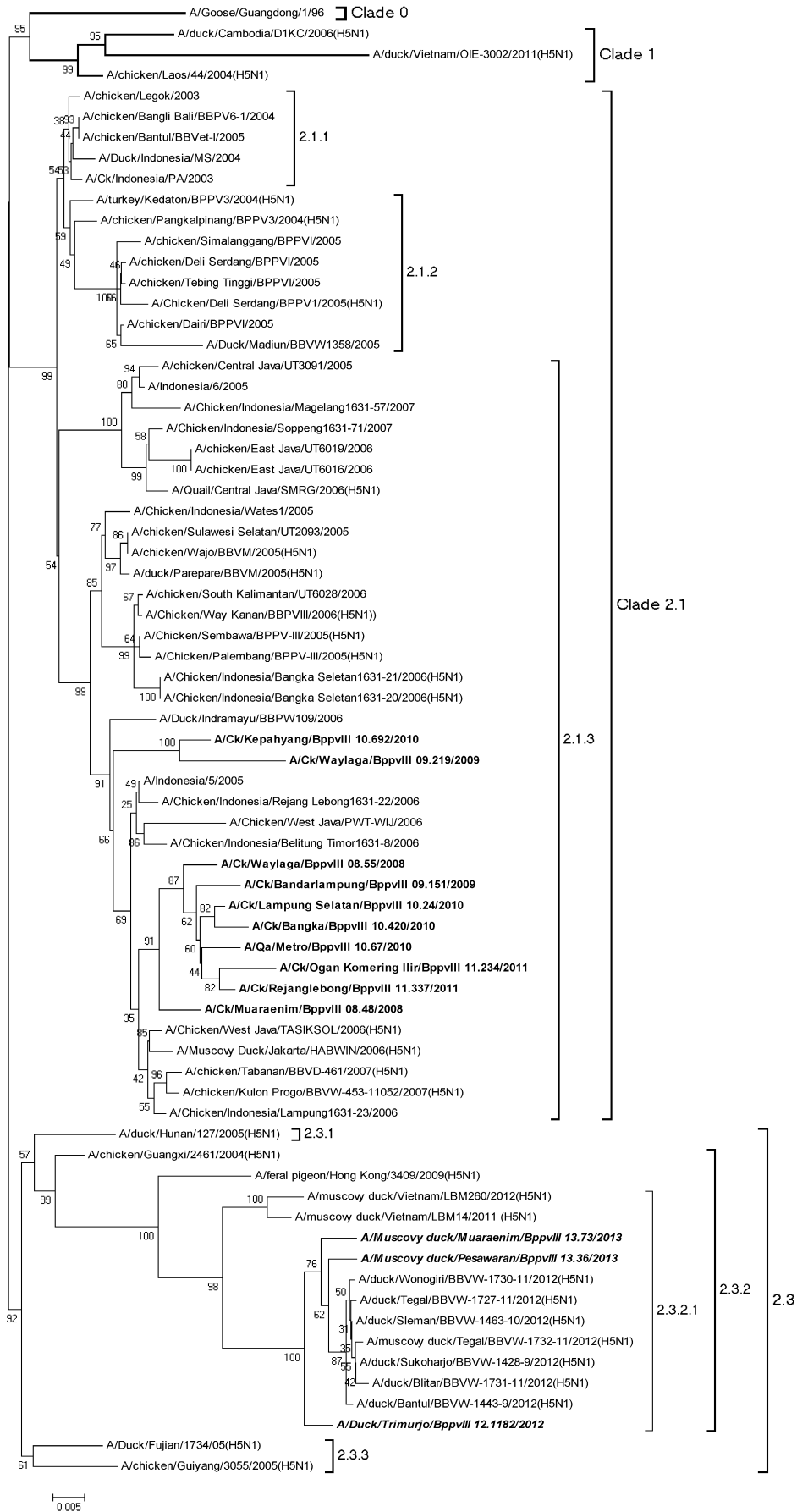
**Tabel 2.** Posisi *antigenic site* (H5 nomenklatur) oleh Duvvuri *et al.* (2009)

