

Sekuensing Gen Hemagglutinin untuk mendukung *Antigenic Cartography*

Rosmelati Situmeang dan Anieka Rochmah
Pusat Veterinaria Farma Surabaya

ABSTRAK

Penggunaan seed vaksin yang tidak memperhatikan struktur genom virus khususnya protein HA, dapat menimbulkan tekanan imunologis pada virus AI di lapangan yang akan memicu terjadinya mutasi. Respon imun yang timbul dalam tubuh baik oleh infeksi alam, maupun vaksinasi dapat menimbulkan tekanan pada gen HA maupun NA yang menyebabkan *antigenic drift*, sehingga adanya virus influenza A ini di alam maupun penggunaan vaksin influenza diperlukan koreksi dengan interval tertentu terhadap virus (*seed*) yang digunakan (Tamura dan Kurata; Seo *et al.*, 2002).

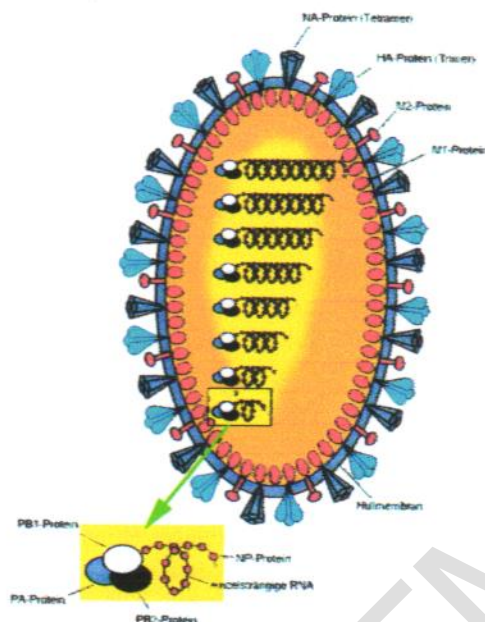
Antigenic cartography menggambarkan analisis kuantitatif dan visualisasi *antigenic behavior* dari sifat antigenitas virus Avian Influenza sehingga dapat digunakan untuk : evaluasi antigenitas, seleksi strain vaksin, strategi *booster* dari vaksinasi, dan mengetahui hubungan antara sifat genetik dan antigenitas (OFFLU/AAHL, 2009). Analisis hasil sekuensing gen HA isolat Pare yang dimiliki oleh Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) pada regio *cleavage site* didapat sejumlah asam amino *basic* yang banyak dan tidak sederhana (*multiple basic amini acid*) yaitu **PQRERRRKKRGL** dan dikategorikan sebagai *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Gen HA virus AI isolat Pare bersifat stabil karena mempunyai tingkat homologi yang tinggi dengan isolat AI yang diisolasi pada awal masuknya virus AI ke Indonesia.

Kata kunci : Sekuensing, Gen HA AI Isolat Pare, *Antigenic cartography*.

PENDAHULUAN

Virus Influenza termasuk famili *Orthomyxoviridae* dengan tiga macam tipe yaitu tipe A, tipe B, dan tipe C. Pembagian ketiga tipe ini berdasarkan sifat antigenik yang terdapat pada gen matriks dan nukleoprotein. Tipe A dan B memiliki delapan macam fragmen gen yang dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu gen eksternal dan gen internal. Gen eksternal terdiri dari gen hemagglutinin (HA) dan gen neuromidase (NA) yang banyak berfungsi untuk perlekatan dengan sel inang dan bersifat antigenik. Gen internal terdiri dari

gen *polymerase basic 2* (PB2); *polymerase basic 1* (PB1); *polymerase acidic* (PA); nukleoprotein (NP); Matriks (M) dan non struktural. Gen internal ini berfungsi dalam replikasi dan transkripsi virus. Kedelapan fragmen ini akan menghasilkan sepuluh macam protein. Masing-masing fragmen akan menghasilkan satu macam protein, kecuali fragmen M dan NS yaitu masing-masing menghasilkan dua macam protein yaitu protein M1 dan M2, serta protein NS1 dan NS2 seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1 (Horimoto dan Kawaoka, 2001).



