

Titer Antibodi Pascavaksinasi Flu Burung Subtipe H5N1 pada Ternak Itik di Baha, Mengwi, Badung, Bali

(MONITORING TITER ANTIBODIES POST-VACCINATION
OF AVIAN INFLUENZA SUBTYPE H5N1 IN DUCK LIVESTOCK OF
BAHA VILLAGE, MENGWI DISTRICT, BADUNG REGENCY, BALI PROVINCE)

Fransiska Gratia Sonita Marson¹,
Ida Bagus Kade Suardana², Tjokorda Sari Nindhia³

¹Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,

²Laboratorium Virologi Veteriner,

³Laboratorium Biostatistika Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

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

Telp/Fax: (0361) 223791

e-mail: idasuardana@unud.ac.id

ABSTRAK

Itik merupakan satu jenis unggas air yang kini menarik perhatian. Selain sebagai penghasil telur, itik juga merupakan salah satu sumber penyedia bahan pangan berupa daging yang bernilai gizi tinggi. Peternakan itik sering menghadapi kendala serangan penyakit, seperti virus flu burung atau *Avian Influenza* (AI). Virus AI disebabkan oleh virus dari famili *Orthomyxoviridae*, genus influenza tipe A, subtipe H5N1. Untuk mengatasi hal tersebut peternak pembibit melakukan vaksinasi pada itik umur 18 hari tanpa dilakukan pengulangan dan akan dijual pada saat itik berusia tiga bulan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui titer antibodi flu burung subtipe H5N1 pascavaksinasi tunggal pada peternakan itik di Desa Baha, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung. Titer antibodi diuji dengan uji *Hemagglutination inhibition* (HI) dan dinyatakan dalam rerata titer dengan satuan Log 2. Pengambilan sampel serum dilakukan sebanyak tiga kali dengan jarak waktu pengambilan sampel yaitu dua minggu. Hasil penelitian menunjukkan rerata titer antibodi pada tiga kali pengambilan adalah $0 \pm 0,000$, $0 \pm 0,000$ dan $0,45 \pm 1,395$ HI log₂. Dari 60 sampel ditemukan dua sampel positif AI dengan persentase seroprevalensi 3,33%. Simpulannya adalah bahwa telah terjadi infeksi virus AI secara alami pada ternak itik yang digembalakan di Desa Baha, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung, Provinsi Bali.

Kata-kata kunci: itik; *Avian Influenza*; H5N1; vaksinasi; titer antibodi; infeksi alami

ABSTRACT

Duck is one type of waterfowl that is now attracting attention. Apart from being an egg producer, ducks are also a source of food ingredients that contain high nutrients. Duck farms often face obstacles to disease, such as bird flu or *Avian Influenza* (AI). AI viruses are caused by viruses from the family *Orthomyxoviridae*, genus influenza type A, subtype H5N1. To overcome this, the duck farmer vaccinate 18-day-old ducks without repetition and will put them on sell when the ducklings are 3 months old. This study is to determine the post-vaccination H5N1 bird flu antibody titer on a duck farm in Baha Village, Mengwi District, Badung Regency. Antibody titer with *Hemagglutination inhibition* (HI) test and expressed in mean titer with Log 2 units. The process of taking serum samples is performed 3 times with 2 week interval. The results showed the average antibody titer on three consecutive withdrawals were $0 \pm 0,000$, $0 \pm 0,000$ and $0,45 \pm 1,395$ HI log₂. From 60 samples found two AI positive samples with seroprevalence percentage of 3.33%. The

conclusion is that there has been a natural AI virus infection in duck farmers in Baha Village, Mengwi District, Badung Regency, Bali Province.