Clade 0	Clade 2.1.1	Clade 2.1.3	Clade 2.3.2
T36	T	T	T
K48	K	K	K
R53	R	K,R	K
Q115	Q	Q	Q
N124	N	N	N
D126	E	E	E
S128	S	S	S
P136	P	P	S
H138	Q	Q,L	Q
R140	K	K,R,S,N	N
S141	S	S,P	S
K152	K	K	K
N182	N	N	N
A185	A	A	A
K189	R	R	R
K412	K	K	K

Glikosilasi asam amino diketahui juga memberikan pengaruh pada perubahan *antigenic*. Posisi glikosilasi asam amino terkait asparagin (N) sangat berpotensi sebagai tempat penempelan oligosakarida. Konsensus glikosilasi menganut pola sekuen N-X-S atau N-X-T dengan N (asparagin), X sebagai asam amino lain dan S/T (serin/treonin) (Spiro, 2002). Penempelan oligosakarida pada asam amino tertentu sangat penting untuk proses pelipatan gen HA untuk berikatan dengan reseptor sel. Terdapat 7-9 glikosilasi ditemukan pada gen HA (Schulze, 1997). Menurut Duvvuri *et al.* (2009), posisi glikosilasi terletak pada asam amino 11-13, 23-25, 154-156, 165-167, 286-288, 484-486 dan 543-545 (nomenklatur H5). Beberapa isolat penelitian mengalami glikosilasi pada posisi 154-156 yaitu isolat dari Waylaga, Muara Enim, Bandar Lampung, Lampung Selatan, Bangka, Kepahyang, Palembang, Ogan Komering Ilir, dan Metro. Isolat Metro mengalami substitusi asam amino pada posisi 484 (N484K). Glikosilasi pada posisi 154-156 berdekatan dengan *antigenic site* dan reseptor *binding site* (Duvvuri *et al.*, 2009). Glikosilasi pada posisi ini akan memengaruhi afinitas ikatan pada reseptor dan mekanisme virus AI dalam menghindari respons imun hospes. Hal ini berkaitan dengan adanya penambahan rantai oligosakarida pada posisi 154.

Menurut WHO (2008), virus AI dikelompokkan ke dalam sepuluh *clade* besar (0-9). Pada *clade* 2 dibagi menjadi lima *subclade* (2.1-2.5). *Clade* 2.1 (2.1.1-2.1.3) berasal dari isolat virus AI unggas dan manusia Indonesia. *Clade* 2.3 (2.3.1-2.3.4) berasal dari isolat unggas dan manusia yang diisolasi di negara China, Hong Kong, Vietnam, Thailand, Laos dan Malaysia. *Clade* 2.2 terdiri dari isolat dari berbagai negara yang menyebar akibat penyebaran virus karena perdagangan unggas dan migrasi burung liar. Analisis pohon filogenik pada Gambar 3 menunjukkan bahwa dari semua virus yang dianalisis secara umum membentuk tiga *clade* besar yaitu *clade* Indonesia dan Asia Tenggara (*clade* 2), *clade* Asia (*clade* 1) dan *clade* 0 (A/goose/Guangdong/96). Sepuluh isolat VAI Lampung berada pada *clade* 2.1.3 bersama dengan A/Chicken/Sembawa/BPPV-III/2005 (Acc. No. EU124103), A/Chicken/Indonesia/Rejang Lebong 1631-22/2006 (Acc. No. EU124204), A/Chicken/Palembang/BPPV-III/2005 (Acc. No. EU124102), A/Chicken/Indonesia/Bangka Seletan1631-20/2006 (Acc. No. EU124202), A/Chicken/Indonesia/Bangka Seletan1631-21/2006 (Acc. No. EU124203), A/Chicken/Indonesia/Belitung Timor 1631-18/2006 (Acc. No. EU124201) dan A/Chicken/Way Kanan/BBPVIII/2006 (Acc. No. EU124086). Tiga virus AI subtipe H5N1 isolat yang menginfeksi unggas air (Trimurjo, Pesawaran, dan Muara Enim) merupakan *strain* virus yang berbeda dengan virus AI subtipe H5N1 di Indonesia yang telah ditemukan/diisolasi sebelumnya. Tiga isolat VAI tersebut membentuk *clade* baru yang dekat dengan *clade* virus unggas asal Vietnam yaitu *clade* 2.3.2 (Pfeiffer *et al.*, 2009; Wibawa *et al.*, 2012).