Gambar 1. Fragmen gen yang membentuk virus *Avian Influenza* (Horimoto dan Kawaoka, 2001).

Pembagian sub tipe virus Influenza A didasarkan pada glikoprotein HA dan NA. Sampai saat ini virus Influenza A memiliki 16 macam protein HA dan 9 macam protein NA (OIE, 2008). Asam amino yang terdapat pada *cleavage site* protein HA dapat digunakan untuk membedakan virulensi virus Influenza. Umumnya virus Influenza mempunyai asam amino arginin (R) pada ujung karboksil HA1 dan asam amino glisin (G) pada ujung amino HA2. Urutan nukleotida atau asam amino pada regio HA1 yang berperan sebagai antigenisitas merupakan faktor pembeda antar sub tipe. Perbedaan sub tipe pada regio ini minimal sebesar 30% (Horimoto dan Kawaoka, 2001).

Gen hemagglutinin (HA) merupakan suatu gen yang akan melakukan translasi protein HA sebagai glikoprotein permukaan yang berfungsi sebagai *receptor-binding* dan *membrane fusion glycoprotein*. Protein hemagglutinin disusun oleh 568 asam amino dengan berat molekul 56 kDA. Molekul HA terdiri dari subunit HA1 dan subunit HA2. Protein subunit HA1 berperan dalam mediator kontak awal dengan membran sel dan protein subunit HA2 bertanggung jawab terhadap fusi membran. Protein HA1 mempunyai berat molekul 45 kDA (Nwe, 2006).

Mekanisme respon imun yang timbul dalam tubuh jika terjadi infeksi alam, maupun vaksinasi dapat menimbulkan

tekanan pada gen HA maupun NA yang menyebabkan *antigenic drift*, sehingga adanya virus influenza A ini di alam maupun penggunaan vaksin influenza diperlukan koreksi dengan interval tertentu terhadap virus (*seed*) yang digunakan (Tamura dan Kurata; Seo *et al.*, 2002).

Genotipe adalah kode genetik yang dapat diukur yang menggambarkan fenotipe suatu makhluk hidup. Perubahan pada genotipe tidak secara langsung berhubungan 1 banding 1 dengan perubahan fenotipe, misalnya perubahan 1% pada genotipe tidak secara langsung menyebabkan perubahan 1% juga pada fenotipe. Fenotipe merupakan ekspresi dari kode genetik yang kadang dapat diukur, tetapi sering juga tidak dapat diukur seperti jenis kelamin, warna rambut dan warna mata. Genotipe dari gen hemagglutinin menggambarkan fenotipe (*antigenic behavior*) dari protein HA. Sifat antigenitas (*antigenic behavior*) dari protein HA di laboratorium dapat diukur dengan melakukan uji HI. Titer HI yang tinggi menunjukkan antigenitas yang tinggi yaitu kemiripan antara antigen (sampel) dan serum yang digunakan (OFFLU/AAHL, 2009).

Antigenic cartography merupakan metoda pemetaan *antigenic behavior* yang

menggambarkan *range* titer antigen yang diukur terhadap beberapa antisera yang berbeda. Data pemetaan antigenik ini akan dikonversikan ke dalam matriks jarak *Multidimensional scalling algorithms* (MDS). *Antigenic cartography* menggambarkan analisis kuantitatif dan visualisasi *antigenic behavior* dari sifat antigenitas virus Avian Influenza sehingga dapat digunakan untuk : evaluasi antigenitas, seleksi strain vaksin, strategi *booster* dari vaksinasi, dan mengetahui hubungan antara sifat genetik dan antigenitas (OFFLU/AAHL, 2009).

Dari paparan di atas disimpulkan perlunya sekuensing gen HA secara utuh untuk mengetahui data genetik yang nantinya digunakan untuk mendukung *antigenic cartography* dalam hal ini dilakukan sekuensing terhadap gen HA utuh dari isolat Pare yang dimiliki oleh Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Hasil sekuensing gen HA Pare akan dibandingkan dengan *antigenic cartography* dari isolat-isolat yang ada sekarang ini untuk melihat apakah isolat Pare masih layak dijadikan sebagai *seed* vaksin.

