

Isolasi dan Identifikasi Wabah Avian Influenza pada Bulan Oktober 2004-Maret 2005 di Indonesia

NLP. I. Dharmayanti[✉], R. Indriani, R. Damayanti & A. Wiyono
Balai Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT

Isolation and Identification of Avian Influenza Outbreak in October 2004 – March 2005 in Indonesia. Recent outbreak of avian influenza A (H5N1) in poultry throughout Asia including Indonesia caused major economic problems. Bird's infection with this virus was identified in Indonesia in January 2004. Since March 2004, the avian influenza cases has decreased, but then in October 2004 was reported that outbreak has occurred in some district in Indonesia. This study is the first to isolation and identification the avian influenza outbreak in Indonesia in October 2004 until March 2005. Our finding revealed that outbreak of poultry disease in this period was caused by an avian influenza H5 subtype.

Keywords: Identification, virus avian influenza subtype H5

PENDAHULUAN

Virus influenza adalah anggota dari *Orthomyxoviridae* (Lamb & Krug, 1996), Virus ini mempunyai materi genetik RNA berpolaritas negatif, mempunyai amplop dan diklasifikasikan menjadi tipe A, B dan C. Virus influenza A diklasifikasikan menjadi beberapa sub tipe berdasarkan pada dua jenis glikoprotein permukaan yaitu Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA). Sebanyak 15 HA dan 9 NA sub tipe telah diidentifikasi. Semua sub tipe virus influenza A dapat ditemukan pada unggas air atau unggas yang telah didomestikasi, tetapi hanya beberapa sub tipe yang dapat ditemukan di mamalia atau manusia. Induk semang alami dari influenza B dan C adalah manusia (Ellis & Zambon, 2001). Influenza B juga dapat ditemukan pada

anjing laut (Osterhaus *et al.*, 2000) dan influenza C dapat diisolasi dari babi (Gou *et al.*, 1983).

Virus avian influenza *highly pathogenic* telah diisolasi dari beberapa wabah pada peternakan unggas (Alexander *et al.*, 1993; Bean *et al.*, 1985; Harimoto *et al.*, 1995; Swayne 1997; Swayne *et al.*, 1997). Pada tahun 1997, virus avian influenza H5N1 telah ditransmisikan dari ayam ke manusia di Hongkong, yang menyebabkan 18 kasus akibat infeksi virus ini dan enam diantaranya meninggal (*Centers for Disease Control and Prevention*, 1998). Virus yang diisolasi dari manusia dan unggas mempunyai kesamaan kandungan genetic dan bentuk fenotipik termasuk virulensinya pada mamalia (Claas *et al.*, 1998; Suarez *et al.*, 1998).

Di Indonesia, wabah avian

✉ JL. R.E.Martadinata 30, Bogor. E-mail: nlpdharmayanti@yahoo.com

influenza pada peternakan ayam dan unggas lainnya telah terjadi sejak akhir tahun 2003. Dharmayanti *et al.* (2004b) telah berhasil mengidentifikasi bahwa penyebab wabah yang menimbulkan banyak kematian dan kerugian ekonomi pada bulan Oktober 2003 sampai Februari 2004, disebabkan oleh virus avian influenza H5. Setelah bulan Februari 2004, wabah avian influenza seperti mereda dengan sendirinya, tetapi pada bulan Oktober 2004, terjadi letupan wabah yang banyak menimbulkan kematian pada beberapa jenis unggas seperti merak, merpati, itik dan ayam buras. Wabah ini terus berlanjut sampai bulan Maret 2005 dan banyak menyerang peternakan ayam komersial. Untuk menentukan secara pasti penyebab wabah ini harus dilakukan isolasi agen yang menyebabkan penyakit ini. Isolasi dan identifikasi wabah pada periode ini belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi agen infeksi yang menyebabkan kematian puluhan ribu unggas pada bulan Oktober 2004 sampai Maret 2005.

