

Karakter Virus *Avian Influenza* Isolat Indonesia pada Wabah Gelombang Ke Dua

N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, R. DAMAYANTI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 8 Juni 2005)

ABSTRACT

DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. INDRIANI, R. DAMAYANTI, A. WIYONO and R.M.A. ADJID. 2005. Indonesian avian influenza viruses character in second wave epidemic. *JITV* 10(3): 217-226.

Second wave of epidemic avian influenza occurred from December 2004 until April 2005. In March 2005, the disease had infected some districts in South Sulawesi such as Wajo and Soppeng. More than 21 field isolates have been collected and identified as avian influenza virus subtype H5N1. In this study further characterized was undertaken for 14 isolates of avian influenza using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and sequencing in region of HA1 gene. It was then followed by genetic analysis to identify the mutation and phylogenetic relationship of the isolates. The study indicates that the Indonesia isolates collected in second wave epidemic are generally having a different group to the isolates group in 2003 and 2004. There is point mutation in the nucleotide sequence of the isolate collected at August 2004-March 2005, that is the replacement of adenine by guanine in the position of 195.

Key Words: Avian Influenza Virus, Second Epidemic Wave, Mutation

ABSTRAK

DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. INDRIANI, R. DAMAYANTI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID. 2005. Karakter virus *avian influenza* isolat Indonesia pada wabah gelombang ke dua. *JITV* 10(3): 217-226.

Wabah *avian influenza* gelombang ke dua terjadi mulai bulan Desember 2004 sampai bulan April 2005. Pada bulan Maret 2005, *avian influenza* telah menginfeksi beberapa peternakan di daerah Sulawesi Selatan yaitu Kabupaten Wajo dan Soppeng. Lebih dari 21 isolat telah dikoleksi sejak Desember 2004 sampai Maret 2005 dan diidentifikasi sebagai virus *avian influenza* sub tipe H5N1. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap 14 isolat *avian influenza* yang dikoleksi pada periode tersebut dengan metode RT-PCR-sequencing pada gen Hemagglutinin (HA) kemudian dilanjutkan dengan analisis genetiknya untuk mengetahui apakah telah terjadi mutasi pada isolat tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat Indonesia yang diisolasi pada wabah gelombang ke dua umumnya mempunyai kelompok yang berbeda dengan kelompok isolat tahun 2003 dan 2004. Mutasi titik terjadi pada isolat yang diisolasi pada Agustus 2004-Maret 2005 yaitu basa Guanine menggantikan Adenine pada urutan nukleotida ke-195.

Kata Kunci: Virus *Avian Influenza*, Wabah Gelombang Ke dua, Mutasi

PENDAHULUAN

Virus *avian influenza* (AI) adalah virus yang bersegmen, mempunyai materi genetik RNA beruntai tunggal dengan polaritas negatif. Virus ini termasuk ke dalam famili *Orthomyxoviridae* yang terbagi menjadi virus influenza A, B dan C, tetapi hanya influenza A saja yang secara alami dapat menginfeksi unggas. Virus influenza tipe A selanjutnya dibagi menjadi sub tipe-sub tipe berdasarkan antigenisitas pada protein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) dan telah diketahui sebanyak 15 jenis sub tipe HA (H1-15) dan 9 jenis sub tipe NA (N1-N9). Masing-masing virus mempunyai satu protein HA dan satu protein NA, yang berpotensi membentuk beberapa kombinasi. Virus dengan semua kombinasi sub tipe HA dan NA telah

dapat diisolasi pada spesies unggas (SUAREZ *et al.*, 2004).

Wabah *avian influenza* di Indonesia telah terjadi sejak pertengahan tahun 2003. Pada tahun itu pula, sejumlah negara di Asia juga terserang wabah *avian influenza*. Wabah *avian influenza* di Thailand dan Vietnam telah terjadi pada tahun 2004 dan diperkirakan secara keseluruhan sampai saat ini sekitar 120 juta unggas yang telah dimusnahkan untuk mencegah semakin meluasnya penyakit ini. Jumlah korban manusia diperkirakan meninggal akibat terinfeksi *avian influenza* di dua negara tersebut bertambah menjadi 32 orang (NAIPOSPOS, 2005).

Kasus *avian influenza* di Indonesia mencapai puncaknya pada bulan Januari-Februari 2004. Kejadian *avian influenza* kemudian menurun sejalan dengan mulai dilakukannya kebijakan pemerintah melakukan

vaksinasi *avian influenza* pada unggas sebagai salah satu alat untuk mengendalikan penyakit ini. Kasus *avian influenza* mulai terjadi kembali secara sporadis di beberapa tempat pada bulan Agustus 2004. Wabah *avian influenza* gelombang ke dua di Indonesia sekitar akhir bulan Oktober 2004-Maret 2005 yang menyerang sejumlah daerah di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur. Wabah gelombang ke dua ini telah menyebabkan terinfeksi beberapa daerah di Propinsi Sulawesi Selatan yang merupakan daerah bebas *avian influenza*. DHARMAYANTI *et al.* (2005a) telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi beberapa isolat *avian influenza* yang diperoleh dari wabah tersebut.

Avian influenza adalah virus yang mudah bermutasi dengan melakukan *antigenic shift* dan *antigenic drift*. Setelah lebih dari setahun menjadi penyebab wabah virus *avian influenza* di Indonesia mungkin telah berubah. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi virus *avian influenza* pada wabah gelombang ke dua sehingga dapat diketahui virus *avian influenza* tersebut sudah berubah atau belum berubah.

MATERI DAN METODE

Virus

Sebanyak 23 isolat virus *avian influenza* telah diisolasi pada bulan Oktober 2004 sampai dengan Maret 2005, pada saat terjadinya wabah *avian influenza* gelombang ke dua. Pada penelitian ini digunakan 14 virus *avian influenza* untuk dianalisis lebih lanjut. Virus ini berasal dari beberapa daerah di Indonesia yang telah ditentukan subtipe dengan menggunakan uji RT-PCR, yaitu *avian influenza* subtipe H5 (DHARMAYANTI *et al.*, 2005a). Virus-virus ini dipelihara dalam cairan alantois yang disimpan pada temperatur -20°C. Untuk propagasi virus *avian influenza* dilakukan pada telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari pada ruang alantois (OIE, 2000). Tabel 1 menunjukkan isolat yang dikoleksi pada wabah *avian influenza* gelombang ke dua.