MATERI

Bahan

Qiamp Viral RNA Mini kit (Qiagen), SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq Hifi (Invitrogen), Nucleospin Extract II (Macherey- Nagel), DNA Ladder (Biolabs), Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystem), Buffer (10x) with EDTA (Applied Biosystem), Bigdye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystem), Water, DNase & RNase freewater (MP Bio 821932), Ethidium Bromide, Agarose LE (Roche 11685660001), Loading Dye Solution (Fermentas 00020337), Premized TBE Buffer 10 X, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche 11732668001), HA10F/R, HA20F/R, HA30F/R, HA40F/R (First Base).

Alat

Thermal cycler (Perkin Elmer), Electrophoresis Cell (Bio - Rad), Transluminator (UVP), Power supply (Biorad), Mikropipet (Biorad), microwave (Hitachi), microcentrifuge (Beckmann), sequencer Applied Bio System 3130, laminar flow hood (ESCO), vortex, spin down.

METODA

Dilakukan ekstraksi RNA virus isolat Pare dengan menggunakan *Qiamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)*. RNA yang diperoleh diproses menjadi cDNA dan diamplifikasi dengan menggunakan metoda *one step*. Proses *one step* untuk mendapatkan produk PCR menggunakan *SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq Hifi (Invitrogen)*. Proses amplifikasi DNA menggunakan empat pasang primer untuk mendapatkan sekuen gen HA secara utuh (CSIRO, 2008). Primer yang digunakan adalah primer HA10F/R menghasilkan produk PCR \pm 350 bp, primer HA20F/R menghasilkan produk PCR \pm 700 bp, primer HA30F/R menghasilkan produk PCR \pm 700 bp, dan primer HA40F/R menghasilkan produk PCR \pm 700 bp. Produk PCR yang diperoleh dipurifikasi dengan menggunakan *Nucleospin Extract II (Macherey- Nagel)*.

Sebelum produk PCR yang telah dipurifikasi *dirunning* dalam mesin sekuensing ada beberapa tahapan yang dilakukan yaitu proses *cycle sequencing* dan purifikasi produk *cycle sequencing*. Sekuensing menggunakan mesin sequencer ABI prism tipe 3130 yang memiliki empat kapiler dengan panjang 50 cm dengan

kemampuan membaca hasil sekuen hingga 700 nukleotida.

HASIL



1 2 3 4

Gambar 2. Hasil elektroforesis dengan menggunakan pasangan primer HA10 (1), Ha20 (2), HA30(3) dan HA40(4).

```

10 Jul 2010                               Sequence Data
Molecule: 10FPare, 342 bps DNA
Description:
File Name: (not saved), dated
Printed: 1-342 bps (Full), format Single Strand

-   ggccagtagc aaaagcaggg gttcaatctg tcaaaatgga gaaaatagtg cttcttcttg
6   caatagccag tcttgtaaag agtgatcaga tttgcattgg ttaccatgca aacaattcaa
12  cagagcaggt tgacacaata atggaaaaga acgttactgt tacacatgcc caagacatac
18  tggaaaagac acacaacggg aagctctgcg atctagatgg agtgaagcct ctaattttaa
24  gagattgtag tgtagctgga tggctcctcg ggaacccaat gtgtgacqaa ttcacaaatg
30  taccggaatg gtcttacata gtggagaagg gtcatagntg tt
    
```

Gambar 3. Hasil sekuensing produk PCR dengan menggunakan primer Ha10

10 Jul 2010 Sequence Data
 Molecule: 20FPare, 620 bps DNA
 Description:
 File Name: (not saved), dated
 Printed: 1-620 bps (Full), format Single Strand

```

1   ttctggatct agatggagtg aagcctctaa ttttaagaga ttgtagtgta gctggatggc
61  tctctgggaa cccaatgtgt gaocgaattca tcaatgtacc ggaatggctc tacatagtgg
121 agaaggccaa tccagccaat gacctctgtt acccagggaa tttcaacgac tatgagaac
181 tgaaacacct attgagcaga ataaaccatt ttgagaaaaa tcagatcacc cccaaaagt
241 cttggtccga tcatgaagcc tcatcagggg tgagctcagc atgtccatcc cagggaaaagt
301 cctctctctt tagaaatgtg gtagggctta tcaaaaagaa cagtacatcc ccaacaataa
361 agagaagcta caataatacc aaccaagaag atcttttggg actgtggggg attcaccatc
421 ctaatgatgc agcagagcag acaaggctat atcaaaaccc aaccacctat atttccgttg
481 ggacatcaac actaaaccag agattgggtc caaaaatagc tactagctcc aaagtaaacy
541 ggcaaatggg aaggatggaa tctctctgga caattttaaa accgaatgat gcaatcaact
601 tcgagagtaa tggaaatttc
    
```

