

Hasil Pemantauan Pascavaksinasi Flu Burung pada Pternakan Itik di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali

*(MONITORING OF POST VACINATION FLU BURUNG IN DUCKS LIVESTOCK OF
TAKMUNG VILLAGE KLUNGKUNG REGENCY, BALI)*

**Ni Komang Valerie Suriana¹,
Ida Bagus Kade Suardana², Tjokorda Sari Nindhia³**

¹ Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,

²Laboratorium Virologi Veteriner,

³Laboratorium Biostatistika Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;

Telp/fax: 0361-223791

e-mail: idasuardana@unud.ac.id

ABSTRAK

Flu burung atau *Avian Influenza* (AI) merupakan penyakit virus menular strategis yang bersifat endemis di Indonesia. Virus AI dapat menyerang berbagai jenis unggas peliharaan termasuk kalkun, ayam, burung puyuh, angsa dan itik. Unggas air seperti itik merupakan *reservoir* semua subtipe H dan N virus *Avian Influenza*. Penelitian bertujuan untuk memantau hasil titer antibodi pascavaksinasi pada itik petelur dengan vaksin AI-H5N1 inaktif. Peternak melakukan vaksinasi pada umur 12 hari dan pengambilan darah dilakukan pada minggu pertama, minggu kedua dan minggu ketiga pascavaksinasi. Sampel serum diambil sebanyak 20 dan di uji dengan uji serologis hambatan hemaglutinasi (HI). Hasil penelitian menunjukkan persentase seropositif pada minggu pertama 0%, minggu kedua 5%, dan minggu ketiga 10%. Periode pengambilan serum tidak berbeda nyata terhadap peningkatan titer antibodi. Sehingga belum mampu menimbulkan kekebalan terhadap AI-H5N1.

Kata-kata kunci: itik petelur; *avian influenza*; H5N1; titer antibodi

ABSTRACT

Flu Burung or *Avian Influenza* is an endemic strategic infectious viral disease in Indonesia. AI viruses attack various types of domestic poultry including turkeys, chickens, quails, geese and ducks. Waterfowl such as ducks is a reservoir of all subtypes of H and N *Avian Influenza* virus. The aim of this study was to monitor the results of post-vaccination antibody titers in laying ducks with the inactivated AI-H5N1 vaccine. Farmers do the vaccination at the age of 12 days and blood drawn in the first week, second week and third week post-vaccination. Serum samples were taken as many as 20 and tested by serological test for hemagglutination inhibition (HI). The results showed the percentage of seropositive in the first week was 0%, the second week was 5%, and the third week was 10%. Serum taking period was not significantly different to increase in antibody titer. The result shown vaccination has not been able to cause immunity against AI-H5N1.

Keywords: layer ducks; *avian influenza*; H5N1; vaccination; antibody titer

PENDAHULUAN

Itik merupakan satu diantara unggas air yang memiliki sumber keanekaragaman hayati ternak Indonesia yang mempunyai peluang untuk dikembangkan sebagai penghasil telur dan daging (Tarigan *et al.*, 2015). Budidaya ternak itik semakin digemari masyarakat sebagai alternatif sumber pendapatan di daerah pedesaan maupun di sekitar perkotaan. Budidaya ternak itik juga mampu meningkatkan ekonomi peternak di Indonesia. Kendala yang sering dihadapi dalam usaha peternakan itik ialah serangan penyakit, salah satunya adalah *Avian Influenza* (AI) atau yang dikenal dengan penyakit flu burung. Penyakit AI memiliki dampak yang merugikan bagi industri peternakan unggas, mengingat tingkat morbiditas dan mortalitasnya dapat mencapai 100%. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh virus AI ditaksir sampai miliaran rupiah setiap tahunnya (Pawestri *et al.*, 2017).

