

## ANALISIS FILOGENETIK ISOLAT VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 ASAL PROVINSI ACEH

### *Phylogenetic Study of Avian Influenza Virus Subtype H5N1 Isolate from Aceh*

Teuku Zahrial Helmy<sup>1</sup>, Rini Widayanti<sup>2</sup>, dan Aris Haryanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

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

E-mail: zahrialbiochemistryfkhsk@gmail.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melakukan studi filogenetik virus AI tipe A subtype H5N1 isolat asal Provinsi Aceh yang dapat memberikan informasi secara molekuler tentang kekerabatan antar isolat virus AI tipe A subtype H5N1. Sebanyak 11 isolat virus AI asal Provinsi Aceh yang dikoleksi oleh Laboratorium Virologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional I di Medan, Sumatera Utara selama kurun waktu 2007-2008 digunakan dalam penelitian ini. Metode penelitian meliputi preparasi sampel isolat virus, ekstraksi RNA, amplifikasi gen H, elektroforesis DNA hasil amplifikasi, sekuensing, dan analisis data hasil sekuensing dengan *software* MEGA 4.0. Hasil sekuensing diketahui bahwa daerah yang teramplifikasi sebesar 191 bp. Hasil *alignment* dari nukleotida 191 bp ditemukan urutan nukleotida yang menyandi 5 asam amino yang berbeda pada posisi asam amino ke-493, 498, 499, 504, dan 515 antara isolat virus AI subtype H5N1 asal Provinsi Aceh selama tahun 2007-2008 dengan isolat dari pembandingan dari *gene bank*. Konstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa virus AI subtype H5N1 asal Provinsi Aceh tahun 2007-2008 mengelompok secara terpisah dari isolat Indonesia yang lain, tetapi masih dalam klaster virus AI subtype H5N1 Indonesia.

Kata kunci: filogenetik, virus AI, H5N1, sekuensing

#### ABSTRACT

The objective of this research was to study the phylogenetic of avian influenza virus (AIV) sub type H5N1 isolate from Aceh Province in order to provide molecular information of the phylogenetic relationships among AIV isolates type A especially subtype H5N1. A total of 11 virus isolates from Aceh province which were collected by the laboratory of Virology in Veterinary Investigation Center Regional I Medan- North Sumatra during the year of 2007-2008, were used in this study. The research method includes: sample preparation of virus isolates, RNA extraction, amplification of H gene in AIV by RT-PCR, electrophoresis of RT-PCR products, sequencing and data analysis of sequencing products by MEGA 4.0 software. Sequencing results of H gene shown the size of amplification product was 191 bp. The alignment of 191 bp reveal that the sequence of nucleotides encode 5 different amino acids at the position of 493<sup>rd</sup>, 498<sup>th</sup>, 499<sup>th</sup>, 504<sup>th</sup>, and 515<sup>th</sup> among AIV isolates subtype H5N1 from Aceh province during the year of 2007-2008 with comparable isolate from GenBank. The construction of phylogenetic tree showed that AIV subtype H5N1 isolates from Aceh province collected during the year of 2007-2008 clustered separately from other Indonesian AIV isolates, but still in a cluster of Indonesian AIV subtype H5N1.

Key words: phylogenetic, AIV, H5N1, sequencing

#### PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) atau flu burung disebabkan oleh virus influenza tipe A, subtype H5N1 yang dapat menyebabkan penyakit influenza pada hewan piaraan jenis unggas dan mamalia seperti kuda, babi, dan manusia (Boyce *et al.*, 2008; Lee and Saif, 2008). Beberapa tahun terakhir perhatian dunia kesehatan hewan dan manusia terpusat kepada semakin mewabahnya penularan virus AI sub tipe H5N1 yang telah menyebabkan kerugian perekonomian yang cukup besar baik pada industri peternakan perunggasan di dunia maupun di Indonesia pada khususnya. Virus AI subtype H5N1 merupakan penyakit hewan menular yang bersifat zoonosis. Virus AI subtype H5N1 dilaporkan juga telah menyebabkan kematian pada manusia sehingga tidak mengherankan jika kewaspadaan global terhadap wabah pandemi flu burung mendapatkan perhatian yang serius (Yee *et al.*, 2008; Lupiani dan Reddy, 2009). Data terakhir tanggal 29 November 2011 di dunia saat ini telah dilaporkan sebanyak 571 kasus konfirmasi infeksi virus AI tipe A subtype H5N1 pada manusia dengan 335 kasus diantaranya berakhir fatal. Di Indonesia, dilaporkan sebanyak 182 kasus konfirmasi infeksi virus AI subtype

H5N1 pada manusia dan sebanyak 150 kasus berakhir dengan fatal (WHO, 2011).

