

PENGARUH PEMBERIAN DEAE DEXTRAN DAN PENGATURAN SUHU INKUBASI TERHADAP REPLIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA TELUR AYAM BEREMBRIO

Sapto Rini Budi Prasetyowati*¹, Jusak Nugraha², Chairul A. Nidom³

^{1,2}. Prodi S2 Imunologi Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga

^{1,2}. Universitas Airlangga: Jl. Airlangga Surabaya (031) 5041566, 5041536

e-mail: rinfarah14@gmail.com^{*1}

Abstrak

Kemampuan replikasi virus Avian Influenza (AI) di telur ayam berembrio (TAB) tidak stabil. Titer virus yang dihasilkan rendah dan sangat bervariasi antar tiap TAB. Suhu inkubasi yang optimal bervariasi untuk masing masing virus AI berkisar 35⁰C- 37⁰C. Di-ethyl amino ethyl Dextran (DEAE Dextran) bersifat polikationik sehingga bisa meningkatkan adesi antara virus dan sel embrio. Penelitian ini menggunakan suhu 35⁰C dan suhu 37⁰C serta konsentrasi DEAE Dextran 25 dan 50 mikrogram. Peningkatan replikasi virus diketahui dengan Uji Haemagglutinasi (HA) dan Egg Infectious Dose 50. Hasil uji HA yang dibutuhkan adalah Prosentase titer HA ≥ 128 HAU. Hasil penelitian dengan analisa Chi-square didapatkan hasil bahwa virus A/chicken/Subang29/clade 2.1.3/Pusvetma 2012 ada hubungan prosentase titer HA ≥ 128 , pada suhu inkubasi 37⁰C dan antara tanpa pemberian Dextran dan dengan pemberian DEAE Dextran 25 dan 50 mikrogram. Sedangkan virus A/Chicken/Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012 menunjukkan adanya hubungan besarnya prosentase titer HA ≥ 128 HAU dengan suhu inkubasi 35⁰C dan pemberian Dextran 25 dan 50 mikrogram. Perbedaan kemampuan replikasi kedua virus tersebut dipengaruhi oleh perbedaan susunan asam amino pada Haemagglutinin yang ditunjukkan dengan homologi antara keduanya adalah 87,8%-88,1%. DEAE

Dextran berpengaruh positif terhadap peningkatan kemampuan replikasi virus Avian Influenza HPAI A/chicken/Subang29/clade 2.1.3/Pusvetma 2012 dan A/ Chicken /Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012 pada suhu inkubasi yang berbeda

Keyword: Avian Influenza, DEAE Dextran, Suhu Inkubasi

1. PENDAHULUAN

Antigen AI produk Pusvetma berupa whole virus AI strain tertentu yang inaktif.

Sebagai bahan diagnostik, antigen Pusvetma diharapkan mempunyai sifat-sifat stabil;

akurasi (tepat uji); dan antigennya mudah

direplikasi (dikembangkan). Sifat mudah

dikembangkan adalah salah satu kendala

dalam produksi vaksin dan antigen.

Berdasarkan pengalaman di laboratorium

Pusvetma, terdapat perbedaan kemampuan replikasi di antara virus AI. Virus AI H5N1 yang diisolasi dari daerah Pare yang pertama muncul pada tahun 2004 (A/Ck/Pare/PVF/2004) relatif lebih cepat berkembang biak, lebih stabil dan lebih tinggi jumlah virus yang dihasilkan artinya lebih mudah bereplikasi. Sifat ini membuat proses produksi lebih mudah, lebih cepat dan lebih murah.

Saat ini virus yang beredar di Indonesia adalah virus AI clade 2.3.1 dan virus AI clade 2.3.2. (Azhar, 2014; Hendra, 2014). Dalam rangka monitoring virus AI di Indonesia maka dibutuhkan antisera dan antigen yang mengandung kedua virus tersebut. Sesuai tupoksinya maka Pusvetma melaksanakan pembuatan hiperimmune serum AI clade 2.1.3 dan clade 2.3.2 di mana dalam proses produksinya membutuhkan pembuatan antigen virus AI clade 2.1.3 dan 2.3.2.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1.Faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan replikasi virus AI

Respon kekebalan telur ayam berembrio; suhu inkubasi dan kelembaban, keseragaman umur embrio, strain virus AI dan kemampuan virus AI bereplikasi pada TAB.