Wabah AI terjadi hampir dibelahan dunia, kecuali di benua antartika. Di Indonesia penyakit flu burung telah menimbulkan wabah yang luar biasa sehingga disebut sebagai kejadian luar biasa (KLB) flu burung yang terjadi pada tahun 2003 sampai 2006 (Kencana, 2017). Gejala klinis yang ditimbulkan apabila unggas terinfeksi penyakit AI akan teramati mengalami anoreksia, depresi, produksi telur menurun, emasi, gangguan pernapasan bernapas yang disertai keluarnya eksudat dari hidung, batuk, edema daerah wajah, konjungtivitis, kepala bengkak, bersin, demam dan diare. Pada pemeriksaan lebih lanjut akan terlihat adanya peradangan pada langit-langit, mulut, trakhea, dan laring (Mulyadi dan Prihatini, 2005). Beberapa tindakan strategis yang dapat dilakukan untuk mengendalikan penyakit AI diantaranya peningkatan biosekuriti, vaksinasi, melakukan depopulasi dan pemusnahan (*stamping-out*) terhadap unggas sakit di daerah tertular, pengendalian lalu lintas ternak, serta monitoring terhadap unggas sakit (Kencana, 2017).

Vaksinasi adalah tindakan memasukkan antigen berupa virus atau agen penyakit yang telah dilemahkan dalam tubuh sehat dengan maksud merangsang zat kebal (antibodi) (Yulistiya *et al.*, 2016). Di daerah tertular, vaksinasi dilakukan terhadap unggas yang masih sehat maupun terhadap unggas di lingkungan sekitarnya. Efektivitas vaksin AI akan lebih baik apabila strain virus dalam vaksin yang digunakan homolog dengan strain virus yang ada di lapangan (Sudarisman, 2006). Saat ini vaksin AI banyak dijual bebas di *poultry shop* dengan berbagai merek. Vaksin yang baik mampu mencegah timbulnya gejala klinis dan menekan pengeluaran

virus (virus *shedding*) secara sempurna apabila unggas yang divaksin tersebut terpapar virus lapangan yang ganas (Suartha *et al.*, 2011). Untuk mendapatkan hasil vaksinasi yang protektif terhadap flu burung harus diterapkan metode vaksinasi yang tepat. Indikasi vaksinasi yang baik dievaluasi berdasarkan kemampuan vaksin merangsang pembentukan antibodi. Titer antibodi protektif terhadap serangan flu burung atau Avian Influenza apabila memiliki inhibis pada serum yang diencerkan 1:16 (2^4) atau $\log 2^4$ yang menggunakan antigen 4 HA Unit (OIE, 2000).

Vaksinasi adalah penyuntikan substansi asing atau antigen ke dalam tubuh merupakan periode laten atau periode induksi oleh karena belum dapat ditunjukkan adanya antibodi. Berakhirnya periode laten, menyusul periode biosintesis antibodi yang dibedakan dalam 3 fase, yaitu fase logaritmik terjadi kenaikan kadar antibodi secara logaritmik dalam tempo 4-10 hari. Dalam fase ini, waktu yang diperlukan untuk melipatkan konsentrasi dua kali sekitar 5-8 jam. Hal ini disebabkan bertambah banyaknya plasmasit sebagai hasil pembelahan berulang sel-sel B. Fase datar yaitu jumlah antibodi yang diproduksi plasmasit setelah dikurangi oleh antibodi yang telah bereaksi dengan antigen yang disuntikkan dan yang telah mengalami katabolisme. Fase penurunan efektivitas vaksinasi terjadi apabila antibodi yang mengalami katabolisme dan yang bereaksi lebih banyak daripada yang diproduksi (Subowo, 1996). Untuk memperoleh kekebalan populasi ternak yang memadai terhadap virus AI, diperlukan cakupan vaksinasi sekurang-kurangnya 60% (Spackman dan Swayne, 2013). Unggas yang divaksinasi AI H5N1 dapat terhindar dari kemungkinan terinfeksi virus AI H5N1 yang beredar terhadap *clade 2.1.3* maupun *clade 2.3.2*. Vaksin memberikan respon imun protektif yang sebagian besar dihasilkan oleh hemagglutinin (HA) dan sedikit neuraminidase (NA) yang terdapat di dalam antigen vaksin.

