

IDENTIFIKASI MOLEKULER VIRUS SUBTIPE H3 DAN H10 PADA UNGGAS

Molecular Identification of Influenza Virus Subtype H3 and H10 on Avian Species

NLP Indi Dharmayanti¹ dan Risa Indriani¹

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

E-mail: nlpdharmayanti@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi molekuler virus-virus influenza yang tidak dapat diidentifikasi dengan primer H5N1 sehingga perlu dilakukan identifikasi lanjutan dengan primer virus influenza lainnya untuk mengetahui jenis sub tipe virus influenza yang bersirkulasi di lapang. Sampel yang digunakan adalah lima sampel cairan alantois (Kode B1-B5) yang diduga mengandung virus influenza selain virus H5N1. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan beberapa set primer influenza dan konfirmasi dilakukan dengan pengurutan *deoxyribonucleic acid* (DNA). Dari hasil analisis RT-PCR dan pengurutan DNA menunjukkan bahwa sampel dengan kode B1 dan B2 menunjukkan homologi tertinggi dengan data virus yang terdaftar di GenBank (NCBI) yaitu dengan virus influenza sub tipe H3 sedangkan sampel dengan kode B4 mempunyai homologi tertinggi dengan virus influenza sub tipe H10. Dari identifikasi dan karakterisasi tersebut kemungkinan bahwa virus sampel kode B1 (A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009) dan (B2) A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009 adalah virus (AI) sub tipe H3 sedangkan sampel kode B4 (A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010) adalah virus AI sub tipe H10.

Kata kunci: identifikasi, molekuler, virus influenza, sub tipe

ABSTRACT

This research aims to identify the molecular characterization of influenza viruses that cannot be identified with H5N1 primers, so that it is necessary to further identify using other influenza primer to find out the influenza subtype virus circulated in the field. The sample used were five allantoic fluid samples (Code B1-B5) suspected contained influenza viruses but not H5N1. The method used in this study was RT-PCR using multiple primer sets then confirmed by deoxyribonucleic acid (DNA) sequencing. The analysis of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and DNA sequencing showed that the code samples B1 and B2 show the highest homology with the data registered in GenBank virus (NCBI) that is H3 subtype influenza virus, while B4 code sample has the highest homology with the influenza virus subtype H10. The possibility of identification and characterization result of the virus sample B1 code (A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009) and (B2) A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009 was (AI) virus subtype H3 while B4 code (A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010) was the AI virus subtype H10.

Key words: identification, molecular, influenza virus, subtype

PENDAHULUAN

Virus influenza adalah virus *ribonucleic acid* (RNA) berpolaritas negatif, termasuk famili *Orthomyxoviridae* yang diklasifikasikan menjadi tipe A, B, dan C berdasarkan pada mayoritas antigen protein internal yaitu nukleoprotein (NP) dan matrix (M). Virus influenza A adalah virus yang paling virulen dari tiga tipe influenza tersebut dan dapat menyebabkan penyakit saluran napas dengan rentang gejala ringan sampai parah dan kadang fatal. Influenza A diklasifikasikan ke dalam beberapa sub tipe berdasarkan antigenisitas kedua protein permukaan yaitu (HA) dan (NA). Protein permukaan virus yang telah diidentifikasi sampai saat ini terdapat sebanyak 16 sub tipe HA (H1-H16) dan 9 sub tipe NA (N1-N9) (Rohm *et al.*, 1996; Lamb dan Krug, 2001; Wright dan Webster, 2001; Fouchier *et al.*, 2005).

Virus influenza A dapat diisolasi dari berbagai spesies makhluk hidup, seperti manusia, babi, kuda, unggas air, ayam, mamalia laut, dan unta (Webster *et al.*, 1992). Di antara inang virus (AI), unggas air merupakan reservoir dari virus ini. Berdasarkan studi yang dilakukan, diketahui bahwa semua virus yang bersirkulasi pada spesies hewan lainnya berasal dari unggas air (Webster *et al.*, 1992). Virus *highly*

pathogenic (HPAI) menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi sedangkan semua sub tipe virus dikategorikan sebagai *low pathogenic* (LPAI) menyebabkan gejala ringan atau tidak bergejala sama pada unggas yang terinfeksi (Alexander, 2000; Harimoto dan Kawaoka, 2001).

