

KAJIAN TITER ANTIBODI AYAM PETELUR PASCAVAKSINASI AVIAN INFLUENZA (AI) DI DELAPAN PROVINSI DI INDONESIA

Ketut Karuni Nyanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Rahajeng Setiawaty, Yati

Suryati

Unit Uji Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan

Kementerian Pertanian

Abstrak

Penyakit *Avian influenza* (AI) adalah penyakit penting pada unggas, karena bersifat zoonotik dan menyebabkan kerugian ekonomi dengan tingkat morbiditas dan mortalitas penyakit sangat tinggi (90-100%). Salah satu program pengendalian dan pemberantasan penyakit AI adalah dengan vaksinasi. Pengkajian ini dilakukan untuk memperoleh informasi gambaran status kekebalan pascavaksinasi AI pada ayam petelur di 8 (delapan) provinsi di Indonesia yang meliputi Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Bali dan Kalimantan Selatan. Sampel yang diperoleh adalah serum ayam petelur pascavaksinasi AI sebanyak 800 sampel. Terhadap sampel serum ayam petelur pascavaksinasi AI dilakukan uji hambatan hemaglutinasi ⁽⁶⁾ untuk mengetahui titer antibodi serum terhadap virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Apabila lebih dari 70% sampel serum yang berasal dari lokasi pengambilan sampel yang sama menunjukkan titer lebih besar dari 16 (>16) terhadap virus AI subtipe H5N1, berarti vaksin AI yang diaplikasikan protektif terhadap virus AI, khususnya subtipe H5N1⁽²⁾. Sedangkan pengujian sampel serum secara serologis terhadap virus AI subtipe H9N2 menunjukkan hasil positif apabila titer antibodi terhadap virus AI subtipe H9N2 lebih besar dari atau sama dengan 128 (≥ 128) ^(4,6). Hasil protektif terhadap virus AI subtipe H5N1 ditunjukkan oleh sampel ayam petelur pascavaksinasi AI yang berasal dari 6 Provinsi yaitu: Sumatera Barat, Jawa Barat, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Bali dan Kalimantan Selatan. Sedangkan sampel serum yang menunjukkan positif terhadap virus AI subtipe H9N2 berasal dari 7 provinsi yaitu: Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan Bali. Dengan memperhatikan bahwa pada saat kegiatan pengkajian ini dilaksanakan belum ada vaksin AI subtipe H9N2 yang telah diregistrasi, maka adanya serum positif virus AI subtipe H9N2 mengindikasikan terjadinya infeksi lapang ataupun penggunaan vaksin AI subtipe H5N1 yang juga mengandung subtipe H9N2.

Kata kunci: *Avian influenza*, vaksin, serologis, hambatan hemaglutinasi

PENDAHULUAN

Penyakit *Avian influenza* (AI) adalah penyakit penting pada unggas, karena bersifat zoonotik dan menyebabkan kerugian ekonomi dengan tingkat morbiditas dan mortalitas penyakit sangat tinggi (90-100%). Penyakit ini disebabkan oleh virus AI subtipe H5N1 yang mempunyai patogenesis tinggi^(6,11)

Kebijakan Pemerintah dalam pengendalian dan penanggulangan penyakit AI di Indonesia adalah melalui program vaksinasi. Program vaksinasi dilakukan untuk mengurangi jumlah hewan yang peka terhadap infeksi dan mengurangi *shedding* virus atau virus yang dikeluarkan dari hewan tertular sehingga mengurangi kontaminasi lingkungan (memutus mata rantai penyebaran virus AI). Vaksin AI yang beredar di Indonesia adalah vaksin AI yang menggunakan *seed* lokal dan diproduksi di dalam negeri. Saat ini vaksin AI yang beredar di Indonesia adalah vaksin AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Penggunaan dan kebutuhan vaksin AI di Indonesia cukup besar, sementara kasus AI di Indonesia masih terjadi.

Pada akhir tahun 2016 dilaporkan terjadinya kasus penurunan produksi telur pada peternakan ayam petelur (layer) di beberapa provinsi di Indonesia dan ditengarai kasus tersebut disebabkan oleh virus AI subtipe H9N2. Kondisi ini menyebabkan beberapa pelaku usaha peternakan ayam melakukan vaksinasi AI dengan vaksin AI bivalen, yaitu kombinasi antara AI subtipe H5N1 dan H9N2.

Tujuan pengkajian adalah untuk melihat gambaran status kekebalan pasca vaksinasi AI pada ayam layer di lapangan.