Tabel 1. Nama isolat, induk semang, bulan isolasi dan subtipe dari isolat *avian influenza* yang diisolasi pada wabah *avian influenza* gelombang ke dua (DHARMAYANTI *et al.*, 2005b)

Nama isolat	Induk semang	Bulan isolasi	Subtipe
A/Duck/Banten/Pdgl-2/2004	Itik	Oktober 2004	H5
A/Peacock/Jakarta/labB-2/2004	Merak	Oktober 2004	H5
A/Chicken/West Java/PwtB1/2004	Ayam	Desember 2004	H5
A/Chicken/West Java/PwtA1/2004	Ayam	Desember 2004	H5
A/Chicken/Jakarta/PgD/2004	Ayam	Desember 2004	H5
A/Goose/West Java/Bgr-Sbagyo1/2/2005	Angsa	Januari 2004	H5
A/Muscovy duck/West Java/Bgr-Sbagyo2/2/2005	Entog	Januari 2004	H5
A/Small turtledove/West Java/Bgr-Sbagyo3/2/2005	Perkutut	Januari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005	Ayam	Januari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Smi31M-2/2005	Ayam	Januari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Sbg-81/2/2005	Ayam	Januari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Smi-Mah/brs2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Duck/West Java/Smi-Rum/2/2005	Itik	Februari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Smi-Ijum/brs2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Smi-Hayati/brs2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/West Java/Sbg2-weni2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/East Java/Sby-Nid2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/East Java/Mlg-Nid2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/East Java/Mjkt/Nid2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/East Java/Blitar3/Nidlay/2/2005	Ayam	Februari 2004	H5
A/Chicken/South Sulawesi/Wajo4/1/2005	Ayam	Maret 2004	H5
A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng6/1/2005	Ayam	Maret 2004	H5
A/Chicken/South Sulawesi/Wajo1/2005	Ayam	Maret 2004	H5

DNA sekuensing

Cairan alantois yang terinfeksi virus *avian influenza* diekstraksi dengan menggunakan Trizol Reagent untuk memperoleh RNA virus. Pelet RNA yang diperoleh digunakan sebagai templat pada reaksi *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) seperti yang telah digambarkan pada penelitian terdahulu (DHARMAYANTI *et al.*, 2004). Purifikasi hasil PCR dan sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan DNA sequencer 377 (PE Applied Biosystem) dengan metode *direct sequencing*. Primer yang digunakan untuk sekuensing fragmen gen HA1 adalah primer yang digunakan untuk mengamplifikasi dan sekuensing fragmen gen HA1 yaitu Primer H5-155f ACACATGCYCARGACATACT dan Primer H5-699r CTYTGRTTYAGTGTGATGT (LEE *et al.*, 2001). Konsentrasi primer yang dibutuhkan untuk *direct sequencing* adalah 200 ng/μl dengan total volume 100 μl.

Analisis genetik

Analisis genetik dilakukan dengan menggunakan program Bioedit. *Phylogenetic tree* dihasilkan dengan *maximum parsimony method* dengan 100 *bootstrap replicates* pada CLUSTAL W.

HASIL

Hasil homologi sekuen nukleotida isolat *avian influenza* yang diisolasi pada wabah gelombang ke dua menunjukkan homologi yang bervariasi yaitu berkisar antara 84 sampai 98%. Sedangkan jika dibandingkan dengan isolat yang diisolasi pada tahun 2003, berkisar diantara 75 sampai 93%. Jika dibandingkan dengan isolat yang diisolasi pada awal sampai pertengahan tahun 2004, mempunyai homologi sekitar 82 sampai 94%. Data homologi selengkapnya ditunjukkan pada Tabel 2.

Berdasarkan analisis perbandingan sekuen nukleotida dapat diperoleh hasil seperti pada Gambar 1. Pada urutan nukleotida ke-84-86, semua isolat yang berasal dari Indonesia, Vietnam dan Thailand yang dibandingkan mempunyai urutan nukleotida Timin-Sitosin-Guanina (TCG). Pada urutan tersebut isolat A/Duck/China/319-2/03 dan A/Chicken/Guangdong/174/04 terdapat pada posisi 85-87 dan isolat A/Pigeon/Jakarta/PgD/2004 mengalami mutasi pada posisi nukleotida ke-84 yaitu timin digantikan dengan sitosin. Dibandingkan dengan isolat yang diisolasi pada wabah *avian influenza* yang terjadi pada bulan Oktober 2003–Maret 2004, isolat yang diisolasi pada bulan Agustus 2004–Maret 2005 mempunyai sedikit perbedaan yaitu selalu ditemukannya basa guanina menggantikan basa adenina pada urutan nukleotida ke-195. Isolat yang berasal dari Wajo, Soping dan isolat

Tabel 2. Homologi sekuen nukleotida (%) diantara virus *avian influenza* yang dibandingkan

