

DIAGNOSIS CEPAT VIRUS AVIAN INFLUENZA TIPE A SUBTIPE H5 DARI SPESIMEN LAPANGAN DENGAN METODE *ONESTEP* SIMPLEX RT-PCR

Rapid Diagnosis of Avian influenza Virus Type A Subtype H5 From Field Specimen by Onestep Simplex RT-PCR Method

Aris Haryanto¹, Duhita Andinita¹, Sri Handayani Irianingsih², dan Dini Wahyu Yudianingtyas³

¹Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Laboratorium Virologi Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta

³Laboratorium Virologi dan Bioteknologi, Balai Besar Veteriner Maros, Maros

E-mai: arisharyanto@yahoo.com

ABSTRAK

Virus *avian influenza* (AI) merupakan virus dengan materi genetik RNA *single-stranded sense* negatif, beramplop yang termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*. *Onestep simplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) merupakan salah satu metode diagnosis yang dapat diandalkan untuk mendeteksi virus AI. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menerapkan metode diagnosis cepat virus AI pada spesimen lapangan secara langsung dari pasar unggas berdasarkan amplifikasi RT-PCR gen M dan H5 dengan metode yang berbasis *onestep simplex* RT-PCR tanpa melalui proses inokulasi dan propagasi virus AI dalam telur ayam berembrio (TAB). Sebanyak 35 sampel spesimen lapangan dari *swab* trakea unggas yang berasal dari pasar unggas di Terban, Kotamadya Yogyakarta digunakan dalam penelitian ini. Amplifikasi DNA secara *onestep simplex* RT-PCR pada gen matriks (M) dilakukan terhadap seluruh sampel. Pada sampel-sampel yang menunjukkan hasil positif pada amplifikasi gen M kemudian dilakukan amplifikasi RT-PCR secara lebih lanjut untuk gen H5 virus AI. Produk hasil amplifikasi RT-PCR gen M dan H5 divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel *agarose* konsentrasi 1% dengan pewarnaan *SYBR® Safe DNA Gel Staining*. Hasil amplifikasi RT-PCR gen M menunjukkan bahwa dari 35 sampel diperoleh 8 sampel positif terinfeksi virus AI tipe A yang ditunjukkan dengan adanya fragmen DNA sebesar 200 bp, sedangkan hasil amplifikasi gen H5 sebanyak 5 dari 8 sampel-sampel tersebut merupakan virus AI tipe A subtype H5 yang ditunjukkan dengan adanya fragmen DNA sebesar 545 bp. Diagnosis cepat virus AI tipe A subtype H5 secara langsung dari spesimen lapangan di pasar unggas dapat dilakukan dengan metode *onestep simplex* RT-PCR, namun metode diagnosis tersebut tidak dapat mendeteksi keberadaan virus AI dalam sampel yang virusnya terlalu sedikit.

Kata kunci: diagnosis, virus AI, spesimen, RT-PCR

ABSTRACT

Avian influenza virus (AI) is a single-stranded negative sense enveloped RNA virus which belongs to the family of Orthomyxoviridae. Onestep simplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) is one of diagnosis technique that is reliable to detect AI virus. The objective of this research is to carry out a rapid diagnosis method for AI virus directly from field specimens in live bird market based on amplification of M and H5 gene using onestep simplex RT-PCR method without viral inoculation and propagation into embryonated chicken eggs. Field specimens of 35 bird's tracheal swaps which collected from live bird market in Terban, Kotamadya Yogyakarta were used in this research. Amplification of DNA using onestep simplex RT-PCR for matrix (M) gene was performed to 35 field specimens. Samples which were positively detected then were further amplified using onestep simplex RT-PCR for H5 gene. The PCR product from the amplification of M and H5 genes were visualized using 1% agarose gel electrophoresis with SYBR® Safe DNA Gel Staining. The results showed that based on the M gene amplification from 35 field samples, 8 samples were positive infected AI virus type A with the presence of DNA fragments in size of 200 bp, whereas based on the H5 amplification, 5 samples from 8 positive samples are infected AI virus subtype H5 with the presence of DNA fragments in size of 545 bp. Rapid diagnosis of AI virus type A subtype H5 directly from field specimens in live bird market can be performed by onestep simplex RT-PCR method, however this method cannot detect AI viruses in samples which have less viral load.