Pada akhir tahun 2003 dan awal tahun 2004, wabah virus HPAI H5N1 terjadi di peternakan ayam pada delapan negara di Asia (Li *et al.*, 2004; Viseshakul *et al.*, 2004), sedangkan di Indonesia diidentifikasi pertama kali pada akhir tahun 2003 (Dharmayanti *et al.*, 2004; Wiyono *et al.*, 2004). Virus ini telah menjadi endemik pada peternakan ayam dan menyebabkan penyakit zoonosis yang menular ke manusia termasuk di Indonesia (Hien *et al.*, 2004a; Hien *et al.*, 2004b; Chotpitayasunondh *et al.*, 2005; Puthavathana *et al.*, 2005). Sejauh ini belum ada laporan yang menunjukkan adanya transmisi virus H5N1 dari manusia ke manusia, sehingga infeksi pada manusia masih berasal dari unggas yang terinfeksi virus ini sebelumnya.

Di Indonesia, virus influenza H5N1 telah menjadi endemik, dengan teridentifikasinya *novel* H1N1 pada manusia dan babi di Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2011). Bersirkulasinya virus H5N1 dan virus influenza lainnya memberikan peluang terjadinya *reasortant* antara virus H5N1 dengan virus influenza lainnya

seperti virus H3N2 sehingga kemungkinan akan menciptakan virus influenza baru yang patogenitasnya belum diketahui. Pada penelitian ini diidentifikasi molekuler virus-virus influenza yang tidak dapat diidentifikasi dengan primer H5N1 sehingga perlu diidentifikasi lanjutan dengan primer influenza lainnya untuk mengetahui jenis suptipe virus influenza yang bersirkulasi di lapang.

MATERI DAN METODE

Spesimen

Spesimen yang digunakan adalah cairan alantois seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sampel yang digunakan dalam penelitian

Kode	Nama virus	Identifikasi dengan primer AI sub tipe H5
B1	A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009	Negatif
B2	A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009	Negatif
B3	A/Duck/Buleleng/BBVD574-10/2009	Negatif
B4	A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010	Negatif
B5	A/Duck/Tabanan/BBVD0610183-3/2010	Negatif

Ekstraksi RNA Virus dan RT-PCR

Qiamp RNA mini Kit (Qiagen) digunakan untuk mengekstraksi RNA dari cairan alantois. Hasil ekstraksi selanjutnya digunakan sebagai cetakan dalam reaksi *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) untuk mengidentifikasi sub tipe virus AI. Primer yang digunakan untuk RT-PCR adalah primer H5, H3, dan H10 sesuai dengan petunjuk Lee *et al.* (2001). Pengujian sampel pertama dilakukan dengan menggunakan primer H5 kemudian dilanjutkan dengan primer H3 dan H10. Hasil amplifikasi positif yaitu menunjukkan pita ampikon sesuai Lee *et al.* (2001) dilanjutkan dengan pengurutan DNA.

Pengurutan DNA

Ampikon positif dalam proses elektroforesis dipotong dengan tepat pada posisinya, kemudian dilakukan purifikasi dengan menggunakan QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen). Hasil purifikasi berupa *deoxyribonucleic acid* (DNA) dijadikan cetakan untuk reaksi PCR-sequencing. Pengurutan DNA dilakukan dengan menggunakan reagen Big Dye Terminator Reaction Kit V 3.1 (Applied Biosystem) dan purifikasi hasil PCR menggunakan BDX Terminator (Applied Biosystem). Pengurutan DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystem).