VIRUS AI		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
156/97	1		99	93	88	93	89	95	95	90	74	80	82	87	84	82	87	87	82	94	94	89	90	85	91	90	88	88	80	86	86	87	83	88	85	87	88	
258/97	2			93	87	94	89	95	95	90	73	79	81	87	84	82	87	87	82	94	95	90	90	85	91	90	89	89	79	86	86	87	83	88	85	87	88	
SP33/04	3				90	98	92	94	97	91	76	82	84	90	85	84	90	89	84	93	93	91	92	87	92	92	90	91	91	88	89	90	86	90	87	89	88	
Guang/04	4					88	95	90	88	92	86	86	90	90	84	90	94	94	91	89	89	92	92	93	88	91	91	93	88	89	90	94	86	94	91	91	92	
Vi/33/04	5						90	94	97	91	75	80	83	89	83	81	88	88	81	93	93	90	91	86	92	91	89	89	80	86	87	88	84	89	86	88	89	
E319/03	6							91	89	94	80	87	90	92	86	89	94	93	90	91	90	94	94	92	90	92	93	94	86	90	91	94	87	95	92	92	93	
Ck/5/04	7								96	94	76	84	85	90	87	84	90	86	89	98	98	92	92	88	94	93	92	92	81	88	88	90	86	91	87	90	91	
Thai/1/04	8									90	74	80	82	88	84	82	87	87	81	94	95	89	90	85	92	90	89	89	78	86	87	88	84	88	85	88	88	
Blit1/03	9										79	86	88	93	88	86	93	91	88	93	92	94	93	90	92	94	94	94	84	91	90	92	85	93	90	92	93	
Blit2/03	10											88	91	86	86	87	85	84	86	76	75	79	85	82	76	77	84	79	82	86	75	79	80	80	82	86	85	
74/03	11												90	89	85	85	87	87	83	84	83	87	87	85	84	86	87	88	82	86	88	88	81	87	85	85	88	
Os/04	12													89	87	88	90	90	85	85	87	88	82	84	86	86	88	86	88	86	90	84	88	90	88	87	88	
BP/04	13														89	88	92	91	88	90	90	92	92	88	90	92	93	92	85	91	92	92	86	92	90	92	93	
DK1/04	14															88	86	86	87	87	87	87	82	86	87	86	86	83	87	86	86	84	86	85	88	87	88	
DK2/04	15																	90	91	92	85	85	88	86	88	85	86	87	88	88	87	91	86	90	90	88	89	
DK13/04	16																		95	92	91	90	93	95	92	90	92	92	94	87	91	92	95	88	95	93	92	
Pdgl1/04	17																			91	84	89	92	91	92	89	91	90	93	88	91	92	94	88	93	94	92	94
Pdgl2/04	18																				87	86	90	89	90	86	88	88	90	88	90	89	93	87	91	90	89	
Du/Pdgl/04	19																					98	93	93	89	95	94	91	92	81	88	87	97	85	91	88	91	
Peac/04	20																						92	92	88	94	93	91	92	80	88	87	90	86	90	88	90	
Pwt1/04	21																							93	90	96	98	97	98	85	94	92	95	89	96	92	95	
PgA/04	22																								90	92	94	93	94	84	90	92	93	87	93	90	91	
PgD/04	23																									88	90	90	92	86	86	91	92	87	92	90	88	91
Go/Cia/05	24																											97	95	95	81	91	89	92	87	93	89	92
Md/Cia/05	25																												96	97	83	93	91	94	89	94	91	94
27M/05	26																													97	84	93	93	94	87	95	91	94
81M/05	27																														85	94	93	96	89	97	93	95
Blit3/05	28																															87	86	88	85	86	85	88
Adin/05	29																																93	93	88	93	91	93
Hay/05	30																																	95	89	93	92	92
Wen/05	31																																		89	97	94	94
Rum/05	32																																			89	90	89
Bd18/05	33																																				95	96
Mak2/05	34																																					94
Mak4/05	35																																					97
Mak6/05	36																																					98

yang berasal dari itik di Bogor yaitu A/Duck/West Java/Ciawi-bd18/05 mengalami mutasi yaitu basa timin yang terdapat pada semua isolat yang ada di Indonesia dan China menjadi sitosin pada posisi nukleotida ke-290. Isolat yang berasal dari Wajo, Sopeng dan Bogor ini mempunyai insersi basa guanina pada urutan nukleotida ke-295, seperti halnya isolat yang berasal dari Subang yaitu A/West Java/Sbg2-weni2/2/200; DKI yaitu A/Muscovyduck/Jakarta/DKI1-2/2004; A/Chicken/

Jakarta/DKI2-2/2004 dan A/Quail/Jakarta/DKI3-2/2004 dan Sukabumi yang berasal dari puyuh yaitu A/Quail/West Java/Smi2-2/2004 yang tidak ditemukan pada isolat lainnya.

Analisis *phylogenetic tree* menunjukkan virus *avian influenza* yang menjadi penyebab wabah gelombang ke dua, masih berada dalam satu kelompok (*in group*) dengan virus *avian influenza* yang menyebabkan wabah pada tahun 2003 dan 2004 (Gambar 2).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
E319-2/03										
Guang/04										
Blit1/03										
In/PA/03										
Blit2/03										
In/BL/03										
In/5/04										
74/03										
Os/Bgr/04										
Qu/Smi/04										
DKI1/04										
DKI2/04										
DKI3/04										
Pdgl1/04										
Pdgl2/04										
Du/Pdgl/04										
Pea/Jkt/04										
Pwt1/04										
PgA/Jkt/04										
PgD/Jkt/04										
Go/Cia/05										
Md/Cia/05										
Smi/27M/05										
Sbg/81/05										
Bl13/05										
Smi/Ad/05										
Smi/Hay/05										
Sb/Wen/05										
Du/Rum/05										
Bd18/05										
Waj2/05										
Waj4/05										
Sop6/05										
E319-2/03										
Guang/04										
Blit1/03										
In/PA/03										
Blit2/03										
In/BL/03										
In/5/04										
74/03										
Os/Bgr/04										
Qu/Smi/04										
DKI1/04										
DKI2/04										
DKI3/04										
Pdgl1/04										
Pdgl2/04										
Du/Pdgl/04										
Pea/Jkt/04										
Pwt1/04										
PgA/Jkt/04										
PgD/Jkt/04										
Go/Cia/05										
Md/Cia/05										
Smi/27M/05										
Sbg/81/05										
Bl13/05										
Smi/Ad/05										
Smi/Hay/05										
Sb/Wen/05										
Du/Rum/05										
Bd18/05										
Waj2/05										
Waj4/05										
Sop6/05										
E319-2/03										
Guang/04										
Blit1/03										
In/PA/03										