Key words: diagnosis, AI virus, specimen, RT-PCR

PENDAHULUAN

Virus *avian influenza* (AI) merupakan virus dengan materi genetik RNA *single-stranded sense* negatif dan beramplop yang termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*. Virus influenza dapat diklasifikasikan menjadi beberapa tipe, yaitu A, B, dan C berdasarkan perbedaan antigenik pada nukleoprotein (NP) dan protein matriks (M) (Horimoto dan Kawaoka, 2001). Virus AI dapat dibagi menjadi beberapa subtype berdasarkan perbedaan antigenik pada glikoprotein permukaannya, yaitu hemagglutinin (H) dan neuraminidase (N) yang ditemukan pada amplop virus. Protein virus lainnya adalah nukleoprotein (NP) yang merupakan protein struktural, protein matriks (M1 dan M2), protein polimerase (PA, PB1, dan PB2), dan protein non struktural (NS1 dan NS2) (Kamps *et al.*, 2006).

Pada saat ini dilaporkan terdapat 16 subtype H (H1-H16) dan varian antigenik 9 N (N1-N9) yang dikenal pada virus influenza A (Fouchier *et al.*, 2005). Subtype patogenik H5N1 virus AI dilaporkan telah menginfeksi unggas sejak akhir tahun 2003 dan telah menjadi epidemi di beberapa negara Asia dengan wabah serius, termasuk Indonesia, Vietnam, Thailand, Korea Selatan, Laos, Kamboja, Jepang, dan Malaysia yang berakibat tingginya angka kematian pada unggas dengan kerugian ekonomi yang signifikan (Thontiravong *et al.*, 2007).

Salah satu metode diagnosis untuk deteksi dan penentuan subtype virus AI yang sering digunakan adalah isolasi virus pada telur ayam berembrio (TAB) dengan sampel yang berasal *swab* atau organ yang mengalami perubahan patologis yang kemudian diperiksa secara serologis terhadap gen H dan N. Metode tersebut akurat dan sensitif untuk mendeteksi

virus AI dalam suatu *flock* tetapi membutuhkan tenaga yang banyak dan memakan waktu (Murayama *et al.*, 1999; Cattoli *et al.*, 2004).

Salah satu metode deteksi cepat untuk virus AI adalah *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Metode RT-PCR dapat digunakan sebagai metode diagnosis cepat untuk mendeteksi dan menentukan subtipe virus AI secara spesifik (Payungporn *et al.*, 2004). Sejumlah kecil RNA virus AI dapat dideteksi bahkan ketika virus sudah terinaktivasi dengan menggunakan teknik RT-PCR, sedangkan isolasi virus pada TAB membutuhkan virus yang hidup, oleh karenanya metode amplifikasi dengan RT-PCR lebih sensitif. Pada surveilans virus AI secara rutin di lapangan, diperlukan metode yang cepat, akurat, sensitif, dan spesifik sehingga keberadaan virus AI dapat dengan cepat, tepat, dan akurat diketahui. Metode RT-PCR dapat menjadi solusi karena beberapa kelebihan yang dimiliki. Sampel yang dibutuhkan juga bervariasi, baik sampel *swab* maupun sampel organ. Pada studi mengenai surveilans virus AI pada pasar unggas ditunjukkan pada *swab* trakea lebih cocok digunakan dan mengandung lebih banyak virus dibandingkan sampel dari *swab* kloaka atau lingkungan (Bulaga *et al.*, 2003).

Surveilans virus AI salah satunya dapat dilakukan pada pasar unggas karena pasar unggas dapat menjadi salah satu sumber penyebaran virus AI. Menurut Cardona *et al.* (2009), pada pasar unggas berkumpul berbagai macam spesies unggas yang berasal dari berbagai pemasok. Berbagai jenis spesies unggas, kurangnya manajemen *all in-all out* dan adanya berbagai pemasok unggas menyebabkan pasar unggas menjadi sumber potensial dari virus AI. Untuk itu dapat digunakan teknik RT-PCR dengan sampel yang berasal dari sampel *swab* dari unggas hidup maupun sampel organ dari unggas mati seperti yang telah direkomendasikan oleh Horimoto dan Kawaoka (1995).

