

Vol. 5 No. 2, September 2011
ISSN : 1978-225X

Jurnal Kedokteran Hewan



FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS SYIAH KUALA
Bekerjasama dengan
PERHIMPUNAN DOKTER HEWAN INDONESIA



ISSN : 1978-225X

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN
Vol. 5 No. 2, September 2011

Terbit setiap Maret dan September

Alamat Redaksi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala,
Jl. Tgk. Hasan Krueng Kalee No. 4 Darussalam, Banda Aceh, 23111
Telp./Fax. No. 0651-7551536, *E-mail* : jurnal_khusk@yahoo.com

Ketua Penyunting :
Tongku N. Siregar

Penyunting Pelaksana :
Hamdan
T. Armansyah TR
Arman Sayuti
Erdiansyah Rahmi
Amalia Sutriana
Dwinna Aliza

Penyunting Ahli :
Mahdi Abrar
M. Hambal
T. Fadrial Karmil
M. Aman Yaman
Yudha Fahrimal
Sugito
Samadi

Sekretariat :
Fakhrurrazi

Rekening : 158-0000007419 Bank Mandiri
Cabang Banda Aceh

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN

SYARAT-SYARAT PENULISAN

1. Ketentuan Umum

Naskah harus asli yang dihasilkan dari hasil penelitian bidang kedokteran hewan dan peternakan yang belum pernah dipublikasikan.

2. Format Penulisan

- Artikel diketik dengan jarak 2 spasi kecuali untuk judul, abstrak, judul tabel, judul gambar dan daftar pustaka diketik menurut ketentuan tersendiri
- First line* dimulai 5 ketukan ke dalam.
- Huruf *Times New Roman* 12
- Kertas HVS ukuran kuarto (8,5 x 11")
- Naskah dapat ditulis dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris
- Jumlah halaman penulisan maksimal 8 (delapan) halaman

3. Sistematika Penulisan

- Judul*
Judul artikel dalam berkala ilmiah haruslah spesifik dan efektif (tidak boleh lebih dari 14 kata dalam tulisan berbahasa Indonesia, atau 10 kata bahasa Inggris, atau 90 ketuk pada papan kunci). Judul dibuat dalam 2 bahasa yaitu bahasa Indonesia dan bahasa Inggris.
- Identitas Penulis*
Nama-nama penulis ditulis tanpa gelar akademis atau indikasi jabatan dan kepangkatan. Identitas penulis harus dilengkapi dengan alamat lembaga tempat kegiatan penelitian dilakukan untuk keperluan alamat korespondensi kalau berbeda (jika ada alamat *e-mail* dicantumkan)
- Abstrak*
Setiap artikel harus disertai satu paragraf abstrak (bukan ringkasan yang terdiri atas beberapa paragraf) secara gamblang, utuh, dan lengkap yang menggambarkan esensi isi keseluruhan tulisan. Abstrak ditulis dalam 2 bahasa yakni bahasa Indonesia dan bahasa Inggris yang maksimal terdiri dari 200 kata. Abstrak dilengkapi dengan 3-5 kata kunci yang mencerminkan konsep yang dikandung artikel.
- Pendahuluan*
Pendahuluan berisi latar belakang, tujuan dan manfaat penelitian
- Materi dan Metode*
Materi dan metode memuat bahan dan peralatan yang digunakan terutama yang spesifik. Prosedur penelitian harus ditulis secara singkat.
- Hasil dan Pembahasan*
- Kesimpulan*
- Ucapan Terima Kasih* (bila perlu)
- Daftar Pustaka*
Daftar pustaka disusun berdasarkan abjad dan bukan nomor urut. Penulisan nama jurnal harus sesuai dengan singkatan yang berlaku (kalau tidak ada singkatan, jangan disingkat). Komposisi sumber pustaka adalah jurnal ilmiah/majalah ilmiah minimal 60% dan *textbook* maksimal 40%.

Contoh.

- Jainudeen, M.R. and E.S.E. Hafez. 2000. Gestation, Prenatal Physiology, and Parturition. In **Reproduction in Farm Animals**, B. Hafez and E.S.E. Hafez (ed). 7th Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Siregar, T.N., N. Areuby, G. Riady, dan Amiruddin. 2004. Efek pemberian PMSG terhadap respon ovarium dan kualitas embrio kambing lokal prepuber. **Media Kedokteran Hewan** 20(3):108-112.