Keywords: duck; Avian Influenza; H5N1; vaccine; antibody titer; natural infections

PENDAHULUAN

Seiring perkembangan zaman dan kemajuan pola pikir manusia, menjadikan itik sebagai salah satu jenis unggas air yang kini menarik perhatian pada bidang peternakan di Indonesia. Selain sebagai penghasil telur, itik juga merupakan salah satu sumber penyedia bahan pangan yang bernilai gizi tinggi, terutama protein hewani yang dibutuhkan manusia. Itik merupakan jenis ternak yang termasuk dalam golongan unggas air dan memiliki ciri morfologi yang khas untuk menunjang kehidupannya. Beberapa ciri khas itik di antaranya yaitu kaki yang relatif pendek dibandingkan tubuhnya dengan jari-jari kaki berselaput (*foot web*), paruh ditutupi selaput tipis dengan bagian tepi berlipat dilapisi zat tanduk, bulu tebal dan berminyak, serta bentuk tulang dada yang datar (Suharno dan Setiawan, 2012).

Penyakit flu burung atau *Avian Influenza* (AI) dikelompokkan kedalam penyakit menular berbahaya karena bersifat zoonosis yang mematikan (OIE, 2004). Flu burung merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus Influenza tipe A, termasuk famili *Orthomyxoviridae*. Virus Influenza tipe A adalah suatu virus RNA berantai tunggal yang mempunyai *envelope* dengan delapan segmen, berpolaritas negatif dan berbentuk bulat atau filamen dengan diameter 50-120 nm x 200-300 nm. Virus Influenza tipe A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda dan kadang-kadang pada mamalia seperti cerpelai dan paus (Hewajuli *et al.*, 2008). Ciri utama virus AI yaitu memiliki antigen hemaglutinasi (HA) dan antigen neurominidase (NA) yang terdapat pada permukaan virus (De Jong dan Hien, 2006).

Penyakit flu burung yang pertama diidentifikasi di Italia lebih dari 100 tahun yang lalu, kini muncul di seluruh dunia (Capua *et al.*, 1999). Pandemi flu pertama terjadi pada tahun 1918 di Spanyol disebabkan oleh virus influenza A (H1N1). Pada tahun 2004 terjadi kejadian luar biasa (KLB) *Avian Influenza A* (H5N1) di beberapa negara di Afrika, Eropa, dan Asia, seperti di Vietnam, Hongkong, Thailand, Indonesia, China, Turki, Azerbaijan, serta Mesir (Pracoyo, 2009). Di Bali agen penyakit AI pertama kali diisolasi serta dilaporkan pada tahun 2004 (Mahardika *et al.*, 2005). Berdasarkan patogenisitasnya, virus AI dibedakan menjadi *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi dan sering menimbulkan wabah dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI) menyebabkan gejala ringan atau tidak memiliki gejala pada unggas yang terinfeksi (Isnawati *et al.*, 2019). Inang alami dari virus influenza A adalah unggas air.

Virus influenza A biasanya tidak menimbulkan penyakit pada inang alami, karena pada hewan tersebut virus berada dalam keadaan seimbang dan tidak menimbulkan penyakit (Webster, 1992; Fouchier, 2003).

Virus flu burung bereplikasi di gastrointestinal itik, sehingga *shedding* virus bersama feses ditransmisikan ke unggas atau mamalia lain melalui fecal-oral (Sturm-Ramirez *et al.*, 2004). Secara periodik virus influenza disebarkan ke inang lain, termasuk mamalia, dan menyebabkan infeksi yang sifatnya sementara dan kadang-kadang menimbulkan kematian. Jarang sekali, virus influenza ditularkan ke spesies lain dan menimbulkan infeksi terus-menerus yang permanen pada inang tersebut. Penularan virus AI terjadi melalui kontak langsung dan tidak langsung. Sumber penularan virus AI secara langsung adalah ekskreta yang berasal dari hidung, mulut, dan konjungtiva serta feses unggas yang menderita. Virus AI dikeluarkan dari hidung, konjungtiva, dan kloaka unggas yang terinfeksi, oleh karena virus tersebut bereplikasi pada saluran pernafasan, pencernaan, ginjal, dan/atau organ reproduksi (Swayne dan Suarez, 2000; Helmi *et al.*, 2015).