Analisis Hasil

Urutan nukleotida hasil pengurutan diedit dan ditranslasikan dengan menggunakan program Bioedit dan Finch TV. Selanjutnya untuk mendapatkan

konfirmasi terhadap hasil sekuen DNA, data nukleotida dimasukkan dalam BLAST search (NCBI) pada website www.ncbi.nlm.nih.gov.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil RT-PCR diketahui bahwa sampel kode B1 (A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009) dan (B2) A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009 adalah virus AI sub tipe H3 sedangkan sampel kode B4 (A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010) adalah virus AI sub tipe H10 (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis RT-PCR dengan primer H3, H5, dan H10 (1= A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009; 2= A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009; 3= A/Duck/Buleleng/BBVD574-10/2009; 4= A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010; 5= A/Duck/Tabanan/BBVD0610183-3/2010; 6= A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009; 7= A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009; 8= A/Duck/Buleleng/BBVD574-10/2009; 9= A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010; 10= A/Duck/Tabanan/BBVD0610183-3/2010; 11= A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009; 12= A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009; 13= A/Duck/Buleleng/BBVD574-10/2009; 14= A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010; 15= A/Duck/Tabanan/BBVD0610183-3/2010; M= Marker; Primer H3: sampel No. 1-5; Primer H5: sampel No. 6-10; Primer H10: sampel No. 11-15)

Hasil RT-PCR kemudian dilakukan pengurutan terhadap sampel B2 (mewakili sub tipe H3) dan B4. Selanjutnya hasil analisis pengurutan DNA dimasukkan dalam NCBI melalui fasilitas BLAST untuk menghomologikan sekuen yang diperoleh dengan data urutan virus AI yang tersedia dalam NCBI. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sampel B1 dan B2 mempunyai homologi tertinggi dengan virus AI sub tipe H3N8, sedangkan sampel kode B4 menunjukkan homologi tertinggi dengan virus AI sub tipe H10N8 (data tidak ditunjukkan). Translasi asam amino pada protein HA memperlihatkan tiga virus yang diidentifikasi sebagai sub tipe H3 dan H10 merupakan virus LPAI karena tidak mempunyai *multiple basic* asam amino pada *cleavage site* protein HA seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Perbandingan urutan asam amino di alam antara virus AI avirulen dan virulen telah menunjukkan bahwa HA dengan *cleavability* yang terbatas (tipe avirulen) biasanya mempunyai arginin tunggal (R) sedangkan tipe virulen dengan *cleavability* yang tinggi mempunyai rangkaian residu asam amino basa pada *upstream* dari *cleavability site* (Bosch *et al.*, 1981). Sebagian besar

