

Karakterisasi Gen Non Struktural 1 (NSI) Virus *Avian Influenza* pada Isolat Itik Tahun 2013

Characterization of Avian Influenza Virus Non Structural Gen 1 (NSI) on Duck Isolate in 2013

Nur Khusni Hidayanto¹, Widya Asmara², M. Haryadi Wibowo²

¹Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
Jl. Raya Pembangunan Gunung Sindur Bogor

²Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna 2, Karangmalang Yogyakarta 55281
Email : khuznihidayanto@gmail.com

Abstract

Outbreaks of avian influenza (AI) in Indonesia has occurred since the end of 2003 and is still occurring endemic until now. At the end of 2012 cases of high mortality in ducks caused AI subtype H5N1 disease classified into clade 2.3.2, whereas the previous AI viruses are classified in clade 2.1.1, 2.1.2 and 2.1.3. One that play a role in the virulence of AI disease is amino acid motif of C-terminal nonstructural 1 (NS1) protein. Sequence analysis of nonstructural 1 (NS1) protein influenza virus derived from poultry have amino acid motif at the C-terminal ESEV being the human influenza virus has RSKV motif at the C-terminal. Residue C-terminal NS1 protein of avian influenza virus subtype H5N1 needs to be studied because it affects the pathogenicity and virulence of the virus. This study aims to determine the amino acid motif at the C-terminal nonstructural protein 1 (NS1) of avian influenza virus that attacked ducks in 2013 samples derived from cases of AI in ducks in Tulungagung and Blitar in 2013 Virus isolation using embryonated eggs chicken tertunas. Identification of AI virus subtype H5N1 using the technique of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers H5 (Lee et al., 2001) with the target 545 bp amplification and primer N1 (Payungporn et al., 2004) with the target 131 bp amplification. NS1 gene amplification using RT-PCR with two primer pairs (Noah et al-Bannet., 2007) were designed to amplify NS gene continued NS1 gene sequencing process. Sequences obtained were analyzed using the software MEGA 5:05 which includes multiple alignment, amino acid prediction and phylogenetic tree analysis. Results of nucleotide sequences obtained 690 nt that encodes a protein NS1. The phylogenetic tree analysis show all tested isolates not grouped into Indonesian isolates in 2003-2008 and adjacent to the cluster of AI virus from Asia clade 2.3.2. All isolates in 2013 found a deletion of amino acids at positions 80-84, D92E amino acid substitutions, all isolates have amino acid alanine (A) at amino acids 149 and isolates have amino acids variation of lysine (K) and glutamic acid (E) at position 196. All isolates have ESEV motif at PDZ ligand NS1 gen.

