

Pengembangan Sejumlah Primer untuk *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* Guna Melacak Virus Flu Burung di Indonesia

*(DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR REVERSE TRANSCRIPTASE
POLYMERASE CHAIN REACTION TO DETECT AVIAN INFLUENZA VIRUS
IN INDONESIA)*

Ni Luh Putu Indi Dharmayanti, Risza Hartawan, Dyah Ayu Hewajuli

Bagian Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner,
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian Republik Indonesia
Jln. RE Martadinata No 30, Bogor 16114, Indonesia
Telp. +62 251 8331048; Email : nlpdharmayanti@yahoo.com

ABSTRAK

Situasi virus flu burung atau *avian influenza* (AI) di Indonesia sampai saat ini telah bersirkulasi dua jenis *clade* virus AI yaitu *clade* 2.1.3 dan 2.3.2 serta juga terdapat varian virus AI yang terjadi akibat mutasi virus AI. Kondisi ini membutuhkan beberapa evaluasi di antaranya adalah metode untuk deteksi dan diagnosis virus AI di lapang. Metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk mendeteksi virus AI di Indonesia telah menjadi standar di banyak laboratorium di Indonesia. Keberhasilan metode RT-PCR dalam mendeteksi virus AI sangat tergantung pada kecocokan sekuen nukleotida primer dengan virus yang bersirkulasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode RT-PCR dengan mendisain dan menggunakan primer AI subtipe H5 untuk meningkatkan keberhasilan dalam mendeteksi virus AI di lapang. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah mendisain primer dengan menggunakan *software Primer Design*, optimasi dan validasi primer dilakukan dengan menggunakan virus AI yang telah dikarakterisasi sebelumnya, serta melakukan RT-PCR pada sampel lapang yang dikoleksi untuk menguji sensitivitas dan spesifisitas primer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer H5 yang didisain pada penelitian ini yaitu H5-ID dan H5-NLP mampu mendeteksi virus AI pada sampel lapang lebih baik dibandingkan dengan primer spesifik H5 yang digunakan sebelumnya. Simpulan dari penelitian ini memperlihatkan bahwa disain primer H5 yang disesuaikan dengan virus AI yang bersirkulasi di lapang memperlihatkan hasil yang lebih baik dalam mendeteksi virus AI. Virus AI subtipe H5N1 di lapangan selalu berubah dan berevolusi sehingga penelitian menyarankan dalam mendiagnosis virus AI subtipe H5 dengan menggunakan metode RT-PCR, sebaiknya menggunakan lebih dari satu set primer spesifik subtipe H5.

Kata-kara kunci : pengembangan primer, virus *avian influenza*, subtipe H5, RT-PCR

ABSTRACT

Until recently, two clades of avian influenza viruses (AIVs) designated as 2.3.2 and 2.2.3 have been circulating in Indonesia. Mutations of AIV genes have created many more variants of the virus. It is therefore important to evaluate the appropriate methods used for the detection and diagnosis of AI virus in the field. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) have been used as a standard method for detection of AIV in many laboratories in Indonesia. The success of RT-PCR for detection of AIV virus is dependent on the nucleotide sequences of primer that match with the circulating of AIVs. The aims of this study was to develop RT-PCR by designing primers for H5 subtype specific to the circulating AIVs in the field. The primers were designed using Primer Design software, and optimization and validation of the primer were conducted using AIVs that have been characterized in the previous study. The primers were then used RT-PCR using AIV isolates from field samples and their sensitivity and specificity were then determined. The results showed that the H5 primers designed in this study, H5-ID and H5-NLP, was able to detect the AIVs in field samples better than the H5-specific primers have been used previously. In conclusion, H5 primers designed based on recent viruses in the field showed better results in the detection of AI virus as compared to the previous primers. As AIV-H5N1 subtype in the field will continue to change and evolve, the use of primers designed in this study is recommended for diagnosis of H5 AIV.

Keywords : Development, primer, avian influenza virus, H5 subtype, RT-PCR

PENDAHULUAN

Virus influenza termasuk kelompok virus RNA berpolaritas negatif, famili *Orthomyxoviridae* yang diklasifikasikan menjadi tipe A, B, dan C berdasarkan pada mayoritas antigen protein internal yaitu nukleoprotein (NP) dan matriks (M1). Virus influenza-A adalah virus yang paling virulen dari tiga tipe influenza tersebut dan dapat menyebabkan penyakit saluran pernapasan dengan rentang gejala ringan sampai parah dan kadang bersifat fatal. Influenza A diklasifikasikan ke dalam beberapa subtipe berdasarkan antigenisitas kedua protein permukaan yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Protein permukaan virus yang telah diidentifikasi pada unggas sampai saat ini terdapat sebanyak 16 subtipe HA (H1-H16) dan sembilan subtipe NA (N1-N9) (Rohm *et al.*, 1996; Lamb dan Krug., 2001; Wright dan Webster, 2001; Fouchier *et al.*, 2005).

Sampai pada tahun 2014 dan awal 2015, sirkulasi virus flu burung/avian influenza (AI) di Indonesia telah didominasi oleh dua jenis *clade* yaitu *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2 (Dharmayanti *et al.*, 2014b). Berkembangnya kedua jenis *clade* di Indonesia tentunya membutuhkan beberapa evaluasi, di antaranya adalah deteksi dan diagnosis virus AI di lapang.

Metode yang digunakan untuk mendiagnosis penyakit AI umumnya meliputi isolasi virus, *Hemagglutination Inhibition* (HI), *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan beberapa jenis metode molekuler seperti *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan *Realtime Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) (OIE, 2014; WHO, 2002). Isolasi virus AI merupakan metode *reference standar* dalam mendiagnosis virus AI, namun metode ini membutuhkan waktu yang lama karena harus ditumbuhkan pada telur embrio bertunas atau biakan sel, membutuhkan partikel virus hidup dengan jumlah yang cukup banyak. Meskipun isolasi virus sangat sensitif namun tidak spesifik karena agen penyakit lain seperti virus *avian paramyxovirus* lainnya dapat tumbuh bersama spesimen yang kita tumbuhkan dalam telur embrio bertunas ataupun biakan sel (Swayne *et al.*, 1998). Seiring dengan kemajuan teknologi molekuler, instrumen penting dalam mendeteksi AI berdasarkan asam nukleat virus dalam mendeteksi subtipe HA atau NA menggunakan metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menjadi satu pilihan yang banyak digunakan

untuk mendeteksi berbagai macam agen penyakit termasuk AI (Starick *et al.*, 2000; Poddar, 2002).