BAHAN DAN CARA KERJA

Identifikasi agen

Sampel diambil dari ayam mati atau di bunuh dengan gejala klinis. Gejala klinis berupa gangguan pernapasan, ngorok, sinusitis, odema pada kepala dan muka., perdarahan jaringan subkutan diikuti sianosis kulit, terutama pada kaki, pial dan kepala. Organ yang diambil diantaranya adalah usus dengan fesusnya, trakea, paru-paru, limpa, ginjal, otak, hati dan jantung. Sampel juga diambil dari swab trakea dan kloaka dari unggas hidup. Sampel-sampel ini dikoleksi dan diproses secara terpisah atau pol. sampel

ditempatkan pada *phosphate buffered saline* (PBS), pH 7,0-7,4 yang mengandung penicillin (2000 unit/ml) dan streptomycin (2 mg/ml). Jaringan atau organ sampel dihaluskan untuk dibuat suspensi 10-20% (w/v) dalam larutan antibiotika. Suspensi ini diproses secepat mungkin setelah diinkubasi pada temperatur kamar selama 1-2 jam. Suspensi ini kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatnya diinkubasikan pada ruang alantois telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari dan diinkubasi selama 31-35 jam. Setelah itu telur-telur dimatikan embrionya dengan cara memasukkan pada suhu 4°C pada refrigerator. Cairan alantois dipanen dan diuji aktivitas hemaglutinasinya (HA) yaitu dengan dapat diaglutinasinya sel darah merah ayam yang direaksikan dengan cairan alantois infeksi. Adanya aktivitas HA menunjukkan kemungkinan terdapatnya virus avian influenza A atau avian paramyxovirus. Cairan alantois yang memberikan reaksi negatif dilakukan pasase lebih lanjut (OIE, 2000). Cairan alantois ini kemudian dilakukan isolasi RNA virus dan uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk mengkonfirmasi keberadaan virus avian influenza dan menentukan subtipenya.

Uji Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Ekstraksi RNA dilaksanakan dengan menggunakan *Trizol reagent*^R (*Life Technology*) dan dengan menggunakan metode sesuai instruksi penggunaan dengan modifikasi. Pelet RNA yang terbentuk diresuspensi dengan 10 µl *RNase-free water*. Suspensi RNA ini dapat langsung digunakan untuk

sampel pada pengujian RT-PCR atau dapat disimpan pada -20°C sampai digunakan. Primer yang di gunakan untuk RT-PCR adalah primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen Matrix: (1). Untuk mengamplifikasi gen Matrix avian influenza digunakan *primer* M52C dan M253R sesuai dengan Fouchier *et al.* (2000); (2) Untuk melakukan subtiping virus avian influenza dilakukan subtiping untuk avian influenza subtipe H5, karena subtipe ini adalah subtipe yang menyebabkan wabah pada tahun 2003 sampai awal 2004. Jika hasilnya negatif H5 maka identifikasi virus avian influenza akan dilanjutkan kepada subtiping H1-H15. Susunan oligonukleotida dari primer-primer tersebut adalah sebagai berikut Primer untuk gen Matrix sesuai dengan Fouchier *et al.* (2000). Primer Matrix disusun berdasarkan daerah *conserved* pada gen matrix, yang telah dirancang untuk *single-tube reverse transcription-PCR* untuk mendeteksi virus influenza A dari berbagai spesies (Fouchier *et al.*, 2000). Untuk subtiping virus avian influenza dengan menggunakan primer sesuai Lee *et al.* (2001). Pasangan primer yang spesifik untuk gen hemaglutinin (HA) biasanya berhubungan dengan virus avian influenza yang digunakan (Lee *et al.*, 2001). RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript one Step RT-PCR System* (Invitrogen) sesuai dengan instruksi penggunaan dengan mesin *Hybaid Termal Cycler*.

Parameter yang diamati

Parameter yang digunakan dalam penelitian, ini adalah adanya aktivitas hemaglutinasi yang menunjukkan keberadaan virus influenza atau virus paramyxo dan adanya amplifikasi hasil RT-PCR pada posisi 500-600bp untuk

virus avian influenza subtipe H5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi virus avian influenza

Semua isolat diperoleh dengan melakukan kunjungan ke lokasi wabah, kiriman dari peternak atau sesama kolega. Isolat merpati dan merak yang berasal dari Jakarta, empat isolat yang berasal dari Jawa Timur, satu isolat yang berasal dari Sulawesi Selatan diperoleh dari kiriman sesama kolega, sedangkan dua isolat yang berasal dari Purwakarta, tiga isolat yang berasal dari Sukabumi yang diisolasi pada bulan Januari 2004 berasal dari kiriman peternak, sisanya adalah hasil dari kunjungan ke lokasi wabah.