Berdasarkan lokasi penyebarannya virus AI di Indonesia dimasukkan ke dalam 3 grup yaitu grup A, B, dan C. Grup A mewakili virus yang ada di Jawa, Timor Barat, dan Sulawesi. Grup B mewakili virus Jawa, Bali, Flores, dan Timor Barat. Grup C mewakili virus dari Jawa, Sumatera, dan Bangka (Takano *et al.*, 2009). Virus AI asal Lampung digolongkan pada grup C. Virus tersebut masih mempunyai hubungan dan kedekatan dengan virus AI grup Jawa. Penyebaran virus AI ke Sumatera dan pulau lainnya diakibatkan karena pola transportasi unggas pembawa virus yang tanpa kontrol (Takano *et al.*, 2009). Virus AI subtipe H5N1 isolat Lampung merupakan turunan virus khas Indonesia dapat dipastikan muncul (*escape*) akibat mutasi dan penyebaran virus lewat transportasi kecuali pada virus AI yang menginfeksi unggas air. Virus isolat Lampung tahun 2012-2013 yang menginfeksi unggas air tampaknya bukan merupakan turunan virus yang ada di Indonesia yang berasal dari *clade* 2.1 tetapi merupakan virus yang baru diintroduksi ke Indonesia. Introduksi virus AI yang menginfeksi unggas air diakibatkan karena transportasi unggas dari Jawa sedangkan introduksi virus AI yang menginfeksi unggas air di Jawa sampai saat ini belum diketahui mekanismenya (Wibawa *et al.*, 2012).



Gambar 3. Phylogenetic tree isolat Lampung 2008-2013 (cetak tebal merupakan isolat penelitian)