Dalam produksi antigen, hasil uji Haemagglutinasinya diharapkan bisa mencapai nilai sama dengan atau lebih besar dari 128 HAU sehingga keseluruhan proses produksi bisa efisien dan efektif. Kemampuan replikasi virus berubah dari waktu ke waktu yang ditunjukkan dengan hasil uji Haemagglutinasinya yang cenderung menurun. Oleh karena itu dicari cara untuk bisa menyelesaikan masalah ini. Suhu inkubasi adalah salah satu faktor yang mempengaruhi kemampuan replikasi virus AI pada telur ayam berembrio (TAB). Suhu yang tinggi mempengaruhi kadar penguapan yang terjadi melalui pori kerabang. Keadaan ini mempengaruhi volume alantois. Semakin banyak terjadi penguapan, volume alantois semakin berkurang. Aktifitas yang tinggi dari Haemagglutinasinya (HA) dan Neurominidase (NA) membebani embrio dan menyebabkan kematian awal pada

embrio. Kematian awal embrio berpengaruh terhadap efisiensi produksi. Hasil penelitian Khalili didapatkan bahwa telur ayam berembrio yang bisa dipakai lebih banyak jika diinkubasikan pada suhu 35⁰C. Hasil penelitian mengenai suhu inkubasi berdasarkan analisa statistik, perbedaan suhu berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzyme polymerase yang meningkat pada suhu 39⁰C dibandingkan pada suhu 35⁰C (Lang et al., 2011). Tapi peneliti lain menulis bahwa titer HA tertinggi didapatkan jika suhu inkubasi 34,4⁰C tergantung strain virus (Khalili, 2013)

2.2. DEAE Dextran

Penggunaan senyawa di-ethyl aminoethyl dextran (DEAE Dextran) untuk meningkatkan kemampuan replikasi virus yang ditunjukkan dengan tingginya titer virus baik dalam EID50 maupun HA. Penambahan inokulum dengan Di-Ethyl Amino Ethyl Dextran (DEAE Dextran) akan meningkatkan titer HA 2 log. DEAE Dextran juga dapat mempermudah partikel virus untuk melekat pada permukaan sel

JBP Vol. 17, No. 3, Desember 2015—Sapto Rini Budi Prasetyo

karena sifatnya sebagai polikation . Informasi yang lain menyebutkan bahwa DEAE Dextran bertindak sebagai pengikat di permukaan sel sebagai sumber ionik virus untuk melekat. (Hassan et al, 2011)

3. METODE PENELITIAN

Telur ayam berembrio yang dipakai adalah Spesifik Antibodi Negatif (SAN) diinokulasi dengan virus AI clade 2.1.3 dan clade 2.3.2. Di-Ethyl Amino Ethyl Dextran (DEAE Dextran) produk dari Sigma kemasan 10 gram. DEAE Dextran diencerkan menjadi 25 µg DEAE Dextran/0.1 ml dan 50 µg DEAE Dextran/0.1 ml. Inokulum virus berisi 10³ EID 50/0.1 ml larutan working seed virus AI clade 2.1.3 dan clade 2.3.2. Besarnya dosis DEAE Dextran ditentukan dari penelitian Eman A. Hassan et al 2011. Inokulasi dilakukan inokulasi DEAE dextran terlebih dahulu 0.1 ml, kemudian suspensi virus 0.1 ml. Perlakuan antar strain dilakukan pada waktu yang berbeda untuk mencegah kontaminasi. Telur ayam berembrio yang telah diinfeksi virus AI H5N1 diberi identitas yang jelas dan diinkubasi pada

suhu 35° C dan 37° C di dalam inkubator selama dua hari. Pengamatan terhadap keadaan embrio dilakukan setiap jam dengan cara diteropong (candling) untuk memastikan bahwa embrio masih hidup. Telur yang mengandung embrio yang telah mati segera dikeluarkan dari inkubator untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam refrigerator bersuhu 4°C guna mencegah terjadinya pembusukan. Telur ayam berembrio yang telah disimpan pada suhu 4° C selama 4-24 jam kemudian dikeluarkan. Bagian kerabang telur didesinfeksi dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian kulit/kerabang telur dikelupas secara aseptik. Membran khorioallantois dan amnion disingkap dan digunting lalu cairan allantoisnya disedot dengan menggunakan spuit secara hati-hati, agar kuning telur tidak ikut terhisap. Masing-masing telur yang dipanen menggunakan spuit yang baru, Setiap spuit diberi tanda sesuai dengan label yang ada pada telur. Hasil panen cairan alantois selanjutnya dibagi dalam wadah steril masing masing 1 cc dan disimpan di suhu -80° C sampai dipergunakan.