Metode RT-PCR untuk mendeteksi influenza-A dan subtipe virus influenza dikembangkan oleh beberapa peneliti di antaranya adalah Fouchier *et al.* (2000); Lee *et al.* (2001), Wright *et al.* (1995); Takano *et al.* 2009; Tanga *et al.* 2012. Metode berbasis RT-PCR digunakan oleh laboratorium-laboratorium yang bertanggung jawab terhadap deteksi dan diagnosis AI menggunakan RT-PCR ataupun qRT-PCR untuk menapis AI dari sampel lapang. Penggunaan metode RT-PCR tentunya harus disertai dengan kecocokan primer yang digunakan dengan virus yang bersirkulasi di lapang. Dalam perkembangannya, virus AI di Indonesia yang bersirkulasi sejak tahun 2004 telah banyak mengalami mutasi, dan menciptakan varian-varian virus AI yang bersirkulasi di lapang (Dharmayanti *et al.*; 2004; Wiyono *et al.*, 2004; Dharmayanti, 2009). Mudahnya virus AI bermutasi dan bersirkulasinya varian-varian virus AI serta bersirkulasinya dua jenis *clade* virus AI di Indonesia, seharusnya dilakukan evaluasi terhadap metode diagnosis AI terutama kemampuan primer dalam mengamplifikasi virus AI dalam metode RT-PCR yang digunakan.

Situasi AI terkini berdasarkan laporan Unit Reaksi Cepat-Penyakit Hewan Menular Strategis (URC-PHMS) pusat Direktorat Kesehatan Hewan-Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan (PKH) sejak 2007 s/d 2014, perkembangan kasus AI pada unggas di Indonesia menunjukkan kecenderungan penurunan yang cukup signifikan setiap tahunnya. Pada tahun 2007 desa dengan kasus positif AI mencapai 2.751, menurun pada tahun 2011 menjadi 1.390, lalu pada tahun 2012 menurun menjadi 546 dan pada 2013 menjadi 470, tahun 2014 menurun menjadi 346 kasus. Laporan terkini sampai Januari 2015 adalah sebanyak 10 kasus. Sebaran terjadinya kasus wabah AI selama setahun menunjukkan pola musiman, dan peningkatan kasus terjadi pada musim hujan/basah (Ditjenak, 2014).

Meskipun terjadi penurunan kasus AI namun tidak dapat diartikan bahwa virus AI tidak bersirkulasi lagi, karena data menunjukkan bahwa sirkulasi virus AI tidak hanya terjadi di peternakan unggas namun juga terjadi di pasar tradisional yang menjual unggas dan produk unggas lainnya. Banyak sampel yang terdeteksi sebagai virus AI namun tidak

terdeteksi sebagai virus AI subtipe H5. Ketidakberhasilan dalam mendeteksi subtipe virus AI dapat disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya adalah kemungkinan sampel tersebut adalah virus AI bukan subtipe H5 namun subtipe lainnya, atau primer yang digunakan dalam metode RT-PCR untuk mendeteksi virus AI sudah tidak cocok lagi. Ketidakcocokan primer mungkin karena adanya mutasi pada virus AI tersebut pada lokasi bertepatan dengan disain primer tersebut. Hal tersebut tentunya akan menimbulkan banyak kegagalan dalam mendeteksi virus AI subtipe H5 sehingga diperlukan disain primer spesifik baru yang dapat mendukung meningkatnya keberhasilan dalam mendeteksi sirkulasi virus AI di lapang. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan beberapa set primer spesifik subtipe H5 virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia untuk meningkatkan keberhasilan deteksi virus AI di lapang.

METODE PENELITIAN

Virus AI dan Sampel Lapang

Virus AI yang digunakan dalam studi ini adalah beberapa virus AI yang diisolasi dari tahun 2003 sampai dengan tahun 2013 (Tabel 3). Virus-virus tersebut telah diidentifikasi dan dikarakterisasi pada penelitian sebelumnya sebagai virus AI subtipe H5N1 (Dharmayanti *et al.*, 2004; Dharmayanti, 2009; Dharmayanti dan Darminto, 2009; Dharmayanti *et al.*, 2012).

Selain virus AI yang telah dikarakterisasi juga digunakan sampel lapang yang dikoleksi pada tahun 2014 berupa usap kloaka unggas dan sampel lingkungan. Sampel-sampel lapang ini pertama kali diidentifikasi dengan menggunakan primer matriks untuk menentukan virus influenza tipe-A (Fouchier *et al.*, 2000). Selanjutnya jika positif teridentifikasi sebagai virus AI tipe A, maka dilanjutkan dengan uji RT-PCR menggunakan primer subtipe H5 sesuai dengan metode Lee *et al.* (2001) dan primer yang didisain pada penelitian ini.

Ekstraksi RNA Virus AI

Cairan alantois hasil panen virus AI yang digunakan pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan Uji Hemagglutinasasi (HA) untuk mengetahui apakah isolat tersimpan masih mampu mengaglutinasi sel darah merah ayam. Setelah itu diambil sebanyak 140 μ L cairan alantois untuk diekstraksi dengan menggu-

nakan QIAmp RNA mini kit (Qiagen) sesuai dengan instruksi penggunaan, sedangkan untuk sampel lapang, sebanyak 1 mL sampel lapang dalam larutan transpor media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) di sentrifugasi dengan kecepatan 1500-3000 rpm selama 15 menit dan selanjutnya diambil sebanyak 140 μ L untuk diekstraksi dengan menggunakan reagen dan metode yang sama pada waktu mengekstraksi virus dalam cairan alantois.

Disain Primer dan Kondisi Reaksi RT-PCR

Disain primer spesifik H5 dilakukan pada penelitian ini adalah berdasarkan informasi sekuen nukleotida pada gen Hemagglutinin (HA) virus AI asal Indonesia yang diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan sekuen gen HA yang telah dipublikasi pada penelitian sebelumnya (Dharmayanti *et al.*, 2011a; Dharmayanti *et al.*, 2011b; Dharmayanti *et al.*, 2012; Dharmayanti *et al.*, 2014b). Selanjutnya *multiple sequence alignment* gen HA virus AI dilakukan dengan menggunakan program *Bioedit version 7* (www.mbio.ncsu.edu). Primer spesifik pertama (H5-NLP) didisain berdasarkan sekuen nukleotida pada gen HA1 virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 yang merupakan virus AI *clade* 2.1.3, primer spesifik kedua (H5-ID) didisain berdasarkan sekuen nukleotida gen HA1 virus A/Environment/East Java/LM13 (*clade* 2.3.2.1). Disain primer ini menggunakan *software Primer Design*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Disain primer pertama berdasarkan sekuen nukleotida pada gen HA1 virus A/Chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 yang mewakili virus H5N1 *clade* 2.1.3 serta disain primer kedua yang berdasarkan virus Indonesia *clade* 2.3.2.1 yaitu A/Environment/East Java/LM13 mempunyai susunan nukleotida seperti disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 2 diperlihatkan kondisi reaksi RT-PCR yang digunakan untuk primer yang didisain pada penelitian ini.