4. Prosedur Pengiriman Naskah

Pengiriman makalah dapat dilakukan setiap saat dalam bentuk cetakan (*print out*) sebanyak 3 (tiga) eksemplar dan 1 (satu) disket 3,5" atau CD (program MS World) dikirim ke alamat redaksi :

Jurnal Kedokteran Hewan

Alamat Redaksi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala,
Jl. Tgk. Hasan Krueng Kalee No. 4 Darussalam, Banda Aceh, 23111
Telp./Fax. No. 0651-7551536, *E-mail* : jurnal_khusk@yahoo.com

Makalah yang telah dimuat dikenai biaya penerbitan dan pengiriman lewat transfer-bank Mandiri cabang Banda Aceh atas nama drh. Hamdan, MP., Rek. No. 158-0000007419. Semua keputusan redaksi tidak dapat diganggu-gugat dan tidak diadakan surat menyurat untuk keputusan tersebut.

PEMILIHAN *ADJUVANT* PADA VAKSIN *AVIAN INFLUENZA*

Used of Adjuvant in Avian Influenza Vaccine

I Nyoman Suartha¹, I Wayan Teguh Wibawan², I Gusti Ngurah Narendra Putra³,
Ni Made Ritha Krisna Dewi³, dan I Gusti Ngurah Kade Mahardika³

¹Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

²Laboratorium Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Virologi dan Biologi Molekuler Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

E-mail: suartha@khunud@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui perbedaan respon antibodi yang ditimbulkan oleh vaksin AI dengan *seed* virus AI H5N1 Indonesia yang dicampur dengan *adjuvant* berbeda. Formula vaksin yang dicobakan pada penelitian ini adalah monovalen dan polivalen. Tiga isolat virus HPAI sub tipe H5N1 yang digunakan adalah Chicken/Denpasar/Unud-01/2004, Chicken/Klungkung/Unud-12/2006, dan Chicken/Jembrana/Unud-17/2006. *Adjuvant* yang digunakan yaitu *Freund's complete* dan *incomplete adjuvant*, aluminium hidroksida, dan *immunostimulating complexes* (Iscoms). Vaksin monovalen dibuat dengan cara masing-masing isolat virus AI yang telah diinaktivasi dicampur dengan masing-masing *adjuvant*. Vaksin campuran (polivalen) dibuat dengan mencampur ketiga isolat dengan masing-masing *adjuvant*. Vaksin disuntikkan secara subkutan pada ayam layer jenis Isa Brown umur 3 minggu dan diulang pada umur ayam 5 minggu masing-masing sebanyak 0,5 ml/ekor. Pengambilan serum untuk pengujian titer antibodi dilakukan setiap 1 minggu setelah vaksinasi. Pengujian antibodi poliklonal dilakukan dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ayam percobaan yang divaksinasi dengan *adjuvant* aluminium hidroksida mempunyai GMT anti-H5 paling tinggi baik pada vaksin monovalen atau polivalen. *Adjuvant* aluminium hidroksida adalah *adjuvant* terbaik untuk pembentukan antibodi anti-AI sub tipe H5N1 pada ayam.

Kata kunci: *adjuvant*, *avian influenza*, antibodi

ABSTRACT

This study aims to determine the antibody responses induced by vaccine avian influenza virus (AIV) H5N1 Indonesia, which was mixed with different adjuvant. Two formulas of vaccine were tried, i.e. monovalent and polyvalent vaccines. Three isolates of AIV H5N1 have been tried in this experiment. The isolates were Chicken/Denpasar/Unud-01/2004, Chicken/Klungkung/Unud-12/2006, and Chicken/Jembrana/Unud-17/2006. The adjuvants were Freund's complete and incomplete adjuvant, aluminum hydroxide, and immunostimulating complexes (Iscoms). Monovalent vaccines were made with each vaccine and mixed with each adjuvant. The polyvalent vaccine was made by mixing all three seeds with adjuvant. Vaccines were injected subcutaneously to Isa Brown layer chicken at 3 weeks of age and repeated at the age of 5 weeks each with 0.5 ml vaccine per chicken. Sera were harvested at one and two weeks after the second vaccination. The sera were tested with hemagglutination inhibition test (HI). The results show that the geometric mean titer (GMT) of sera of chickens vaccinated with aluminum hydroxide adjuvant has highest titer compare to Freund's and ISCOM adjuvant. It is concluded that the adjuvant aluminum hydroxide is the best adjuvant to induce anti-AIV H5N1 antibody in chicken.