JBP Vol. 17, No. 3, Desember 2015—Sapto Rini Budi Prasetyo

UJI HA

Penyiapan Sel Darah Merah / Red Blood Cell (RBC) Ayam 1 %.

Darah ayam segar diambil dengan menggunakan spuit 5 ml melalui vena brachialis, selanjutnya ditampung dalam tabung reaksi yang telah diisi antikoagulan EDTA, dengan dosis 1 mg/mL darah. Sel darah merah dalam tabung reaksi ditambahkan PBS pH 7,0 kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 RPM selama 15 menit. Supernatan dibuang, pellet ditambahkan PBS dan disentrifugasi kembali. Hal ini dilakukan sebanyak tiga kali sehingga diperoleh suspensi sel darah merah yang bersih dan dibuat RBC 5 % dan 1% dengan penambahan PBS pH 7,0.

Metode titrasi virus dengan cara Hemagglutination Assay (HA) (FAO,2014)(OIE,2012)

- a. Virus dititrasi pada mikroplate U-bottom 96-well plate.
- b. 25 µl PBS dimasukkan kedalam seluruh well sesuai jumlah baris yang sudah dihitung untuk mengadakan pengujian.

- c. 25 µl alantois dimasukkan ke dalam well pertama di masing-masing baris pertama untuk pengujian. Pengenceran serial dua kali dari alantois mulai kolom 1 ke kolom 11 dan buang 25 µl dari kolom 11. Kolom 12 sebagai kontrol RBC
- d. 25 µl PBS dimasukkan ke semua wells yang akan digunakan untuk pengujian.
- e. Darah merah ayam (RBC) 1% dimasukkan ke dalam semua well yang digunakan untuk pengujian, tutup semua plate, goyangkan selama 10 sampai 15 detik.
- f. Inkubasi dalam suhu 4°C selama 45 sampai 60 menit
- g. Periksa plate untuk haemagglutinas; Titration endpoint adalah pengenceran antigen tertinggi dimana terjadi agglutinas lengkap. Pada tingkat pengenceran ini, virus dianggap mengandung 1 haemagglutinating unit (HAU) per 25 µl.
- Alantois yang dikumpulkan dari masing masing TAB untuk setiap perlakuan diencerkan secara desimal dalam larutan fosfat penyangga steril PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dengan pH 7,2 yang mengandung Gentamicin 0.2%. Dari pengenceran itu kemudian diambil 5 pengenceran tertinggi yaitu 10^{-5} sampai dengan 10^{-9} untuk disuntikkan kedalam telur - telur ayam berembrio umur 11 hari . Tiap pengenceran tersebut disuntikkan kedalam ruang khorio alantoik telur ayam berembrio sebanyak 5 butir dengan volume 0,1 ml per butir telur. Sedangkan untuk kontrol terdiri dari 5 butir telur ayam berembrio umur 10 hari, disuntik dengan 0,1 ml larutan PBS steril dengan pH 7,2 . Kemudian telur-telur yang telah disuntik disimpan dalam inkubator pada suhu 37 ° C . Telur-telur tersebut diamati setiap hari dengan cara meneropong memakai bola lampu (*Candling*). Kematian embrio pasca inokulasi harus dicatat kemudian cairan khorio alantoiknya diambil untuk dilakukan uji hemagglutinas (HA) untuk memastikan bahwa kematian tersebut disebabkan oleh

Metoda titrasi EID 50 (Young,2010)

virus AI. Penginkubasian dilakukan selama 5 hari, setelah 5 hari semua telur yang masih tersisa (embrio belum mati) dibunuh dengan cara menyimpan didalam lemari es pada suhu 4 ° C selama satu malam. Dari setiap telur diambil cairan khorio alantoiknya dan dilakukan uji Hemagglutinasasi (HA) satu persatu . Selanjutnya kandungan virus dalam EID50 ditentukan berdasarkan rumus sbb . :

$$m = \frac{X_k + 1}{2} d - d \cdot \frac{\sum r_i}{n}$$

M = Titik akhir (endpoint) (EID so); Xk =

Nilai log pada garis akhir titrasi (10)

d = Log -pengenceran dalam hal ini pengenceran 10 kali (log 10= 1);