Keywords : C - terminal, NS1, Avian Influenza, Ducks

Abstrak

Wabah *avian influenza* (AI) di Indonesia telah terjadi sejak akhir tahun 2003 dan masih terjadi secara endemis sampai sekarang. Pada akhir tahun 2012 terjadi kasus kematian yang cukup tinggi pada itik yang disebabkan penyakit AI subtipe H5N1 yang diklasifikasikan ke dalam clade 2.3.2, sedangkan virus AI sebelumnya diklasifikasikan pada clade 2.1.1, 2.1.2 dan 2.1.3. Salah satu yang berperan dalam virulensi penyakit AI adalah motif asam amino *C-terminal* protein nonstruktural 1 (NS1). Analisis sekuens virus *influenza* terutama protein nonstruktural 1 (NS1) yang berasal dari unggas mempunyai motif asam amino ESEV pada *C-terminal* sedang pada virus *influenza* manusia mempunyai motif RSKV pada *C-terminal*. Data sekuens NS1 untuk virus AI terbaru belum lengkap sehingga perlu disekuens untuk melengkapi data molekuler NS1 virus AI. Residu *C-terminal* protein NS1 virus *avian influenza* subtype H5N1 perlu dikaji karena mempengaruhi patogenisitas dan virulensi virus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motif asam amino pada *C-terminal* protein nonstruktural 1 (NS1) virus *avian influenza* yang menyerang itik pada tahun 2013. Sampel berasal dari kasus AI pada itik di Tulungagung dan Blitar pada tahun 2013. Isolasi virus menggunakan telur berembrio tertunas ayam. Identifikasi virus AI subtipe H5N1 menggunakan teknik *reverse transcription polimerase chain reaction* (RT-PCR) dengan primer H5 (Lee *et al.*, 2001) dengan target amplifikasi 545 bp dan primer N1 (Payungporn *et al.*, 2004) dengan target amplifikasi 131 bp. Amplifikasi gen NS1 menggunakan RT-PCR dengan 2 pasang primer (Bannet-Noah *et al.*, 2007) yang didesain mengamplifikasi gen NS dan dilanjutkan proses sekuensing gen NS1. Sekuens yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan software MEGA 5.05 yang meliputi multiple alignment, prediksi asam amino dan analisis pohon filogenetik. Hasil sekuens isolat diperoleh panjang nukleotida yang mengkode protein NS1 sepanjang 690 nt. Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa ke lima isolat uji tidak berada satu grup dengan dengan isolat asal Indonesia tahun 2003-2008 dan berdekatan dengan klaster virus AI yang berasal dari Asia clade 2.3.2. Pada semua isolat tahun 2013 ditemukan delesi asam amino pada posisi 80-84, substitusi asam amino D92E, asam amino 149 semua isolat mempunyai asam amino *alanine* (A), asam amino ke 196 ditemukan adanya variasi substitusi berupa *lysine* (K) dan *glutamic acid* (E) dan asam amino pada gen NS1 mempunyai motif ESEV pada posisi PDZ *ligand*.

Kata kunci: *C-terminal*, NS1, *Avian Influenza*, Itik.

Pendahuluan

Wabah *avian influenza* di Indonesia telah terjadi sejak pertengahan tahun 2003 (Damayanti *et al.*, 2004). Kasus AI di Indonesia masih terus terjadi dengan frekuensi yang beragam selama tahun 2006-2012 (Anonim, 2012). Pada akhir tahun 2012 terjadi kasus AI pada itik di daerah Jawa Tengah, D.I. Jogjakarta dan Jawa Timur yang disebabkan penyakit AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 (Wibawa *et al.*, 2012).

Virus AI tipe A memiliki delapan segmen gen yang mengkode sepuluh protein yang berbeda. Protein tersebut antara lain PB1, PB2, and PA polymerase, HA, NP, NA, M1 and M2 proteins, NS1 dan NS2. (Webster *et al.*, 1992, Horimoto dan Kawaoka, 2001). Protein nonstruktural 1 (NS1)

merupakan satu dari delapan segmen protein pada virus *avian influenza* (AI). Protein NS1 pada *influenza A* merupakan protein nonstruktural yang diekspresikan dalam jumlah besar pada sel yang diinfeksi virus, tetapi belum dideteksi di virion (Garcia-sastre *et al.*, 1998). Protein NS1 virus *avian influenza* mengandung dua domain fungsional yaitu *N-terminal RNA-binding domain* (residu 1-73) yang berfungsi melawan respon imun hospes dengan memblokir sintesis *interferon* tipe I dan *C-terminal domain efektor* (residu 73-237) yang berinteraksi dengan protein seluler (Qian *et al.*, 1994, Zohari *et al.*, 2008, Dundon *et al.*, 2009).

Beberapa asam amino penting protein NS1 bertanggung jawab pada virulensi virus AI. Protein NS1 yang mengalami substitusi asam amino tunggal prolin menjadi serin pada posisi 42 (P42S)

meningkatkan virulensi virus AI pada mencit (Jiao *et al.*, 2008). Protein NS1 virus AI yang mengandung asam amino leusin pada posisi 103 dan isoleusin pada posisi 106 dapat meningkatkan tingkat infeksi pada paru (Dankar *et al.*, 2011). Long *et al.* (2008) menyatakan bahwa protein NS1 yang mengalami delesi 15 nukleotida pada posisi 263 – 277 dan substitusi asam aspartat menjadi asam glutamat pada posisi 92 berperan meningkatkan virulensi virus AI H5N1 pada ayam dan mencit. Virus *avian influenza* H5N1 yang mengandung alanin pada posisi asam amino ke 149 pada protein NS1 mampu mencegah induksi *interferon* pada *chicken embryo fibroblasts* (CEF) (Li *et al.*, 2006). Daerah *C-terminal domain* efektor yang mempunyai asam amino lisin atau asam glutamat pada posisi 196 berkaitan dengan aktivasi transkripsi IRF3 dan *interferon-β*. (Kuo *et al.*, 2010).