Keywords: *adjuvant*, *avian influenza*, *antibody*

PENDAHULUAN

Virus *Avian Influenza* (AI) yang sangat patogen (*highly pathogenic avian influenza virus*/HPAI) sub tipe H5N1 yang mewabah pada unggas dilaporkan dapat melewati barrier spesies unggas-manusia dan dapat menjadi ancaman pandemi (De Jong dan Hien, 1997; WHO, 2005; Fouchier *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Pencegahan infeksi AI pada unggas sangat penting dilakukan. Ratusan juta ayam dan itik telah dimusnahkan untuk menghentikan laju penyebarannya. Strategi yang umum dilakukan untuk pengendalian AI

pada unggas adalah pemusnahan unggas yang tertular dalam radius tertentu (*stamping out/preemptive culling*), biosekuriti, dan vaksinasi.

Salah satu upaya untuk meningkatkan efektivitas vaksinasi untuk mempercepat peningkatan titer antibodi adalah dengan penggunaan *adjuvant* pada vaksin. *Adjuvant* adalah bahan yang ditambahkan pada vaksin untuk merangsang respon imun. Vaksin tanpa *adjuvant* tidak mampu merespon titer antibodi secara maksimal dan protektif pada pencegahan influenza (Stephenson *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2009). *Adjuvant* sering digunakan jika antigen

segera dinetralisir tubuh atau antigen tidak mampu merespon pembentukan antibodi. Penggunaan *adjuvant* mampu meningkatkan titer dua kali lebih tinggi dibandingkan tanpa *adjuvant* (De Jong *et al.*, 2003). Penggunaan *adjuvant* juga dapat mengurangi dosis antigen yang diperlukan dalam merespon antibodi. Di samping itu *adjuvant* juga mampu membuat keseimbangan respon antibodi humoral dan antibodi berperantara sel (Hunter, 2002).

Efektivitas dari vaksin AI juga sangat ditentukan oleh *seed* virus vaksin yang digunakan. Vaksin yang baik mampu mencegah dengan sempurna timbulnya gejala klinis dan menekan pengeluaran virus (virus *shedding*) secara sempurna jika unggas yang divaksin terpapar virus lapang yang ganas (FAO, 2008). Dalam penelitian ini diamati perbedaan respon antibodi yang ditimbulkan oleh vaksin AI dengan *seed* virus AI H5N1 Indonesia yang dicampur dengan berbagai *adjuvant*.

MATERI DAN METODE

Keamanan Laboratorium

Semua pekerjaan laboratorium dengan virus aktif dilakukan dalam ruangan khusus yang kedap udara dengan fasilitas penyaring udara masuk dan keluar dengan HEPA filter, yang didalamnya dilengkapi dengan *Biosafety Cabinet Class III* (BSC-III) bertekanan negatif dan *autoclave*. Semua bahan yang hendak dibuang dan alat yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam *autoclave* sebelum dikeluarkan dari ruangan. Tenaga kerja yang bekerja dalam ruangan tersebut selalu dilengkapi dengan *Personal Protective Equipment* (PPE) baku.

Virus dan Antibodi Standar

Tiga isolat virus HPAI subtipe H5N1 yang digunakan dalam penelitian adalah Chicken/Denpasar/Unud-01/2004, Chicken/Klungkung/Unud-12/2006, dan Chicken/Jembrana/Unud-17/2006 (Mahardika *et al.*, 2004; Mahardika *et al.*, 2006a; Mahardika *et al.*, 2006b). Anti VAI-H5N1 standar diperoleh dari Balitvet Bogor.