Blit2/03	T-.....-.....-.....C.....-.....
In/BL/03	-.....-.....-.....-.....-.....-.....
In/5/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....
74/03	T-.....-.....-.....-.....-.....T.....-A..
Os/Bgr/04	T-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Qu/Smi/04	T-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
DKI1/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....
DKI2/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
DKI3/04	-.....G.....-.....-.....-.....G.C.....G.....
Pdgl1/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
Pdgl2/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Du/Pdgl/04	-.....G.....-.....-.....-.....-.....-.....
Pea/Jkt/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Pwt1/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
PgA/Jkt/04	-.....T.....-.....-.....-.....-.....G.....
PgD/Jkt/04	-.....-.....C.....-.....-.....-.....-.....
Go/Cia/05	T.....-.....G.....-.....-.....-.....-.....
Md/Cia/05	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Smi/27M/05	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Sbg/81/05	-.....T.....-.....-.....-.....-.....-.....
Bl13/05	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Smi/Ad/05	A.G-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Smi/Hay/05	A.G-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Sb/Wen/05	A.G-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
Du/Rum/05	A..A.....A.....C.....-.....-.....-.....
Bd18/05	A.G-.....G.....-.....-.....-.....C.....G.....
Waj2/05	A.G-.....A.....-.....-.....-.....C.....G.....
Waj4/05	A.G-.....-.....-.....-.....-.....C.....G.....
Sop6/05	A.G-.....-.....-.....-.....-.....C.....G.....
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400	
E319-2/03	TCATCAGG-GGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGG-AAGTTCCTCCTTTTCAGG-AATGTGG-TATGG-CTTATCAAAAA-GAAGCATG-CATACCCA
Guang/04	-.....-.....G.....A.....-.....-.....AG.....-.....
Blit1/03	-.....-.....AG.....T.A.....-.....G.....-.....AG.....-.....
In/PA/03	-.....-.....AG.....T.A.....-.....-.....AG.....-.....
Blit2/03	C-.....C.....C.....A..G..AG.....C.....T.AA..G.....GG.....-G.....G.....-.....AG..G.....C
In/BL/03	-.....-.....AG.....T.A.....-.....-.....AG.....-.....
In/5/04	-.....-.....AG.....T.A.....-.....-.....AG.A.....-.....
74/03	..C.....-A.....C.....T..G..AG.....C.....T.AA.TGT--G.....-.....CAC..G-..G..AG.....C
Os/Bgr/04	-.....-.....T..G..AG.....T.AA.GGT--G.....-.....-.....A.....-.....C
Qu/Smi/04	-.....-.....T.....AGC.....T.AA.....-.....-.....AG.....-.....C
DKI1/04	-.....-.....T.....G.....T.AAA.TG.....G.....G.....C.....GA.C.AT.C.....C
DKI2/04	A.G.....-.....T.....G.....T.A..G.....-.....T.....-.....A..A.....C
DKI3/04	T.....-.....G.....T.....CG.....T.A.....-.....-.....A.....-.....
Pdgl1/04	TCA.G.....T.....G.....T.A.....-.....G.....-.....AG.A.....-.....
Pdgl2/04	CA.G.....T.....G..GG.....T.A.....-.....-.....A..A.....-.....
Du/Pdgl/04	-.....-.....T.....G.....T.A.....-.....-.....A..A.....-.....
Pea/Jkt/04	-.....-.....T.....G.....T.A.....-.....-.....A..A.....-.....
Pwt1/04	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-.....-.....AG.A.....-.....
PgA/Jkt/04	T.....-.....G.....T.....CG.....T.A.....-.....-.....A.....-.....
PgD/Jkt/04	-.....-.....T.....G.....T.A.....-.....-.....A..A.....-.....
Go/Cia/05	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-.....-.....AG.A.....-.....
Md/Cia/05	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-.....-.....AG.A.....-.....
Smi/27M/05	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-.....-.....AG.A.....-.....T..
Sbg/81/05	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-.....-.....AG.A.....-.....
Bl13/05	TCA.G.....T.....T.....GA.C.....T..G.....G.....G.....-.....AG.....-.....
Smi/Ad/05	TCA.GA.....T.....G.....C.....T.A..A.GT.G.....G.....A.....AG.A.....-.....
Smi/Hay/05	-CA.GA.....T.....G.....C.....T.A.....-T.G.....G.....-.....AG.A.....-.....
Sb/Wen/05	TCA.GA.....T.....G.....C.....T.A.....-T.G.....-.....-.....AG.A.....-.....
Du/Rum/05	GA.....T.....G.....C.....T.A.....-T.....-.....A.....AG.A.....-.....
Bd18/05	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-T.....-A.....-.....AG.A.....-.....
Waj2/05	GA.....T.....C.....T.A.....-G.....-A.....-.....AG.A.....-.....
Waj4/05	-A.....-.....T.....C.....T.A.....-T.....GA.....-.....AG.A.....-.....
Sop6/05	-A.....-.....T.....G.....C.....T.A.....-T.....GA.....-.....AG.A.....-.....
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500	
E319-2/03	ACAATAAAG-AGAAGCTACAATAAT-ACCA---ACC-AAGAAGATCTTTTGG-TACTGTGGGG--ATTG-ACCATCCTAATG-AT-GCGGCAGAGC-AG
Guang/04	.T.....-.....-.....-.....-.....A.....C.A.....-.....-.....
Blit1/03	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
In/PA/03	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Blit2/03	TTT.....T.C.T.....-.....-CCG.....AT.....-ACTG.G.....GGGG.TTC.....C.CCC.AAT.TCG..GG..AA.A
In/BL/03	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
In/5/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
74/03	TTT.....T.C.T.....-.....AT.T..G.....T.....GG.....AC.....C.CC.....AT.C.GCCG..CAAAACC
Os/Bgr/04	TT.A-GAG.A..T.C.T.....-.....C.....A..T..G.....-AC.GTG.....GGG--TTC.....C.CC.....A.CCG..G.AG.AA--
Qu/Smi/04	-.....C.....-.....-.....-.....G.....-.....G.....-.....T.....A.A.A..A
DKI1/04	..C..T.....G.....T.C..T..TC.....-.....C.....CT.....G.G.....-GA.TC.....C.....CT.....TG.....G..G.A.A.A.A
DKI2/04	T.....-.....T.C..T..-T.C---A..C.A..A.....-GG.A.G.....G-G..-C.....C.....T.GT.G.G.CG.A.AAG..
DKI3/04	-.....-.....-.....-.....-.....G.....-.....GG.....G.....-.....
Pdgl1/04	C.....-.....-.....-.....G.....GGGA.TCC.....T.....G.....-.....
Pdgl2/04	-.....-.....T.....-.....T.....G.....G.G.....-AC..C.....TG.....G.....G.A.AAG.A
Du/Pdgl/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Pea/Jkt/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
Pwt1/04	-A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....-.....
PgA/Jkt/04	-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....-.....
PgD/Jkt/04	-.....-.....CCA.....-.....-.....-.....C.....-.....
Go/Cia/05	-A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....-.....
Md/Cia/05	-A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....-.....
Smi/27M/05	-A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....-.....
Sbg/81/05	-A.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....A.....-.....
Bl13/05	..TA.G.....T.....C.T.....-.....T.CT.....G.....G.....G.....TCC..CC.....G.....-.....
Smi/Ad/05	G.A.....T.....-.....-.....G.....GG.....TCC..C.....T.A.....-.....GGAGA.A..
Smi/Hay/05	-A.....-.....-.....-.....G.....G.....-CC.....-.....-.....AGA
Sb/Wen/05	A.....-.....T.....-.....-.....-.....-C.....G.....-.....AG-