Berdasarkan tingkat infeksi virus AI dapat dikelompokkan atas 2 tingkatan infeksi yaitu *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI). *Highly pathogenic avian influenza* merupakan infeksi yang sangat patogen yang dapat menyebabkan angka kematian sampai 100%. Unggas yang terinfeksi oleh HPAI biasanya akan mati secara mendadak dengan atau tanpa menunjukkan gejala klinis. Gejala yang sering terlihat yaitu depresi, lemah, dan koma. Gejala depresi dapat ditandai dengan bulu kasar, nafsu makan menurun, diare, gerakan lambat, dan produksi telur menurun. Infeksi oleh HPAI umumnya disebabkan oleh virus AI sub tipe H5 dan H7 (Tabbu, 2000), sedangkan pada infeksi LPAI dicirikan dengan infeksi yang ringan. Kasus yang disertai kontaminasi oleh agen infeksi patogen yang lain menyebabkan LPAI berubah menjadi patogen dan angka kematian yang cukup besar (Akoso, 2006).

Kasus flu burung di Provinsi Aceh pertama sekali muncul pada tahun 2004 dengan ditemukannya kasus pertama pada ayam kampung di Kota Banda Aceh. Selanjutnya penyakit ini menyebar hampir di seluruh kabupaten di Provinsi Aceh. Berdasarkan pemeriksaan

yang dilakukan oleh laboratorium tipe B, Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Provinsi Aceh, kasus penyakit AI dilaporkan sampai tahun 2008 telah ditemukan di 12 kabupaten di Provinsi Aceh dengan jumlah angka kematian ternak lebih dari 20.000 ekor. Pemeriksaan atau diagnosis kasus AI di Provinsi Aceh umumnya dilakukan berdasarkan gejala klinis, isolasi virus, *rapid test*, dan pemeriksaan patologi anatomi (Anonimus, 2008).

Penelitian ilmiah tentang distribusi virus AI di Indonesia sudah banyak dilakukan, namun penelitian untuk melakukan studi filogenetik isolat virus AI subtype H5N1 yang pernah menginfeksi dan mewabah di beberapa kabupaten di Provinsi Aceh belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan melakukan studi filogenetik virus AI tipe A subtype H5N1 isolat asal Provinsi Aceh sehingga bermanfaat untuk memberikan informasi secara molekuler tentang kekerabatan antar isolat virus AI tipe A subtype H5N1 yang pernah mewabah di Provinsi Aceh.

## MATERI DAN METODE

### Preparasi Sampel

Sampel berasal dari isolat virus koleksi Laboratorium Virologi, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional I di Medan, Sumatera Utara selama kurun waktu tahun 2007 sampai 2008. Untuk mendapatkan sampel dalam penelitian ini, maka isolat virus diinokulasikan kembali ke dalam telur ayam berembrio (TAB) yang berumur 10-11 hari, dan diinkubasikan pada suhu 37° C. Setelah 24-72 jam diinkubasi, virus dipanen dengan cara mengambil cairan korioalantoisnya.

### Ekstraksi RNA Virus

*Ribonucleic acid* (RNA) virus yang berasal dari cairan korioalantois diekstraksi dengan menggunakan *Purelink™ micro-to-Midi Total RNA purification system* dari Invitrogen. Isolasi RNA sampel mengikuti prosedur standar yang direkomendasikan oleh Invitrogen. Sebanyak 250 µl sampel yang berupa cairan allantois dimasukkan ke dalam tabung (*microtube* 1,5 ml) yang telah diisi dengan Trizol sebanyak 750 µl sehingga total volume menjadi 1000 µl. Hasil akhir proses ekstraksi RNA virus diperoleh volume akhir sampel sebanyak 50 µl total *template* RNA.

### Amplifikasi Gen H dengan Metode Simplex RT-PCR

Setelah diperoleh *template* dari proses ekstraksi RNA total, maka semua isolat uji diamplifikasi terhadap gen hemaglutinin (HA) menggunakan metode *simplex* RT-PCR. Amplifikasi RT-PCR dimulai dari proses sintesis cDNA secara *reverse transcription* pada suhu 48° C selama 45 menit sebanyak 1 siklus dan *initial denaturation* pada suhu 94° C selama 5 menit sebanyak 1 siklus. Kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR dengan program: denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 47° C selama 60 detik, ekstensi 68° C selama 30 detik

dan final ekstensi pada suhu 68° C selama 10 menit sebanyak 40 siklus.