Motif residu *C-terminal* protein NS1 yang ada pada mayoritas virus *avian influenza* A berperan dalam propagasi virus dan penyebaran virus pada unggas (Zielecki *et al.*, 2010). Analisis sekuen virus *influenza* terutama protein nonstruktural 1 (NS1) yang berasal dari unggas mempunyai motif asam amino ESEV pada *C-terminal*, sedangkan pada virus *influenza* manusia mempunyai motif RSKV pada *C-terminal* (Soubies *et al.*, 2009). Residu *C-terminal* (ESEV atau EPEV) protein NS1 virus *avian influenza* subtipe H5N1 dari isolat asal manusia tidak mempengaruhi kemampuan virus untuk

tumbuh dalam kultur jaringan, tetapi secara signifikan meningkatkan virulensi dan patogenisitas virus pada tikus yang terinfeksi dan menyebabkan alveolitis dan hemoragi pada paru-paru tikus yang terinfeksi (Jackson *et al.*, 2007). Dharmayanti *et al.* (2009) menyatakan bahwa virus *avian influenza* yang berasal dari unggas dan manusia yang berasal dari kasus pada tahun 2007 memiliki motif ESEV.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui susunan asam amino protein NS1 virus *avian influenza* isolat AI pada itik tahun 2013 dan mengetahui ada tidaknya perubahan pada marker virulensi (asam amino 42, 80-84, 92, 149 dan 196) dan spesifitas hospes pada *C-terminal* protein NS1 (PDZ *ligand*) virus *avian influenza* isolat AI pada itik tahun 2013.

Materi dan Metode

Isolat Penelitian

Isolat virus *avian influenza* berasal dari peternakan itik di Campurdarat, Tulungagung dan Ponggok, Blitar yang terindikasi terserang penyakit AI pada tahun 2013, yaitu dengan gejala tortikolis dan kematian yang tinggi. Isolasi virus dilakukan di Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates Yogyakarta sedangkan untuk amplifikasi *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan proses sekuensing dilakukan di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) Bogor.

Tabel 1. Isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian

No	Kode Isolat	Jenis Unggas	Asal Isolat	Tahun
1	A/duck/Jatim/NKH -1/2013	Itik	Tulungagung	2013
2	A/duck/Jatim/NKH -2/2013	Itik	Blitar	2013
3	A/duck/Jatim/NKH -3/2013	Itik	Blitar	2013
4	A/duck/Jatim/NKH -4/2013	Itik	Blitar	2013
5	A/duck/Jatim/NKH -5/2013	Itik	Blitar	2013

Isolasi virus *Avian Influenza*

Isolat virus diinokulasikan pada telur berembrio tertunas umur 9-11 hari melalui cairan allantois. Adanya pertumbuhan virus AI ditentukan dengan uji hemaglutinasi (HA) dan dilanjutkan dengan uji hambatan hemaglutinasi (*hemagglutination inhibition*/HI) (Spackman, 2007). Hasil propagasi isolat selanjutnya diidentifikasi secara molekuler.

Identifikasi Isolat Virus AI H5N1 Secara Molekuler

Virus AI dari cairan allantois dilakukan ekstraksi RNA menggunakan *Qiamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Cat: 52904). Hasil ekstraksi berupa RNA digunakan mendeteksi virus *avian influenza*

subtipe H5N1 menggunakan prosedur *One Step RT-PCR kit* (Qiagen, Cat: 210212). Primer yang digunakan yaitu sepasang primer H5 (Lee *et al.*, 2001) dengan target amplifikasi 545 bp dan primer N1 (Payungporn *et al.*, 2004) dengan target amplifikasi 131 bp (Tabel 2). Siklus amplifikasi pada mesin *thermal cycler* diawali dengan *reverse transcriptase* pada suhu 50° C selama 30 menit, *hot start* 95° C selama 15 menit, kemudian 35 siklus dimana masing-masing siklus terdiri dari denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 54° C selama 1 menit untuk primer H5 atau 55° C selama 1 menit untuk primer N1 dan elongasi 72° C selama 1 menit. Amplifikasi diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72° C selama 10 menit.