MATERI DAN METODE

Materi

1. Materi Sampling

Bahan dan alat yang dibawa untuk sampling pengkajian adalah: *ice box* (kotak pendingin), *ice packs*, termometer, spuit 3 mL, kapas alkohol, tabung 1.8 mL, kotak wadah serum, APD (alat pelindung diri), marker, label dan parafilm.

2. Materi Pengujian

a. Uji Hambatan Aglutinasi (OIE 2015)

Bahan dan alat uji hambatan aglutinasi yaitu virus (antigen AI subtipe H5N1 dan H9N2 produksi Pusvetma, serum positif AI, serum negatif AI, 800 sampel serum dari hasil sampling, *Phospat Buffer Saline/PBS* (Gibco), *Red Blood Cell* (RBC) 1 %, larutan Alsever, alkohol 70 %, iodin, *microplate 96 well V-bottom* (Nunc), *multi*

channel 10-100 μ l, *single channel* 25-100 μ l, tips 10-100 μ l, *pipet aids*, *pipet measure* 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, *Biosafety Cabinet* (BSC) tipe 2a, *shaker*, *chamber*, masker, sarung tangan, *baker plastic* volume 2L (*autoclavable*).

Metode

1. Metode Sampling

Sampel serum ayam layer pascavaksinasi AI diambil dari 8 Provinsi di Indonesia yang dipilih berdasarkan pertimbangan anggaran Tugas Pembantuan (TP) pengendalian AI (Ditjennak 2019), yaitu Sumatera Barat, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Kalimantan Selatan, Sumatera Selatan dan Bali. Dari setiap provinsi dipilih dua Kabupaten/Kota yang disesuaikan dengan arahan Dinas Peternakan setempat. Setiap Kabupaten/Kota diambil sampel darah ayam layer pasca vaksinasi AI sebanyak lima puluh (50). Sampel darah diambil melalui *vena brachialis* dengan menggunakan spuit 3 mL, selanjutnya disimpan pada suhu ruang (27-32°C) sampai serumnya keluar. Serum dimasukkan ke dalam tabung 1.8 mL dan disimpan dalam kotak pendingin dengan suhu 2-8°C, untuk selanjutnya diukur titer antibodinya terhadap virus AI di Laboratorium Unit Uji Virologi BBPMSOH.

2. Metode Pengujian

a. Uji Hambatan Hemaglutinasi (OIE 2015)

- Uji Hemaglutinasi (HA)

Masukkan 0,025 mL PBS, pH 7.0–7.4 ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Masukkan 0,025 mL virus AI ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian buat pengenceran dua kali 0,025 mL antigen. Masukkan 0,025 mL PBS pada semua lubang *microplate*. Masukkan 0,025 mL RBC 1% ke semua lubang *microplate*. Homogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC.

- Uji *Back Titration*

Masukkan 0,025 mL PBS, pH 7.0– 7.4 ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Masukkan 0,025 mL virus AI 4 HAU ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian buat pengenceran dua kali 0,025 mL antigen. Masukkan 0,025 mL PBS pada semua lubang *microplate*. Masukkan 0,025 mL RBC 1% ke semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara

perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC.

- Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

Masukkan 0,025 mL PBS, pH 7.0–7.4 ke dalam masing-masing lubang pada *microplate*. Masukkan 0,025 ml serum ke dalam lubang pertama *microplate*. Kemudian dibuat pengenceran dua kali 0,025 mL serum. Masukkan 0,025 mL antigen 4 HAU pada semua lubang *microplate* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (25-27°C). Masukkan 0,025 mL RBC 1% ke semua lubang *microplate*. Selanjutnya dihomogenkan dengan *shaker* secara perlahan dan inkubasikan selama 40 menit pada suhu ruang (25-27°C). Hasil dibaca dengan memiringkan *microplate* agar terlihat ada tidaknya aliran RBC.

Interpretasi hasil berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 28/Permentan/OT.140/5/2008 suatu flock peternakan dinyatakan protektif apabila lebih dari 70% sampel memiliki titer protektif lebih dari 16 (>16).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1 Hasil

Sampel serum ayam petelur pascavaksinasi AI telah didapat dari 8 provinsi, masing-masing berjumlah 100 sampel perprovinsi, sehingga total sampel yang terkoleksi sebanyak 800 sampel. Terhadap sampel serum darah tersebut dilakukan uji hambatan hemaglutinasi⁽⁶⁾ untuk mengetahui titer antibodi serum terhadap virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2. Apabila lebih dari 70% sampel serum dari flock menunjukkan titer lebih besar dari 16 (≥ 16) terhadap virus AI subtipe H5N1, berarti vaksin AI yang diaplikasikan protektif terhadap virus AI, khususnya subtipe H5N1⁽²⁾. Sampel serum dinyatakan positif antibodi terhadap virus AI subtipe H5N1 bila memiliki titer sebesar 16, dan dinyatakan negatif bila titer kurang dari 16.