### Analisis Produk Hasil PCR dengan Elektroforesis Gen H

Produk amplifikasi PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel *agarose* 2%. Setiap sampel yang akan dielektroforesis dicampurkan dengan *loading dye buffer* sebagai pemberat sebanyak 2 µl per sampel yang ditambahkan dH<sub>2</sub>O dan dihomogenkan hingga merata. Sampel pertama dimasukkan ke dalam sumuran ke-2 hingga sampel yang ke-11, pada sumuran pertama diisi dengan *DNA ladder* 100 bp sebagai *marker* sedangkan kontrol positif dimasukkan pada sumuran yang terakhir. Setelah semua sumuran terisi dengan sampel, *marker* dan kontrol positif, dilakukan *running* elektroforesis pada tegangan 135 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis dibaca pada *transilluminator viewer*. Hasil yang baik akan diperoleh satu pita DNA pada setiap sumuran sesuai dengan target gen H.

### Sekuensing

Hasil amplifikasi menggunakan metode *single step multiplex* RT-PCR diambil 5 sampel mewakili 5 kabupaten asal sampel untuk dilakukan sekuensing DNA terhadap gen HA (H5). Untuk melakukan sekuensing 5 sampel tersebut terlebih dahulu dilakukan amplifikasi gen H5. Sampel dikirim ke *Research and Development Centre* PT Charoen Pokphand Indonesia, Tbk dalam bentuk cDNA untuk disekuensing. Reaksi sekuensing dilakukan secara enzimatik, dengan *dye terminator cycle sequencing*. Sebelum dilakukan sekuensing produk PCR harus dipurifikasi untuk membersihkan produk hasil PCR dari sisa bufer maupun komponen-komponen reaksi lainnya sehingga mendapatkan hasil sekuensing yang baik.

### Analisis Data Hasil Sekuensing

Data hasil sekuensing yang berupa kromatogram dianalisis dengan menggunakan *software* program MEGA 4.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Virus diidentifikasi melalui inokulasi dan propagasi isolat virus pada telur ayam berembrio (TAB) yang *specific pathogen free* (SPF) yang berumur 10-11 hari. Semua embrio ayam mati pada hari ke-2 setelah diinkubasi. Cairan korioalantois diambil dan diuji dengan menggunakan *rapid test* untuk memastikan semua isolat yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar positif AI. Hasil inokulasi dan *rapid test* menunjukkan bahwa semua isolat positif terhadap keberadaan virus AI seperti disajikan pada Tabel 1.

Amplifikasi secara RT-PCR pada gen H virus AI subtype H5N1 isolat dari Propinsi Aceh dilakukan dengan menggunakan pasangan primer CU-H5F dan CU-H5R sehingga fragmen DNA hasil amplifikasi adalah sebesar 189 bp. Setelah dilakukan *alignment* sekuens isolat uji dan sekuens isolat pembandingan

**Tabel 1.** Hasil inokulasi pada telur ayam *specific pathogen free* (SPF) yang berembrio berumur 10-11 hari dan hasil pengujian dengan *rapid test*

No	Jenis Unggas	Nomor Agenda Sampel*	Asal Daerah (Kabupaten)	Hasil Inokulasi pada TAB	Hasil Rapid Test
1.	Ayam	477 (I)/ 08	Aceh Timur	+	+
2.	Ayam	477 (II)/ 08	Aceh Timur	+	+
3.	Ayam	15/07	Pidie	+	+
4.	Ayam	79 / 07	Bireuen	+	+
5.	Ayam	16/07	Pidie	+	+
6.	Ayam	477 (III)/ 08	Aceh Timur	+	+
7.	Ayam	340 / 08	Lhokseumawe	+	+
8.	Ayam	739 (I)/08	Simeulue	+	+
9.	Ayam	12/07	Aceh Besar	+	+
10.	Ayam	12 04/ 06	Pidie	+	+
11.	Ayam	12 03/ 06	Pidie	+	+

\*: Nomor agenda dari bagian epidemiologi Laboratorium BPPV I Medan; TAB (telur ayam berembrio); (+) : Positif AI