Peternakan Itik Pertelur Sugi Oka melakukan sistem pemeliharaan intensif sehingga pemeliharaan itik dilakukan dalam kandang. Pemeliharaan itik dilakukan pada fase *starter* hingga fase *grower*. Peternakan tersebut melakukan vaksinasi *Avian Influenza* subtipe H5N1 pada itik umur 12 hari oleh dokter hewan tanpa pemeriksaan antibodi. Maka dalam penelitian ini akan mendeteksi dan melakukan pemantauan titer antibodi *Avian Influenza* subtipe H5N1 pascavaksinasi pada peternakan itik petelur Sugi Oka di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Serum itik petelur pascavaksinasi sebanyak 20 sampel, antigen AI 4 unit HA virus standar H5N1 Puspetma (Surabaya), *Phosphat buffered saline* (PBS) dan suspensi eritrosit 1%, dan alkohol 70%. Dalam penelitian ini menggunakan vaksin AI H5N1 inaktif yang diproduksi oleh PT Medion (Ciparay, Bandung, Indonesia).

Hewan Coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah itik petelur umur 12 hari yang telah divaksinasi menggunakan vaksin AI H5N1 inaktif secara injeksi melalui intramuskuler dengan dosis 0,2 mL/ekor pada Peternakan Itik Petelur Sugi Oka. Vaksinasi dilakukan oleh dokter hewan setempat. Itik dipelihara oleh peternakan itik petelur Sugi Oka di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali.

Pengumpulan Sampel Serum

Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 3 kali, yaitu minggu pertama, minggu kedua, dan minggu ketiga pascavaksinasi. Pengambilan darah dilakukan pada vena sayap (vena *brachialis*) dengan menggunakan spuit 1 mL tanpa antikoagulan. Darah dibiarkan membeku dalam suhu kamar sampai serumnya keluar. Serum yang masih bercampur dengan sel darah merah dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* steril. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatannya dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang baru untuk mendapatkan serum. Serum siap digunakan untuk pemeriksaan selanjutnya.

Uji Hemaglutinasi (uji HA)

Sebanyak 0,025 mL PBS diisikan pada masing-masing lubang plat mikro dengan menggunakan pipet mikro atau *microdroper*. Tambahkan pada lubang pertama dan lubang kedua suspensi antigen yang akan diuji dan selanjutnya buat pengenceran seri kelipatan dua mulai dari lubang kedua sampai lubang kesebelas dengan menggunakan pengencer mikro. Kemudian tambahkan 0,025 mL PBS ke dalam tiap-tiap lubang (1-12) dan selanjutnya diaduk dengan pengocok mikro. Kemudian ditambahkan ke dalam setiap lubang masing-masing 0,05 mL suspensi sel darah merah 1% dan ayak kembali selama 3 detik. Plat mikro dieramkan pada suhu kamar selama 1 jam dan di amati timbul atau tidaknya reaksi seldarah merah setiap 15 menit. Reaksi positif ditandai dengan adanya bentukan kristal pada sumuran plat mikro akibat reaksi

hemaglutinasi. Pembacaan titer HA dilakukan dengan memiringkan plat mikro $\geq 45^\circ$. Titer HA virus dinyatakan sebagai kebalikan dari pengenceran tertinggi virus yang masih mampu menimbulkan reaksi aglutinasi secara sempurna. Pada umumnya titer HA yang digunakan pada uji HI adalah 4 unit HI (Bhakty *et al.*, 2018).