Hasil isolasi virus avian influenza yang berasal dari organ dan swab kloaka atau trakea dapat dilihat pada Tabel 1. Semua isolat diambil dari lokasi wabah dengan kematian mendadak, tanpa gejala klinis yang jelas dan membunuh hampir semua populasi yang ada. Pada Tabel 2 dapat dilihat beberapa isolat virus yang tidak menunjukkan aktivitas hemaglutinasi. Adanya aktivitas hemaglutinasi ditandai dengan adanya butiran-butiran seperti pasir setelah sel darah merah ayam direaksikan dengan isolat virus. Dengan metode ini, sepertinya wabah yang menimbulkan kematian tinggi ini tidak disebabkan karena virus avian influenza, karena tidak dapat dideteksinya virus ini dengan metode konvensional. Tetapi setelah dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan metode RT-PCR, isolat-isolat yang tidak menunjukkan aktivitas hemaglutinasi dengan uji RT-PCR dapat dideteksi adanya virus avian influenza

Uji RT-PCR

Semua isolat yang diuji

Tabel 1. Sampel unggas yang diambil dari beberapa daerah wabah, hasil isolasi virus avian influenza dan nama isolat.

Induk Semang	Sampel	Daerah wabah	Bulan isolasi	Isolasi Virus	Nama Isolat
Itik	organ	Pandlegang	Okt-04	-	A/Duck/Banten/Pdgl-2/2004
Merak putih	organ	Jakarta	Okt-04	-	A/Peacock/Jakarta/labB-2/2004
Ayam	swab kloaka	Purwakarta	Des-04	+	A/Chicken/West Java/PwtB1/2004
Ayam	swab kloaka	Purwakarta	Des-04	-	A/Chicken/West Java/PwtA1/2004
Merpati	organ	Jakarta	Des-04	+	A/Chicken/Jakarta/PgD/2004
Angsa	swab kloaka	Bogor	Jan-04	+	A/Goose/West Java/Bgr-Sbago1/2/2005
Entok	organ	Bogor	Jan-04	+	A/Muscovy duck/West Java/Bgr-Sbago2/2/2005
Perkutut	organ	Bogor	Jan-04	+	A/Small turtledove/West Java/Bgr-Sbago3/2/2005
Ayam	organ	Sukabumi	Jan-04	+	A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005
Ayam	organ	Sukabumi	Jan-04	+	A/Chicken/West Java/Smi31M-2/2005
Ayam	organ	Subang	Jan-04	+	A/Chicken/West Java/Sbg-81/2/2005
Ayam	organ	Sukabumi	Feb-04	+	A/Chicken/West Java/Smi-Mah/brs2/2005
Itik	swab kloaka	Sukabumi	Feb-04	+	A/Duck/west Java/Smi-Rum/2/2005
Ayam	organ	Sukabumi	Feb-04	+	A/Chicken/West Java/Smi-Ijum/brs2/2005
Ayam	organ	Sukabumi	Feb-04	+	A/Chicken/West Java/Smi-Hayati/brs2/2005
Ayam	organ	Subang	Feb-04	+	A/Chicken/West Java/Sbg2-weni2/2005
Ayam	swab trakea	Surabaya	Feb-04	+	A/Chicken/East Java/Sby-Nid2/2005
Ayam	swab trakea	Malang	Feb-04	-	A/Chicken/East Java/Mlg-Nid/2/2005
Ayam	swab trakea	Mojokerto	Feb-04	+	A/Chicken/East Java/Mjkt/Nid2/2005
Ayam	swab trakea	Blitar	Feb-04	+	A/Chicken/East Java/Blitar3/Nidlay/2/2005
Ayam	organ	Wajo	Mar-04	+	A/Chicken/South Sulawesi/Wajo2/1/2005
Ayam	organ	Wajo	Mar-04	+	A/Chicken/South Sulawesi/Wajo4/1/2005
Ayam	organ	Sopeng	Mar-04	+	A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng6/1/2005

menunjukkan terdeteksinya virus avian influenza dengan dapat diamplifikasinya semua sampel dengan primer Matrix avian influenza. Hasil amplikon sebesar 200-300 bp sesuai dengan Fouchier *et al.* (2000)(Gambar 1 & 2). Uji dilanjutkan dengan melakukan subtiping avian influenza. Primer yang digunakan adalah primer untuk mengidentifikasi subtipe H5, mengingat kasus yang terjadi menimbulkan kematian yang tinggi dan mendadak sehingga kemungkinan, wabah disebabkan oleh virus avian influenza *highly pathogenic* yaitu H5N1. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa wabah disebabkan oleh virus avian influenza

subtipe H5 dengan amplikon sebesar 500-600 bp dan sesuai dengan Lee *et al.* (2001) (Gambar 3 & 4).