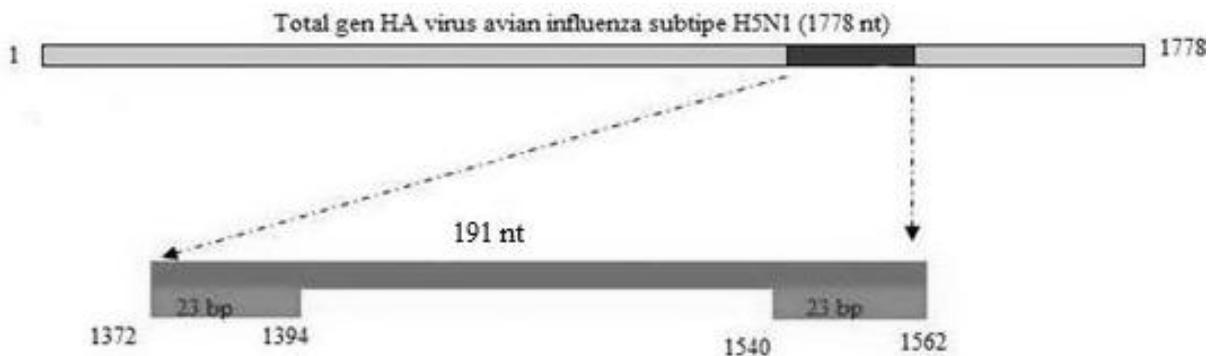
diketahui bahwa penempelan primer terletak pada posisi basa ke 1372 untuk primer *forward* dan pada posisi ke 1562 untuk primer *reverse*.

Primer CU-H5F dengan panjang 23 bp menempel pada nukleotida ke 1372 sampai dengan nukleotida ke 1394 dari gen H sedangkan primer CU-H5R menempel pada nukleotida ke 1540 sampai nukleotida ke 1562 sehingga diketahui bahwa daerah yang teramplifikasi sebesar 191 bp. Hasil amplifikasi berupa fragmen DNA 191 bp dengan primer CU-H5F dan CU-H5R sudah sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Philippe *et al.* (2008), metode RT-PCR tersebut digunakan untuk mendeteksi virus influenza H5N1 pada nyamuk yang dikoleksi pada peternakan ayam di Thailand pada tahun 2005. Skema letak tempat penempelan primer disajikan pada Gambar 1.

Daerah yang teramplifikasi seperti diilustrasikan pada Gambar 1, tidak dapat menentukan tingkat virulensi virus ataupun pengelompokan virus HPAI atau LPAI. Tingkat virulensi AI ditentukan oleh daerah pembelahan prekursor hemaglutinin (HA0) menjadi HA1 dan HA2 atau *cleavage site polybasic amino acid* (Starick *et al.*, 2007).

Hasil sekuensing fragmen gen H5 dari lima isolat uji dianalisis dan dibandingkan dengan beberapa isolat virus H5N1 asal Indonesia dan isolat lain yang diakses dari *gene bank*. Analisis hasil sekuensing dalam penelitian ini menggunakan 15 isolat perbandingan yang

diakses dari *gene bank*. Perbandingan data hasil sekuens dilakukan untuk menentukan posisi nukleotida dan asam amino yang tepat dan melihat perubahan yang terjadi baik pada basa nukleotida maupun asam amino. Identifikasi gen H dari 5 isolat uji menunjukkan adanya variasi pada beberapa posisi nukleotida bila dibandingkan dengan isolat-isolat lain dari *gene bank*. Variasi urutan nukleotida dapat diketahui setelah dilakukan *alignment* pada semua isolat uji dan isolat perbandingan dengan program Clustal W. Perbandingan runutan nukleotida isolat uji dengan 15 isolat perbandingan yang terdiri atas 7 isolat virus AI subtipe H5N1 asal Sumatera, 2 isolat asal Jawa, 2 isolat asal Kalimantan, dan 3 isolat asal Asia. Perbandingan dengan isolat Sumatera yaitu isolat Pidie/ BPPV1/2005 (EU 124093), Deli Serdang/05 (EU 124091), Karo/2005 (EU124089), Padang/2005 (EU124088), Tapanuli Utara/2005 (EU124083), Langkat/2005 (EU124082), Bangka 1631-21/2006 (EU 124203), dan Medan/2005 (EU124081), nukleotida beragam ditemukan pada posisi nt ke 1374, 1383, 1392, 1395, 1419, 1440, 1464, 1478, 1479, 1540, dan 1545. Dibandingkan dengan isolat virus AI subtipe H5N1 asal Jawa yaitu isolat *East Java*/UT6023/2006 (GQ122563) dan Wates 83/2005 (EU 124054) keragaman nt ditemukan pada posisi ke 1374, 1383, 1392, 1478, 1540 dan 1545. Perbandingan isolat isolat uji dengan isolat asal Kalimantan yaitu isolat *South*



**Gambar 1.** Skema letak penempelan primer CU-H5F dan CU-H5R untuk mengamplifikasi gen HA virus influenza H5N1. (▬) : Primer *forward* dan *reverse*=23 bp; (▬) : Daerah yang teramplifikasi=191 bp)

Kalimantan/UT6028/ 2006 (GQ 122571) dan East Kalimantan/UT1035/ 2004 (GQ 122387) nt beragam terdapat pada posisi ke 1383, 1392, 1395, 1540, dan 1545.