Du/Rum/05	G.A.....T.....A.G.....G.....GT.....GG.A.TCC..C.....T...G..G-.....
Bd18/05	-..A.....-.....-.....G-..A.TC.....-.....AGA
Waj2/05	T..G.A.....-.....C-.....G.....GGGA.TCT.....T...G..G.....AGC..
Waj4/05	-..A.....C.....-.....C.....GGGA.TC.....-..T.....AGA
Sop6/05	-..A.....-.....G.....GG-A.TC.....-.....AGA
	510 520 530 540
E319-2/03	ACAAGGCTCTATCAA-----
Guang/04	A.....AACCC-----
Blit1/03	A.....AACCCAACCACCTATATTTCGGTTGGGA
In/PA/03	T.T.T-----
Blit2/03	A.....AACCCAACCACCTATATTTCGGTTGGGA
In/BL/03	A.....AACCCAACCACCTATATTTCGGTTGGGA
In/5/04	G.CT.T.T.A-----
74/03	G.A.T-----
Os/Bgr/04	T.....ACCCAC-----
Qu/Sml/04	ACG.TT.T.T.A.AACCCCCC-----
DKI1/04	A.....A-----
DKI2/04	A.....A-----
DKI3/04	A.....A-----
Pdg11/04	AGG.T-----
Pdg12/04	A.....AACCCGACCACCTATATTTCGGTGG--
Du/Pdg1/04	A.....AACCCGACCACCTATATTTCGGTGGGA
Pea/Jkt/04	A.....AACCC-----
Pwt1/04	T.....AACCCA-----
PgA/Jkt/04	A.....AACCCAACCACCTATTT-----
PgD/Jkt/04	A.....AACCCAACCCT-----
Go/Cia/05	A.T.....AACCC-----
Md/Cia/05	A.....AAC-----
Smi/27M/05	A.T.....TT-----
Sbg/81/05	A.GAT.T.T-----
Bl13/05	T-----
Smi/Ad/05	T-----
Smi/Hay/05	T-----
Sb/Wen/05	T-----
Du/Rum/05	CA.G.CTATATCA-----
Bd18/05	CC-----
Waj2/05	CA.G.CTATATC.....
Waj4/05	CA.G.CTATCT.....
Sop6/05	CA.G.CTATCT.....

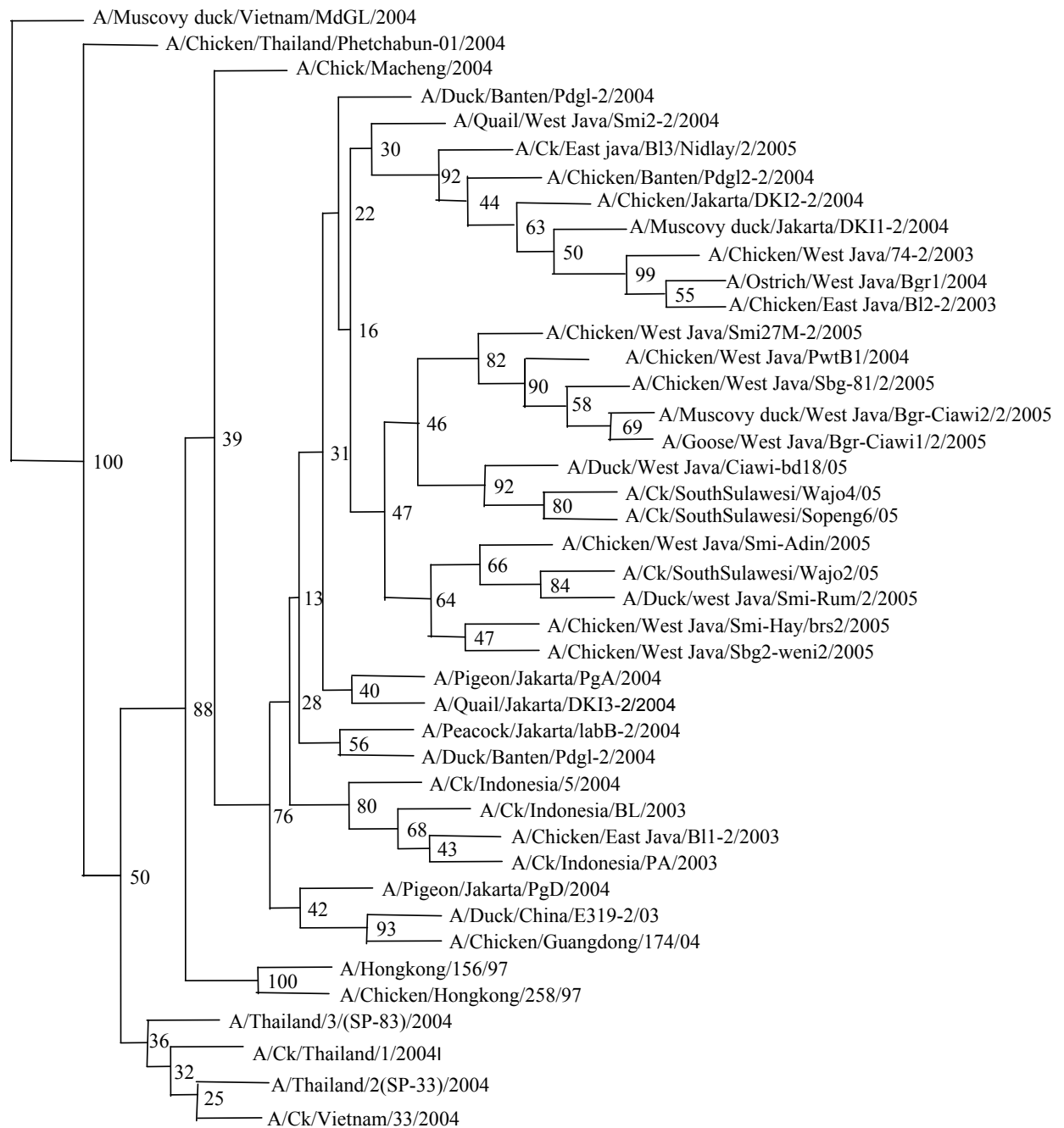
Gambar 1. Perbandingan sekuen nukleotida diantara virus *avian influenza* isolat Indonesia dengan *A/Duck/China/E319-2/03* dan *A/Chicken/Guangdong/174/04*