Tabel 2. Sekuen nukleotida primer *forward* dan *reverse* virus AI subtipe H5N1

Gen	Nama	Sekuen (5' - 3')	Ukuran (bp)	Sumber
H5	H5-155 F	ACACATGCYCARGACATACT	545	Lee <i>et al.</i> , 2001
	H5-699 R	CTYTGRTTYAGTGTTGATGT		
N1	N1-1 F	GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC	131	Payungporn <i>et al.</i> , 2004
	N1-2 R	TGATAGTGTCTGTTATTATGCC		

Sekuensing dan analisis hasil sekuensing

Isolat AI subtipe H5N1 dilakukan sekuensing DNA terhadap gen NS1. Sampel akan dikirim ke laboratorium bioteknologi BBPMSOH untuk dilakukan proses sekuensing. Primer yang digunakan yaitu dua pasang primer yang didesain untuk mengamplifikasi daerah NS1 (Tabel 2). Siklus amplifikasi pada mesin *thermal cycler* diawali dengan *reverse transcriptase* pada suhu 50° C selama 30 menit, *hot start* 95° C selama 15 menit, kemudian 35 siklus dimana masing-masing siklus terdiri dari

denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 55.5° C selama 1 menit untuk primer NS1-1F dan NS1-563R atau 52° C selama 1 menit 10 detik untuk primer NS1-347F dan NS1-890R dan elongasi 72° C selama 1 menit 30 detik. Amplifikasi diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72° C selama 10 menit. Setelah proses amplifikasi dilanjutkan dengan proses sekuensing. Data sekuen yang diperoleh diolah dengan menggunakan software MEGA 5.05 yang meliputi *multiple alignment*, prediksi asam amino dan analisis pohon filogenetik.

Tabel 3. Sekuen nukleotida primer *forward* dan *reverse* virus AI gen NS1

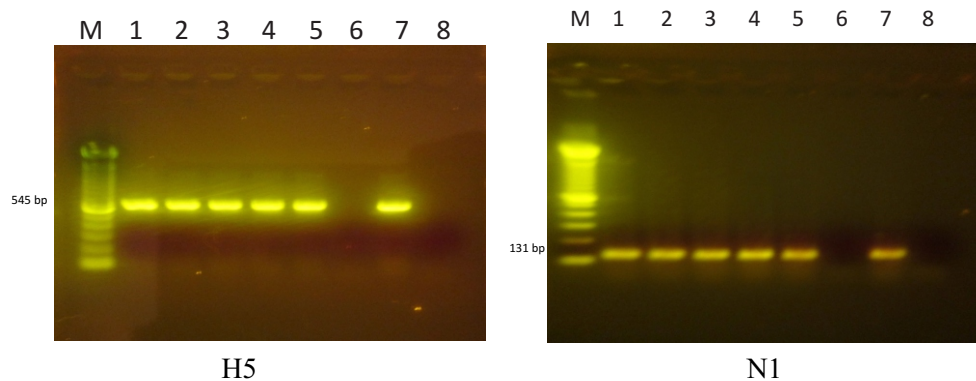
Gen	Nama	Sekuen (5' – 3')	Ukuran (bp)	Sumber
NS1	NS1-1 F	AGCAAAAGCAGGGTG	563	Banet-Noah <i>et al.</i> , 2007
	NS1-563 R	YCCAATTGCATTTTTGACATCCT		
NS1	NS1-347 F	AGGGCCYCTYTGCATYARAATGG	529	
	NS1-890 R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT		

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi Virus AI subtipe H5N1

Isolasi dan propagasi isolat virus yang berasal dari itik yang diduga terserang AI pada tahun 2013 yang dilakukan di Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates Yogyakarta menunjukkan 5 sampel positif terhadap antigen H5 menggunakan uji haemaglutinasi inhibisi

(HI). Isolat yang positif AI subtipe H5 selanjutnya diidentifikasi terhadap virus *avian influenza* subtipe H5N1 menggunakan uji *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Hasil identifikasi menggunakan primer H5 dan N1 menunjukkan bahwa kelima isolat virus merupakan virus *avian influenza* subtipe H5N1 (gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolat virus menggunakan primer H5 dan N1. M: Marker (100 bp), 1 – 5: Sampel penelitian, 6: virus ND, 7: kontrol positif (VAI), 8: kontrol negatif.