Pengujian sampel serum secara serologis terhadap virus AI subtipe H9N2 dinyatakan positif apabila titer antibodi terhadap virus AI subtipe H9N2 lebih besar dari 128 (≥ 128)^(6,11). Pengujian terhadap ada tidaknya titer antibodi terhadap antigen virus AI subtipe H9N2 dilakukan karena pada saat kegiatan pengkajian ini dilaksanakan vaksin AI yang telah diregistrasi masih terbatas pada vaksin tunggal AI subtipe H5N1.

Hasil uji serologis terhadap 800 sampel serum pascavaksinasi AI sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Titer Antibodi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 dan H9N2 Serum Paskavaksinasi AI di 8 Provinsi di Indonesia Tahun 2019

No	Provinsi	Titer Antibodi AI H5N1			Titer Antibodi AI H9N2	
		> 16	16	< 16	≥128	< 128
1	Sumatera Barat					
	Payakumbuh	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	44 (88%)	6 (12%)
	Lima Puluh Kota	48 (96%)	0 (0%)	2 (4%)	18 (36%)	32 (64%)
2	Sumatera Selatan					
	Banyuasin	20 (40%)	12 (24%)	18 (36%)	36 (72%)	14 (28%)
	Kota Palembang	29 (58%)	12 (24%)	9 (18%)	18 (36%)	32 (64%)
3	Jawa Barat					
	Kuningan	49 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	27 (54%)	23 (46%)
	Cirebon	2 (4%)	39 (78%)	9 (18%)	0 (0%)	50 (100%)
4	Jawa Tengah					
	Demak 1	24 (48%)	14 (28%)	12 (24%)	13 (26%)	37 (74%)
	Demak 2	21 (42%)	23 (26%)	6 (12%)	39 (78%)	11 (22%)
5	Daerah Istimewa Yogyakarta					
	Bantul	8 (16%)	20 (40%)	22 (44%)	30 (60%)	20 (40%)
	Sleman	38 (76%)	4 (8%)	8 (16%)	33 (66%)	17 (34%)
6	Jawa Timur					
	Blitar	35 (70%)	7 (14%)	8 (16%)	42 (84%)	8 (16%)
	Kediri	1 (2%)	2 (4%)	47 (94%)	29 (58%)	21 (42%)
7	Bali					
	Tabanan	46 (92%)	4 (8%)	0 (0%)	16 (32%)	34 (68%)
	Badung	47 (94%)	3 (6%)	0 (0%)	2 (4%)	48 (96%)
8	Kalimantan Selatan					
	Banjarnegara	41 (82%)	7 (14%)	2 (4%)	0 (0%)	50 (100%)
	Banjarnegara	49 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	50 (100%)
	Total	508 (63.5 %)	149 (18.62 %)	143 (17.88 %)	347 (43.37 %)	453 (56.63 %)

Pada Tabel 1 dapat dilihat keragaan protektivitas vaksin AI berdasarkan pengujian titer antibodi virus AI Subtipe H5N1 dan H9N2 dalam serum paskavaksinasi AI di 8 Provinsi di Indonesia Tahun 2019 sebagai berikut:

- 2.1 Secara keseluruhan, vaksinasi AI belum memenuhi kriteria protektif karena sampel serum yang menunjukkan titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16 berjumlah 508 sampel (63.5%), atau kurang dari 70%.
- 2.2 Secara spesifik per lokasi pengambilan sampel menunjukkan bahwa di beberapa kabupaten/kota pelaksanaan vaksinasi AI memenuhi kriteria protektif terhadap virus AI H5N1 karena lebih dari 70% (>70%) memiliki titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16. Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan proteksi terhadap virus AI H5N1 yaitu yang dilaksanakan di 8 kabupaten/kota di 5 provinsi, meliputi:

- a. Sumatera Barat : Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota
- b. Jawa Barat : Kabupaten Kuningan.
- c. DI Yogyakarta : Kabupaten Sleman.
- d. Bali : Kabupaten Tabanan dan Kabupaten Badung.
- e. Kalimantan Selatan : Kabupaten Banjar Baru dan Kota Banjar.