Pengujian dengan Virus AI Indonesia

Primer yang didisain pada penelitian ini diuji terlebih dahulu terhadap virus RNA lainnya seperti tetelo/*Newcastle Diseases* (ND) dan *Infectious Bronchitis* (IB) untuk mengetahui bahwa primer ini hanya spesifik terhadap virus AI. Hasil pengujian spesifisitas primer

Tabel 1. Urutan sekuen nukleotida primer spesifik flu burung/*avian influenza* sub tipe H5 yang didisain pada penelitian ini

Disain	Nama primer	Sekuens nukleotida	Posisi primer pada gen HA	Besar amplikon (<i>Base pairs</i> , bp)
1	H5-NLP86F	5'-CAGAGCAGGTTGACACAATC-3'	86	377
	H5-NLP463R	5'-CCAGGTATGGACATGCTGAG-3'	463	
2	H5-ID252F	5'-CGAATTCACCAATGTGCCAG-3'	252	637
	H5-ID889R	5'-GAGTCTGACACCTGGTGTG-3'	889	

Tabel 2. Kondisi dan program *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* untuk primer spesifik flu burung/*avian influenza* sub tipe H5 yang didisain pada penelitian ini

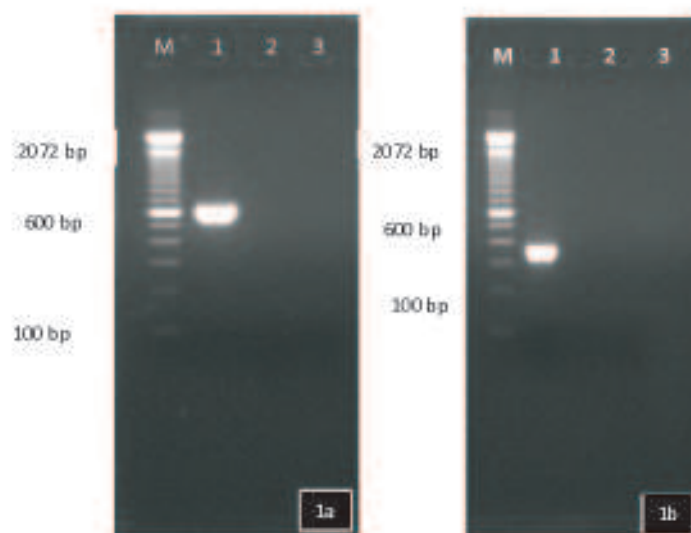
Kondisi	<i>Reverse Transcriptase (RT)</i>		<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>			
	RT	Pre-denaturasi	Denaturasi	Annealing	Ekstensi	Final ekstensi
Suhu (°C)	42	95	95	53	72	72
Durasi (menit)	45	3	30 detik	40 detik	40 detik	10
Jumlah siklus	1	1	35	35	35	1

menunjukkan bahwa primer H5-NLP dan H5-ID tidak dapat mengamplifikasi virus ND ataupun IB yang ditunjukkan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 diperlihatkan bahwa primer H5-NLP dan H5-ID menunjukkan hasil positif mengamplifikasi virus AI (RJL24) dan hasil negatif jika digunakan untuk mengamplifikasi virus ND strain Ita dan virus IB strain I-37.

Selanjutnya, hasil pengujian RT-PCR

dengan menggunakan virus AI seperti pada Tabel 3 menunjukkan bahwa primer H5-NLP (H5-NLP86F dan H5-NLP463R) dan H5-ID (H5-ID252F dan H5-ID889R) dapat mengamplifikasi virus AI sub tipe H5N1.

Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh primer H5 (Lee *et al.*, 2001) yang umum digunakan untuk mendeteksi virus AI sub tipe



Gambar 1. Hasil amplifikasi virus AI (RJL24), ND (Ita) dan IB (I-37) terhadap primer spesifik H5-ID (1a) dan H5-NLP (1b). Keterangan Gambar M (Marker 100bp), 1 (isolat virus AI, RJL24), 2 (ND Ita) dan 3 (IB I-37).

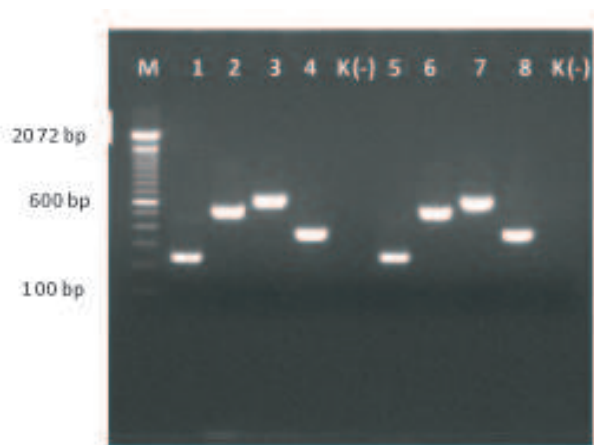
Tabel 3. Virus flu burung/*avian influenza* sub tipe H5N1 yang digunakan pada pengujian terhadap primer spesifik *avian influenza* sub tipe H5

No	Nama Isolat Virus AI	Hasil RT-PCR Primer		
		H5-Lee	H5-ID	H5-NLP
1	A/Chicken/West Java/Smi-M6/2008	Positif	Positif	Positif
2	A/Environment/West Java/Bks34/2013	Positif	Positif	Positif
3	A/Chicken/WestJava/Pwt-Wij/2006	Positif	Positif	Positif
4	A/Chicken/West Java/1074/2003	Positif	Positif	Positif
5	A/Duck/Central Java/Bres24/2013	Positif	Positif	Positif
6	A/Chicken/Bengkulu/RJL24/2013	Positif	Positif	Positif
7	A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006	Positif	Positif	Positif
8	A/MuscovyDuck/West Java/Bgr-Cw/2005	Positif	Positif	Positif
9	A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013	Positif	Positif	Positif
10	A/Quail/West Java/Smi-Py9/2011	Positif	Positif	Positif

H5 di Indonesia (Tabel 3) (Dharmayanti *et al.*, 2004; Dharmayanti *et al.*, 2011a; Dharmayanti *et al.*, 2011b; Hewajuli dan Dharmayanti, 2014, Dharmayanti *et al.*, 2014a; Dharmayanti *et al.*, 2014b). Hasil amplifikasi pada beberapa virus AI dari ketiga primer yaitu H5-Lee, H5-NLP dan H5-ID disajikan pada Gambar 2. Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa virus influenza A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 dan A/Chicken/Bengkulu/RJL24/2013 dapat diamplifikasi dan menunjukkan hasil positif dengan primer matriks influenza-A yang digunakan untuk mengamplifikasi virus influenza tipe A dan ketiga jenis primer spesifik AI sub tipe H5 (H5-Lee; H5-ID dan H5-NLP). Hasil positif ini ditunjukkan dengan amplifikasi dengan primer Flu A (Matrix) sebesar 200-300 bp, primer H5-Lee mempunyai ampikon sebesar 545bp, H5-NLP sebesar 377 bp dan H5-ID sebesar 637 bp.

Pengujian lanjutan dilakukan pada sampel lapang yang diperoleh dari *monitoring* virus AI di pasar tradisional di Banten, Jawa Tengah, dan Jawa Timur. Pada pengujian di Kabupaten Serang (Banten) memperlihatkan bahwa primer H5-Lee dapat mengamplifikasi dua dari 10 sampel, sedangkan primer H5-NLP dapat mengamplifikasi tiga dari sepuluh sampel, dan H5-ID tidak dapat mengamplifikasi target (Tabel 4).