Uji Hambatan Hemaglutinasi (titrasi)

Untuk mengetahui tingkat kekebalan suatu hewan dapat dilakukan pengukuran titer antibodi dengan uji HI titrasi. Kedalam *microplate* dasar U diisi dengan 0,025 mL PBS pada setiap lubang (1-12), lubang pertama dan kedua diisi dengan serum yang selanjutnya diencerkan secara seri kelipatan dua dari lubang kedua sampai kesepuluh dengan *microdiluter*. Pada lubang (1-11) ditambahkan 0,025 mL suspensi antigen 4-unit HA, sedangkan pada lubang 12 hanya diisi 0,025 mL PBS kemudian diayak selama 30 detik dan diinkubasikan dalam suhu kamar selama 30 menit. Pada setiap lubang (1-12) ditambahkan 0,05 ml suspensi eritrosit 1% dan diayak kembali selama 30 detik. *Microplate* diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam dan diamati setiap 15 menit untuk mengetahui ada tidaknya reaksi aglutinasi eritrosit. Hasil uji HI positif ditandai dengan adanya endapan pada dasar *microplate* atau tidak ada aglutinasi (Suardana *et al.*, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji HI terhadap 20 ekor itik yang dilakukan pada peternakan itik Sugi Oka di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali menunjukkan pada pengambilan serum minggu pertama pascavaksinasi semua sampel menunjukkan titer seronegatif. Pada minggu kedua pascavaksinasi hanya 1 sampel yang menunjukkan seropositif dengan titer 2^5 , dan pada minggu ketiga pascavaksinasi hanya 2 sampel yang menunjukkan seropositif dengan titer 2^9 . Titer antibodi AI dan waktu pengambilan sampel dimuat pada Tabel 1

Tabel 1. Titer antibodi itik petelur pascavaksinasi AI-H5N1 pada peternakan itik petelur Sugi Oka di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali

No	Pengambilan Serum	Jumlah Positif	Titer Antibodi
1	Minggu Pertama	0	2^0
2	Minggu Kedua	1	2^5
3	Minggu Ketiga	2	2^9

Pembentukan antibodi pada pascavaksinasi AI dalam penelitian ini tidak mengalami peningkatan yang signifikan. Rerata titer antibodi pada minggu pertama pascavaksinasi yaitu 0,0 HI log 2, pada minggu kedua pascavaksinasi 0,25 HI log 2, dan pada minggu ketiga pascavaksinasi 0,90 HI log 2. Persentase seropositif itik petelur terhadap pascavaksinasi AI pada setiap pengambilan serum minggu ke-1, ke-2, dan ke-3 berturut-turut adalah 0%, 5%, dan 10%. Rerata titer antibodi dan persentase seropositif dan seronegatif setiap minggu pengambilan sampel dimuat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata titer antibodi dan persentase seropositif serta seronegatif pada peternakan itik petelur Sugi Oka di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali

No	Pengambilan Sampel	Rerata Titer Antibodi HI log 2	Persentase (%)	
			Seropositif	Seronegatif
1	Minggu Pertama	.00 HI Unit	0	100
2	Minggu Kedua	.25 HI Unit	5	95
3	Minggu Ketiga	.90 HI Unit	10	90

Hasil analisis sidik ragam *ANOVA One Way* menunjukkan bahwa waktu pengambilan serum tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap titer antibodi AI pada itik pascavaksinasi. Hal ini dapat dilihat dari nilai Sig yaitu 0,243 ($P>0,05$) sehingga tidak dapat dilanjutkan uji Duncan dan Regresi.

Avian influenza (AI) atau yang dikenal sebagai flu burung disebabkan oleh virus yang menyerang bangsa unggas seperti ayam dan bebek. Penyakit ini dapat menyebabkan wabah yang sangat merugikan bagi peternak karena menurunkan kematian dari ternak yang terserang. Wibawa *et al.* (2012) memaparkan bahwa virus AI H5N1 *clade* 2.3.2 asal itik bukan berasal dari garis keturunan virus H5N1 *clade* 2.1 yang telah endemis di Indonesia. Virus H5N1 *clade* 2.3.2 ini mempunyai jarak keragaman pasangan nukleotida antar spesies (*average pairwise distance*) lebih dari 1,5% terhadap *clade* yang telah ada dan terdefinisi sebelumnya. Penyakit AI dapat bersifat mematikan unggas dan bersifat zoonosis yang dapat menular ke manusia (Suwito *et al.*, 2013). Salah satu program pencegahan penyakit yang sering dilakukan adalah vaksinasi. Vaksinasi sebelum infeksi merupakan pilihan utama dalam berternak untuk melindungi hewan ternak. Salah satu peternakan yang melakukan vaksinasi yaitu peternakan itik Sugi Oka. Peternakan ini memelihara *day old duck* (DOD) dengan jumlah 300 ekor yang telah divaksinasi umur 12 hari dengan menggunakan vaksin Medivac Avian Influenza subtype H5N1 dengan dosis