2.3 Hasil serologis dari serum ayam petelur pascavaksinasi yang menunjukkan bahwa flock peternakannya positif terhadap virus AI subtipe H9N2 (memiliki titer antibodi virus AI H9N2 di atas 128) adalah:

- a. Sumatera Barat : Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota.
- b. Sumatera Selatan : Kabupaten Banyuasin dan Kota Palembang.
- c. Jawa Barat : Kabupaten Kuningan.
- d. Jawa Tengah : Kabupaten Demak.
- e. DI Yogyakarta : Kabupaten Bantul dan Kabupaten Sleman
- f. Jawa Timur : Kabupaten Blitar dan Kabupaten Kediri.
- g. Bali : Kabupaten Badung dan Kabupaten Tabanan.

Pembahasan

Serum pascavaksinasi AI H5N1 berasal dari ayam petelur dengan umur yang bervariasi antara 7-72 minggu berhasil dikoleksi sebanyak 800 sampel. Sampel serum tersebut kemudian diuji dengan uji hambatan aglutinasi untuk mengukur titer antibodi yang timbul terhadap virus AI. Virus yang digunakan adalah AI subtipe H5N1 dan AI subtipe H9N2.

Hasil titer antibodi terhadap AI subtipe H5N1 positif jika mempunyai titer minimal 16⁽¹⁾, dan vaksinasi AI dinyatakan protektif terhadap flock bila lebih dari 70% mempunyai titer lebih besar dari 16⁽²⁾.

Hasil titer antibodi terhadap AI subtipe H9N2 positif jika mempunyai titer lebih besar atau sama dengan 128 (≥ 128)^(4,6)

Tabel 3 menunjukkan bahwa secara keseluruhan 508 sampel (63.5%) dari 800 sampel serum ayam petelur yang diuji memiliki titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16. Hasil ini menunjukkan bahwa vaksinasi AI yang diterapkan belum mampu menimbulkan proteksi. Secara spesifik per lokasi pengambilan sampel menunjukkan bahwa di beberapa kabupaten/kota pelaksanaan vaksinasi AI memenuhi kriteria protektif terhadap virus AI H5N1 karena lebih dari 70% (>70%) memiliki titer antibodi virus AI H5N1 di atas 16.

Vaksinasi AI yang berhasil menimbulkan proteksi terhadap virus AI H5N1 yaitu yang dilaksanakan di 8 kabupaten/kota di 5 provinsi, meliputi:

- a. Sumatera Barat : Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota
- b. Jawa Barat : Kabupaten Kuningan.
- c. DI Yogyakarta : Kabupaten Sleman.
- d. Bali : Kabupaten Tabanan dan Kabupaten Badung.
- e. Kalimantan Selatan : Kabupaten Banjar Baru dan Kota Banjar.

Keberhasilan program vaksinasi dapat dilihat dari nilai protektif terhadap virus AI subtipe H5N1 yang didapat. Peternakan yang tidak mempunyai tingkat proteksi dapat disebabkan berbagai faktor diantaranya tata laksana vaksinasi, tata laksana peternakan, dan biosekuriti lingkungan yang kurang memadai. Tata laksana vaksinasi dan tata laksana peternakan terlihat dari data vaksinasi di peternakan yang tidak terdokumentasi dengan baik, dan tidak adanya riwayat vaksinasi AI di peternakan.

Tabel 1 menunjukkan bahwa 347 (43,37%) sampel serum yang diuji terhadap titer antibodi virus AI subtipe H9N2 menunjukkan hasil positif karena mempunyai titer lebih besar atau sama dengan 128 (≥ 128). Sampel serum tersebut berasal dari 7 provinsi meliputi: Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur dan Bali.

Sampel serum pascavaksinasi vaksin AI yang menunjukkan titer antibodi protektif virus AI H5N1 ($>70\%$ flock mempunyai titer antibodi H5N1 >16) dan positif subtipe H9N2 (mempunyai titer antibodi H9N2 ≥ 128), diindikasikan terjadinya infeksi lapang atau penggunaan vaksin AI subtipe H5N1 yang juga mengandung subtipe H9N2. Sampel serum tersebut berasal dari 6 kabupaten/kota di 4 provinsi, meliputi Provinsi: 1) Sumatera Barat (Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota), 2) Jawa Barat (Kabupaten Kuningan), 3) DIY (Kabupaten Sleman), dan 4) Bali (Kabupaten Badung dan Tabanan).