Hal yang berbeda terjadi pada sampel lapang yang berasal dari Surabaya (Tabel 5), Lamongan (Tabel 6), dan Kota Malang (Tabel 7) yang



Gambar 2. Hasil amplifikasi virus *avian influenza* sub tipe H5N1 dengan menggunakan primer H5-Lee, H5-ID dan H5-NLP. No 1-4 menggunakan isolat virus A/Muscovy Duck/Banten/BR7/2013 sedangkan no 5-8 menggunakan isolat A/Chicken/Bengkulu/RJL24/2013. Keterangan Gambar adalah sebagai berikut : M (Marker),K(-)Kontrol Negatif, 1 (Isolat BR7, primer Matrix (Flu A)), 2 (Isolat BR7, primer H5-Lee), 3 (Isolat BR7, primer H5-ID), 4 (Isolat BR7, primer H5-NLP), 5 (Isolat RJL24, primer Matrix (Flu A)), 6 (Isolat RJL24, primer H5-Lee), 7 (Isolat RJL24, primer H5-ID), 8 (Isolat RJL24, primer H5-NLP)

Tabel 4. Hasil uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada sampel lapang asal Kabupaten Serang, Banten

No	Nama Petemak/ Pedagang	Alamat	Spesies/ Asal Sampel	Kode Sampel	Hasil RT-PCR			
					Flu A	H5.Lee	H5.ID	H5.NLP
1	SRG1	Pasar SRG Banten	Pisau	SR G25/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Telenan	SR G26/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Timbangan	SR G27/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
2	SRG 2	Pasar SRG Banten	Pisau	SR G29/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Timbangan	SR G31/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
3	SRG 3	Pasar SRG Banten	Baskom	SR G46/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Lantai	SR G85/2014	Positif	Positif	Negatif	Negatif
			Pisau	SR G87/2014	Positif	Positif	Negatif	Negatif
4	SRG 4	Pasar SRG Banten	Timbangan	SR G90/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Pisau	SRG 100/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
Positif					10	2	0	3
Persentase					100%	20%	0	30%

Tabel 5. Hasil uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada sampel lapang asal Kota Surabaya, Jawa Timur

No	Nama Petemak/ Pedagang	Alamat	Spesies/ Asal Sampel	Kode Sampel	Hasil RT-PCR				
					Flu A	H5.Lee	H5.ID	H5.NLP	
1	SB 1	Pasar SB Jatim	Tempat Sampah	SB.09/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif	
			Lantai	SB/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	
2	SB 2	Pasar SB Jatim	Telenan	SB.22/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif	
			Pencabut Bulu	SB.23/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif	
			Tempat Sampah	SB.24/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	
3	SB 3	Pasar SB Jatim	Lantai	SB.25/2014	Positif	Positif	Negatif	Positif	
			Pisau	SB.26/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	
			Telenan	SB.27/2014	Positif	Positif	Positif	Negatif	
4	SB 4	Pasar SB jatim	Pencabut Bulu	SB.28/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	
			Telenan	SB.32/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif	
			Telenan	SB.37/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	
			Lantai	SB.40/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif	
			Lantai	SB.44/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif	
4	SB 4	Pasar SB jatim	Pisau	SB.45/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	
			Telenan	SB.46/2014	Positif	Positif	Positif	Negatif	
			Pencabut Bulu	SB.47/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif	
Tempat Sampah					SB.48/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Jumlah Positif					17	3	6	7	
Persentase					100%	17%	35%	35%	

memperlihatkan bahwa primer H5-ID mampu mendeteksi 35% di Surabaya, 70% di Lamongan dan 94% di Kota Malang.

Primer H5-NLP (Tabel 5, 6, dan 7) menunjukkan kemampuan yang lebih rendah dalam mendeteksi virus AI di ketiga kabupaten/kota tersebut yaitu 35% (Surabaya), 4% (Lamongan), dan 17% (Malang). Namun, untuk Kota Solo (Tabel 8), primer H5-NLP mempunyai kemampuan deteksi yang lebih baik yaitu 85% terhadap virus AI subtipe H5N1 dibandingkan dengan primer H5-Lee dan H5-ID. Hasil penelitian ketiga jenis primer spesifik H5 menunjukkan bahwa primer H5-Lee mempunyai kemampuan deteksi terendah

terhadap AI, yaitu 12% (Solo), 1% (Lamongan), 3% (Surabaya), 0% (Malang), dan 20% (Serang). Pada Gambar 3 diperlihatkan amplikon hasil RT-PCR dari beberapa sampel lapang dengan menggunakan primer Influenza-A. Semua sampel lapang menunjukkan positif influenza-A yang ditunjukkan dengan amplifikasi pada posisi 200-300 bp (Fouchier *et al.*, 2000).

Pada Gambar 4, 5, dan 6 diperlihatkan hasil amplifikasi beberapa sampel lapang yang telah menunjukkan positif teridentifikasi sebagai influenza-A (Gambar 3) dan selanjutnya diuji dengan menggunakan primer spesifik subtipe H5 yaitu primer H5-Lee (Gambar 4), primer H5-ID (Gambar 5) dan primer H5-NLP (Gambar 6).

Tabel 6. Hasil uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada sampel lapang asal Kabupaten Lamongan, Jawa Timur

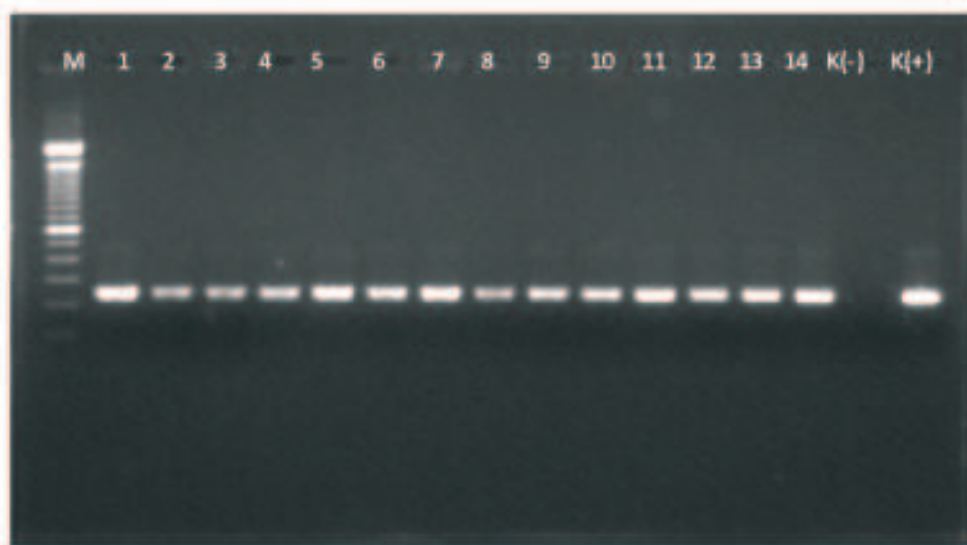
No	Nama Peternak/ Pedagang	Alamat	Spesies/ Asal Sampel	Kode Sampel	Hasil RT-PCR			
					Flu A	H5.Lee	H5.ID	H5.NLP
1	LA 1	Pasar LA Jatim	Entok	LA.13-Mr/Ci/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Entok					
			Ayam Kampung					
			Ayam Kampung					
			Ayam Kampung					
			Ayam Kampung					
			Ayam Kampung					
			Ayam Kampung					
			Ayam Kampung					
2	LA 2	Pasar LA Jatim	Pisau	LA.63/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Pencabut Bulu	LA.64/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Tempat Sampah	LA.65/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Lantai	LA.66/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Air Got	LA.67/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
3	LA 3	Pasar LA Jatim	Pisau	LA.68/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Tempat Sampah	LA.70/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Entok	LA.97/2014	Positif	Positif	Positif	Positif
				LA.98/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
				LA.99/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Itik	LA.100/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
				LA.101-Dk/Tr/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
4	LA 4	Pasar LA Jatim	Pisau	LA.72-Pisau/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Meja	LA.75-Meja/28/10/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Kain Lap	LA.76-KainLap/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
5	LA 5	Pasar LA Jatim	Pisau	LA.77-Pisau/28/10/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Telenan	LA.78-Telenan/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Timbangan	LA.79-Timbangan/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
6	LA 6	Pasar LA Jatim	Pisau	LA.82-Pisau/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Meja	LA.85-Meja/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Kain Lap	LA.86-KainLap/28/10/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Jumlah Positif					24	1	17	1
Persentase					100%	4%	70%	4%