Runtutan nt isolat uji bila dibandingkan dengan isolat virus AI subtipe H5N1 asal Guangdong/1/96 (AF 144305) ditemukan 5 nt beragam, yaitu pada posisi ke 1443, 1478, 1492, 1496 dan 1510, dan dengan isolat Hongkong/715.5/01 (AF 509025) ditemukan 7 nt beragam yaitu pada posisi ke 1395, 1473, 1478, 1492, 1496, 1510 dan 1518. Perbandingan isolat uji dengan isolat Guangdong/1/2005 (EU 874899) terdapat 7 nt beragam pada posisi nt ke 1395, 1452, 1478, 1492, 1510, 1540, dan 1545. Keragaman jumlah nt dan asam amino isolat uji dan isolat pembanding dari *gene bank* disajikan pada Tabel 2.

Keragaman nt antara isolat uji dengan isolat pembanding dari gen bank paling banyak ditemukan pada isolat Karo/2005 (EU124089) dan Medan/2005 (EU124081), yaitu sebanyak 9 nt dan paling sedikit pada isolat East Java/UT6023/2006 (GQ122563) dan South Kalimantan/UT6028/2006 (GQ 122571) sebanyak 4 nukleotida. Perbandingan isolat uji dengan isolat pembanding akan ditemukan variasi substitusi nukleotida dalam bentuk transisi dan transversi. Substitusi nukleotida transisi yaitu perubahan antara

basa purin (A dan G) atau antara basa pirimidin (C dan T) dan transversi adalah perubahan dari basa purin menjadi basa pirimidin dan sebaliknya. Substitusi transisi dan transversi dapat menyebabkan perubahan atau tanpa adanya perubahan asam amino yang ditranslasikan. Nilai transisi dan transversi yang diamati dari isolat uji dengan 15 isolat pembanding disajikan pada Tabel 3.

Tingkat substitusi transisi ditampilkan dalam angka yang dicetak tebal dan tingkat substitusi transversi ditampilkan dalam angka yang dicetak miring. Perubahan dalam bentuk transisi dari semua isolat uji dan isolat pembanding terjadi pada A menjadi G (8,15 %), T menjadi C (28,21 %), C menjadi T (41,72 %) dan G menjadi A (12,58 %). Nilai transversi yang teramati sebanyak 8 kali, yaitu A ke T (1,03 %), A ke C (0,69 %), T ke A (1,79 %), T ke G (1,16 %), C ke A (1,79 %), C ke G (1,16 %), G ke T (1,03 %), dan G ke C (0,69 %). Kejadian substitusi nukleotida yang teramati pada semua isolat paling banyak adalah substitusi transisi yaitu sebesar 90,66 % dan substitusi transversi sebesar 9,34 %. Kejadian transisi dan transversi pada penelitian ini paling sering terjadi pada basa ketiga triplet kodon. Transisi pada basa ketiga tidak menyebabkan perubahan pada asam amino dan transversi pada basa ketiga tidak selalu menyebabkan perubahan pada asam amino.

**Tabel 2.** Keragaman urutan nukleotida dan asam amino dari 191 nt pada gen H antara isolat uji dengan isolat pembanding dari *gene bank*