Sejak akhir tahun 2003 sampai sekarang, Indonesia masih belum dapat membebaskan dari penyakit avian influenza. Dharmayanti *et al.* (2004a) dalam penelitiannya telah mendiagnosa penyebab wabah yang banyak menimbulkan kematian pada ayam petelur, burung puyuh dan burung onta yang terjadi pada tahun akhir tahun 2003 sampai Februari 2004 yaitu disebabkan oleh virus avian influenza subtipe H5. Penelitian lebih lanjut yang dilakukan Dharmayanti *et al.* (2004b)

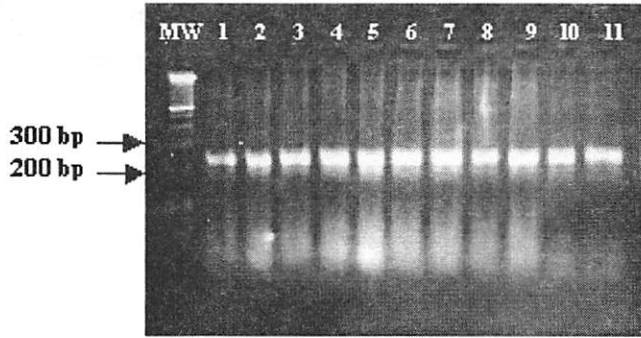
Tabel 2. Hasil amplifikasi RT-PCR dengan primer Matrix dan primer H5 avian influenza

No	Nama Isolat	RT-PCR Matrix (200-300 bp)	RT-PCR H5 (500-600bp)
1	A/Duck/Banten/Pdgl-2/2004	+	+
2	A/Peacock/Jakarta/labB-2/2004	+	+
3	A/Chicken/West Java/PwtB1/2004	+	+
4	A/Chicken/West Java/PwtA1/2004	+	+
5	A/Chicken/Jakarta/PgD/2004	+	+
6	A/Goose/West Java/Bgr-Sbagyo1/2/2005	+	+
7	A/Muscovy duck/West Java/Bgr-Sbagyo2/2/2005	+	+
8	A/Small turtledove/West Java/Bgr-Sbagyo3/2/2005	+	+
9	A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005	+	+
10	A/Chicken/West Java/Smi31M-2/2005	+	+
11	A/Chicken/West Java/Sbg-81/2/2005	+	+
12	A/Chicken/West Java/Smi-Mah/brs2/2005	+	+
13	A/Duck/west Java/Smi-Rum/2/2005	+	+
14	A/Chicken/West Java/Smi-Ijum/brs2/2005	+	+
15	A/Chicken/West Java/Smi-Hayati/brs2/2005	+	+
16	A/Chicken/West Java/Sbg2-weni2/2005	+	+
17	A/Chicken/East Java/Sby-Nid2/2005	+	+
18	A/Chicken/East Java/Mlg-Nid/2/2005	+	+
19	A/Chicken/East Java/Mjkt/Nid2/2005	+	+
20	A/Chicken/East Java/Blitar3/Nidlay/2/2005	+	+
21	A; Chicken/South Sulawesi/Wajo2/1/2005	+	+
22	A/Chicken/South Sulawesi/Wajo4/1/2005	+	+
23	A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng6/1/2005	+	+

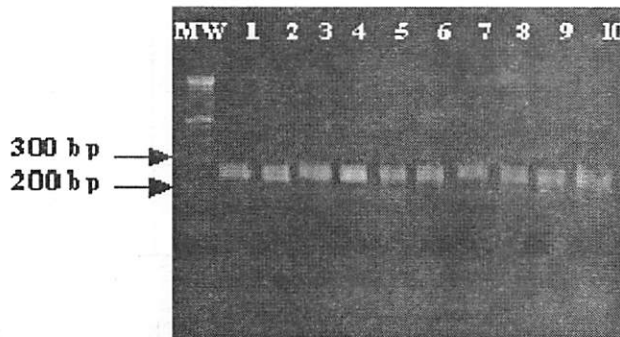
mengkarakterisasi secara molekuler virus avian influenza pada wabah Oktober 2003 sampai Oktober 2004 menunjukkan bahwa wabah avian influenza yang terjadi pada periode itu disebabkan oleh avian influenza subtipe H5NI *highly pathogenic*.