0,2 ml melalui intramuskular oleh dokter hewan setempat. Pada penelitian ini vaksin yang digunakan adalah vaksin inaktif. vaksin inaktif adalah vaksin yang mengandung virus yang telah dimatikan tanpa meubah struktur antigenik, hingga mampu membentuk zat kebal (Baxter, 2007). Menurut Amelia *et al.* (2016), kekebalan vaksin inaktif lebih lambat terbentuk dibandingkan dengan kekebalan vaksin aktif, namun dapat bertahan lebih lama. Vaksin virus AI aktif (vaksin dengan virus yang dilemahkan) tidak direkomendasi karena virus AI bersifat zoonosis, di samping itu virus AI juga dapat mengalami mutasi genetik atau terjadi pertukaran segmen gen dengan virus AI lain yang bersikulasi di daerah tersebut (Kencana *et al.*, 2016). Sehingga tindakan monitoring pascavaksinasi sangat diperlukan untuk mengetahui respon imun itik pada vaksin yang diberikan.

Pembentukan antibodi spesifik terhadap antigen dapat diuji dengan HI *test* yang ditandai adanya peningkatan titer antibodi (Balqis *et al.*, 2011). Persentase titer antibodi seropositif pada minggu pertama vaksinasi adalah 0%, minggu kedua 5% dan minggu ketiga 10% dari masing-masing 20 sampel. Rendahnya titer seropositif mungkin disebabkan oleh adanya maternal antibodi yang masih tinggi pada saat dilakukan vaksinasi. Itik divaksin pada umur 12 hari tanpa diawali dengan pemeriksaan titer maternal antibodi sebelum dilakukan vaksinasi dan hal ini sudah biasa dilakukan oleh peternak. Anak itik yang baru menetas memiliki antibodi maternal yang diperoleh pasif dan dapat menghambat pembentukan antibodi, sehingga mempengaruhi keberhasilan vaksinasi. Penghambatan antibodi maternal berlangsung sampai antibodinya habis yaitu sekitar 20 hari setelah menetas (Amelia *et al.*, 2016). Menurut Okwor *et al.*, (2014), apabila vaksinasi dilakukan pada anak itik yang memiliki antibodi maternal masih tinggi akan mengganggu pembentukan antibodi karena maternal antibodi akan menetralsir antigen vaksin. Sehingga pada proses vaksinasi yang dilakukan sebelum maternal antibodi habis akan mempengaruhi jumlah titer antibodi yang terbentuk (Yulistya *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan maternal antibodi sehingga peneliti tidak mengetahui maternal antibodi menunjukkan titer yang tinggi ataupun rendah. Titer antibodi pascavaksinasi pada penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada setiap minggunya ($P>0,05$). Namun, hasil peningkatan titer antibodi yang didapatkan pada penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian oleh Azizah *et al.*, (2017) yang menyatakan peningkatan titer antibodi setiap minggunya menunjukkan berbeda sangat nyata ($P<0,01$) akibat dari pelepasan

antigen vaksin secara terus menerus sehingga merangsang pembentukan antibodi. Hal ini disebabkan karena maternal antibodi pada penelitian Azizah *et al.*, 2017 menunjukkan $0 \log 2$ yang diartikan tidak terdapat maternal antibodi. Maternal antibodi dapat mengurangi efektivitas vaksinasi, tingginya maternal antibodi akan menutupi epitop sel B sehingga mengganggu inisiasi sel B (Hasselquist dan Nilsson, 2009).