Pada penelitian ini dilakukan amplifikasi gen M dan H5 virus AI dengan metode RT-PCR menggunakan sampel *swab* trakea unggas yang berasal dari pasar unggas di Terban, Kotamadya Yogyakarta. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menerapkan metode diagnosis cepat virus AI pada spesimen lapangan dari pasar unggas berdasarkan amplifikasi RT-PCR gen M dan H5 dengan metode yang berbasis *onestep simplex* RT-PCR tanpa melalui proses inokulasi dan propagasi virus AI dalam TAB, sehingga akan menjadi lebih cepat, tepat, akurat serta dapat digunakan dalam surveilans rutin penyebaran virus AI keperluan pencegahan dan penanggulangan infeksi virus AI pada hewan dan penularannya kepada manusia.

MATERI DAN METODE

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel virus yang dikoleksi dari *swab* trakea unggas yang dijual di pasar unggas Terban, Kotamadya Yogyakarta sebanyak 35 sampel dengan menggunakan sistem *pooling*. Sampel-sampel disimpan dalam media transpor virus yang berisi glukosa 100% 0,1 ml, *phenol red* 0,4% 0,1 ml, penisilin-streptomisin 40.000 IUP 2,5 ml, gentamisin 50 µg/ml 0,5 ml, *bovine serum* 1 ml untuk 100 ml *phosphate buffer saline* (PBS) dengan pH 7,0.

Ekstraksi RNA virus AI dilakukan dengan kit ekstraksi RNA (QIAmp Viral RNA Kit, nomor katalog: 52906), sedangkan amplifikasi gen M dan H5 secara RT-PCR dilakukan dengan kit RT-PCR (Qiagen *Onestep* RT-PCR kit, nomor katalog: 210212). Prosedur ekstraksi RNA virus dari sampel lapangan dan amplifikasi RT-PCR gen M dan H5 dilakukan sesuai dengan rekomendasi dari *Qiagen*.

Elektroforesis DNA hasil amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan gel *agarose* UltraPure™ nomor katalog: 16500100 (Invitrogen), 10X TAE *buffer* UltraPure™ nomor katalog: 15558-042 (Invitrogen), *Safe DNA Gel Stain* 10.000x (*concentrate in DMSO*) SYBR®, *DNA Ladder*, *DNA Marker 100 Kb*, dan dua pasang primer, yaitu primer M dan primer H5 dengan urutan nukleotida seperti yang disajikan dalam Tabel 1.

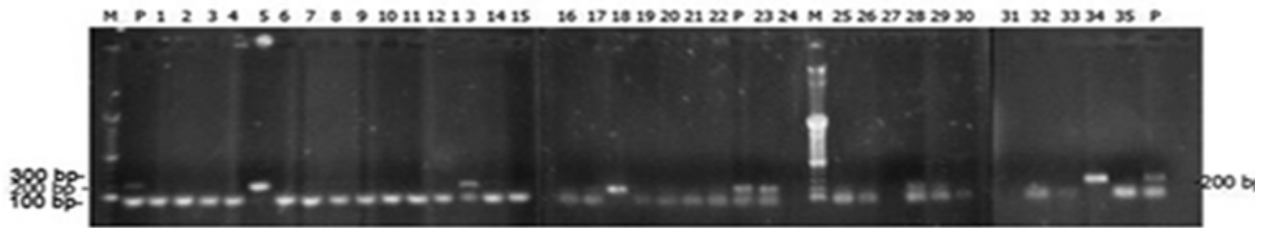
Peralatan utama yang digunakan pada amplifikasi RT-PCR adalah *thermal cycler* dari Infiniten Model: TC-XX/H, tabung steril 1,5 ml dan 0,2 ml, tip mikropipet ukuran 10, 100, 200, dan 1000 µl, mikropipet, pinset, rak tabung, *centrifuge* 5804R, *ependorf*, *Spin Down* Qualitron Inc. nomor katalog: DW-41, *vortex mixer* Maxi Mix II Barnstead Thermolyne nomor model: M37610-33, cetakan gel (*tray*), aparatus elektroforesis Mupid EXY Submarine Electrophoresis System Advance, transiluminator UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