Setelah wabah pada bulan Februari 2004, beberapa pendapat dikalangan peternak menyatakan bahwa virus avian influenza yang sekarang menginfeksi telah berubah menjadi virus avian influenza selain subtipe H5, yang tidak ganas. Pendapat ini berdasarkan

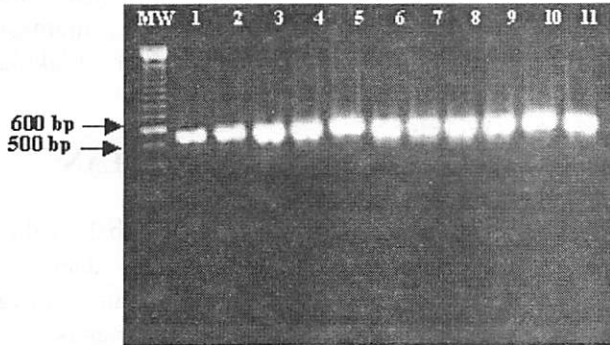
gejala klinis yang ditemukan peternak tidak seperti pada wabah avian influenza yang lalu. Ayam hanya mengalami penurunan produksi telur saja. Tetapi upaya untuk melakukan indentifikasi lebih lanjut tidak pernah dilakukan. Virus avian influenza merupakan virus yang mudah melakukan mutasi dengan cara *antigenic drift* atau dengan *antigenic shift* (Murphy & Webster, 1996). Virus ini mempunyai delapan segmen genom RNA sehingga secara teoritis dapat terbentuk 256 kombinasi yang berbeda (Webster &



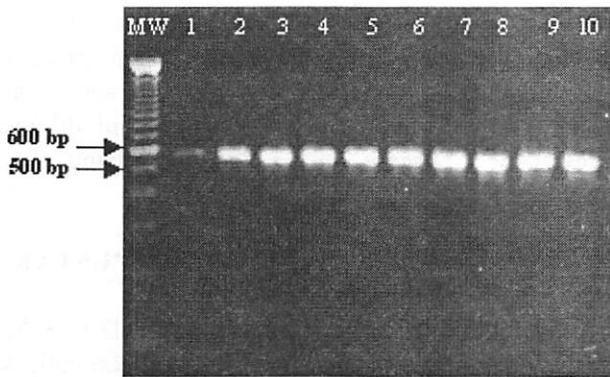
Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan primer matrix avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100bp, lubang nomor 1 sampai 10 adalah berturut-turut isolat A/Duck/Banten/Pdgl-2/2004, A/Peacock/Jakarta/labB-2/2004, A/Chicken/West Java/PwtB1/2004, A/Chicken/West Java/PwtA1/2004, A/Chicken/Jakarta/PgD/2004, A/Goose/West Java/Bgr-Ciawi/2/2005, A/Muscovy duck/West Java/Bgr-Ciawi2/2/2005, A/Small turtledove/West Java/Bgr-Ciawi/2/2005, A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005, A/Chicken/West Java/Smi31M-2/2005, A/Chicken/West Java/Sbg-81/2/2005. Besar amplikon adalah sekitar 200-300 bp



Gambar 2. Hasil amplifikasi dengan primer matrix avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100bp, lubang nomor 1 sampai 10 adalah isolat A/Chicken/West Java/Smi-Mah/brs2/2005, A/Duck/west Java/Smi-Rum/2/2005, A/Chicken/West Java/Smi-Ijum/brs2/2005, A/Chicken/West Java/Smi-Hayati/brs2/2005, A/Chicken/West Java/Sbg2-weni2/2005, A/Chicken/East Java/Mjkt/Nid2/2005, A/Chicken/East Java/Blitar3/Nidlay/2/2005, A/Chicken/South Sulawesi/Wajo2/1/2005, A/Chicken/South Sulawesi/Wajo4/1/2005, A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng6/1/2005. Besar amplikon adalah sekitar 200-300 bp