PEMBAHASAN

Virus influenza mempunyai struktur yang hampir sama (LAMB dan KRUG, 1996). Pada mikroskop elektron, virus tampak *pleomorphic*, mempunyai virion yang *roughly spherical* (kira-kira berdiameter 120 nm) dan berfilamen. Virus ini mempunyai dua tipe *spike* yaitu HA dan NA yang berbeda pada permukaan virion dengan panjang sekitar 16 nm. *Spike* HA terlihat seperti *rod shaped* dan menonjol dari amplop sebagai trimer (WILSON *et al.*, 1981), sedangkan *spike* NA sebagai *mushroom-shaped tetramer* (COLMAN *et al.*, 1987). Dua glikoprotein ini diperoleh dari turunan amplop lipid yang berasal dari membran plasma induk semang dengan sekuen-sekuen pendek dari asam amino hidrofobik (daerah transmembran). HA adalah glikoprotein tipe I (yang mengandung sebuah ektodomain N-terminal dan turunan C-terminal), sedangkan NA adalah glikoprotein tipe II (yang mengandung turunan N-proksimal dan ektodomain C-terminal). HA virion melekat pada

sialyloligosaccharides pada permukaan sel (PAULSON, 1985) dan bertanggung jawab terhadap aktivitas hemaglutinasi (HIRST, 1941). HA membentuk antibodi netralisasi virus yang penting dalam mencegah infeksi. NA adalah sialidase (GOTTSCHALK, 1957) yang mencegah agregasi virion dengan menghilangkan sel dan asam sialat pada permukaan virion (PAULSON, 1985). Antibodi terhadap NA juga penting dalam memproteksi induk semang (WEBSTER *et al.*, 1978).

Virus influenza A yang menginfeksi ayam dan kalkun biasanya mempunyai derajat virulensi yang ekstrim, yaitu jika bukan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) pasti *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Virus HPAI menyebabkan penyakit sistemik dengan kematian yang cepat pada ayam dan kalkun, biasanya mendekati hampir 100%. Virus LPAI menyebabkan infeksi yang terlokalisasi dengan tidak memperlihatkan atau hanya sedikit gejala klinis. Semua isolat HPAI adalah sub tipe H5 atau H7, tetapi tidak semua sub tipe H5 dan H7 menyebabkan HPAI (SUAREZ *et al.*, 2004).



Gambar 2. Analisis *phylogenetic* terhadap urutan nukleotida pada fragmen gen HA1 virus *avian influenza*

Ketika *avian influenza* patogen terhadap satu spesies unggas, virus influenza A mungkin tidak patogen pada spesies yang lain (ALEXANDER *et al.*, 1986). Misalnya pada itik, secara khas resisten terhadap virus yang letal pada ayam. Sebagai contoh, A/Turkey/Ireland/1378/85 (H5N8) yang secara cepat membunuh ayam dan kalkun, tidak menimbulkan gejala penyakit pada itik, walaupun dapat dideteksi pada beberapa organ internal dan darah dari unggas yang terinfeksi (KAWAOKA *et al.*, 1987). Faktor inang menentukan kepekaan terhadap virus

influenza. (HARIMOTO dan KAWAOKA, 2001). Hal ini menjelaskan wabah yang terjadi di Kabupaten Pandeglang pada bulan Oktober 2004. Wabah *avian influenza* pada Kabupaten Pandeglang telah menyerang peternakan rakyat dimana itik dan ayam dipelihara secara bersamaan. Konfirmasi penyebab wabah telah dilakukan pada penelitian terdahulu yaitu disebabkan oleh virus *avian influenza* sub tipe H5N1 (DHARMAYANTI *et al.*, 2004; 2005a; 2005b). Ayam yang terinfeksi penyakit ini mengalami kematian

mendadak tanpa menunjukkan gejala klinis, tetapi itik yang dipelihara bersama ayam tersebut masih hidup dan sehat tanpa menunjukkan gejala sakit. Dari itik tersebut berhasil diisolasi virus *avian influenza* yang berasal dari sampel *swab* kloaka dan trakea. Hal serupa juga terjadi di Kabupaten Sukabumi, pada wabah Februari 2005, dimana wabah *avian influenza* telah membunuh hampir semua ayam kampung dalam suatu populasi yang dipelihara bersama itik. Virus *avian influenza* berhasil dideteksi pada itik tersebut walaupun itik tidak menunjukkan gejala klinis. Isolat *A/Duck/West Java/Ciawi-bd18/2005* juga diperoleh dari peternakan itik yang tidak menunjukkan gejala sakit *avian influenza*, tetapi berada di wilayah wabah. Secara klinis itik terlihat sehat tetapi berhasil diisolasi virus *avian influenza* subtipe H5N1.

Sejak wabah *avian influenza* di Indonesia terjadi pada bulan Oktober 2003, virus *avian influenza* yang bersirkulasi sampai Oktober 2004 masih mempunyai kedekatan genetik yang tinggi dan masih merupakan virus *avian influenza highly pathogenic* (DHARMAYANTI *et al.*, 2005b). Pada penelitian wabah *avian influenza* gelombang kedua, dilakukan analisis homologi sekuen nukleotida diantara isolat *avian influenza* yang dibandingkan. Isolat *A/Chicken/East Java/Blitar2/2/2003* merupakan isolat yang mempunyai homologi terendah jika dibandingkan dengan isolat *avian influenza* lainnya, baik itu yang diisolasi pada tahun 2003, 2004 dan 2005 (Tabel 2). Homologi tertinggi dengan isolat ini hanya dengan isolat yang berasal dari burung onta yaitu *A/Ostrich/West Java/Bgr1/2004*.