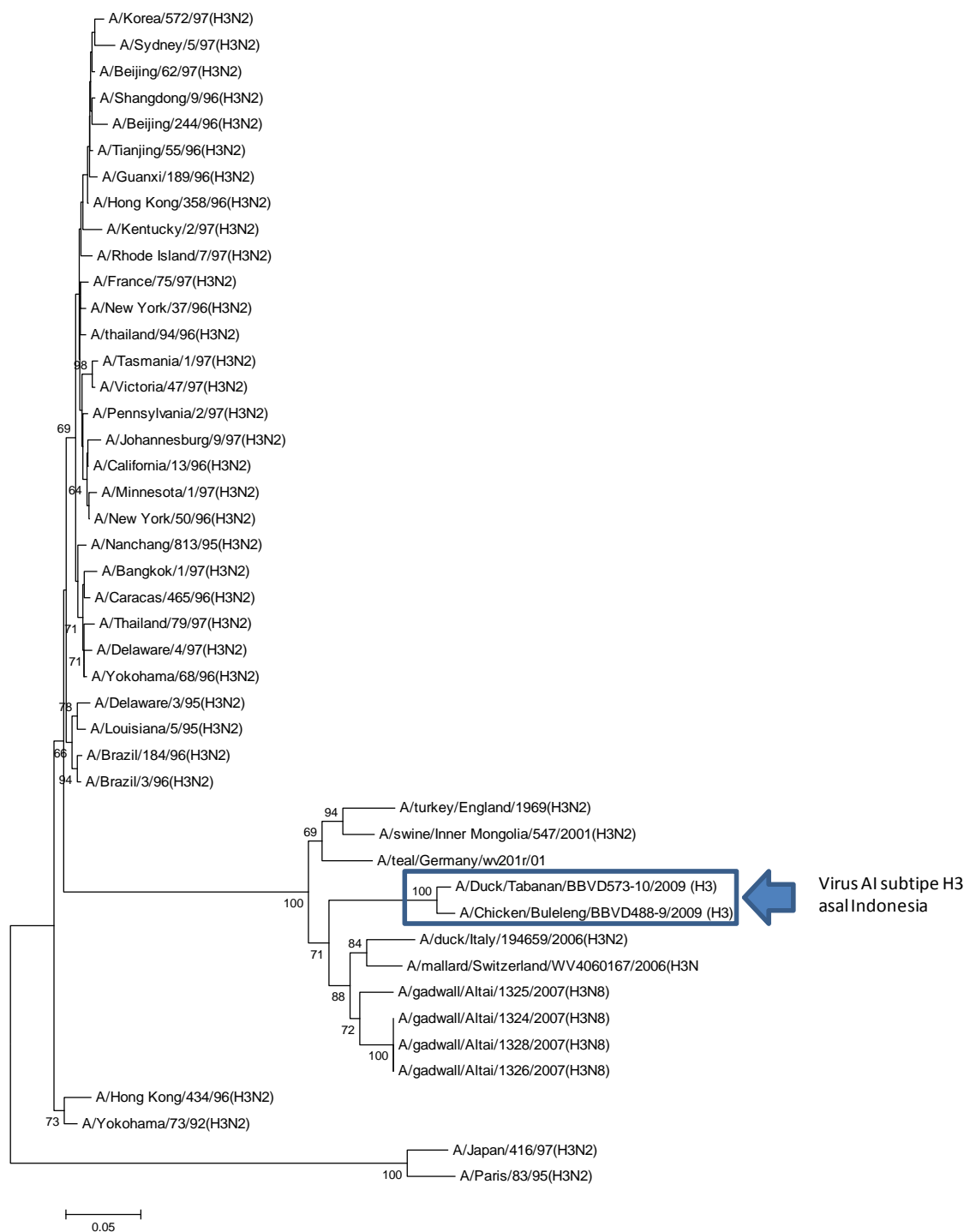
virus AI mempunyai R pada karboksil terminus dari HA1 dan glisin (G) pada amino terminus dari HA2, meskipun beberapa mempunyai lisin (K) pada posisi tersebut (Kawaoka *et al.*, 1990; Gunther *et al.*, 1993).

Dari hasil analisis pengurutan DNA menunjukkan bahwa sampel dengan kode B2 (A/Duck/Tabanan/

BBVD573-10/2009) menunjukkan homologi tertinggi dengan data virus yang terdaftar di GenBank (NCBI) yaitu dengan virus AI sub tipe H3. Analisis filogenetika memperlihatkan bahwa dua virus AI sub tipe H3 yang dianalisis dalam penelitian ini berkelompok dengan virus AI sub tipe H3 asal Eropa (Gambar 2). Sampel

Tabel 2. Urutan nukleotida dan hasil translasi asam amino sampel B2 dan B4

Nama Sampel	Sekuen asam amino di cleavage site HA	Keterangan
A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009	PEKQTR	Low Pathogenic (LPAI)
A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010	PEIIQGR	Low Pathogenic (LPAI)