Terjadinya perbedaan tingkat respon imun pada ternak terhadap vaksin dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya adalah kemungkinan karena perbedaan kemampuan antigenik dari antigen vaksin yang digunakan, di samping kualitas antigen, komposisi *adjuvant* yang digunakan juga mempengaruhi potensi inaktif (Kencana *et al.*, 2016). Indikasi kegagalan vaksinasi yaitu rendahnya titer antibodi pascavaksinasi. Namun, pembentukan titer antibodi pada saat vaksinasi pertama tidaklah setinggi vaksinasi *booster* dan relatif tidak bertahan lama karena pada saat vaksinasi pertama didalam tubuh unggas belum terbentuk sel memori (Banu *et al.*, 2009).

Penyuntikan vaksinasi dengan memasukkan substansi asing ke dalam hewan akan membangkitkan produksi antibodi yang spesifik terhadap substansi asing tersebut. Setelah penyuntikan antigen tersebut merupakan periode laten atau periode induksi oleh karena belum dapat ditunjukkan adanya antibodi. Berakhirnya periode laten, menyusul periode biosintesis antibodi yang dibedakan dalam 3 fase, yaitu fase logaritmik terjadi kenaikan kadar antibodi secara logaritmik dalam tempo 4-10 hari. Dalam fase ini, waktu yang diperlukan untuk melipatkan konsentrasi dua kali sekitar 5-8 jam. Hal ini disebabkan bertambah banyaknya plasmasit sebagai hasil pembelahan berulang sel-sel B. Fase datar yaitu jumlah antibodi yang diproduksi plasmasit setelah dikurangi oleh antibodi yang telah bereaksi dengan antigen yang disuntikkan dan yang telah mengalami katabolisme. Fase penurunan terjadi apabila antibodi yang mengalami katabolisme dan yang bereaksi lebih banyak daripada yang diproduksi (Subowo, 1996). Titer antibodi protektif terhadap serangan flu burung atau *Avian Influenza* apabila memiliki inhibis pada serum yang diencerkan 1:16 (2^4) atau $\log 2^4$ yang menggunakan antigen 4 HA Unit (OIE, 2000). Lama pembentukan antibodi protektif pascavaksinasi ini diduga akibat efek *adjuvant* dalam vaksin inaktif yang digunakan. Menurut Suartha *et al.* (2011), *adjuvant* terdapat dalam vaksin berperan membentuk granuloma atau depot antigen sehingga antigen vaksin dikeluarkan secara perlahan-lahan untuk memicu respon imun yang lebih lama.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa persentase titer antibodi seropositif di peternakan itik petelur Sugi Oka pada minggu pertama pascavaksinasi adalah 0%, minggu kedua 5% dan minggu ketiga 10% dari masing-masing 20 sampel dan belum mampu menimbulkan kekebalan terhadap Avian Influenza subtype H5N1.

SARAN

Perlu dilakukan pemeriksaan maternal antibodi pada ternak sebelum melakukan vaksinasi. Vaksinasi dilakukan saat titer maternal antibodi tidak produktif dan melakukan tindakan pemberian vaksinasi yang benar dengan memberikan dosis yang benar, memperhatikan suhu pada vaksin, dan jadwal dilakukannya vaksinasi. Pada Peternakan Itik Petelur Sugi Oka di Desa Takmung, Kabupaten Klungkung, Bali harus melaksanakan *booster* vaksinasi Avian Influenza subtype H5N1 pada ternaknya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh staf laboratorium Virologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Udayana atas fasilitas yang diberikan serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian sehingga penelitian dapat selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia W, Santosa PE, Suharyati S. 2016. Pengaruh Dosis Vaksin AI (*Avian Influenza*) Inaktif pada Itik Betina Terhadap Titer Antibodi yang Dihasilkan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(2): 140-142.
- Azizah H, Suardana IBK, Sampurna IP. 2017. Respons Imun Itik Bali Pascavaksinasi Flu Burung. *Indonesia Medicus Veterinus*. 6(4): 320-326.
- Balqis U, Hambal M, Mulyadi, Samadi, Darmawi. 2011. Peningkatan Titer Antibodi Terhadap Avian Influenza dalam Serum Ayam Petelur yang Divaksin dengan Vaksin Komersial. *Agripet*. 11(1): 5-9.
- Banu NA, Islam MS, Chowdhury MMH. 2009. Determination of immune response of Newcastle Disease Virus. *J. Bangladesh Agric. Univ*. 7(2): 329-334.
- Baxter D. 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational medicine*. 57(8): 552-556.
- Bhakty ZW, Kencana GAY, Suartha IN. 2018. Titer Antibodi Ayam Petelur Pascavaksinasi Avian Influenza pada Peternakan Komersial di Desa Denbantas, Kecamatan Tabanan. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(2): 123-131.