Gambar 4. Hasil sekuensing produk PCR dengan menggunakan primer HA20

10 Jul 2010 Sequence Data
 Molecule: 30FPare, 657 bps DNA
 Description:
 File Name: (not saved), dated
 Printed: 1-657 bps (Full), format Single Strand

```

1   ggtacaaaa atagctacta gatccaaagt aaacgggcaa agtggaaagga tggaaattctt
61  ctggacaatt ntaaaaaccga atgatgcaat caacttcgag agtaatggaa atttccattgc
121 tccagaatat gcatacaaaa ttgtcaagaa aggggactca gcaattatga aaagtgaatt
181 ggaatatggt aactgcaaca ccaagtgtca aactccaatg gggggcataa actctagtat
241 gccattccac aacataacacc ctctcaccat cgggggaatgc cccaaatcagc tgaatcaaaa
301 cagattagtc ctctggactg ggtccagaaa tagccctcaa agagagagaa gaagaaaaaa
361 gagaggacta ttctggagcta tagcaggttt tatagagggg ggaatggcagg gaatggtaga
421 ttgtttggtat ggggtaccacc atagcaatga gcagggcagc ggaatcagctg cagacaagaa
481 atccactcaa aaggcaatag atgganttac caataaggtc aactcgatca ttgacaaaaa
541 gaacactcag ttctgagccg ttggaaagga atttaataac ttgaaaagga gaatagagaa
601 ttaaaacaag aagatggaa gacggattcc ataggtctgg acttataatg ctgaaact
    
```

Gambar 5. Hasil sekuensing produk PCR dengan menggunakan primer HA30

10 Jul 2010 Sequence Data
 Molecule: 40FPareHA, 514 bps DNA
 Description:
 File Name: (not saved), dated
 Printed: 1-514 bps (Full), format Single Strand

```

1   agggaattta ataacttaga aaggagaata gagaatttaa acaagaagat ggaagacgga
61  ttcttagatg tctggactta taatgctgaa cttctggttc tcatggaaaa tgagagaact
121 ctgacttttc atgactcaaa tgttaagaac ctctacgaca aggtccgact acagcttagg
181 gataatgcaa aggagctggg taacggttgt ttogagttct atcacaaatg tgataatgaa
241 tgtatggaaa gtataagaaa cggaacgtat aactaccocg agtattcaga agaagcaaga
301 ttaaaaagag aggaaataag tggagtaaaa ttggaatcaa taggaactta ccaaatactg
361 tcaattttat caacaagtgc gagttcccta gcactggcaa tcatgatggc tgggtctatc
421 ttatggatgt gtcacaatgg atcgttacaa tgagaattt gcatttaaat ttgtgagttc
481 agattgtagt taaaaacacc cttgttttcta ctgg
    
```

Gambar 6. Hasil sekuensing produk PCR dengan menggunakan primer HA40

PEMBAHASAN

Gen HA merupakan suatu gen yang akan melakukan translasi protein HA sebagai glikoprotein permukaan yang berfungsi untuk perlekatan dengan reseptor sel inang. Protein HA dapat menimbulkan respon imun bagi inang. Dari analisis pada regio *cleavage site* gen HA isolat Pare

didapat sejumlah asam amino *basic* yang banyak dan tidak sederhana (*multiple basic amino acid*) yaitu **PQRERRRKKRGL**. Asam Amino yang menyusun regio *cleavage site* ini mempunyai susunan yang sama dengan beberapa isolat AI Indonesia lainnya seperti yang terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Susunan asam amino pada *cleavage site* gen HA