Karakteristik gen NS1 virus *avian influenza*

Hasil sekuen dari empat isolat diperoleh panjang nukleotida yang mengkode protein NS1 sepanjang 690 nt kecuali isolat A/duck/jatim/NKH-2/2013 yaitu diperoleh 660 nt karena hasil sekuen yang kurang optimal. Analisis gen NS1 virus AI menggunakan isolat A/goose/Guandong/1996 sebagai isolat acuan dan sebagai pembanding untuk analisis data ditambahkan isolat asal Indonesia tahun 2003 –

2008 yang diambil dari *gen bank*. Hasil penelitian terhadap isolat asal itik tahun 2013 didapatkan adanya delesi dan substitusi beberapa asam amino pada protein NS1. Pada semua isolat tahun 2013 asam amino pada posisi 42 berupa serin (S) dan ditemukan delesi asam amino pada posisi 80-84. Substitusi asam aspartat (D) menjadi asam glutamat (E) pada posisi 92 ditemukan pada semua isolat. Pada asam amino 149 semua isolat mempunyai asam

amino alanin (A). Asam amino ke 196 ditemukan adanya variasi substitusi berupa lisin(K) pada isolat virus A/duck/Jatim/NKH-1/2013, A/duck/Jatim/NKH-2/2013 dan A/duck/Jatim/NKH-4/2013 dan *glutamic acid* (E) pada isolat virus A/duck/Jatim/NKH-

3/2013 dan A/duck/Jatim/NKH-5/2013. Pada posisi PDZ *ligand* kelima isolat penelitian mempunyai motif ESEV. Data substitusi asam amino pada *C-terminal* secara lengkap ditampilkan di tabel 3.

Isolat	Asam amino gen C -terminal NS1					Motif <i>PDZ domain ligand</i>
	42	Delesi 80-84	92	149	196	
A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)	A	Tidak	D	A	E	ESEV
A/chicken/Legok/2003(H5N1)	A	Ya	D	A	E	ESEV
A/Muscovy_duck/Jakarta/DKI - Uwit/2004(H5N1)	A	Ya	D	A	E	ESEV
A/Muscovy_duck/West_Java/Bgr - Cw/2005(H5N1)	A	Ya	D	A	E	ESEV
A/muscovy_duck/Jakarta/Sum106/2006 (H5N1)	A	Ya	D	A	E	ESEV
A/Muscovy_duck/West_Java/Bks3/2007 (H5N1)	A	Ya	D	A	E	ESEV
A/chicken/West_Java/Smi - Acul/2008(H5N1)	A	Ya	D	A	E	ESEV
A/duck/Jatim/NKH -1/2013(H5N1)	A	Ya	E	A	E	ESEV
A/duck/Jatim/NKH -2/2013(H5N1)	A	Ya	E	A	E	ESEV
A/duck/Jatim/NKH -3/2013(H5N1)	A	Ya	E	A	K	ESEV
A/duck/Jatim/NKH -4/2013(H5N1)	A	Ya	E	A	E	ESEV
A/duck/Jatim/NKH -5/2013(H5N1)	A	Ya	E	A	K	ESEV

Tabel 4. Karakter genetik asam amino gen *C-terminal* protein NS1 virus H5N1.

A: Alanin, S: Serin, D: Asam Aspartat, E: Asam Glutamat, K: Lysine, S: Serine, V: Valine.

Pada penelitian ini hasil sekuen yang disejajarkan dan dikonversi ke dalam asam amino merupakan daerah *N-terminal RNA-binding domain* (residu 1-73) dan *C-terminal domain efektor* protein NS1 yang terletak pada asam amino 74-230. Menurut Baez *et al.* (1981) daerah yang mengkode 230 asam amino yang diawali *start codon* pada posisi 27-29 dan diakhiri *stop kodon* pada posisi 717-719 merupakan daerah yang mengkode protein NS1. *C-terminal domain efektor* protein NS1 merupakan daerah yang terletak pada asam amino 74-237 yang berfungsi berinteraksi

dengan protein seluler (Qian *et al.*, 1994, Zohari *et al.*, 2008, Dundon *et al.*, 2009).