- Hasselquist D, Nilsson JA. 2009. Maternal Transfer of Antibodies in Vertebrates; Trans-Generational Effects on Offspring immunity. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*. 364(1513): 51-60.
- Kencana GAY. 2017. *Penyakit Virus Unggas*. Denpasar: Udayana University Press.
- Kencana GAY, Suartha IN, Paramita NMAS, Handayani AN. 2016. Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dengan Avian Influenza Memicu Imunitas Protektif pada Ayam Petelur terhadap Penyakit Tetelo dan Flu Burung. *Jurnal Veteriner*. 17(2): 257-264.
- Mulyadi B, Prihatini. 2005. Diagnosa Laboritik Flu Burung (H5N1). *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 12(2): 71-81.
- Office International des Epizooties (OIE). 2000. *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*. 4th ed. Paris. Pp: 216.
- Okwor GO, El-Yuguda A, Baba SS. 2014. Profile of Maternally Derived Antibody in Broiler Chicks and In-Ovo Vaccination of Chick Embryo against Newcastle Disease. *World Journal of Vaccines*. 4(1): 72-80.
- Pawestri MM, Suardana IBK, Sampurna IP. 2017. Respon Imun Primer Itik Bali Terhadap Avian Influenza Pascavaksinasi Polivalen Nd-AI Inaktif. *Indonesia Medicus Veterinus*. 6(5): 347-353.
- Spackman E, Swayne DE. 2013. Vaccination of Gallinaceous Poultry for H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Current Questions and New Technology. *Virus Research*. 178: 121-132.
- Suardana IBK, Dewi NMRK, Mahardika IGNK. 2009. Respon Imun Itik Bali terhadap Berbagai Dosis Vaksin Avian Influenza H5N1. *Jurnal Veteriner*. 10(3): 150-155
- Suartha IN, Wibawan IWT, Putra IGNN, Dewi NMR, Mahardika IGNK. 2011. Pemilihan Adjuvant pada Vaksin Avian Influenza. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 5(2): 49-52.
- Subowo. 1996. *Imunobiologi*. Bandung: Angkasa. Pp: 55-57.
- Sudarisman. 2006. Pengaruh penggunaan vaksin H5N1 dan H5N2 virus avian influenza pada peternakan unggas di Jawa Barat. *Jurnal Puslitbang*. 11: 766-773.
- Suwito W, Supriadi, Winarti E, Primatika RA. 2013. Kajian Vaksin Avian Influenza (AI) pada Ayam Buras dengan Sistem Kandang Kurung di Gunung Kidul Yogyakarta. *Jurnal Sains Peternakan*. 11(2): 79 -83.
- Tarigan S. 2015. Infeksi Subklinis Avian Influenza H5N1 pada Peternakan Ayam yang Menerapkan Program Vaksinasi. *Jurnal Wartazoa*. 25(2): 75-84.
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, Romlah, Daulay RSD, Saftria K. 2012. Invesstigasi Wabah Penyakit pada Itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur: Identifikasi Sebuah Clade Baru Virus Avian Influenza subtype H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner*. 12: 2-8.
- Yulistiya E, Edy P, Surharyati S. 2016. Pengaruh Pemberian Dosis Vaksin Avian Influenza Inaktif pada Itik Jantan Terhadap Jumlah Sel Darah Putih dan Titer Antibodi yang dihasilkan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(4): 272-276.