## KESIMPULAN

Dari data penelitian dapat diambil kesimpulan terdapat perbedaan genetik antar isolat Lampung dari tahun 2003-2013 ditemukan berkisar antara 1,15-9,06 % dengan tingkat homologi mencapai 90,94-98,85%. Variasi genetik ditemukan di *antigenic site* dengan adanya substitusi pada posisi 53 (R53K), 126 (D126E), 136 (P136), 138 (H138Q dan H138L), 140 (R140K, R140S dan R140N), 141 (S141P), dan 189 (K189R). Berdasarkan analisis filogenik isolat-isolat Lampung tahun 2008-2011 termasuk ke dalam *clade* 2.1.3 dan masuk ke dalam grup C berdasarkan sebaran geografiknya dan isolat AI tahun 2012-2013 yang menginfeksi unggas air mempunyai homologi sekitar 98,5-99,1% bila dibandingkan dengan isolat AI yang menginfeksi unggas air asal Jawa dan termasuk ke dalam *clade* 2.3.2.1.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Program BEP USDA yang telah mendanai penelitian ini dan seluruh staf Laboratorium Bioteknologi BPPV Regional III dan Laboratorium Bioteknologi PUSVETMA Surabaya atas bantuan dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Air, G.M., Webster, R.G., Colman, P.M., and Laver, W.G. 1987. Distribution of sequence differences in influenza N9 neuraminidase of tern and whale viruses and crystallization of the whale neuraminidase complexed with antibodies. **Virology** 160:346-354.
- Alexander, D.J. 1982. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australia 2002-2006. **Avian Diseases** 51:161-166.
- Cardona, C.J., Z. Xing, C.E. Sandrock, and C.E. Davis. 2009. Avian influenza in birds and mammals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 32:255-273.
- Duvvuri, V.R.S.K., B. Duvvuri, W.R. Cuff, G.E. Wu, and J. Wu. 2009. Role of positive selection pressure on the evolution of H5N1 hemagglutinin. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics** 7:1-10.
- Guo, Y., M. Wang, Y. Kawaoka, O. Gorman, T. Ito, T. Saito, and R.G. Webster. 1992. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. **Virology** 188:245-255.
- Kovacova, A., G. Ruttkay-Nedecky, I.A. Haverlik, and S. Janacek. 2002. Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins. **Virus Genes** 24(1):57-63.
- Lee, C.W. and Y.M. Saif. 2009. Avian influenza virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 32:2-5.
- Lupiani, B. and S.M. Reddy. 2009. Review the history of avian influenza. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 32:311-323.
- Peiris, J.S., M.D. de Jong, and Y. Guan. 2007. Avian influenza virus (H5N1): A threat to human health. **Clinical Microbiology Review** 20:243-267.
- Pfeiffer, J., M. Pantin-Jackwood, T.L. To, T. Nguyen, and D.L. Suarez. 2009. Phylogenetic and biological characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses (Vietnam 2005) in chickens and ducks. **Virus Research** 142:108-120.
- Plotkin, J.B., J. Dushoff, and S.A. Levin. 2002. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. **PNAS** 99(9):6263-6268.
- Schulze, I.T. 1997. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. **Journal of Infectious Diseases** 176 (Suppl 1):24-28.
- Smith, G.J.D., T.S.P. Naipospos, T.D. Nguyen, M.D. de Jong, D. Vijaykrishna, T.B. Usman, S.S. Hassan, T.V. Nguyen, T.V. Dao, N.A. Bui, Y.H.C. Leung, C.L. Cheung, J.M. Rayner, J.X. Zhang, L.J. Zhang, L.L.M. Poon, K.S. Li, V.C. Nguyen, T.T. Hien, J. Farrar, R.G. Webster, H. Chen, J.S.M. Peiris, and Y. Guan. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. **Virology** 350:258-268.
- Spackman, E., D.A. Senne, S. Davison, and D.L. Suarez. 2003. Sequence analysis of recent [7H] avian influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States. **Journal of Virology** 77:13399-133402.
- Spiro, R.G. 2002. Protein glycosylation : nature, distribution, enzymatic information and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology** 4:43-56.
- Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. **Virology** 258:1-20.
- Suarez, D.L. 2008. **Avian Influenza**. Blackwell Publishing Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA.
- Suarez, D.L. and D.A. Senne. 2000. Sequence analysis of related low-pathogenic and highly pathogenic H5N2 avian influenza isolates from United States live bird markets and poultry farms from 1983 to 1989. **Avian Diseases** 44:356-364.
- Takano, R., C.A. Nidom, M. Kiso, Y. Muramoto, S. Yamada, Y.S. Tagawa, C. Macken, and Y. Kawaoka. 2009. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. **Virology** 390:13-21.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** 28(10):2731-2739.
- Webster, R.G., V.S. Hinshaw, W.J. Bean, K.L. Van Wyke, J.R. Geraci, S.T. Aubin, and G. Petrusson. 1981. Characterization of an influenza A virus from Seals. **Virology** 113:712-724.
- WHO. 2008. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). **Emerging Infectious Diseases** 14(7): e1. Doi: 10.3201/eid1407.071681
- Wibawa, H., W.J. Prijono, N.L.P.I. Dharmayanti, S.H. Irianingsih, Y. Miswati, A. Rohmah, E. Andesyha, Romlah, R.S.D. Daulay, dan K. Safitria. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur: Identifikasi sebuah clade baru virus avian influenza sub tipe baru di Indonesia. **Buletin Lab. Vet.** 12(4):2-8.
- Zhou, N.N., D.A. Senne, J.S. Landgraf, S.L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L. Liu, K.J. Yoon, S. Krauss, and R.G. Webster. 2000. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. **Veterinary Microbiology** 74:47-58.