VIRUS	URUTAN AA CLEAVAGE SITE
Ck-Pare-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jabar-05-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Jatim-06-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Jatim-09-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Jatim-12-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Ck-Jatim-13-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Jateng-18-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Jabar-21-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jakarta-31-2003	PQRERRRIKRGL
Ck-Kaltim-35-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Banten-38-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jatim-39-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jatim-51-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jateng-59-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Kaltim-61-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Kalsel-80-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jakarta-91-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Bali-105-2004	PQRERRRIKRGL
Ck-Jatim-122-2005	PQRERRRIKRGL

Dengan demikian virus isolate Pare secara molekuler dapat dikategorikan sebagai *Highly Pathogenic Avian Influenza*

(HPAI). Adanya poli asam amino pada regio *cleavage site* ini tidak hanya merupakan target dari protease seperti

tripsin saja, melainkan juga oleh protease intraseluler seperti furin atau plasmin yang dapat menyebabkan penyebaran virus secara sistemik dan meningkatkan virulensi (Hulse *et al.* 2004; Harimoto dan Kawaoka, 2001).

Dari penggabungan hasil sekuensing HA 10, HA20, HA30, dan HA 40 diperoleh urutan nukleotida gen HA secara utuh seperti pada gambar 7.

```

10 Jul 2010                               Sequence Data
Molecule:                               CK-Pare-2004, 1787 bps DNA
Description:
File Name:                               (not saved), dated
Printed:                                  1-1787 bps (Full), format Single Strand

      1  ggccagtagc  aaaaagcaggg  gttcaatctg  tcaaaatgga  gaaaatagtj  ctctctcttg
      61  caatagccag  tcttgyctaa  agtgatcaga  tttygatty  ttaacatgca  aacatttcaa
     121  cagagcaggt  tgacaacaat  atggaaaaga  acgttactgt  tacaacatgc  caagacatac
     181  tggaaaagac  acacaacagg  aagctctgcy  atctagatgy  agtgaagcct  ctaattttta
     241  gagattgtay  tctagctgga  tggctctctg  ggaacccaat  gctgtaogaa  ttcatcaatg
     301  taocgyaaty  gtcttacata  ggggagaagg  ccaatccagc  caatgacctc  tyytaaccag
     361  ggaatttcaa  cgaactatga  gaastgaaac  accatctgag  cagaataaac  catitttgaga
     421  aaattcagat  catccccaaa  agtctctggt  ccgatcctga  agcctcctca  ggggtgagct
     481  cagcatgtcc  ataccagggg  aagtctctct  ttttagaaa  cgtggtatgg  ottatcaaaa
     541  agaacagtac  ataccacaac  ataaagajaa  gotacaataa  taaccaacca  gaagatcttt
     601  tggtaactgy  ggggattcac  catctcaatg  atgcagcaga  gcagacaagg  ctatatcaaa
     661  acccaacccc  ctatatctcc  gttgygacat  caacaotaaa  ccagagattg  gtaaccaaaa
     721  tagctactag  atccaaagta  aacyggcaaa  gtggagggat  ggaattcttc  tggacaattt
     781  taacaacgaa  tgatgcaato  aactctgaya  gtaatggaaa  ttctattgct  ccagaataty
     841  catcaaaaat  tgcacaagaa  ggggaactcag  caattatgaa  aaytgaattg  gaatatygta
     901  actgcaaccc  caagtgtcaa  actccaatgg  gggcgataaa  ctctagtatg  ccattccaca
     961  acatacaacc  tctcacctac  ggggaattgcc  ccaaatatyt  gaaatcaaac  agatttagtcc
    1021  ttgcgactgg  gctcagaaat  agcctcmeta  gagagajaa  aagaaaaaag  agaggactat
    1081  ttggagctat  agcaggtttt  atagagggag  gatggcaggy  aatggttagt  gtttgytatg
    1141  ggtaccacca  tagcaatgag  caggggagtg  gatacctctc  agacaagaaa  tccactcaaa
    1201  aggcaataga  tggayttacc  aataaagttca  actcgatcat  tgacaaaaatg  aacactcaag
    1261  ttgaggccgt  tggaaagggaa  tttataact  tagaaaggag  aatagagaat  ttaaacaaag
    1321  agatggaga  cggatctctag  atgtctggac  ttataatgct  gaactctggy  ttctcatgga
    1381  aaatgagaga  actctagact  ttcctgactc  aaatgttaay  aaactctcag  accaggtctgy
    1441  actacagctt  agggataatg  caaagayct  ggttaacggt  tgtttcagct  tctatcaca
    1501  atgtgaaat  gaatgtatgg  aaagtataag  aaacgyaacg  tataactaac  cgcagtattc
    1561  agaaajayca  agattcaaaa  gagajyaaat  aaytggayta  aaattggaa  caatggaaac
    1621  ttaaccaaca  ctgtcaattc  attcaacagt  gggagattcc  ctagaactgg  caatcatgat
    1681  ggotggtota  tctttatgga  tctgctccaa  tggatctgta  caatgcagaa  tttgcaatta
    1741  aattgtgag  ttcagattgt  agtcaaaaa  acccttgttt  ctactggy