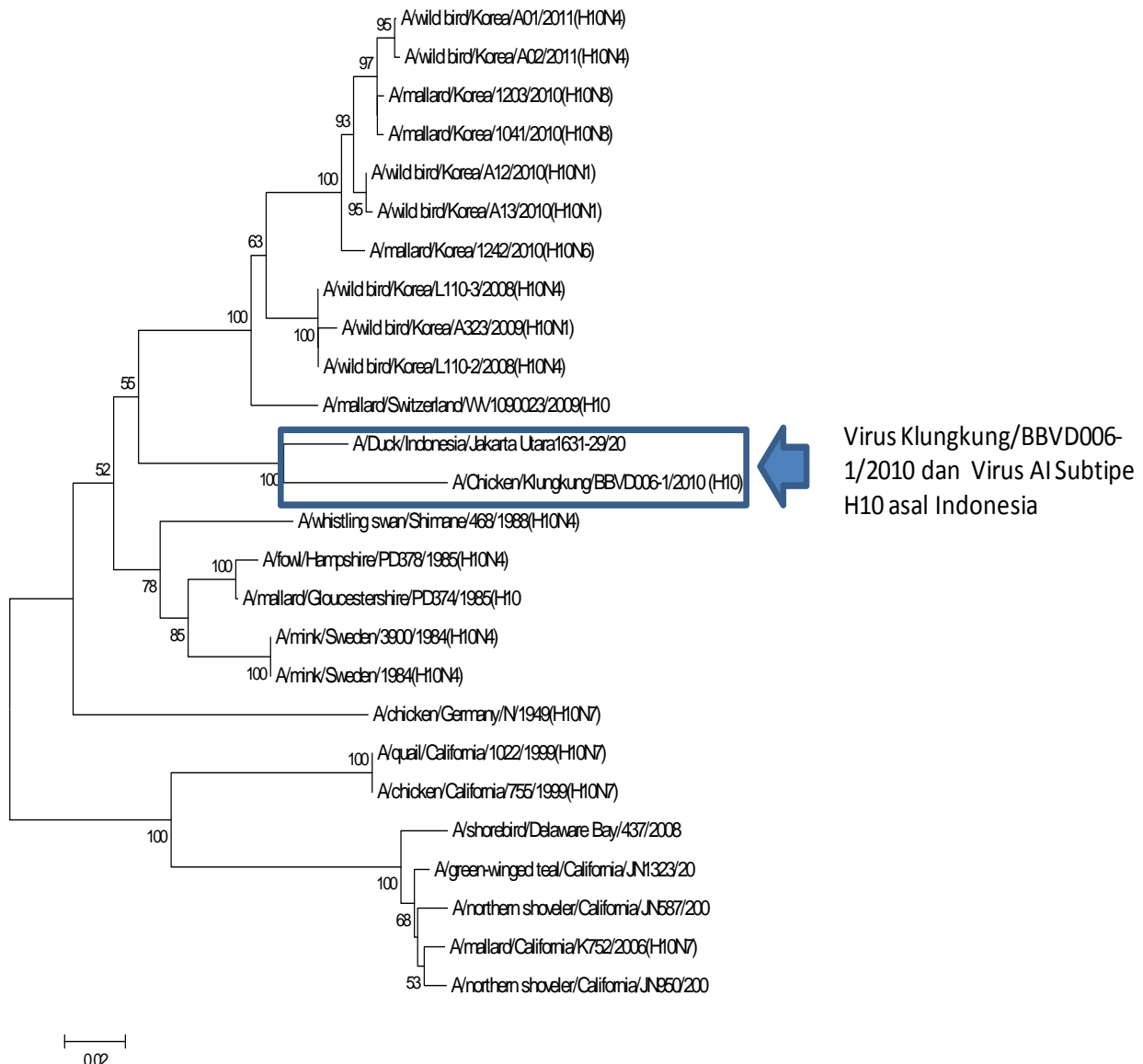
Gambar 2. Pohon filogenetika gen Hemagglutinin virus AI sub tipe H3. Virus AI sub tipe H3 asal Indonesia dalam kotak tertutup

dengan kode B4 (A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010) mempunyai homologi tertinggi dengan virus AI sub tipe H10. Urutan yang dilakukan dengan *cleavage site* pada HA menunjukkan virus LPAI karena tidak mempunyai *multiple basic* asam amino. Analisis filogenetika memperlihatkan bahwa virus sub tipe H10 pada penelitian ini (A/Chicken/Klungkung/BBVD006-01/2006) berdekatan dengan virus Indonesia lainnya yaitu A/Duck/Indonesia/Jakarta Utara/1631-29/2006 yang juga merupakan virus sub tipe H10 (Gambar 3).