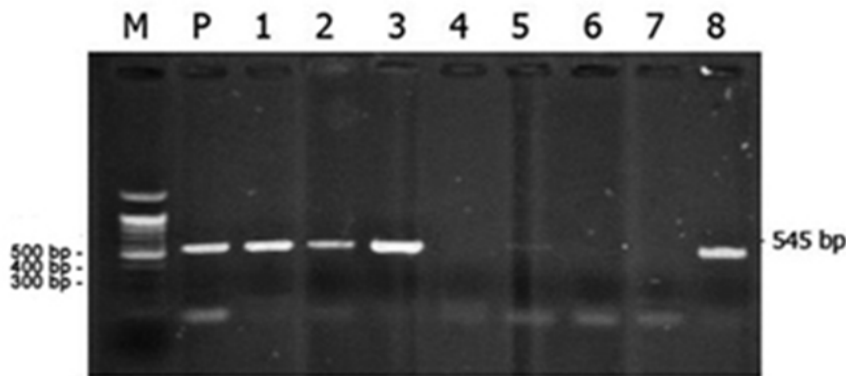
Pada penelitian ini sebanyak 35 sampel *swab* trakea unggas yang berasal dari pasar unggas Terban di Kotamadya Yogyakarta dikoleksi secara sistem *pooling* dan dilakukan ekstraksi RNA. Selanjutnya, RNA hasil ekstraksi digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi gen M virus AI dengan metode *onestep simplex* RT-PCR. Hasil RT-PCR gen M yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1% secara detail disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Urutan nukleotida pasangan primer gen M (AAHL, 2004) dan H5 (Lee *et al.*, 2001)

Gen Target	Sekuens Primer	Produk PCR (bp)
Gen M	MF : 5'-GCACTTGAATTGTGGATTCTTAGTC-3'	200
	MR : 5'-AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTACTCC-3'	
Gen H5	H5F : 5'-ACACATGCYCARGACATACT-3'	545
	H5R : 5'-CTYTGRTTYAGTGTGAATGT-3'	



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen M (200 bp) dari ke-35 sampel unggas dengan metode *onestep simplex* RT-PCR. (Lajur M adalah DNA *Ladder* 100 bp, lajur 1 sampai 35 adalah nomor sampel, dan lajur P adalah kontrol positif dari Antigen virus AI 128 HA. Sampel nomor 5, 13, 18, 23, 25, 28, 29, dan 34 menunjukkan hasil amplifikasi positif untuk gen M berupa fragmen DNA amplicon sebesar 200 bp).



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen H5 (545 bp) 8 sampel unggas dengan metode *onestep simplex* RT-PCR yang sebelumnya telah menunjukkan hasil positif untuk gen M. (Lajur M adalah DNA *Ladder* 100 bp, lajur 1-8 menunjukkan nomor sampel, dan lajur P adalah kontrol positif dari Antigen 128 HA. Sampel nomor 1, 2, 3, 5, dan 8 menunjukkan hasil positif untuk gen H5 berupa fragmen DNA sebesar 545 bp sedangkan nomor 4, 6, dan 7 menunjukkan hasil negatif untuk gen H5).

Gambar 1 merupakan hasil elektroforesis hasil amplifikasi gen M dari ke-35 sampel unggas. Fragmen DNA hasil amplifikasi RT-PCR berupa pita DNA sebesar 200 bp yang muncul pada sampel nomor 5, 13, 18, 23, 25, 28, 29, dan 34, sedangkan pita yang muncul pada sampel yang berukuran lebih kecil dari 100 bp merupakan *excess primer* atau *primer dimer* yang akan muncul bila tidak terjadi amplifikasi. Metode amplifikasi untuk gen M ini dilakukan seperti prosedur standar yang direkomendasikan oleh AAHL (2004) yang menghasilkan fragmen DNA untuk gen M sebesar 200 bp. Hasil amplifikasi RT-PCR pada gen M tersebut menunjukkan bahwa sampel-sampel tersebut mengandung virus AI. Pada lajur nomor 1, 2, 3, 4, 6, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 30, 31, 32, 33, dan 35 tidak menunjukkan adanya fragmen DNA sebesar 200 bp sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel-sampel tersebut tidak mengandung virus AI tipe A.