Dengan mempertimbangkan bahwa pada saat kegiatan pengkajian ini dilaksanakan belum ada vaksin AI kombinasi antara virus AI subtipe H5N1 dan subtipe H9N2, atau vaksin AI tunggal subtipe H9N2 yang telah diregistrasi, maka adanya serum positif virus AI subtipe H9N2 mengindikasikan ayam-ayam tersebut pernah terpapar virus AI subtipe H9N2 yang berasal dari infeksi lapang atau penggunaan vaksin AI subtipe H5N1 yang juga mengandung subtipe H9N2.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Tingkat keberhasilan program vaksinasi yang dilakukan di tingkat peternakan kurang dari 70% pada sampel serum yang berasal dari Kabupaten Demak (Provinsi Jawa Tengah), Kabupaten Bantul (Provinsi DIY), Kabupaten Banyuasin dan Kota Palembang (Provinsi Sumatera Selatan), Kabupaten Kediri (Provinsi Jawa Timur), dan Kabupaten Cirebon (Provinsi Jawa Barat).

Adanya serum positif virus AI subtipe H9N2 pada sampel yang berasal dari Kabupaten Payakumbuh dan Kabupaten Lima Puluh Kota (Provinsi Sumatera Barat), Kabupaten Banyuasin dan Kota Palembang (Provinsi Sumatera Selatan), Kabupaten Kuningan (Provinsi Jawa Barat), Kabupaten Demak (Provinsi Jawa Tengah), Kabupaten Bantul dan Kabupaten Sleman (Provinsi DI Yogyakarta), Kabupaten Blitar dan Kabupaten Kediri (Provinsi Jawa Timur), Kabupaten Badung dan Kabupaten Tabanan (Provinsi Bali), mengindikasikan ayam-ayam tersebut pernah terpapar virus AI subtipe H9N2 yang berasal dari infeksi lapang atau penggunaan vaksin AI subtipe H5N1 yang juga mengandung subtipe H9N2.

Saran

1. Memberi masukan kepada Dinas Peternakan Provinsi Jawa Tengah, Provinsi Daerah Isimewa Yogyakarta, Provinsi Sumatera Selatan, Provinsi Jawa Timur, Provinsi Sumatera Barat, Provinsi Jawa Barat, Provinsi Bali, dan Provinsi Kalimantan Selatan bahwa dapat meningkatkan evaluasi hasil vaksinasi secara rutin ditingkat peternakan dan meningkatkan pelaksanaan biosekuriti pada peternakan tersebut.
2. Perlu dilakukan pengkajian vaksin AI dan serum paska vaksinasi di seluruh provinsi Indonesia yang berkesinambungan, agar data yang diperoleh terkait kualitas mutu vaksin AI yang beredar dapat dievaluasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam kegiatan pengkajian ini, terutama pihak dinas provinsi dan kabupaten yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan Provinsi Jawa Tengah, Provinsi Daerah Isimewa Yogyakarta, Provinsi Sumatera Selatan, Provinsi

Jawa Timur, Provinsi Sumatera Barat, Provinsi Jawa Barat, Provinsi Bali, dan Provinsi Kalimantan Selatan, yang telah memfasilitasi proses pengambilan sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- 1.[Ditjennak]. 2007. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 3.
- 2.[Ditjennak]. 2008. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 28/Permentan/OT.140/5/2008. Tentang Pedoman Penataan Kompartemen dan Penataan Zona Usaha Perunggasan.
- 3.[Ditjennak]. 2017. Peta Status dan Situasi Penyakit Hewan Nasional.
- 4.[Ditjennak]. 2018. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Jilid 1. Edisi 5.
- 5.[Ditjennak]. 2019. Perencanaan Anggaran Kesehatan Hewan 2019 yang disampaikan pada Rakernas tanggal 15 Januari 2019 di Bogor.
- 6.[OIE] Office International Des Epizooties. 2015. OIE Terrestrial Manual. Avian Influenza.http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_ND.pdf.
- 7.Alexander DJ. 1996. Highly Pathogenic Avian Influenza. Manual of Standars for Diagnostic Test and Vaccines. OIE. hal. 155-160.
- 8.Hewajuli, Dharmayanti NLPI. 2008. Karakterisasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza (AI). Wartazoa Vol. 18 No. 2.
- 9.Lee CW, Saif YM. 2009. Avian Influenza Virus. *J. of Comparative Imm.,Micr and Infect Dis* (32). hal: 301-310.
- 10.Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijayakrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rainer JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farra J. Webster RG, Chen H, Peiris JS and Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 50(2): 258 – 268.
- 11.Swayne DE, Havorson DA. 2008. Influenza. Editor Saif YM dalam *Disease of Poultry*. Edisi 12. Blackwell Publishing. Hal: 153-184.
- 12.Webster RG, Bean WJ,Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 152 – 179.