Formulasi Vaksin dengan *Adjuvant*

Adjuvant yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Freund's complete* (FC) dan *incomplete adjuvant* (Sigma), aluminium hidroksida (AH) (Sigma), dan *immunostimulating complexes* (Iscoms). Pembuatan vaksin monovalen dibuat dengan cara masing-masing isolat virus AI yang telah diinaktivasi dengan formaldehid 1% (titer 2^7 HA unit) dicampur dengan *Freund's complete* dan *incomplete adjuvant* berdasarkan protokol standar (Harlow dan Lane 1988), aluminium hidroksida, dan Iscoms (Isconova,

AB, Swedia). Vaksin campuran (polivalen) representasi ketiga kelompok genetik dan antigenik virus AI H5N1 Indonesia (AI3G) dilakukan dengan mencampur ketiga isolat dengan dosis masing-masing 2^4 dengan *adjuvant*. Perbandingan isolat dengan *adjuvant* adalah 50:50. Campuran selanjutnya disuntikkan secara subkutan pada ayam layer jenis Isa Brown sebanyak 0,5 ml/ekor. Penyuntikan dilakukan pada ayam umur 3 minggu dan diulang pada umur ayam 5 minggu. Setiap perlakuan menggunakan 5 ekor ayam. Vaksinasi diulang setiap dua minggu. Pengambilan serum untuk pengujian titer antibodi dilakukan setiap 1 minggu setelah vaksinasi. Pengujian silang antibodi poliklonal dilakukan dengan menantang serum-serum khas tersebut dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI).

Uji Hambatan Hemaglutinasi

Penapisan (*screening*) serum untuk deteksi antibodi dilakukan dengan uji HI cepat. Ke dalam plat mikro, diteteskan sebanyak 0,025 ml serum yang telah diperlakukan awal dan 0,025 ml antigen AI 4 unit HA. Selanjutnya plat mikro beserta isinya diayak selama 30 detik, kemudian dieramkan selama 30 menit. Sebanyak 0,05 ml suspensi sel darah merah ditambahkan kembali ke dalam lubang tersebut lalu diayak selama 30 detik. Hasil dapat diamati setiap 15 menit setelah perlakuan terakhir. Kontrol virus dibuat bersama-sama dengan saat melakukan uji HI di atas dengan materi berupa 0,025 ml *Phosphat Buffer Saline* (PBS), 0,025 ml antigen AI 4 unit HA, dan 0,05 ml suspensi sel darah merah 0,5%. Kontrol darah dibuat dengan mengikuti langkah yang sama dengan materi berupa 0,05 ml PBS dan 0,05 ml suspensi sel darah merah. Serum diperiksa lebih lanjut dengan uji HI titrasi apabila terbentuk endapan nyata di dasar tabung.

Untuk mengetahui titer antibodi, maka dilakukan uji HI titrasi dengan dua kali ulangan berdasarkan prosedur baku (WHO, 2002). Sebanyak 0,025 ml PBS, dimasukkan ke dalam lubang ke-2 sampai ke-12. Lubang pertama dan kedua diisi dengan serum dan kemudian diencerkan secara seri kelipatan dua dari lubang kedua sampai dengan lubang ke-11 dengan pengencer mikro. Setelah melakukan pengenceran kemudian ditambahkan masing-masing 0,025 ml suspensi antigen 4 unit HA ke dalam lubang ke-1 sampai ke-11. Lubang ke-12 hanya diisi dengan PBS 0,025 ml. Setelah menyelesaikan prosedur di atas dilakukan pengayakan selama 30 detik dan selanjutnya dieramkan dalam suhu kamar selama 30 menit. Setelah dieramkan, ditambahkan 0,05 ml suspensi sel darah merah 0,5% ke dalam lubang ke-1 sampai ke-12 dan diayak kembali

selama 30 detik. Setelah diayak plat mikro dieramkan pada suhu kamar selama 1 jam dan diamati setiap 15 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi antibodi poliklonal untuk ketiga isolat dan gabungan ketiga isolat dengan masing-masing *adjuvant* disajikan pada Tabel 1. Dari hasil percobaan itu tampak bahwa ayam percobaan yang divaksinasi dengan *adjuvant* aluminium hidroksida mempunyai GMT anti-H5 paling tinggi.