Beberapa asam amino penting protein NS1 yang bertanggung jawab pada virulensi virus AI yaitu protein NS1 yang mengalami substitusi asam amino tunggal proline menjadi serine pada posisi 42 (P42S) meningkatkan virulensi virus AI pada mencit (Jiao *et al.*, 2008). Long *et al.* (2008) menyatakan bahwa protein NS1 yang mengalami delesi 15 nukleotida pada posisi 263 – 277 dan substitusi asam aspartat (D) menjadi asam glutamat (E) pada posisi 92 berperan meningkatkan virulensi virus AI H5N1 pada

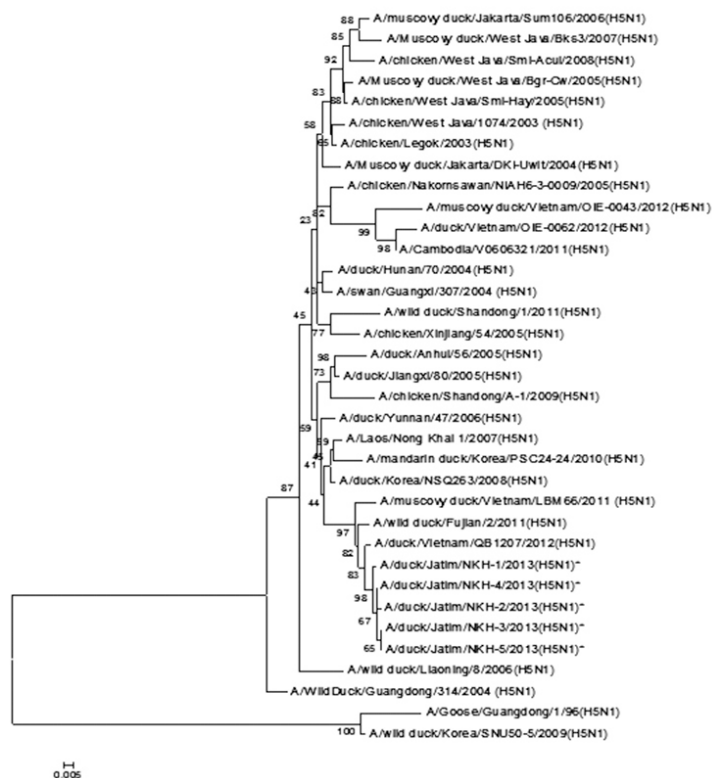
ayam dan mencit. Virus *avian influenza* H5N1 yang mengandung alanin (A) pada posisi 149 pada protein NS1 mampu mencegah induksi *interferon* pada *chicken embryo fibroblasts* (CEF) (Li *et al.*, 2006). Daerah *C-terminal domain efektor* yang mempunyai asam amino lisin (K) atau asam glutamat (E) pada posisi 196 berkaitan dengan aktivasi transkripsi IRF3 dan *interferon- β* (Kuo *et al.*, 2010).

Analisis sekuen asam amino pada gen *C-terminal* kelima isolat AI tahun 2013 mempunyai motif ESEV pada posisi PDZ *domain ligand*. Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat penelitian berasal dari virus unggas. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian Dharmayanti *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa isolat *clade 2.3.2* tahun 2012 asal Indonesia mempunyai motif ESEV pada posisi PDZ *domain ligand*. Dharmayanti *et al.* (2009) menyatakan bahwa virus *avian influenza* yang berasal dari unggas dan manusia yang berasal dari kasus pada tahun 2007 juga memiliki motif ESEV.