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.		1	5	1	1	1	1	1	5	0	3	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2.	3		4	2	2	2	2	2	4	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0
3.	9	10		4	4	4	4	4	0	5	2	4	5	4	4	5	4	4	4	4
4.	4	7	5		0	0	0	0	4	1	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2
5.	4	7	5	0		0	0	0	4	1	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2
6.	4	7	5	0	0		0	0	4	1	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2
7.	4	7	5	0	0	0		0	4	1	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2
8.	4	7	5	0	0	0	0		4	1	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2
9.	11	10	4	7	7	7	7	7		5	2	4	5	4	4	5	4	4	4	4
10.	1	4	10	5	5	5	5	5	12		3	1	0	1	1	1	1	1	1	1
11.	7	6	6	7	7	7	7	7	6	8		2	3	2	2	3	2	2	2	2
12.	3	2	10	7	7	7	7	7	10	4	6		1	0	0	1	0	0	0	0
13.	0	3	9	4	4	4	4	4	11	1	7	3		1	1	1	1	1	1	1
14.	2	1	9	6	6	6	6	6	9	3	5	1	2		0	1	0	0	0	0
15.	3	0	10	7	7	7	7	7	10	4	6	2	3	1		1	0	0	0	0
16.	5	2	12	9	9	9	9	9	12	6	8	4	5	3	2		1	1	1	1
17.	3	0	10	7	7	7	7	7	10	4	6	2	3	1	0	2		0	0	0
18.	4	1	11	8	8	8	8	8	11	5	7	1	4	2	1	3	1		0	0
19.	3	0	10	7	7	7	7	7	10	4	6	2	3	1	0	2	0	1		0
20.	5	2	12	9	9	9	9	9	12	6	8	4	5	3	2	4	2	3	2	

(1. East-Java-UT6023-2006; 2. Pidie-BPPV1-05; 3. Guangdong-1-96; 4. Bireuen/79/07; 5. Aceh-Besar/12/07; 6. Aceh-Timur/477(III)/08; 7. Lhokseumawe/340/08; 8. Simeulue/739(I)/08; 9. Hong Kong-715.5-01; 10. Bangka Selatan1631-06; 11. Guangdong-1-05; 12. Wates83-2005; 13. Kalsel-UT6028-06; 14. Kaltim-UT1035-04; 15. Deli Derdang-BBPVI-05; 16. Karo-BBPVII-2006; 17. Padang-BBPVII-2006; 18. Taput-BBPVI-576-2005; 19. Langkat-BBPVI-576-05; 20. Medan-BBPVI-576-05; Diagonal atas jumlah asam amino yang berbeda antara isolat uji dengan isolat pembanding dari *gene bank*; Diagonal bawah jumlah nukleotida yang berbeda antara isolat uji dengan isolat pembanding dari *gene bank*).

**Tabel 3.** Frekuensi nilai transisi dan transversi pada 5 isolat uji dan 15 isolat pembanding

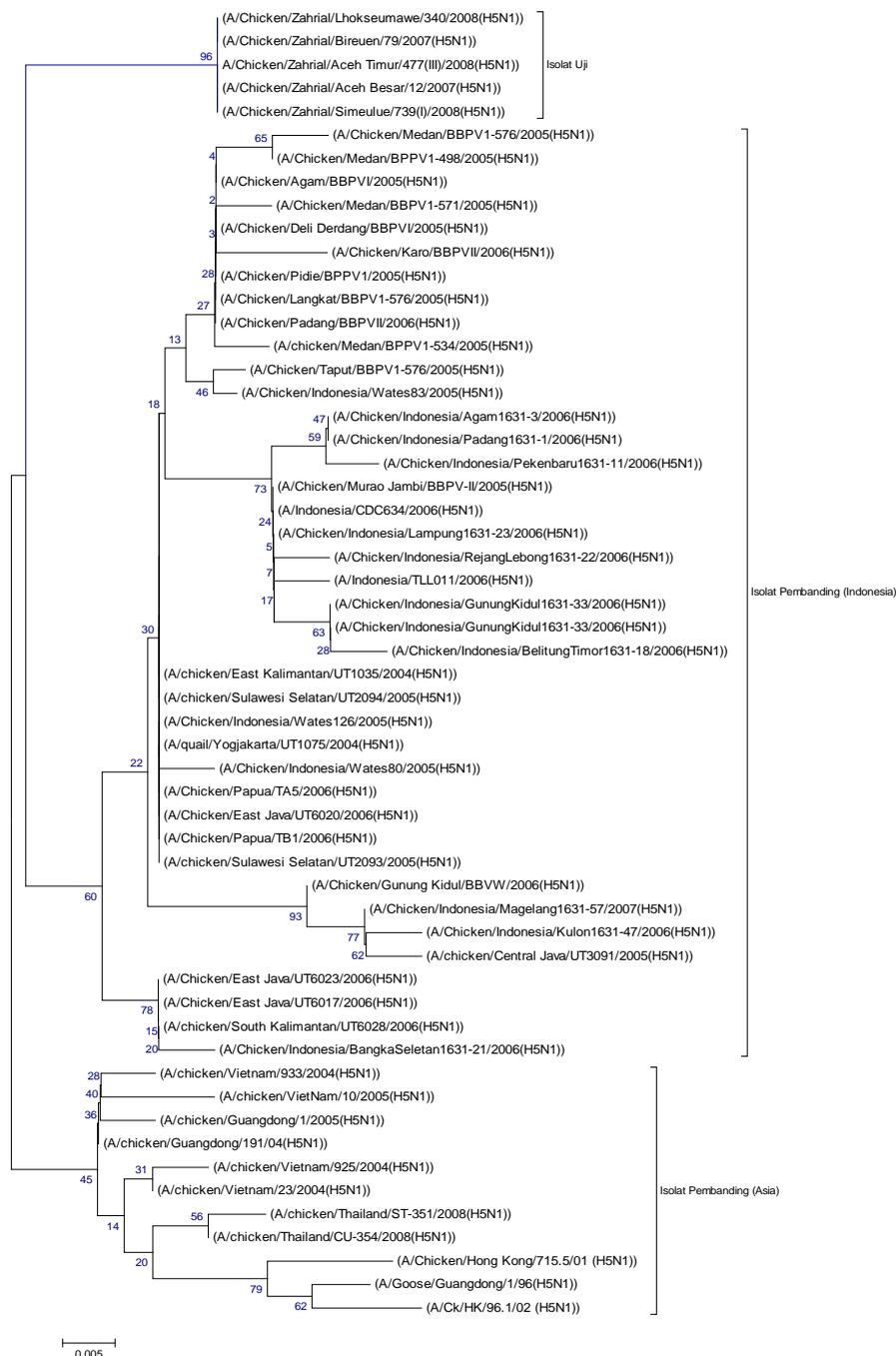
	A	T	C	G
A	-	<i>1 03</i>	<i>0 69</i>	<b>8 15</b>
T	<i>1 79</i>	-	<b>28 21</b>	<i>1 16</i>
C	<i>1 79</i>	<b>41 72</b>	-	<i>1 16</i>
G	<b>12 58</b>	<i>1 03</i>	<i>0 69</i>	-