$\sum r_i$ = Jumlah semua telur yang tidak terinfeksi; n = Jumlah telur yang diinokulasi setiap pengenceran (5 butir telur)

Analisa data

Analisa data menggunakan Chi-square karena yang dibandingkan dua variabel yakni hasil uji HA sama dengan atau lebih dari 128 HAU dengan alantois dengan nilai HA dibawah 128 HAU . Tujuannya untuk melihat apakah ada hubungan antara prosentase HA sama
JBP Vol. 17, No. 3, Desember 2015—Sapto Rini Budi Prasetyo

dengan atau di atas 128 HAU dengan 3 variabel bebas. Dalam penelitian ini variable bebasnya ada 3, yakni DEAE dextran, Strain virus , dan suhu yang berbeda.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 5.1 Prosentase hasil Uji Haemagglutinasasi cairan allantois lebih atau sama dengan 128 HAU

No	Nama virus	SUHU 35 °C			SUHU 37 °C		
		Tanpa dextran	DEAE Dextran 25 µg/0.1 ml All	DEAE Dextran 50 µg/0.1 ml All	Tanpa dextran	DEAE Dextran 25 µg/0.1 ml All	DEAE Dextran 50 µg/0.1 ml All
1	A/chicken/Subang29-clade 2.1.3/Pusvetma-2012	40%	40.00%	48.3%	15%	52%	65%
	A/chicken/Sukoharjo-clade 2.3.2/Pusvetma-2012	65%	83.30%	66.70%	30%	45%	60%

Tabel 5.2 Crosstab dan Chi-square test

Tabel 5.2 Crosstab dan Chi-square test A/chicken/Subang29-clade 2.1.3/Pusvetma-2012

A/chicken/Subang29-clade 2.1.3/Pusvetma-2012		HA		Chi-square test		
		≤128	≥128	Pearson Chi-Square	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Tanpa Dextran, suhu 37°C		85%	15%	13,467	2	,001
25 mikro/0.1ml PBS/0.1 ml All		48.30%	51.70%			
50 mikro/0.1 ml PBS/0.1 ml All		35%	65%			

A/chicken/Subang29-clade 2.1.3/Pusvetma-2012

Ho : Tidak ada hubungan antara prosentase alantois yang mengandung virus di ≥ 128 HAU dengan perlakuan, pemberian DEAE Dextran 25 dan 50 Mikrogram dengan 0.1 ml alantois, dan tanpa pemberian Dextran jika diinkubasikan pada suhu 37°C

H1 : ada hubungan antara prosentase alantois yang mengandung virus ≥ 128 HAU dengan perlakuan, pemberian DEAE Dextran 25 dan 50 Mikrogram dengan 0.1 ml alantois, dan tanpa pemberian Dextran jika diinkubasikan pada suhu 37°C

Jika Chi-square hitung < Chi-square tabel, maka Ho diterima; Jika Chi-square hitung > Chi-square tabel, maka Ho ditolak; Dari Tabel 5.2, jika $\alpha = 0.05$, $df = 2$ maka Chi-square tabel adalah 5.991, sedangkan pada tabel 5.2 Chisquare hitung adalah 13.467, maka Chisquare > chisquare tabel, sehingga Ho ditolak. Probabilitas atau Asymp hitung adalah 0.01, lebih kecil dari 0.05 maka Ho ditolak. Replikasi virus AI Subang 29 clade 2.1.3 akan

meningkat jika inokulum diberi DEAE Dextran dan diinkubasikan pada suhu 37°C

Tabel 5.3 Hasil analisa Crosstab dan Chi-square test
 A/Chicken/Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012

A/Chicken/Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012					
	% HA		Chi-square test		
	≤ 128	≥ 128	Pearson Chi-Square	df	Asymp.Sig (2-sided)
25 mikro/0.1mlPBS/0.1 ml All. suhu 37°	55%	45%	6.348	1	.004
25 mikro/0.1mlPBS/0.1 ml All. suhu 35°C	16.70%	83.30%			

tabel adalah 3.841, sedangkan pada tabel 5.2 Chisquare hitung adalah 6,438, maka Chisquare hitung > chisquare tabel, sehingga Ho ditolak. Probabilitas atau Asymp hitung adalah 0.004, lebih kecil dari 0.05 maka Ho ditolak. Kesimpulan : ada hubungan antara prosentase alantois yang mengandung virus di atas 128 HAU dengan perlakuan pemberian DEAE Dextran 25 Mikrogram/0.1 ml PBS dengan 0.1 ml alantois, yang diinkubasikan pada suhu 37°C dan 35°C