Bersirkulasinya virus AI sub tipe H10 telah diidentifikasi di berbagai negara seperti pada itik pekin di Afrika Selatan (Abolnik *et al.*, 2010), ayam di Kanada (Senne, 2003), dan di Australia pada peternakan ayam pada tahun 2010, bahkan dilaporkan pekerja *abattoir* menderita *conjunctivitis* dan gejala infeksi saluran atas ringan (Arzey *et al.*, 2012). Virus AI sub tipe H10, biasanya tidak dikaitkan dengan gejala patogenesis yang tinggi, namun pernah juga dilaporkan oleh Wood *et al.* (1996) bahwa virus sub tipe

H10 menimbulkan kematian yang cukup tinggi pada ayam percobaan yang diinfeksi intra vena. Di Indonesia, virus sub tipe H10 pernah dilaporkan di GenBank, dan pada penelitian ini virus A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010 berkelompok dengan virus AI sub tipe H10 asal Indonesia yang diisolasi pada tahun 2006.

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa unggas yaitu itik dan ayam dapat menjadi inang dari virus sub tipe H3 dan H10. Hal ini sesuai dengan Webster *et al.* (1992) yang menyebutkan bahwa unggas merupakan inang dari virus dari berbagai macam sub tipe. Situasi endemis virus H5N1 di Indonesia dan ditemukannya virus sub tipe lainnya yaitu sub tipe H3 dan H10 menjadikan situasi virus AI menjadi lebih bervariasi. Bersirkulasinya virus AI dari berbagai sub tipe memungkinkan terjadinya *reassortant* antar virus AI influenza sehingga menyebabkan munculnya virus AI dengan genetika yang berbeda dan kemungkinan dengan patogenesis yang lebih patogen atau sebaliknya.



Gambar 3. Pohon filogenetika gen hemagglutinin virus sub tipe H10nesia dalam kotak tertutup