Menurut Jackson *et al.*, (2007), residu *C-terminal* (ESEV atau EPEV) protein NS1 virus *avian influenza* subtype H5N1 dari isolat asal manusia tidak mempengaruhi kemampuan virus untuk tumbuh dalam kultur jaringan, tetapi secara signifikan meningkatkan virulensi dan patogenisitas virus pada tikus yang terinfeksi dan menyebabkan alveolitis dan hemoragi pada paru-paru tikus yang terinfeksi. Motif ESEV pada PDZ *ligand* juga menyebabkan pelemahan replikasi virus pada kultur sel manusia, *murine*, dan itik tetapi tidak

mempengaruhi replikasi virus pada kultur sel fibroblas ayam (Zielecki *et al.*, 2010). Soubies *et al.*, 2010 menyatakan bahwa adanya motif RSKV pada PDZ *ligand* menyebabkan meningkatnya replikasi virus pada sel itik secara *in vitro* dan *in vivo* dan sel manusia secara *in vitro*, sedangkan motif ESEV pada PDZ *ligand* meningkatkan virulensi pada mencit yang berkaitan dengan peningkatan produksi IFN tipe I pada paru mencit.

Analisis filogenetik NS1 menunjukkan bahwa kelima isolat tidak berada satu grup dengan virus AI asal Indonesia tahun 2003-2008. Virus AI yang diisolasi pada tahun 2013 membentuk klaster virus tersendiri. Kelompok virus tersebut berdekatan dengan klaster virus AI yang berasal dari Asia *clade 2.3.2* yang telah terdapat pada *gene bank* yang menunjukkan kedekatan genetik dengan virus A/muscovy duck/Vietnam/LBM66/2011, A/wild duck/Fujian/2/2011 dan A/duck/Vietnam/QB1207/2012. Analisis tersebut bersesuaian dengan laporan Dharmayanti *et al.* (2013) yang melaporkan bahwa virus baru tahun 2012 tidak berada dalam satu grup dengan virus H5N1 Indonesia dan berada dalam satu kelompok dan berdekatan dengan virus asal Vietnam, sehingga introduksi virus diduga berasal dari luar Indonesia. Virus AI asal Indonesia tahun 2012 dibandingkan dengan virus AI *clade 2.3.2* lain yang ada di *gene bank* menunjukkan kedekatan dengan virus AI yang berasal dari Vietnam, China dan Hongkong (Dharmayanti *et al.*, 2014).



Gambar 2. Pohon filogenetik fragmen gen NS1 di sepanjang nukleotida 217-690. Notasi * adalah isolat yang diteliti.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan isolat virus *avian influenza* tahun 2013 diidentifikasi sebagai *avian influenza* subtipe H5N1. Semua isolat AI tahun 2013 asam amino pada posisi 42 berupa serin (S) dan ditemukan substitusi deleksi asam amino pada posisi 80-84, substitusi asam aspartat (D) menjadi asam glutamat (E) pada posisi 92, asam amino 149 semua isolat mempunyai asam amino alanin (A) dan asam amino ke 196 ditemukan adanya variasi substitusi berupa lisin (K) dan asam glutamat (E). Analisis sekuen asam amino pada gen NS1 kelima isolat AI tahun 2013 mempunyai motif ESEV yang merupakan motif PDZ *ligand* virus asal unggas. Adanya perubahan asam amino pada marker virulensi perlu diwaspadai walaupun belum ada perubahan motif ESEV pada PDZ *ligand*.

Daftar Pustaka

Anonim. 2011. FAO-OIE-WHO Technical Update:Current evolution of avian influenza H5N1 viruses (7 September 2011). <http://www.fao.org/docrep/014/al874e/al874e00.pdf>

Anonim. 2012. Update Perkembangan Kasus Avian Influenza (AI) pada Unggas Kondisi s/d 31 November 2012. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian. <http://ditjennak.deptan.go.id/index.php?page=berita&action=detail&idberita=366>

Baez M., Zazra J. J., Elliot R. M., Young J. F. And Palese P. 1981. Nucleotide Sequence of the Influenza A/duck/Alberta/GO/ 76 Virus NS RNA: Conservation of the NS1 INS2 Overlapping Gene Structure in a Divergent Influenza Virus RNA Segment. *Virology* 113: 397-402.