Selanjutnya hasil positif RT-PCR dari sampel nomor 5, 13, 18, 23, 25, 28, 29, dan 34, dilakukan amplifikasi RT-PCR lebih lanjut dengan menggunakan pasangan primer spesifik untuk mengamplifikasi gen H5 virus AI. Hasil amplifikasi sampel-sampel positif tersebut secara detail disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2 memperlihatkan hasil elektroforesis amplifikasi gen H5 pada ke-8 sampel unggas yang positif pada amplifikasi pertama dengan primer M. Hasil positif untuk amplifikasi RT-PCR dengan pasangan primer untuk gen H5 virus AI ditunjukkan dengan munculnya fragmen DNA sebesar 545 bp. Hal

ini sesuai dengan yang telah dilaporkan oleh Lee *et al.* (2001) dimana hasil positif gen H5 ditunjukkan dengan adanya fragmen DNA sebesar 545 bp. Pada penelitian ini lajur nomor 1, 2, 3, 5, dan 8 terdapat fragmen DNA sebesar 545 bp sehingga dapat dinyatakan bahwa sampel-sampel tersebut mengandung virus AI subtipe H5. Sedangkan pada lajur nomor 4, 6, dan 7 tidak terdapat fragmen DNA. Selain hasil amplifikasi PCR gen M dan H5, didapatkan pula data mengenai hasil isolasi dan identifikasi virus AI pada sampel unggas dari pasar Terban yang dilakukan oleh Setia (2010). Hasil amplifikasi RT-PCR gen M dan H5 dan hasil isolasi virus AI direkapitulasi dan hasilnya disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 terlihat pada beberapa sampel (sampel no. 23, 27, dan 28) menunjukkan hasil positif dengan metode amplifikasi RT-PCR sedangkan hasil isolasi virus menunjukkan hasil negatif. Hal ini terjadi karena virus AI sudah mengalami kematian (inaktif) selama transportasi dari lapangan ke laboratorium atau selama masa penyimpanan sampai dilakukan isolasi virus. Isolasi virus hanya dapat mendeteksi virus hidup, sedangkan virus AI yang diinaktivasi selama transportasi atau yang mungkin ditemukan pada sampel dari lingkungan, hanya dapat dideteksi atau memberikan hasil positif dengan metode amplifikasi RT-PCR. Kemungkinan lain adalah virus AI belum siap beradaptasi untuk tumbuh dan belum mencapai titer agar virus tersebut dapat dideteksi pada TAB. Hal tersebut dapat menjelaskan mengapa terdapat sampel yang menunjukkan hasil

positif pada amplifikasi dengan metode RT-PCR dan hasil negatif pada isolasi virus dalam TAB seperti yang dilaporkan oleh Saberfar *et al.* (2007).

Tabel 2. Rekapitulasi data isolasi dan RT-PCR virus AI sampel unggas dari pasar Terban

No Sampel	Kode Sampel	Isolasi Virus*	Hasil RT-PCR	
			M	H5
1	TB 01 BR 1-5	-	-	-
2	TB 02 LY 1-5	-	-	-
3	TB 02 BR 1-5	-	-	-
4	TB 03 LY 1-5	+	-	-
5	TB 04 AK 1-5	+	+	+
6	TB 06 AK 1-4	-	-	-
7	TB 08 AK 1-5	+	-	-
8	TB 09 AK 1-5	-	-	-
9	TB 10 BR 1-5	-	-	-
10	TB 10 EN 1-3	+	-	-
11	TB 10 AK 1-5	+	-	-
12	TB 11 Lingkungan	-	-	-
13	TB 12 EN 1-5	+	+	+
14	TB 12 AK 1-5	-	-	-
15	TB 13 BR 1-5	-	-	-
16	TB 13 LY 1-5	-	-	-
17	TB 14 AK 1-5	-	-	-
18	TB 15 EN 1	+	+	+
19	TB 15 BR 1-5	+	-	-
20	TB 17 AK 1-5	-	-	-
21	TB 18 AK 1-5	-	-	-
22	TB 19 AK 1-5	-	-	-
23	TB 20 AK 1-3	-	+	-
24	TB 20 EN 1-3	-	-	-
25	TB 21 AK 1-3	+	-	-
26	TB 21 EN 1-4	+	-	-
27	TB 22 AK 1-5	-	+	-
28	TB 23 AK 1-3	-	+	-
29	TB 24 BR 1-5	-	-	-
30	TB 25 LY 1-5	-	-	-
31	TB 26 IT 1-5	-	-	-
32	TB 26 EN 1-5	-	-	-
33	TB 27 EN 1-5	+	+	+
34	TB 27 IT 1-5	-	-	-
35	TB 28 Lantai	-	+	+

* isolasi virus AI dilakukan oleh Setia (2010)