Tabel 5.4. Nilai EID 50 virus

Hasil EID 50 (Egg Infectious Dose 50)					
NO	Perlakuan	A/chicken/Subang29-clade 2.1.3/Pusvetma-2012		A/Chicken/Sukoharjo-clade 2.3.2/Pusvetma-2012	
		Suhu 35 ⁰	Suhu 37 ⁰	Suhu 35 ⁰	Suhu 37 ⁰
1	Tanpa dextran	10 ^{6.7} /0.1 ml	10 ^{5.9} /0.1 ml	10 ^{8.1} /0.1 ml	10 ^{6.3} /0.1 ml
2	50 Mikrogram DEAE Dextran 0.1 Alantois	10 ^{7.3} /0.1 ml	10 ^{7.1} /0.1 ml	10 ^{6.5} /0.1 ml	10 ^{6.7} /0.1 ml
3	25 Mikrogram DEAE Dextran 0.1 Alantois	10 ^{7.3} /0.1 ml	10 ^{6.3} /0.1 ml	10 ^{7.1} /0.1 ml	10 ^{6.5} /0.1 ml

Nilai EID 50 diperoleh dari koleksi seluruh alantois masing masing perlakuan dari HA 0 sampai 512. EID50 bukan merupakan hasil pengulangan oleh karena itu dianalisa secara deskriptif. Dari tabel terlihat dari masing masing virus, dan perlakuan suhu inkubasi, nilai EID 50 terkecil adalah perlakuan tanpa DEAE Dextran.

Hasil uji haemaglutinasi virus A/chicken/Subang29/clade 2.1.3 /Pusvetma 2012 menunjukkan adanya hubungan antara prosentase HA lebih atau sama dengan 128 dengan dengan penambahan DEAE Dextran 50 mikro dan 25 mikro dengan inokulum tanpa DEAE dextran. Pada virus AI A/Chicken/Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012 ada hubungan antara prosentase HA lebih atau sama dengan 128 HAU dengan

penambahan DEAE Dextran 50 mikro dan 25 mikro

Pada penelitian ini DEAE terbukti mempengaruhi kemampuan replikasi virus Avian Influenza sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Pari dan Xu pada tahun 2004 yang menggunakan Deae Dextran dalam proses transfeksi DNA ke dalam sel sejak awal tahun 80 an. Penggunaan DEAE Dextran dapat menghemat jumlah DNA yang dipakai sampai 8-14 kali lipat (Gauss,1992). DEAE Dextran bersifat polikation sehingga memfasilitasi infeksi virus pada sel secara efisien. DEAE dapat berikatan pada permukaan sel sehingga memudahkan perlekatan virus pada sel sehingga ada hubungan antara pemberian DEAE Dextran pada infektifitas virus New Castle disease (Hasaan et al., 2011).

Pada penelitian ini virus AI A/chicken/Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012 ada hubungan antara prosentase HA lebih atau sama dengan 128 HAU dengan penambahan DEAE Dextran 50 mikro dan 25 mikro jika diinkubasikan pada suhu 35⁰C.

Virus A/chicken/Subang29/clade 2.1.3 /Pusvetma 2012 menunjukkan adanya hubungan antara prosentase HA lebih atau sama dengan 128 dengan dengan penambahan DEAE Dextran 50 mikro dan 25 mikro dengan inokulum tanpa DEAE dextran jika diinkubasikan pada suhu 37⁰C. Suhu inkubasi berpengaruh pada pertumbuhan virus. Lang et al (2011) Suhu 37⁰C mempengaruhi aktivitas *polymerase* viral, dan mendorong kecepatan pertumbuhan embrio. Aktifitas *polymerase* virus meningkatkan replikasi virus AI. Suhu inkubasi juga berpengaruh pada aktifitas *trypsin like protease* yang ada pada cairan alantois dan amniotic. *Protease* membelah HA pada LPAI pada temperature di atas 35⁰C . Hasilnya adalah meningkatnya perlekatan virus pada sel epitel dan meningkatnya replikasi virus pada sel epitel dan meningkatkan replikasi pada TAB umur 10, sebaliknya pada umur 14 hari aktifitas *protease* merusak protein HA virus *Avian Influenza*. Khalili menuliskan bahwa temperature berpengaruh pada jumlah alantois. Hal ini disebabkan karena semua

JBP Vol. 17, No. 3, Desember 2015—Sapto Rini Budi Prasetyo

telur secara pasti kehilangan air yang menguap , keluar melalui kerabang telur sekitar 10-11%. Semakin tinggi suhu inkubasi maka penguapan akan semakin banyak.