- Banet-Noach C., Panshin A., Golender N., Simanov L., Rozenblut E., Pokamunski S., Pirak M., Tendler Y., Garcia M., Gelman B., Pasternak R. and Perk S. 2007. Genetic analysis of nonstructural genes (NS1 and NS2) of H9N2 and H5N1 viruses recently isolated in Israel. *Virus Genes*. 34:157–168.
- Damayanti R., Dharmayanti N.L.P.I., Indriani R., Wiyono A. dan Darminto. 2004. Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Organ Ayam yang Terserang Flu Burung Sangat Patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan Teknik Imunohistokimia. *JITV*9(3):197-203.
- Dwe Jong M.D. and Hien T.T. 2006. Avian influenza A (H5N1)(review). *Journal of Clinical Virology* 35:2–13.
- Dharmayanti N.L.P.I. 2009. Molecular Analysis of H5N1 Avian Influenza Virus from Avian Species: Compared with Genbank Data of the Indonesian H5N1 Human Cases. *Microbiology Indonesia*. 3(2):77-84.
- Dharmayanti N.L.P.I., Diwyanto K. dan Bahri S. 2012. Mewaspadai Perkembangan Avian Influenza (AI) dan Keragamana Genetik Virus AI/H5N1 di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 5(2):124-141.
- Dharmayanti N.L.P.I., Hartawan R., Hewajuli D.A., Hardiman, Wibawa H. dan Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik Molekuler dan Patogenesis Virus H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia. *JITV* 18(2): 99-113.
- Dharmayanti N.L.P.I., Hartawan R., Pudjiatmoko, Wibawa H., Hardiman, Balish A., Donis R., Davis C.T. and Samaan G. 2014. Genetic Characterization of Clade 2.3.2.1 Avian Influenza A(H5N1) Viruses, Indonesia, 2012. *Emerging Infectious Diseases*. www.cdc.gov/eid. 20(4): 671-674.
- Dundon, W. G., and Capua, H. 2009. A closer look at the NS1 of influenza virus. *Viruses* 1: 1057-1072.
- Garcia-sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, and T. Muster. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330.
- Horimoto T. and Kawaoka Y. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology reviews*. 14(1):129–149.
- Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R. and Lamb R.A. 2008. A New Influenza Virus Virulence Determinant: The NS1 Protein Four C-Terminal Residues Modulate Pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(11):4381-4386.
- Lee M.S., Chang P. C., Shien J. H., Cheng M. C. And Shieh H. K. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 97:13-22.
- Payungporn S., Phakdeewirot P., Chutinimitkul S. and Theamboonlers A. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol.* 17:588–593.
- Qian X., Alonso-Caplen F., and Krug R.M. 1994. Two Functional Domains of the Influenza Virus NS1 Protein Are Required for Regulation of Nuclear Export of mRNA. *Journal Of Virology*. 68(4):2433-2441.
- Soubies M.S., Volmer C., Croville G., Loupias J., Peralta B., Costes P., Lacroux C., Gue'rin J., and Volmer R. 2009. Species-Specific Contribution of the Four C-Terminal Amino Acids of Influenza A Virus NS1 Protein to Virulence. *Journal of Virology*. 84(13):6733-6747.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M. and Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews*. 56(1):152-179
- Wibawa H., Prijono W.B., Dharmayanti N.L.P.I., Irianingsih S.H., Miswati Y., Rohmah A., Andesya E., Romlah, Daulay R.S.D., dan Safitri K. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur : Identifikasi sebuah clade baru virus Avian Influenza subtype H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner BBVet Wates*. 12(4):2-9.

Zhu Q., Yang H., Chen W., Cao W., Zhong G., Jiao P., Deng G., Yu K., Yang C., Bu Z., Kawaoka Y. and Chen H. 2008. A Naturally Occuring Deletion in Its NS Gene Contributes to the Attenuation of an H5N1 Swine Influenza Virus in Chickens. *Journal of Virology*. 82(1):220-228.

Zielecki F., Semmler I., Kalthoff D., Voss., Mael S., Gruber A.D., Beer M. and Wolff. 2010. Virulence Determinants of Avian H5N1 Influenza A virus in Mammalian and Avian Hosts: Role of the C-Terminal ESEV Motif in the Viral NS1 Protein. *Journal of Virology*. 84(20):10708-10718.