Isolat *avian influenza A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005* yang diisolasi dari sebuah peternakan bibit broiler di Sukabumi pada bulan Februari 2005 menunjukkan homologi yang tinggi yaitu 97% dengan isolat yang diisolasi dari sebuah peternakan komersial di Subang yaitu *A/West Java/Sbg2-81/2/2005*. Isolat Sukabumi lainnya yang diisolasi dari ayam buras *A/Chicken/West Java/Smi-Hay/brs2/2005* mempunyai homologi sebesar 93%, dengan isolat yang diperoleh dari wabah peternakan ayam komersial yang berasal dari Sukabumi yaitu *A/West Java/Chicken/Smi-Adin/2005*. Isolat *A/West Java/Chicken/Smi-Adin/2005* jika dibandingkan dengan isolat berasal dari itik *A/Duck/West Java/Smi-Rum/2/2005* yaitu menunjukkan homologi sebesar 88%. Isolat *A/Duck/West Java/Smi-Rum/2/2005* mempunyai homologi sebesar 87% dengan isolat *A/Chicken/West Java/Smi27M-2/2005* dan jika dibandingkan dengan isolat *A/Chicken/West Java/Smi-Hay/brs2/2005* hal yang sama juga dapat ditunjukkan bahwa antara isolat yang menyerang ayam buras dan itik tersebut hanya menunjukkan homologi sebesar 89%.

Isolat yang diperoleh dari wabah di Sulawesi Selatan yaitu di Kabupaten Wajo dan Sopeng yaitu

A/Chicken/South Sulawesi/Wajo2/2/2005; *A/Chicken/South Sulawesi/Wajo4/2/2005* dan *A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng6/2/2005* menunjukkan homologi yang tinggi yaitu sekitar 95-97% dengan isolat yang berasal dari itik yang diisolasi dari sebuah peternakan itik di Bogor (*A/Duck/West Java/Ciawi-bd18/2005*) dan di Sukabumi yaitu *A/Duck/West Java/Smi-Rum/2/2005*. Isolat yang berasal dari Sulawesi Selatan ini juga mempunyai homologi yang tinggi dengan isolat dari wabah pada bulan Desember 2004 di Purwakarta (*A/Chicken/West Java/PwtB1/2004*), dengan isolat dari Subang yaitu *A/West Java/Sbg2-81/2/2005* dan *A/West Java/Sbg2-weni2/2/2005* yaitu sebesar 96%. Dari hasil homologi tersebut dapat diketahui bahwa kemungkinan wabah yang terjadi di Sulawesi Selatan adalah berasal dari Jawa Barat, mengingat Jawa Barat merupakan sentra unggas Indonesia.

Hasil perbandingan nukleotida menunjukkan adanya perbedaan yang terjadi baik itu mutasi, insersi ataupun delesi (Gambar 1). Perbedaan yang cukup nyata terlihat pada isolat yang diperoleh dari wabah terakhir yaitu isolat yang berasal dari Wajo dan Sopeng. Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang berasal dari Wajo dan Sopeng sudah menunjukkan perbedaan-perbedaan dibandingkan dengan isolat yang dikoleksi sebelumnya. Mutasi ini akan terus berlanjut seiring dengan semakin meningkatnya tekanan imunologi, lingkungan dan perlakuan lainnya yang diperoleh oleh virus tersebut. Hal ini tidak menutup kemungkinan akan menghasilkan virus yang lebih ganas atau yang mempunyai patogenisitas berbeda dengan sebelumnya.

Analisis *phylogenetic tree* menunjukkan isolat *A/Chicken/East Java/B11-2/2003* dan isolat *A/Chicken/Indonesia/PA/2003*, isolat *A/Chicken/Indonesia/BL/2003*, isolat *A/Chicken/Indonesia/5/2003* dalam satu kelompok dan mempunyai *ancestral* yang sama dengan *A/Chicken/Guangdong/174/04*, *A/Duck/China/E319-2/03*, *A/Pigeon/Jakarta/PgD/2004*, *A/Duck/Banten/Pdgl-2/2004* dan *A/Peacock/Jakarta/labB-2/2004*. Isolat-isolat yang diisolasi pada wabah gelombang ke dua umumnya mempunyai *ancestral* yang sama dan dalam satu kelompok yang sama. Hanya isolat *A/East Java/B13/Nidlay/2/2005* yang berasal dari peternakan layer di Blitar, Jawa Timur yang berada di luar kelompok dari wabah gelombang ke dua.

Isolat yang berhasil diisolasi pada wabah di Kabupaten Wajo yaitu *A/Chicken/South Sulawesi/Wajo-Mak2/2005* tampak lebih dekat dengan isolat *A/Duck/West Java/Smi-Rum/2/2005* dibandingkan dengan isolat yang berasal dari Sulawesi Selatan lainnya yaitu isolat *A/Chicken/South Sulawesi/Wajo-Mak4/2005* dan *A/Chicken/South Sulawesi/Sopeng-Mak6/2005*. Kedua isolat yang terakhir ini lebih dekat dengan isolat *A/Duck/West Java/Ciawi-bd18/2005*. Walaupun semua isolat ini mempunyai *ancestral* yang sama. Dari hasil ini menunjukkan ketiga isolat yang

berasal dari Sulawesi Selatan ini mempunyai kedekatan yang lebih tinggi dengan isolat yang berasal dari itik daripada ayam. Virus influenza disekresikan dari saluran intestinal ke dalam feses dari unggas yang terinfeksi (KIDA *et al.*, 1980; WEBSTER *et al.*, 1978). Model transmisi dapat secara langsung atau tidak langsung; termasuk kontak dengan aerosol dan material yang terkontaminasi virus. Ketika unggas mengekskresikan virus dalam jumlah besar dalam fesesnya, beberapa jenis barang dapat dikontaminasi (misalnya pakan, air, peralatan dan kandang) dan mempunyai kontribusi terhadap penyebaran virus. Transmisi *waterborne* menyediakan mekanisme dari tahun ke tahun dari virus *avian influenza* pada habitat alami unggas air misalnya virus *avian influenza* dengan mudah diisolasi dari danau Alaska yang berperan sebagai tempat berkembang biak unggas air yang bermigrasi (ITO *et al.*, 1995). Di Indonesia, populasi unggas terutama ayam kampung hidup bersama dalam suatu sistem peternakan rumah tangga. Pada wabah *avian influenza* gelombang ke dua ini, banyak menyerang ayam kampung milik rakyat. Wabah ini dengan cepat meluas ke peternak yang lain, mungkin akibat cemaran feses ayam kampung terinfeksi, mengingat sistem pemeliharaan ayam kampung adalah secara umbaran. Mobilitas peternak yang tidak menerapkan biosekuriti dan sistem irigasi air mungkin juga mempercepat menyebarnya penyakit ini. Dari hasil penelitian ini dapat diperoleh data bahwa wabah gelombang ke dua yang terjadi di Sulawesi Selatan pada bulan Maret 2005 lalu kemungkinan berasal dari Jawa Barat. Mungkin itik yang berasal dari Jawa Barat berperan dalam penyebaran penyakit *avian influenza* di Sulawesi Selatan atau mungkin karena lalu lintas unggas dan kontaminan produk unggas lainnya yang berasal dari Jawa Barat.