Tabel 7. Hasil uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada sampel lapang asal Kota Malang, Jawa Timur

No	Nama Peternak/ Pedagang	Alamat	Spesies/ Asal Sampel	Kode Sampel	Hasil RT-PCR			
					Flu A	H5.Lee	H5.ID	H5.NLP
1	ML 1	Pasar ML Jatim	Pencabut Bulu	ML.18/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Tempat Sampah	ML.19/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
			Lantai	ML.20/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
2	ML 2	Pasar ML Jatim	Pisau	ML.47/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Telenan	ML.48/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Pencabut Bulu	ML.49/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Entok	ML.55/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Entok					
			Entok					
			Entok					
			Entok					
			Entok	ML.56/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Entok	ML.57/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Entok								
Entok								
Pisau	ML.60/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif			
Telenan	ML.61/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif			
Meja	ML.62/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif			
Pencabut Bulu	ML.63/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif			
Tempat Sampah	ML.64/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif			
Lantai	ML.65/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif			
3	ML 3	Pasar ML Jatim	Pisau	ML.74/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Telenan	ML.75/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Tempat Sampah	ML.77/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Lantai	ML.78/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
					17	0	16	3
Positif					17	0	16	3
Persentase					100%	0	94%	17%

Tabel 8. Hasil uji *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada sampel lapang asal Kota Solo, Jawa Tengah

No	Nama Peternak/ Pedagang	Alamat	Spesies/ Asal Sampel	Kode Sampel	Hasil RT-PCR			
					Flu A	H5.Lee	H5.ID	H5.NLP
1	SLO 1	Pasar SLO Jateng	Ayam Layer Ayam Layer Ayam Layer Lantai Kandang	SLO.18/2014	Positif	Positif	Negatif	Positif
2	SLO 2	Pasar SLO Jateng	Pisau	SLO.24/2014	Positif	Negatif	Negatif	Negatif
			Telenan	SLO.31/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Meja	SLO.32/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
3	SLO 3	Pasar SLO Jateng	Meja	SLO.49/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Lantai	SLO.52/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
4	SLO 4	Pasar SLO Jateng	Telenan	SLO.54/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Meja	SLO.55/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
5	SLO 5	Pasar SLO Jateng	Tempat Sampah	SLO.57/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Lantai	SLO.58/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Pisau	SLO.59/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Telenan	SLO.60/2014	Positif	Positif	Positif	Positif
			Meja	SLO.61/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
6	SLO 6	Pasar SLO Jateng	Pencabut Bulu	SLO.62/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
			Tempat Sampah	SLO.63/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Lantai	SLO.64/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
			Pisau	SLO.65/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
			Pencabut Bulu	SLO.68/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
7	SLO 7	Pasar SLO Jateng	Tempat Sampah	SLO.69/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
			Lantai	SLO.70/2014	Positif	Negatif	Positif	Negatif
			Meja	SLO.73/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Pencabut Bulu	SLO.74/2014	Positif	Negatif	Positif	Positif
			Tempat Sampah	SLO.75/2014	Positif	Negatif	Negatif	Positif
			Lantai	SLO.76/2014	Positif	Positif	Positif	Positif
Positif					25	3	11	21
Persentase					100%	12%	44%	84%

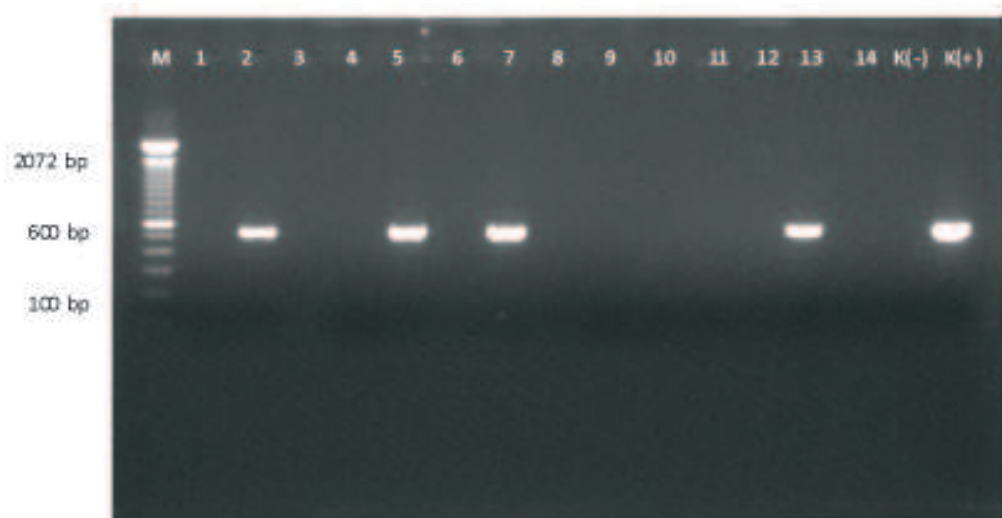


Gambar 3. Hasil amplifikasi beberapa sampel lapang dengan menggunakan primer Matrix untuk mengidentifikasi influenza-A. Keterangan gambar : M (Marker 100bp), 1 (SRG25/2014), 2 (SRG85/2014), 3 (SB.09), 4 (SB.22), 5 (SB.27), 6 (LA.52), 7 (LA.97), 8 (LA.76), 9 (ML.20), 10 (ML.60), 11 (ML.64), 12 (SLO.20), 13 (SLO.60), 14 (SLO.63), K(-) Kontrol Negatif, K(+)Kontrol Positif