(A = adenine, T = thymine, C = cytosine, G = guanine)

Analisis filogenetik gen H ke 5 virus AI sub tipe H5N1 isolat uji asal Provinsi Aceh menggunakan 40 isolat virus AI sub tipe H5N1 asal Indonesia serta 11 isolat virus AI sub tipe H5N1 asal Asia sebagai pembandingan. Nukleotida sebanyak 191 nt yang dianalisis dalam penelitian ini adalah nukleotida no 1372 sampai 1562.

Analisis filogenetik menggunakan metode *Bootstrapped Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan. Kontruksi pohon filogenetik menunjukkan semua isolat virus AI sub tipe H5N1 membentuk 2 klaster terpisah, yaitu klaster pertama

virus AI sub tipe H5N1 asal Indonesia dan klaster kedua yang merupakan virus AI sub tipe H5N1 asal Asia. Hasil ini sesuai dengan yang telah dilaporkan oleh Smith *et al.* (2006), virus AI sub tipe H5N1 asal Indonesia masih membentuk satu klaster sendiri yang terpisah dari kelompok virus AI sub tipe H5N1 negara lain. Klaster Indonesia terbentuk 2 subklaster, yaitu subklaster 1 terdiri dari virus AI sub tipe H5N1 isolat uji dan subklaster 2 terdiri dari virus AI sub tipe H5N1 isolat pembandingan. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat uji dan isolat pembandingan Indonesia yang lain masih berada dalam *Clade 2.1* (Gambar 2).



**Gambar 2.** Kontruksi pohon filogenetik gen H pada nukleotida ke- 1372 sampai 1562 (191 nt) isolat uji dan isolat pembandingan dari gen bank dengan metode *Neighbour-Joining* (model *Kimura 2-parameter*).

Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa ke 5 virus AI sub tipe H5N1 isolat uji ada perbedaan dengan virus AI sub tipe H5N1 di Indonesia yang telah ditemukan sebelumnya. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh karena virus AI sub tipe H5N1 pembandingan dianalisis pada tahun 2004-2006 sedangkan virus AI sub tipe H5N1 isolat uji merupakan isolat tahun 2007-2008. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa virus AI sub tipe H5N1 isolat uji merupakan virus yang telah mengalami evolusi dari virus AI sub tipe H5N1 yang ada sebelumnya. Kejadian serupa juga ditemukan oleh Susanti *et al.* (2008), analisis filogenetik terhadap 1074 nt gen HA pada 9 isolat virus AI sub tipe H5N1 unggas air asal Jawa Barat tahun 2003 sampai dengan 2005, ditemukan 6 isolat virus AI sub tipe H5N1 masuk kedalam kelompok virus AI sub tipe H5N1 Asia, dan 3 isolat yang termasuk kedalam kelompok virus AI sub tipe H5N1 Indonesia (*Clade 2.1*). Hasil analisis filogenetik diduga kuat bahwa virus AI sub tipe H5N1 membentuk subklaster yang berbeda berdasarkan tahun virus tersebut diisolasi. Hasil ini diperkuat dengan klaster Asia yang mengelompok membentuk sub klaster berdasarkan tahun (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan penelitian Starick *et al.* (2007), analisis filogenetik isolat virus AI sub tipe H5N1 asal Jerman yang diisolasi dari tahun yang berbeda yaitu 2006 dan 2007 akan membentuk 2 subklaster (*subclade*) yang berbeda. Subklaster 2.2.1 dan 2.2.2 yang terdiri dari isolat tahun 2006, dan subklaster 2.2.3 terdiri dari isolat tahun 2007. Meskipun demikian, karena analisis filogenetik ini hanya dilakukan pada fragmen kecil (191 nt) dari gen HA, maka perlu penelitian lebih lanjut yang melibatkan fragmen gen HA yang mencakup daerah antigenik dan pengikatan reseptor.

### KESIMPULAN

Hasil sekuensing diketahui bahwa penempelan primer terletak pada posisi basa ke 1372 untuk primer *forward* dan pada posisi ke 1562 untuk primer *reverse* dengan daerah yang teramplifikasi sebesar 191 bp. Hasil *alignment* sebanyak 191 nt yang menyandi 63 asam amino (aa) pada posisi ke 458 sampai 520, ditemukan urutan nukleotida yang menyandi 5 asam amino yang berbeda pada posisi asam amino ke- 493, 498, 499, 504,

dan 515 antara isolat virus AI sub tipe H5N1 asal Provinsi Aceh selama tahun 2007-2008 dengan isolat dari pembandingan dari *gene bank*. Konstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa semua isolat virus AI sub tipe H5N1 membentuk dua klaster yang terpisah, yaitu klaster pertama virus AI sub tipe H5N1 asal Indonesia dan klaster kedua yang merupakan virus AI sub tipe H5N1 asal Asia. Virus AI sub tipe H5N1 asal Provinsi Aceh tahun 2007-2008 mengelompok secara terpisah dari isolat Indonesia yang lain, tetapi masih dalam klaster virus AI sub tipe H5N1 Indonesia.

### DAFTAR PUSTAKA

- Akoso, B.T. 2006. **Penyakit Menular pada Hewan dan Manusia**. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Anonimus. 2008. Laporan Kasus Flu Burung Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam.
- Boyce, W.M., S. Christian, K.J. Chris, K. Terra, and C. Carol. 2008. Avian influenza viruses in wild birds: A moving target. **CIMID-657**.
- Lee, C.W. and Y.M. Saif. 2008. Avian Influenza Virus. **CIMID-660**.
- Lupiani, B., and S.M. Reddy. 2009. The History of Avian Influenza. **CIMID-661**.
- Philippe, B. T. Arunee, M. Dorothee, D. Audrey, B. Priscille, L. Natsuang, and K. Pattamaporn. 2008. Detection of H5N1 Avian Influenza virus from mosquitos collected in an infected poultry farm in Thailand. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 8(1):105-109.
- Smith, G.J.D., T.S.P. Naipospos, T.D. Nguyen, M.D. Dejong, 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, 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. **J.Virol.** 56:45-53.
- Starick, E., M. Beer, B. Hoffmann, C. Staubach, O. Werner, A. Globig, G. Strebelow, C. Grund, M. Durban, F.J. Conraths, T. Mettenleiter, and T. Harder. 2007. Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. **Vet. Microbiol.** (10):3852-3862.
- Susanti, R., R.D. Soejoedono, I.G.N.K. Mahardika, I.W.T. Wibawan, dan M.T. Suhartono. 2008. Filogenetik dan Struktur Antigenik Virus Avian Influenza Subtpe H5N1 Isolat Unggas Air. **J. Vet.**9:99-106.
- Tabbu, C.R. 2000. **Penyakit Ayam dan Penanggulangannya. Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- WHO. 2011. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO 2003-2011. [www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/EN\\_GIP\\_2\\_011129CumulativeNumberH5N1cases.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_2_011129CumulativeNumberH5N1cases.pdf).
- Yee, K.S., E.C. Tim, J.C. Carol. 2008. Epidemiology of H5N1 Avian Influenza. **CIMID - 662**.