Gambar 3. Hasil amplifikasi dengan primer H5 avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100bp, lubang nomor 1 sampai 11 adalah isolat A/Duck/Banten/Pdgl-2/2004, A/Peacock/Jakarta/labB-2/2004, A/Chicken/West Java/PwtB1/2004, A/Chicken/West Java/PwtA1/2004, A/Chicken/Jakarta/PgD/2004, A/Goose/West Java/Bgr-Ciawi/2/2005, A/Muscovy duck/West Java/Bgr-Ciawi/2/2005, A/Small turtledove/West Java/Bgr-Ciawi/2/2005, A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005, A/Chicken/West Java/Smi31M-2/2005, A/Chicken/West Java/Sbg-81/2/2005. Besar ampikon adalah sekitar 500-600 bp



Gambar 4. Hasil amplifikasi dengan primer H5 avian influenza. Lubang MW adalah *molecular weight* 100bp, lubang nomor 1 sampai 10 adalah isolat A/Chicken/West Java/Smi-Mah/brs2/2005, A/Duck/west Java/Smi-Rum/2/2005, A/Chicken/West Java/Smi-Ijum/brs2/2005, A/Chicken/West Java/Smi-Hayati/brs2/2005, A/Chicken/West Java/Sbg2-weni2/2005, A/Chicken/East Java/Mjkt/Nid2/2005, A/Chicken/East Java/Blitar3/Nidlay/2/2005, A/Chicken/South Sulawesi/Wajo2/1/2005, A/Chicken/South Sulawesi/Wajo4/1/2005, A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng6/1/2005. Besar ampikon adalah sekitar 500-600 bp

Laver, 1975). Virus avian influenza dapat menginfeksi beberapa spesies unggas yang sudah didomestikasi atau unggas liar seperti ayam, kalkun, itik puyuh dan lain sebagainya (Webster & Kawaoka, 1988; Easterday *et al.*, 1997). Di Indonesia, virus ini telah menginfeksi berbagai macam spesies unggas seperti pada penelitian ini yaitu ayam, merpati, merak, itik, burung perkutut, angsa dan entok. Berdasarkan pengalaman pada wabah tahun 2003, peternak menduga kematian unggas miliknya disebabkan oleh avian influenza, karena jika disebabkan penyakit lainnya seperti Newcastle Disease biasanya akan menunjukkan gejala klinis terlebih dahulu, seperti tortikolis, kurangnya napsu makan dan kelumpuhan. Untuk memastikan penyebab kematian ribuan unggas ini, maka dilakukan identifikasi agen infeksi yang paling mengarah yaitu dilakukan isolasi virus. Pengujian terhadap hasil isolasi virus menunjukkan sebagian besar isolat mempunyai aktivitas hemaglutinasi yang menyimpulkan bahwa ada agen infeksi seperti avian influenza atau virus *paramixo* seperti Newcastle Disease. Untuk isolat yang tidak menunjukkan aktivitas hemaglutinasi dipasase lebih lanjut dan diuji dengan RT-PCR. Pengujian dilanjutkan untuk memastikan jenis virus yang menginfeksi dengan melakukan uji RT-PCR menggunakan primer Matrix. Uji ini menunjukkan bahwa semua isolat adalah virus avian influenza. Untuk memastikan subtipe virus avian influenza, RT-PCR dilakukan dengan menggunakan primer H5. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa semua isolat yang menginfeksi berbagai jenis unggas tersebut disebabkan oleh avian influenza subtipe H5. Jadi virus avian influenza yang bersirkulasi di Indonesia masih virus

avian influenza subtipe H5. Untuk memastikan tipe NA-nya maka akan dilakukan penelitian lebih lanjut.