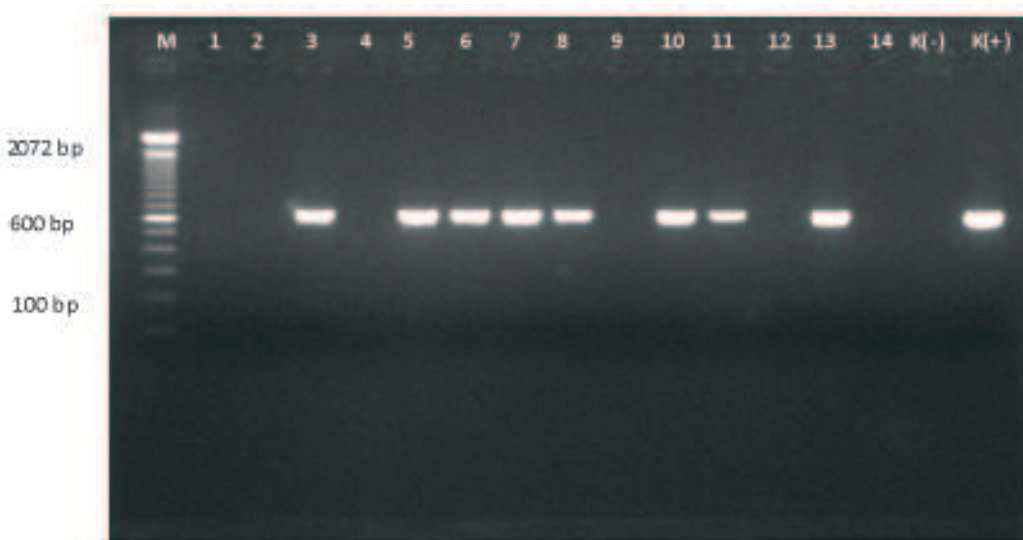
Pada Gambar 4 diperlihatkan bahwa empat sampel yang terdeteksi positif dengan menggunakan primer H5-Lee yaitu sampel nomor 2 (SRG85/2014), sampel no 5 (SB.27), sampel no 7 (LA.97), dan sampel nomor 13 (SLO.20). Hal tersebut mengindikasikan bahwa

metode RT-PCR dengan menggunakan primer H5-Lee kurang sensitif terhadap sampel lapang yang digunakan pada penelitian ini.

Hal yang berbeda jika metode RT-PCR yang digunakan adalah dengan menggunakan primer H5-ID, hasil amplifikasi memperlihatkan bahwa



Gambar 4. Hasil amplifikasi beberapa sampel lapang dengan menggunakan primer spesifik subtype H5, H5-Lee. Keterangan gambar : M (Marker 100bp), 1 (SRG25/2014), 2 (SRG85/2014), 3 (SB.09), 4 (SB.22), 5 (SB.27), 6 (LA.52), 7 (LA.97), 8 (LA.76), 9 (ML.20), 10 (ML.60), 11 (ML.64), 12 (SLO.20), 13 (SLO.60), 14 (SLO.63), K(-) Kontrol Negatif, K(+)Kontrol Positif

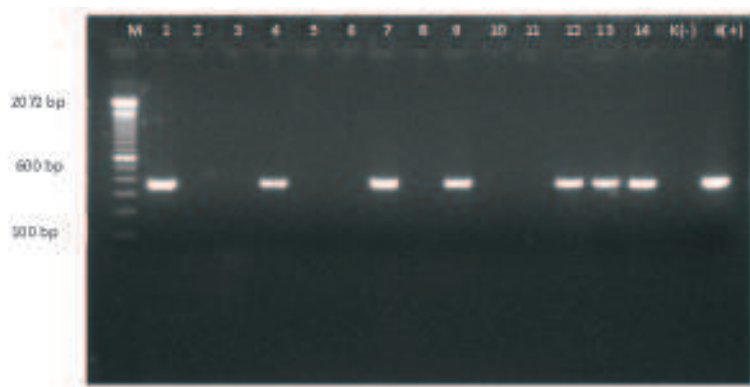


Gambar 5. Hasil amplifikasi beberapa sampel lapang dengan menggunakan primer spesifik subtype H5, H5-ID. Keterangan gambar : M (Marker 100bp), 1 (SRG25/2014), 2 (SRG85/2014), 3 (SB.09), 4 (SB.22), 5 (SB.27), 6 (LA.52), 7 (LA.97), 8 (LA.76), 9 (ML.20), 10 (ML.60), 11 (ML.64), 12 (SLO.20), 13 (SLO.60), 14 (SLO.63), K(-) Kontrol Negatif, K(+) Kontrol Positif.

sebanyak delapan sampel dapat terdeteksi positif AI subtype H5 yaitu tiga sampel sama seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4 (sampel no 5, 7, dan 13), sedangkan lima sampel yaitu sampel no 3 (SB.09), 6 (LA.52), 8(LA.76), 10(ML.60), dan 11(ML.64). Satu sampel yaitu sampel nomor 2 yaitu SRG85/2014 yang dapat teramplifikasi dengan primer H5-Lee tidak dapat teramplifikasi dengan primer H5-ID (Gambar 5).

Deteksi sampel lapang terhadap virus

influenza subtype H5 dengan menggunakan primer H5-NLP menunjukkan bahwa sampel nomor 1 (SRG25/2014), 12(SLO.60), 14(SLO.63) yang tidak dapat diamplifikasi dengan primer H5-Lee dan H5-ID menunjukkan hasil positif jika menggunakan primer H5-NLP (Gambar 6). Dari data penelitian tersebut, menunjukkan bahwa keberhasilan deteksi AI menggunakan Primer H5-Lee, H5-ID, H5-NLP secara keseluruhan memperlihatkan bahwa primer



Gambar 6. Hasil amplifikasi beberapa sampel lapang dengan menggunakan primer spesifik subtype H5, H5-NLP. Keterangan gambar : M (Marker 100bp), 1 (SRG25/2014), 2 (SRG85/2014), 3 (SB.09), 4 (SB.22), 5 (SB.27), 6 (LA.52), 7 (LA.97), 8 (LA.76), 9 (ML.20), 10 (ML.60), 11 (ML.64), 12 (SLO.20), 13 (SLO.60), 14 (SLO.63), K(-) Kontrol Negatif, K(+)Kontrol Positif.

H5-Lee mempunyai keberhasilan terendah dalam mengidentifikasi sampel lapang yaitu 9,7%, sedangkan primer H5-NLP mempunyai keberhasilan 36,6%. Primer H5-ID mempunyai kemampuan deteksi yang tertinggi yaitu 53,7% (Tabel 9).

Tabel 9. Persentase keberhasilan deteksi Primer H5-Lee, H5-ID, H5-NLP pada sampel lapang yang digunakan pada penelitian ini

Sampel Lapang	Primer		
	H5-Lee	H5-ID	H5-NLP
Jumlah Positif/ total sampel	9/93	50/93	34/93
Persentase	9,7%	53,7%	36,6%

Metode molekuler seperti RT-PCR mempunyai banyak kelebihan dalam mendeteksi virus AI di antaranya adalah mempunyai sensitivitas yang tinggi yang serupa dengan isolasi virus, memiliki spesifisitas yang tinggi, dapat dikerjakan dalam jumlah yang besar, dapat digunakan untuk berbagai tipe sampel, meminimalkan kontak dengan agen infeksius sebab virus inaktif selama proses RT-PCR dan dengan harga yang cukup realistis (Atmar *et al.*, 1996; Cattoli *et al.*, 2004; Pregliasco *et al.*, 1998; Spackman *et al.*, 2002).