```

Gambar 7. Gabungan hasil sekuensing produk PCR dengan menggunakan primer HA10, HA20, HA30 dan HA40.

Dari Analisis Blast untuk mengetahui kekerabatan virus isolat Pare dengan virus isolat-isolat lain diperoleh bahwa virus isolat Pare dekat

kekerabatannya dengan virus isolat Legok tahun 2003 dengan tingkat homologi 99% seperti pada gambar 8.

Alignments

Select All Get selected sequences Distance tree of results Multiple alignment

>gb|G0052426.1| Influenza A virus (A/chicken/Legok/2003(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds
Length=1754

Score = 3188 bits (1726), Expect = 0.0
Identities = 1745/1754 (99%), Gaps = 1/1754 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	20	GGTTC AATCTGTCAA AATGGAGAAAATAGTGC TTTCTTCTTGCAATAGCCAGCTTTGT TAA	79
Sbjct	1	GGTTC AATCTGTCAA AATGGAGAAAATAGTGC TTTCTTCTTGCAATAGCTAGTCTTGT TAA	60
Query	80	AAGTGATCAGATTG CATTGGTTACCATGCAAA CAATTC AACAGAGCAGGTTGACACAAT	139
Sbjct	61	AAGTGATCAGATTG CATTGGTTACCATGCAAA CAATTC AACAGAGCAGGTTGACACAAT	120
Query	140	AATGGAAAAGAACG TTACTGT TACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGG	199
Sbjct	121	AATGGAAAAGAACG TTACTGT TACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGG	180
Query	200	GAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCC TCTAATTTT AAGAGATTGTAGTGTAGCTGG	259
Sbjct	181	GAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCC TCTAATTTT AAGAGATTGTAGTGTAGCTGG	240
Query	260	ATGGCTCCTCGGGAA CCAATGTGTGAOGAATTCATCAATGTACCGGAA TGGTCTTACAT	319
Sbjct	241	ATGGCTCCTCGGGAA CCAATGTGTGAOGAATTCATCAATGTACCGGAA TGGTCTTACAT	300
Query	320	AGTGGAGAAGGCCAATCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAA TTTCAACGACTATGA	379
Sbjct	301	AGTGGAGAAGGCCAATCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAA TTTCAACGACTATGA	360
Query	380	AGAAC TGAAACACCTATGTGAGCAGAATAAACCATTTGAG AAAATTCAGATCATCCCAA	439
Sbjct	361	AGAAC TGAAACACCTATGTGAGCAGAATAAACCATTTGAG AAAATTCAGATCATCCCAA	420
Query	440	AAGTTCTTGGTCCGATCATGAGCC TCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGG	499
Sbjct	421	AAGTTCTTGGTCCGATCATGAGCC TCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGG	480
Query	500	AAAGTCTCTCTTTT TAGAAATGTGGTATGGCTTATCAA AAGAACAGTACATACCCAAC	559
Sbjct	481	AAAGTCTCTCTTTT TAGAAATGTGGTATGGCTTATCAA AAGAACAGTACATACCCAAC	540
Query	560	AATAAAGAGAAGCTACAATAATACC AACCAAGAAGATCTTTGGTAC TGTGGGGATTCA	619
Sbjct	541	AATAAAGAGAAGCTACAATAATACC AACCAAGAAGATCTTTGGTAC TGTGGGGATTCA	600
Query	620	CCATCCTAATGATG CAGCAGAGCAGACAAAGGC TATATCAA AACCACCACTATATTTT	679
Sbjct	601	CCATCCTAATGATG CAGCAGAGCAGACAAAGGC TATATCAA AACCACCACTATATTTT	660
Query	680	CGTTGGGACATCAACACTAAAC CAGAGATTGGTACC AAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGT	739
Sbjct	661	CGTTGGGACATCAACACTAAAC CAGAGATTGGTACC AAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGT	720
Query	740	AAACGGGCAAAAGTGG AAGGATGGAAATTTCTTG GACAATTTTAA AACCGAATGATGCAAT	799
Sbjct	721	AAACGGGCAAAAGTGG AAGGATGGAAATTTCTTG GACAATTTTAA AACCGAATGATGCAAT	780
Query	800	CAACTTCGAGAGTAATGGAAATTT CATTTGCTCCAGA ATATGCATACAAAATGTCAAGAA	859
Sbjct	781	CAACTTCGAGAGTAATGGAAATTT CATTTGCTCCAGA ATATGCATACAAAATGTCAAGAA	840
Query	860	AGGGGACTCAGCAAT TATGAAAAGTGAAT TGGAAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCA	919
Sbjct	841	AGGGGACTCAGCAAT TATGAAAAGTGAAT TGGAAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCA	900
Query	920	AAC TCCAATGGGGCGATAAAC TCTAGTATGCCAT TCCACAACATACACCC TCTCACCAT	979
Sbjct	901	AAC TCCAATGGGGCGATAAAC TCTAGTATGCCAT TCCACAACATACACCC TCTCACCAT	960
Query	980	CGGGGAATGCCCAAATATGTGAAA TCAAACAGATTAGTCC TTGCGACTGGGCTCAGAAA	1039
Sbjct	961	CGGGGAATGCCCAAATATGTGAAA TCAAACAGATTAGTCC TTGCGACTGGGCTCAGAAA	1020
Query	1040	TAGCCCTCaaagagagagaa gaagaaaaaaagagGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTT	1099