KESIMPULAN

Hasil identifikasi dan karakterisasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa virus sampel kode B1 (A/Chicken/Buleleng/BBVD488-9/2009) dan (B2) A/Duck/Tabanan/BBVD573-10/2009 adalah virus AI subtype H3 sedangkan sampel kode B4 (A/Chicken/Klungkung/BBVD006-1/2010) adalah virus AI subtype H10.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada BBVet Denpasar atas kontribusi isolat virus AI dalam penelitian ini serta kepada Nana Suryana serta Teguh Suyatno atas bantuan teknisnya. Penelitian ini dibiayai oleh APBN 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Abolnik, C., G.H. Gerdes, M. Sinclair, B.W. Ganzevoort, J.P. Kitching, C.E. Burger, M. Romito, M. Dreyer, S. Swanepoel, G.S. Cumming, and A.J. Olivier. 2010. Phylogenetic analysis of influenza A viruses (H6N8, H1N8, H4N2, H9N2, H10N7) isolated from wild birds, ducks, and ostriches in South Africa from 2007 to 2009. *Avian Dis.* 54:313-322.
- Alexander, D.J. 2000. A review of influenza A viruses in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74:3-13.
- Arzey, G.G., P. D. Kirkland, K. E. Arzey, M. Frost, P. Maywood, S. Conaty, A. C. Hurt, Y.M. Deng, P. Iannello, I. Barr, D. E. Dwyer, M. Ratnamohan, K. McPhie, and P. Selleck. 2012. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia. *EID.* 18(5):814-816.
- Bosch, F.X., W. Garten, H.D. Klenk, and R. Rott. 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of viruses. *Virology.* 113:725-735
- Chotpitayasonondh, T., K. Ungehusak, W. Hanshaoworakul, S. Chunsuthiwat, and P. Sawanpanyalert. 2005. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand. *Emerging Infect. Dis.* 11:201-209.
- Dharmayanti, N.L.P.I., R. Damayanti, A. Wiyono, R. Indriani, dan Darminto. 2004. Identifikasi virus influenza isolat Indonesia dengan metode reverse transcriptase polymerase chain reaction RT-PCR. *JITV.* 9(2):136-143.
- Dharmayanti, N.L.P.I., A. Ratnawati, D.A. Hewajuli, dan Darminto. 2011. Virus influenza novel H1N1 babi di Indonesia. *J. Biol. Indon.* 7(2):289-297.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallensten, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D.M.E. Osterhaus. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from blackheaded gulls. *J. Virol.* 79(5):2814-2822.
- Gunther, I., B. Glatthaar, G. Duller, and W. Garten. 1993. A H1 hemagglutinin of a human influenza A virus with a carbohydrate-modulated receptor binding site and an unusual cleavage site. *Virus Res.* 27:147-160.
- Harimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1):129-149.
- Hien, T.T., N.T. Liem, N.T. Dung, L.T. San, P.P. Mai, N.V.V. Chau, P.T. Suu, V.C. Dong, L.T.Q. Mai, N.T. Thi, D.B. Khao, L.P. Phat, N.T. Thruong, H.T. Long, C.V. Tung, L.T. Giang, N.D. Tho, L.H. Nga, N.T.K. Tien, L.H. San, L.V. Tuan, C. Dolecek, T.T. Thanh, M. de Jong, C. Schultz, P. Ceng, W. Lim, P. Horby, and J. Farrar. 2004a. (H5N1) in 10 patient in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350:1179-1188.
- Hien, T.T., M. de Jong, and J. Farrar. 2004b. - a challenge to global health care structures. *N. Engl. J. Med.* 351:2363-2365.
- Lamb, R.A. and R.M. Krug. 2001. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*. D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Lee, M.S., P.C. Chang, J.H. Shien, M.C. Cheng, and H.P. Shieh. 2001. Identification and subtyping of influenza A viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97:13-22.
- Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J.D. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Ronohardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T.D. Nguyen, A.T. Estoepongstie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T. Hanh, R.J. Webby, L.L.M. Poon, H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen, R.G. Webster, and J.S.M. Peiris. 2004. Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 340:209-213.
- Kawaoka, Y., S. Yamnikova, T.M. Chambers, D.K. Lvov, and R.G. Webster. 1990. Molecular characterization of a new hemagglutinin subtype H14 of influenza A virus. *Virology.* 179:759-767.
- Puthavathana, P., P. Auewarakul, P.C. Charoenying, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K. Boonnak, R. Khanyok, P. Thawachsupa, R. Kijphati, and P. Sawanpanyalert. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J. Gen. Virol.* 86:423-433
- Rohm, C., J.C. Suss, V. Pohle, and R.G. Webster. 1996. Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chicken in Leipzig, Germany. *Virology.* 218:253-257
- Senne, D.A. 2003. Influenza A viruses in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis.* 47:798-805.
- Viseshakul, N., R. Thanawongnuwech, A. Amonsin, S. Suradhat, S. Payungporn, J. Keawchareon, K. Oraveerakul, P. Wongyanin, S. Plitkul, A. Theamboonlers, Y. Poovorawan. 2004. The genome sequence analysis of H5N1 A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. *Virology.* 328:169-176.
- Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56:152-179.
- Wiyono, A., R. Indriani, N.L.P.I. Dharmayanti, R. Damayanti, dan Darminto. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus influenza highly pathogenic subtype H5 dari ayam asal wabah di Indonesia. *JITV.* 9(1):61-71.
- Wood, G.W., J. Banks, I. Strong, G. Parsons, and D.J. Alexander. 1996. An influenza A virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian. Pathol.* 25:799-806
- Wright, P. and R.G. Webster. 2001. Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*. Knipe, D. and P.M. Howley (Eds.). 4th ed. Lippincott Williams and Wilkin, Philadelphia.