Aluminium hidroksida termasuk *adjuvant* tradisional yang berperan membentuk kantong atau depo antigen sehingga antigen vaksin dikeluarkan secara perlahan-lahan untuk memicu respon imun yang lebih lama. Pencampuran vaksin dengan *adjuvant* ini akan memicu timbulnya granuloma yang kaya makrofag. *Adjuvant Freund's complete* merupakan *adjuvant* campuran yang mengandung bakteri *Mycobacterium tuberculosis* mati dalam emulsi air dalam minyak. *Adjuvant* ini juga membentuk depo antigen vaksin, akan tetapi juga memicu makrofag dan sel dendritik (Tizard, 2004). *Imunostimulating complex* (Iscoms) merupakan *adjuvant* modern yang baru dikembangkan dekade 90-an. *Adjuvant* ini merupakan kompleks yang stabil yang mengandung kolesterol, fosfolipid, saponin Quill A dari tanaman *Quillaia saponaria* Molina, dan antigen. *Adjuvant* ini sangat efektif dalam mengarahkan antigen dan *antigen presenting cells* (APC) serta memicu produksi sitokin dan molekul yang ko-stimulatori (Sjoelander *et al.*, 1998; Tizard, 2004; Rajput *et al.*, 2007). *Adjuvant* Iscoms dapat memicu respon antibodi humoral baik sistemik maupun lokal pada mukosa serta kekebalan berperantara sel, dengan dosis antigen yang rendah (Helgeby *et al.*, 2006; Rajput *et al.*,

2007). *Adjuvant* Iscoms telah banyak dicoba sebagai *adjuvant* untuk hewan, sedangkan penggunaan untuk manusia masih dalam tahap percobaan (Sjoelander *et al.*, 1998).

Dalam menerapkan vaksinasi sebagai salah satu strategi penanggulangan AI, hendaknya vaksin AI mampu mencegah dengan sempurna timbulnya gejala klinis dan mampu menekan pengeluaran virus (virus *shedding*) secara sempurna jika unggas yang divaksin terpapar virus lapang yang ganas. Sediaan vaksin AI untuk unggas yang umum untuk penggunaan komersial adalah vaksin virus inaktif dalam *adjuvant* minyak (Van der Goot *et al.*, 2005). Vaksin jenis ini telah terbukti dapat melindungi unggas dari gejala klinis dan kematian, tetapi tidak menekan ekskresi virus (Capua *et al.*, 2002). Penularan yang tak kasat mata ini (*silent transmission*) meningkatkan risiko wabah baru dan membawa ancaman pada kesehatan masyarakat.

Efek samping penggunaan *adjuvant* seperti kolaps, konvulsi, eritema, kebengkakan pada tempat injeksi, dan peningkatan suhu tubuh tidak ditemukan pada anak-anak pada penggunaan *adjuvant* aluminium hidroksida, sedangkan pada balita ditemukan gejala eritema dan peningkatan suhu tubuh setelah vaksinasi. Akan tetapi gejala itu tidak berlangsung dalam jangka waktu lama (Jefferson *et al.*, 2004). Pada penelitian ini juga tidak diamati adanya gejala seperti yang dilaporkan peneliti lain.

KESIMPULAN

Adjuvant aluminium hidroksida mampu merangsang pembentukan titer antibodi tertinggi terhadap vaksin AI subtype H5N1 isolat Indonesia baik dalam bentuk vaksin monovalen atau polivalen AI3G dibandingkan *adjuvant* Freund's komplit dan Iscoms.

Tabel 1. Rataan titer geometrik (Geometrik mean titer/GMT) antibodi AI H5 (-log2) pada serum ayam dengan berbagai *seed* vaksin dan berbagai *adjuvant* pada minggu ke-4

No.	Antigen	<i>Adjuvant</i>	GMT (unit Hi ²)
1.	Chickens/Denpasar/Unud-01/2004	AH	5,8
		FC	4,4
		Iscoms	3,6
2.	Chickens/Klungkung/Unud-12/2006	AH	7,0
		FC	4,4
		Iscoms	4,6
3.	Chickens/Jembrana/Unud-17/2006	AH	6,6
		FC	2,6
		Iscoms	2,8
4.	AI3G	AH	6,0
		FC	4,2
		Iscoms	3,8
5.	Kontrol negatif (PBS)	AH	0,0
		FC	0,0
		Iscoms	0,0