Gambar 8. Homologi nukleotida gen HA isolat Pare dengan Isolat Legok 2003.

KESIMPULAN

Dari hasil-hasil tersebut dapat disimpulkan gen HA virus AI isolat Pare

bersifat stabil karena mempunyai tingkat homologi yang tinggi dengan isolat AI yang diisolasi pada awal masuknya virus AI ke

Indonesia. Untuk mengetahui apakah virus AI isolat Pare ini masih mampu melindungi terhadap virus AI yang menginfeksi ayam di lapangan saat ini, perlu dilakukan analisis lanjutan dengan *antigenic cartography*.

DAFTAR PUSTAKA

- CSIRO, 2008. In House Test for Emergency disease Diagnosis Test and Test Protocol Under Development Molecular Characterization.
- Horimoto T., Kawaoka Y. 2001 Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:129-149
- Hulse D.J. Webster R.G., Russel R.J. Perez D.R. 2004. Molecular Determinants Within the Surface Protein Involved in the Pathogenicity of H5N1 Influenza in Chickens. *J. Virol.* 78:9954-9964
- Nwe Nitar., Qigai He , Sudarat Damrongwatanapokin, Qingyun Du1, Ivanus Manopo, Yukol Limlamthong, Beau James Fenner, Lynn Spencer and Jimmy Kwang. 2006.: Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology* 2006, 6:16 doi: 10.1186/1471-2180-6-16.
- OFFLU/AAHL Workshop, 2009. Serology and virus typing for Antigenic Cartography.
- Office International des Epizooties, 2008. Manual of Standards For Diagnostics Tests and Vaccines.
- Tamura S.I and Kurata T.2004. Defense Mechanisms Against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. *Jpn. J. Infect .Dis.* 57:236-247.