+ hasil positif

- hasil negatif

Tabel 2 juga menunjukkan bahwa beberapa sampel (sampel no. 4, 7, 10, 11, 19, 25, dan 26) memperlihatkan hasil isolasi virus positif sedangkan hasil RT-PCR negatif. Hal ini terjadi karena secara kuantitas jumlah virus AI yang ada pada sampel *swab* trakea sangat rendah sehingga tidak terdeteksi pada metode RT-PCR seperti yang dilaporkan oleh Putri (2006). Amplifikasi gen virus AI secara RT-PCR hanya akan memberikan hasil positif apabila dilakukan dengan jumlah RNA sebagai *template* memenuhi jumlah minimum yang telah ditentukan. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil amplifikasi RT-PCR adalah adanya perbedaan materi dan metode yang digunakan pada penelitian-penelitian tersebut serta adanya perbedaan *strain* dan subtype virus yang diteliti, selain itu perbedaan kualitas masing-masing sampel juga ikut berperan (Noroozian *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil amplifikasi RT-PCR gen H5 sebanyak 5 dari 8 sampel tersebut merupakan virus AI tipe A subtype H5. Diagnosis cepat virus AI tipe A subtype H5 secara langsung dari spesimen lapangan di pasar unggas dapat dilakukan dengan metode *onestep simplex* RT-PCR, namun metode diagnosis tersebut tidak dapat mendeteksi keberadaan virus AI dalam sampel yang *load* virusnya terlalu sedikit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates, Kementan Republik Indonesia dan Kepala Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Strategis Nasional (TA. 2009-2010) DP2M Dikti Kemendiknas Republik Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- AAHL. 2004. Molecular Diagnostic Test Available at Australia Animal Health Laboratory (AAHL). <http://www.csiro.au>.
- Bulaga, L.L., L. Garber, D.A. Senne, T.J. Myers, R. Good, S. Wainwright, S. Trock, and D.L. Suarez. 2003. Epidemiologic and surveillance studies on avian influenza in live-bird markets in New York and New Jersey 2001. *Avian Diseases* 47:996-1001.
- Cardona, C., K. Yee, and T. Carpenter. 2009. Are live bird markets reservoirs of avian influenza? *Poult. Sci.* 88:856-859.
- Cattoli, G., A. Drago, S. Maniero, A. Toffan, E. Bertoli, S. Fassina, C. Terregino, C. Robbi, G. Vicenzoni, and I. Capua. 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol.* 33:432-437.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallensten, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D.M.E. Osterhaus. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79:2814-2822.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 1995. Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *JCM.* 33:748-751.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:129-149.
- Kamps, B.S., C. Hoffmann, and W. Preiser. 2006. Influenza Report 2006. <http://www.InfluenzaReport.com/InfluenzaReport>.
- Lee, M.S., P.C. Chang, J.H. Shien, M.C. Cheng, and H.K. Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods* 97 (1-2):13-22.
- Murayama, N., H. Suzuki, M. Arakawa, K. Nerome, K. Mizuta, and K. Kameyama. 1999. Two outbreaks of influenza A (H3N2) in a Japanese nursing home in the winter of 1996-1997, with differing vaccine efficacy. *Tohoku J. Exp. Med.* 188(4):289-298.
- Noroozian, H., M.V. Marandi, and M. Razazian. 2007. Detection of avian influenza virus of H9 subtype in the faeces of experimentally and naturally infected chickens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Acta Vet. Brno.* 76:405-413.
- Payungporn, S., P. Phakdeewit, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, J. Keawcharoen, K. Oraveerakul, A. Amonsin, and Y. Poovorawan. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunology* 17:588-593.
- Putri, D.D. 2006. Deteksi Virus Avian Influenza (H5N1) pada Unggas Air di Provinsi Lampung dengan Uji Haemagglutination

- Inhibition (HI) dan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Skripsi**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Saberfar, E., M.M. Forghani-Fard, and M. Mosavi. 2007. Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. **IBJ**. 11:69-74.
- Setia, L. 2010. Faktor Resiko Avian Influenza di Pasar Unggas Tradisional di Daerah Istimewa Yogyakarta dengan Pedagang sebagai Unit Kajian. **Tesis**. Program Studi Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Thontiravong, A., S. Payungporn, J. Kewacharoen, S. Chutinimitkul, S. Wattanodorn, S. Damrongwatanapokin, A. Chaisingh, A. Theamboonlers, Y. Poovorawan, and K. Oraveerakul. 2007. The single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detecting H5 and N1 avian influenza A viruses. **Tohoku J. Exp. Med.** 211:75-79.