Pengembangan metode RT-PCR untuk mengidentifikasi virus AI telah banyak dikembangkan, di antaranya oleh Hoffmen *et*

al. (2001) yang mendisain set primer universal untuk mengamplifikasi delapan segmen genom virus AI. Phipps *et al.* (2004) menggunakan sekuen nukleotida di daerah HA2 untuk mengidentifikasi subtype virus AI. Lee *et al.* (2001) mengembangkan metode RT-PCR untuk mengidentifikasi subtype virus AI H1 sampai H15 dengan menggunakan primer spesifik. Set primer *degenerate* untuk mengamplifikasi gen hemaglutinin (HA), neuraminidase (NA), matriks (M) dan non struktural (NS) juga telah dikembangkan oleh Jindal *et al.* (2009). Beberapa metode lain yang telah dikembangkan adalah multiplex RT-PCR untuk mengidentifikasi virus AI beberapa subtype ataupun dengan penyakit unggas lainnya sehingga reaksi menjadi lebih cepat dan murah (Hartawan dan Dharmayanti, 2013; Liu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

Pengembangan primer untuk meningkatkan keberhasilan deteksi virus AI terkini di Indonesia sangat diperlukan untuk hasil diagnosis yang tepat. Tiga set primer spesifik AI subtype H5 yang digunakan pada penelitian ini (H5-Lee, H5-ID dan H5-NLP) menunjukkan hasil yang baik dalam mendeteksi koleksi virus AI yang telah diidentifikasi sebagai virus H5N1 di laboratorium. Hal yang berbeda terjadi jika ketiga primer ini diaplikasikan pada sampel lapang yang dikoleksi sepanjang tahun 2014. Pada penelitian ini primer Lee *et al.* (2001) menunjukkan persentase yang rendah dalam mengamplifikasi sampel lapang terkini hasil koleksi sepanjang tahun 2014, yang teridentifikasi positif influenza tipe A (Fouchier *et al.*, 2000). Sebelumnya primer spesifik H5-Lee telah

banyak digunakan dan mempunyai kemampuan yang baik dalam mendeteksi virus AI ataupun sampel lapang tahun 2003-2011 (Dharmayanti *et al.*, 2004; Dharmayanti *et al.*, 2011a; Dharmayanti *et al.*, 2011b; Hewajuli dan Dharmayanti, 2013; Hartawan dan Dharmayanti, 2014). Namun, seiring dengan terjadinya mutasi dan perubahan pada virus AI sepanjang tahun 2012 sampai sekarang, menyebabkan primer H5-Lee menjadi tidak sensitif lagi dalam mendeteksi virus-virus AI terkini.

Virus AI subtipe H5N1 di Indonesia secara dinamis telah mengalami perubahan *antigenic drift* sejak tahun 2006 (Dharmayanti dan Darminto, 2009; Dharmayanti, 2009). Virus AI yang dikoleksi dari peternakan ayam pascavaksinasi AI mengalami *antigenic drift* yaitu sekitar 1% asam amino berubah setiap tahunnya. Sehingga virus Indonesia sudah berbeda dengan virus asalnya (Dharmayanti, 2009). Mutasi ini melibatkan mutasi titik dalam tempat melekatnya antibodi pada protein HA, NA atau keduanya yang terjadi setiap saat ketika virus bereplikasi (Finkenstadt *et al.*, 2005; Koelle *et al.*, 2006; Boni *et al.*, 2004).

Berubah dan dinamisnya perkembangan virus AI menyebabkan banyak kegagalan dalam mengidentifikasi virus AI subtipe H5 di lapang. Hal ini tentunya sangat membahayakan dalam hal diagnosis sirkulasi AI karena mengakibatkan terjadinya kesalahan diagnosis. Jika suatu sampel di lapang yang menggunakan metode RT-PCR didiagnosis negatif suatu primer spesifik H5, namun jika didiagnosis dengan primer lain ternyata teridentifikasi positif, misalkan dalam hal ini sampel SLO.74.2014 dengan menggunakan primer H5-Lee hasilnya negatif namun jika digunakan primer H5-ID dan H5-NLP hasilnya positif terdeteksi virus AI subtipe H5, maka akan terjadi negatif palsu. Jika terjadi kesalahan diagnosis dalam menentukan status infeksi, tentunya hal ini akan berakibat pada kesalahan dalam menentukan tindakan selanjutnya, seperti *stamping out*, vaksinasi, pemberian desinfektan, peningkatan kewaspadaan terhadap penyebaran penyakit ke hewan lainnya dan manusia serta pemeriksaan lanjutan seperti isolasi virus dan penelitian lanjutan lainnya.

Primer H5-ID mempunyai kemampuan yang lebih tinggi dalam mendeteksi virus AI dari sampel lapang dibandingkan dengan primer H5-NLP. Hal ini kemungkinan disebabkan karena posisi sekuen nukleotida primer H5-ID yaitu di

posisi 252 untuk primer H5-ID *Forward* dan 889 untuk primer H5-ID *Reverse* adalah daerah yang cenderung *conserved* pada virus AI sehingga primer dapat menempel dengan baik dan mengamplifikasi gen HA. Hal inilah yang menyebabkan sampel terdeteksi sebagai positif AI subtipe H5. Dengan begitu mudahnya virus AI mengalami mutasi sehingga primer yang digunakan tidak dapat mengenal sekuen pada gen HA, dimana sekuen nukleotida primer tersebut harus menempel. Hal ini dapat dilihat pada kemampuan primer H5-Lee sebelum tahun 2011 yang dapat dengan baik mendeteksi sampel lapang virus AI pada tahun 2003-2011. Namun kini, primer H5-Lee tidak mampu lagi mendeteksi sampel-sampel lapang terkini yang digunakan dalam penelitian ini. Pemutakhiran (*up date*) primer AI sepertinya sangat penting dalam mendiagnosis virus AI. Hal ini disebabkan virus AI mudah bermutasi. Mutasi adalah salah satu mekanisme paling penting dalam menyebabkan variasi dalam virus influenza. Enzim polimerase virus ini tidak mempunyai kemampuan *proof reading* sehingga diperkirakan berperan dalam kesalahan replikasi yaitu sekitar satu basa dalam setiap 10^4 basa (Holland *et al.*, 1982; Steinhauer dan Holland, 1987).

Primer H5-ID dan H5-NLP yang didisain dalam penelitian ini tidak mengamplifikasi seluruh sampel yang menunjukkan positif influenza-A. Hal ini kemungkinan karena sampel yang dideteksi adalah virus influenza yang bukan dari golongan subtipe H5 sehingga menunjukkan hasil negatif. Namun demikian, dari data tersebut menunjukkan bahwa jika sampel teridentifikasi positif influenza-A namun negatif dengan menggunakan satu primer maka belum tentu sampel tersebut negatif untuk subtipe H5, sehingga dalam mendiagnosis virus AI terutama yang berasal dari lapang sebaiknya menggunakan lebih dari satu set primer subtipe H5 untuk memberikan diagnosis yang lebih baik.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer spesifik H5 yang digunakan dalam metode RT-PCR untuk mendeteksi virus AI dapat mengamplifikasi sampel lapang dengan keberhasilan deteksi tertinggi diperoleh dari metode RT-PCR yang menggunakan primer H5-ID.