Sebagian virus lebih menyukai suhu 35⁰C untuk multiplikasi virus pada membrane alantois dengan penyebab yang belum diketahui (Khalili et al.,2013). Seperti pada hasil penelitian ini virus AI A/chicken/Sukoharjo/clade 2.3.2/Pusvetma 2012 ada hubungan antara prosentase HA lebih atau sama dengan 128 HAU dengan penambahan DEAE Dextran 50 mikro dan 25 mikro jika diinkubasikan pada suhu 35⁰C

5. KESIMPULAN

Penambahan DEAE Dextran berpengaruh positif pada kemampuan replikasi kedua virus dengan suhu inkubasi yang berbeda. Dengan mengetahui pola replikasi virus AI untuk bisa mencapai titer HA sama dengan atau lebih dari 128 HAU dengan prosentase yang tinggi maka dalam produksi antigen selanjutnya akan digunakan DEAE Dextran

dengan penyesuaian suhu inkubasi sesuai dengan jenis virusnya. Dalam Industri produksi vaksin dan antigen, perkembangan virus AI demikian cepat di Indonesia maka diperlukan penelitian terhadap setiap virus strain baru untuk mengetahui kemampuan replikasi virus secara optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Azhar M.,2014. “Perkembangan Kasus AI pada Unggas dan Kematian Itik akibat AI sampai dengan 31 Januari 2014”. *Technical Briefing Meeting ke 10 Ditkeswan – FAO, 7 Februari 2014*
- Dhamayanti NLPI,, Hartawan R, Hewajuli DA, Hardiman, Wibawa H, Pudjiatmoko. 2013. “”Karakteristik Molekuler dan Patogenesitas Virus H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia. *JITV Vol. 18 No2 Th. 2013: 99-113*
- Gauss G., and Lieber M.R., “DEAE-dextran enhances electroporation of mammalian cells”. 1992. *Nucleic Acids Research, 1992, Vol. 20, No. 24 6739-6740*
- Hassan,E.A, Wanis, N.A and Susan K. Tolba. 2011. “Study Of Incorporation Deae Dextran During Production Of Local Avian Influenza (Ai) Inactivated Vaccine” *Egypt. J. Agric. Res., 89 (3), 2011*
- FAO, OFFLU. 2010.”Prescreen HI protocol”. *Prescreen HI Protocol Training*
- Khalili, I, Ghadimipour,R, Ameghi,A, Sedigh-Eteghad, S. 2013. “Optimization of incubation temperature in embryonated chicken eggs inoculated with H9N2 vaccinal subtype of avian influenza virus”. *Veterinary Research Forum. 2013; 4 (3) 145 -. 148. Journal Homepage: vrf.iranjournals.ir*
- Lang, V.,Marjuki,V., Krauss,S.L., Webby R.J., and. Webste R.G. 2011. “Different Incubation Temperatures Affect Viral Polymerase Activity And Yields Of Low-Pathogenic Avian Influenza Viruses In Embryonated Chicken Eggs”. *Arch Virol. 2011 June ; 156(6): 987–994.*
- Nongluk.S., and Yasuo Suzuki. 2012. “Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus”. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B88(2012) doi: 10.2183 /pjab.88.226*
- OIE Terrestrial Manual.2012. Chapter 2.3.4. Avian influenza
- Pari G.S.,Xu Y., 2004. “Gene Transfer into Mammalian Cells Using Calcium Phospat dan DEAE Dextran. Methodes” in *Molecular Biology. Vol 245. Humana Peress Inc.*
- Wibawa H. 2014. “Genetic and antigenic mapping of H5N1 HPAI virus in Indonesia, 2008 – 2013”. *Technical Briefing Meeting ke 10 Ditkeswan – FAO, 7 Februari 2014*
- Young M., Alders R., Grimes S., Spradbrow P., Dias P., da Silva A. and Lobo Q. 2012. “Controlling Newcastle disease in village chickens” A laboratory manual. 2nd edn. *ACIAR Monograph No. 87. Australian Centre for International Agricultural*