KESIMPULAN

Wabah pada unggas yang terjadi di beberapa daerah di Indonesia dan menimbulkan banyak kematian pada populasi unggas pada periode Oktober 2004 sampai dengan Maret 2005 masih disebabkan oleh virus avian influenza subtipe H5.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Sukabumi, Purwakarta, Jakarta, Pandeglang, para peternak dan sesama kolega yang sangat membantu dalam monitoring dinamika virus avian influenza di Indonesia. Ucapan terima kasih kepada Bapak Nana Suryana, Heri Hoerudin dan Agus Winarsongko atas bantuan teknisnya. Penelitian ini dibiayai oleh APBN-2004, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J., S.A. Lister, M.J. Johnson, C.J. Randall, & P.J. Thomas. 1993. An outbreak of highly pathogenic avian influenza in turkeys in Great Britain in 1991. *Vet Rec.* 132 : 535-536.
- Bean, W.J., Y. Kawaoka, J.M. Wood, J.E. Pearson, & R.G. Webster. 1985. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 viruses : potential role of defective interfering RNAs in nature. *J. Virol.*

- 54 : 151-160.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1998. Update: isolation of avian influenza A (H5N1) viruses from humans-Hongkong, 1997-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 46 : 1245-1247.
- Claas, E.C.J., A.D.M.E. Osterhaus, R. van Beek, J.C. de Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A. Krauss, K.F. Shortridge, & R.G. Webster. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. 351 : 472-477.
- Dharmayanti, NLP I., R. Damayanti, A. Wiyono, R. Indriani, & Darminto. 2004a. Identifikasi virus avian influenza Indonesia dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *JITV*. 9(2) : 136-142.
- Dharmayanti, NLP I., R. Damayanti, A. Wiyono, R. Indriani, & Darminto. 2004b. Karakterisasi Molekuler Virus Avian Influenza Indonesia pada bulan Oktober 2003-2004. Laporan Teknis Hasil Penelitian. Balitvet. Bogor.
- Easterday, B.C., V.S Hinshaw, & D.A. Halvorson. 1997. Influenza Diseases of Poultry. Dalam : Calnek, B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, & Y.M.Saif (eds.). *Disease of Poultry*, 9th Ed. Iowa State University Press. Ames. h. 583-605.
- Ellis, J.S. & M.C. Zambon. 2001. Combined PCR-Heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species. *J. Clin Microbiol*. 39 : 4097-4102.
- Fouchier, R.A.M., T.M. Bestebroer, S. Herfst., L. Van der Kemp, G.F. Rimmelzwaan, & A.D.M.E. Osterhaus. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol*. 38. 11 : 4096-4101.
- Guo, Y.J., F.G. Jin., P. Wang, M. Wang, & J.M. Zhu. 1983. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J. Gen Virol*. 64 : 177-182.
- Harimoto, T., E. Rivera., J. Pearson., D. Senne., S. Krauss, Y. Kawaoka, & R.G. Webster. 1995. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology*. 213 : 223-230.
- Lamb, R.A and R.M. Krug. 1996. Orthomyxoviridae : the viruses and their replication. Dalam: Fields B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howly (eds). *Fields Virology*. 3rd Ed. Lippincott-Raven. Philadelphia, Pa. h. 1353-1395.
- Lee, M.S., P.C. Chang, J.H. Shien, M.C. Cheng, & H.P. Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J.Virol. Methods*. 97 : 13-22.
- Murphy, B.R. & R.G. Webster. 1996. Orthomyxoviruses. Dalam : Fields, B.N., D.M. Knipe, & P.M.Howley (eds.). *Fields virology*, 3rd Ed. Ippincott-Raven. Philadelphia. h. 1397-1445
- OIE. 2000. *Manual of Standards for Diagnostik tests and vaccines*. h. 212 -219.

- Osterhaus, A.D., F. Rimelzwaan, B.E. Marthina, T.M. Besterbroer, & R.A. Fouchier. 2000. Influenza B in seals. *Science* 288 : 1051-1053.
- Suarez, D., M. Perdue, N. Cox, T. Rowe, C. Bender, J. Huang, & D.E. Swayne. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza viruses isolated from human and chicken from Hong Kong. *J. Virol.* 72 : 6678-6688.
- Swayne, D. E. 1997. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza viruses for chickens. *Vet. Pathol.* 34 : 557-567.
- Swayne, D.E., M. Perdue, M. Garcia, E. Rivera-Cruz, & M. Brugh. 1997. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chicken. *Avian Dis.* 41 : 335-346.
- Webster, R.G. & W.G. Laver. 1975. Antigenic variation of influenza viruses. *Dalam* : Kilbourne, E.D. (ed.). *The influenza viruses and influenza*. Academic Press, Inc. New York, NY. h. 270-314.
- Webster, R.G. & Y. Kawaoka. 1988. Avian influenza. *Crit. Rev. Poult. Bio.* 1 : 211-246.