Transmisi interspesies dari virus influenza dapat terjadi, tetapi sesungguhnya yang terjadi adalah keterbatasan inang. Sebagai contoh virus tidak dapat bereplikasi secara efisien pada manusia (BEARE dan WEBSTER, 1991) atau pada primata yang bukan manusia (MURPHY *et al.*, 1982). Virus influenza pada manusia pun tidak dapat tumbuh dengan baik di itik (HINSHAW *et al.*, 1983). Sangat sedikit yang diketahui tentang virus dan faktor inang yang dapat menentukan rentang spesies dari virus influenza.

Di Indonesia, penularan *avian influenza* pada mamalia atau manusia belum pernah dilaporkan. Walaupun demikian kita harus tetap waspada, mengingat virus *avian influenza* merupakan virus yang cepat bermutasi sehingga penelitian tentang kemungkinan penularan penyakit ini ke spesies lain seperti mamalia harus segera dilakukan. Pada penelitian ini belum diperoleh isolat virus *avian influenza* yang berasal dari mamalia.

KESIMPULAN

Hasil analisis *phylogenetic tree* menunjukkan bahwa dari isolat Indonesia yang diisolasi pada wabah gelombang ke dua terutama yang diisolasi pada awal tahun 2005 membentuk kelompok tersendiri walaupun masih dalam satu kelompok dengan isolat Indonesia lainnya yang diisolasi pada wabah Oktober 2003-Oktober 2004. Mutasi titik terjadi pada isolat yang diisolasi pada Agustus 2004-Maret 2005 yaitu basa guanina menggantikan adenina pada urutan nukleotida ke-195.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktur Kesehatan Hewan-DitjenNak, 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., G. PARSONS and R.J. MANVELL. 1986. Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, duck and quail. *Avian Pathol.* 15: 647-662.
- BEARE, A.S. and R.G. WEBSTER. 1991. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch. Virol.* 119: 37-42.
- COLMAN, P.M., W.G. LAVER, J.N. VARGHESE, A.T. BAKER, P.A. TULLOCH, G.M. AIR and R.G. WEBSTER. 1987. The three-dimensional structure of a complex of influenza virus neuraminidase and an antibody. *Nature* (London). 326: 358-363.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004. Identifikasi virus *avian influenza* Indonesia dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *JITV* 9: 136-142.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. INDRIANI, R. DAMAYANTI dan A. WIYONO. 2005a. Isolasi dan identifikasi wabah *avian influenza* pada bulan Oktober 2004-Maret 2005 di Indonesia. *J. Biol. Indones.* 3: 341-350.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID. 2005b. Karakterisasi molekuler virus *avian influenza* isolat Indonesia. *JITV* 10: 127-133.
- GOTTSHALK, A. 1957. The specific enzyme of influenza virus and vibrio cholerae. *Biochim. Biophys. Acta.* 23: 645-646.

- HARIMOTO, T. and Y. KAWAOKA. 2001. Pandemic treat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- HINSHAW, V.S., R.G. WEBSTER, C.W. NAEVE and B.R. MURPHY. 1983. Altered tissue tropism of human reassortant influenza viruses. *Virology* 128: 260-263.
- HIRST, G.K. 1941. Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryo infected with avian influenza virus. *Science* 94: 22-23
- ITO, T., K. OKAZAKI, Y. KAWAOKA, A. TAKADA, R.G. WEBSTER and H. KIDA. 1995. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch. Virol.* 140: 163-1172.
- KAWAOKA, Y., A. NESTOROWICZ, D.J. ALEXANDER and R.G. WEBSTER. 1987. Molecular analysis of the haemagglutinin genes of H5 influenza viruses: origin of a virulent turkey strain. *Virology* 158: 218-227.
- KIDA, H., R. YANAGAWA and Y. MATSUOKA. 1980. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect. Immunol.* 30: 547-553.
- LAMB, R.A and R.M. KRUG. 1996. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. pp. 1353-1395.
- LEE, M.S., P.C. CHANG, J.H. SHIEN, M.C. CHENG and H.P. SHIEH. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97: 13-22.
- MURPHY, B.R., V.S. HINSHAW, D.L. SLY, W.T. LONDON, N.T. HOSIER, F.T. WOOD, R.G. WEBSTER and R.M. CHANOCK. 1982. Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect. Immunol.* 37: 1119-1126.
- NAIPOSPOS, T.S.P. 2005. Wabah flu burung gelombang ke dua. Potensi Menjadi Pandemi Asia. Kompas. Jumat, 1 April 2005.
- OIE. 2000. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. Highly pathogenic avian influenza. Paris. pp. 212-232.
- PAULSON, J.C. 1985. Interactions of animal viruses with cell surface receptors. In: The Receptors. M. CONNER (Ed). Academic Press. Inc. Orlando, Fla. pp. 131-219.
- SUAREZ, D., D. SENNE, J. BLANK, I.H. BROWN, S.C. ESSEN, C.W. LEE, R.J. MANVELL, C. MATHIEW-BONSON, V. MORENO, J.C. PEDERSON, B. PANIGRAHY, H. ROJAS, E. SPACKMAN and D.J. ALEXANDER. 2004. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 693-699.
- WEBSTER, R.G., M.A. YAKHNO, V.S. HINSHAW, W.J. BEAN and K.G. MURTI. 1978. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84: 268-278.
- WILSON, I.A., J.J. SKEHEL and D.C. WILLEY. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A resolution. *Nature* (London) 289: 366-373.