Keterangan: AH (aluminium hidroksida); FC (*Freund's complete adjuvant*); Iscoms (*Imunostimulating complex*)

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia atas bantuan dana penelitian melalui Program Insentif Riset Terapan tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Capua, I., C. Terregino, G. Cattoli, F. Mutinelli, and J.F. Rodriguez. 2002. Development of DIVA strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. **Avian Pathol.** 32:47-55.
- De Jong, J.C., A.M. Palache, W.E. Beyer, G.F. Rimmelzwaan, A.C. Boon, and A.D.M.E. Osterhaus. 2003. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. **Dev. Biol. (Basel)**. 115:63-73.
- De Jong, M.M. and T.T. Hien. 1997. Avian influenza A(H5N1). **J. Clin. Virol.** 35:2-13.
- FAO. 2008. **A Global Strategy for the Progressive Control of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI)**. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Fouchier, R.A.M., P.M. Schneeberger, F.W. Rozendaal, J.M. Broekman, S.A.G. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G.F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G.J.J.V. Doornum, G.B.A. Koch, M. Koopmans, and A.D.M.E. Osterhaus. 2004. Avian influenza: A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and fatal case of acute respiratory distress syndrome. **PNAS.** 101:1356-1361.
- Galli, G., K. Hancock, K. Hoschler, J. DeVos, M. Praus, M. Bardelli, C. Malzone, F. Castellino, C. Gentile, T. McNally, G. Del Giudice, A. Banzhoff, V. Brauer, E. Montomoli, M. Zambon, J. Katz, K. Nicholson, and I. Stephenson. 2009. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted pre-pandemic vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 106(19):7962-7967.
- Harlow, E.D. and D. Lane. 1988. **Antibodies a Laboratory Manual**. Cold Spring Press, USA.
- Helgeby, A., N.C. Robson, A.M. Donachie, H. Beackock-Sharp, K. Lovgren, K. Schon, A. Mowat, and N.Y. Lycke. 2006. The combined CTA1-DD/ISCOM adjuvant vector promotes priming of mucosal and systemic immunity to incorporated antigens by specific targeting of B cells. **J. of Immunology.** 176(6):3697-3706.
- Hunter, R.L. 2002. Overview of vaccine adjuvants: Present and future. **Vaccine.** 20(3):7-12.
- Jefferson, T., M. Rudin, and C.D. Pietrantonj. 2004. Adverse event after immunization with aluminium-containing DTP vaccine: Systemic review of the evidence. **The Lancet Infectious Diseases.** 4(2):89-89.
- Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Raharjo, P. Puthawathana, C. Buranathai, T.D. Nguyen, A.T. Estoepongastie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T. Hanh, R.J. Webby, L.L. Poon, H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen, R.G. Webster, and J.S. Peiris. 2004. Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in Eastern Asia. **Nature.** 430:209-213.
- Mahardika, I.G.N.K. 2006a. **Laporan Surveillance AI di Bali, NTB, dan NTT Tahun 2005**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar.
- Mahardika, I.G.N.K. 2006b. **Laporan Kajian AI pada Babi dan Monyet Tahun 2006**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar.
- Rajput, Z.J., S.H. Hu, C.W. Xiao, A.G. Arijo. 2007. Adjuvants effects of saponins on animal immune responses. **J. Zhejiang Univ. Sci.** 8(3):153-161.
- Sjoelander, A., J.C. Cox, and I.G. Barr. 1998. Iscoms: An adjuvants with multiple functions. **J. Leukoc. Biol.** 64:713-723.
- Stephenson, I., K.G. Nicholson, A. Colegate, A. Podda, J. Wood, E. Yoma, and M. Zambon. 2002. Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population. **Vaccine.** 21(15):1687-1693.
- Tizard, I.R. 2004. **Veterinary Immunology: An Introduction**. 7th Ed. Saunders, USA.
- Van der Goot, J.A., G. Koch, M.C.M. de Jong, W. Van Boven. 2005. Quantifications of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. **PNAS.** 102(50):18141-18146.
- WHO. 2002. WHO Global Influenza Programme. **www.who.org**.
- WHO. 2005. Global Influenza Program Surveillance Network 2005. Emerging Infectious Diseases. **www.cdc.gov/eid**.