SARAN

Penelitian ini menyarankan bahwa dalam diagnosis virus AI subtipe H5 dengan menggunakan metode RT-PCR sebaiknya menggunakan lebih dari satu set primer spesifik subtipe H5. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendisain metode multipleks RT-PCR sehingga dapat menghemat biaya dan waktu dalam mendiagnosis penyakit AI subtipe H5N1 di Indonesia

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan atau Dinas terkait yang membidangi peternakan di Kota Serang, Kota Solo, Kabupaten Sukoharjo, Kabupaten Karanganyar, Kota Surabaya, Kabupaten Lamongan, dan Kota Malang yang telah banyak membantu di lapang selama penelitian ini berlangsung. Terima kasih kepada Nana Suryana, Teguh Suyatno dan Ace Endang di Laboratorium Virologi Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, atas bantuan teknisnya dan semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu selama penelitian ini berlangsung dan dapat diselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH. 1996. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol* 34: 2604-2606
- Boni MF JR, Andreasen GV, Christiansen FB. 2004. Influenza drift and epidemic size : the race between generating and escaping immunity. *Theor Popul Boil* 65(2) : 179-191.
- Cattoli GA, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G, Capua I. 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. 2004. *Avian Pathol* 33: 432-437
- Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Wiyono A, Indriani R, Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode reverse transcriptase polymerase chain reaction RT-PCR. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9(2): 136-143
- Dharmayanti NLPI, Darminto. 2009. Mutasi Virus AI di Indonesia : Antigenic Drift Protein Hemagglutinin (HA) Virus Influenza H5N1 Tahun 2003-2006. *Majalah Kedokteran Hewan* 25(1): 1-8.
- Dharmayanti NLPI. 2009. Perubahan Genoma Virus Avian Influenza subtipe H5N1 pada unggas di Indonesia. [*Disertasi*]. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Dharmayanti NLPI, Ibrahim F, Darminto, Soebandrio A. 2011a. Influenza H5N1 Virus of Birds Surrounding H5N1 Human Cases Have Specific Characteristics on the Matrix Protein. *Hayati J Biosci* 18(2): 82-90
- Dharmayanti NLP I, Samaan G, Ibrahim F, Indriani R, Darminto, Soebandrio A. 2011b. The genetic drift of Indonesian Avian Influenza A H5N1 viruses during 2003-2008. *Microbiologi Indonesia* 5(2): 68-80.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Ratnawati A, Hewajuli DA, Indriani R. 2012. Karakteristik virus Avian influenza subtipe H5N1clade 2.3.2 dan clade 2.1.3: Pengembangannya sebagai vaksin dan implikasi penualarannya pada unggas dan manusia. Laporan Hasil Penelitian Kemitraan. Balai Besar Penelitian Veteriner dan Badan Litbang Pertanian.
- Dharmayanti NLPI, Ratnawati A, Hewajuli DA, Indriani R. 2014a. Genetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated from pet bird and chickens from live bird market in Bali and Bekasi (Indonesia) 2011. *AJMR* 8(3): 244-251
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Pudjiatmoko, Wibawa H, Hardiman, Balish A, Donis R, Davis T and Samaan, G. 2014b. Genetic characterization of clade 2.3.2.1 avian influenza A (H5N1) viruses, Indonesia, 2012. 2014. *Emerg Infect Dis* 20(4): 671-674
- Ditjenak 2014. Perkembangan kasus avian influenza (AI) pada unggas kondisi sampai dengan 31 Januari 2015. URC PHMS Pusat Dirkeswan. <http://keswan.ditjennak.deptan.go>. diakses tanggal 11 Februari 2015

- Finkenstadt BF, Morton A, Rand DA. 2005. Modelling antigenic drift in weekly flu incidence. *Statist Med* 24(22): 3447–3461
- Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. 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
- Fouchier, RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus, ADME. 2005. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79(5): 2814-2822
- Hartawan R, Dharmayanti, NLPI. 2014. Sirkulasi virus avian influenza subtype H5N1 di pasar tradisional di Jawa Timur tahun 2012. 2014. *Berita Biologi* 7(1): 97-106.
- Hartawan, R and Dharmayanti, NLPI. 2013. Uji skrining virus Newcastle Disease, avian influenza dan infectious bronchitis menggunakan pendekatan uji multipleks reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 18(3): 159-166.
- Hewajuli DA, Dharmayanti, NLPI. 2014. Identifikasi flu burung H5N1 pada unggas di sekitar kasus flu burung pada manusia tahun 2011 di Bekasi. *J Veteriner* 15(1): 68-78.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146: 2275-2289
- Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577-1585
- Jindal N, Chandera Y, de Abina M, Sreevatsana S, Stallknecht D, Halvorson DA, Goyal SM. 2009. Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method. *J Virol Methods* 160: 163–166.
- Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual M. 2006. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in human. *Science* 314: 1898-1903.
- Lamb R, Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. Dalam Knipe DM, Howley PM (Editor). *Fields Virology*. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. Hlm. 725-769.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HP. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97: 13-22.
- OIE. 2014. Terrestrial Manual 2014. Avian Influenza. Chapter 2.3.4. www.oie.int
- Phipps LP, Essen SC, Brown IH. 2004. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J Virol Methods* 122: 119–122
- Poddar SK. 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods* 99: 63-70
- Pregliasco F, Mensi C, Camorali L, Anselmi G. 1998. Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. *J Med Virol* 56: 168-173
- Rohm C, Suss JC, Pohle V, Webster RG. 1996. Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chicken in Leipzig, Germany. *Virology* 218: 253-257
- Spacman E, Senne E, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40: 3256-3260
- Starick E, Romer-Oberdorfer A, Werner O. 2000. Type and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AI virus). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 295-301
- Steinhauer DA, Holland JJ. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol* 41: 409-433.

- Swayne DE, Senne DA, Beard CW. 1998. Avian influenza. Dalam: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM (Editor). *A Laboratory Manual for The Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 4th ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square PA. Hlm. 150-155
- Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Sakai-Tagawa Y, Macken C, Kawaoka Y. 2009. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. *Virology* 390: 13-21
- Tanga Q, Wang J, Bao J, Suna H, Suna Y, Liua J, Pua J. 2012. A multiplex RT-PCR assay for detection and differentiation of avian H3, H5, and H9 subtype influenza viruses and Newcastle disease viruses. *J Virol Methods* 181: 164-169.
- Wiyono A, Indriani R, Dharmayanti NLP, Damayanti R, Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza subtipe H5 dari ayam asal Wabah di Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9(1): 61-71.
- World Health Organization. Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2002. <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>
- Wright K E, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM. 1995. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 1180-1184.
- Wright P, Webster RG. 2001. Orthomyxoviruses. Dalam Knipe D, Howley P (Editor). *Fields Virology*. 4th Ed. Philadelphia. Lippincott William & Wilkin. Hlm. 1533-1579.
- Wu L, Ding L, Peia Z, Huob X, Wenc G, Pana Z. 2013. A multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of influenza A virus and differentiation of the H1, H3, H5 and H9 subtypes. *J Virol Methods* 188: 47-50