Penularan juga terjadi secara tidak langsung misalnya melalui udara yang tercemar material atau debu yang mengandung virus AI (aerosol), makanan atau minuman, alat atau perlengkapan peternakan, kandang, pakaian, kendaraan, peti telur, *egg tray*, burung, mamalia, dan insekta yang mengandung virus AI. Pada umumnya *strain* virus AI ada dalam bentuk LPAI dan umumnya menyebabkan gejala klinis ringan atau bahkan tidak memperlihatkan gejala klinis. Pada itik peliharaan gejala klinisnya berupa sinusitis, diare dan jumlah kematian yang meningkat. Virus HPAI bersifat sangat infeksius dan fatal pada unggas dan dapat menyebabkan kematian hingga 90 sampai 100% dalam waktu yang cepat dengan atau tanpa memperlihatkan gejala klinis, dan ketika ini terjadi, maka penyakit dapat menyebar dengan cepat antar *flock* (Swayne dan Suarez, 2000). Masa inkubasi virus AI antara 2-10 hari setelah terpapar virus, namun kebanyakan kasus menunjukkan gejala klinis tiga sampai lima hari setelah terpapar virus (Suartha *et al.*, 2010).

Dilaporkan, bahwa infeksi HPAI pada unggas menyebabkan lesi patologi pada sistem pencernaan dan sistem pernapasan, dan terutama pada sistem saraf pusat (Wibawa *et al.*, 2013). Lesi pada sistem pencernaan dapat berupa spleenomegali, kongesti dan hemoragis jaringan limfoid usus, perdarahan berbintik pada pankreas, proventrikulus, ventrikulus, usus kecil dan permukaan serosa saluran pencernaan (Kwon *et al.*, 2005). Lesi pada sistem pernapasan berupa edema, kongesti, hemoragis pada paru-paru (Perkins dan Swayne, 2001), sedangkan lesi pada sistem saraf dapat berupa edema dan hemoragis pada otak (Muramoto *et al.*, 2006). Diduga, jalur VA mencapai sistem saraf pusat adalah via

sistem saraf perifer (Matsuda *et al.*, 2005), saraf olfaktorius (Park *et al.*, 2002), atau sirkulasi darah (Chaves *et al.*, 2011).

Pemeriksaan serologi yang sering dipakai adalah uji hemaglutinase-inhibition (HI) untuk mengetahui adanya antibodi terhadap hemaglutinin (HA) dan uji agar gel presipitasi (AGP) untuk mengetahui adanya antibodi terhadap *Neuraminidase* (NA) (OIE, 2004; Haryanto *et al.*, 2010). Uji serologi lain yang dipakai untuk mengetahui adanya pembentukan antibodi adalah virus *neutralization* (VN), *neuramidase-inhibition* (NI), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), antibodi monoklonal, dan hibridisasi *in situ* (Haryanto *et al.*, 2010).

Vaksinasi AI pada itik dapat dilakukan dengan vaksin inaktif sediaan tunggal maupun kombinasi. Vaksin virus AI aktif (vaksin dengan virus AI yang dilemahkan) tidak direkomendasikan karena penyakit AI bersifat *zoonosis*, di samping itu virus AI juga dapat mengalami mutasi genetik atau terjadi *reassortment* dengan virus AI lain yang bersirkulasi di daerah tersebut sehingga dapat berubah menjadi virus ganas (Kencana *et al.*, 2016). Anak itik yang baru menetas memiliki antibodi maternal yang diturunkan dari induknya. Antibodi maternal yang diperoleh secara pasif dapat menghambat pembentukan imunoglobulin, sehingga memengaruhi keberhasilan vaksinasi. Penghambatan antibodi maternal berlangsung sampai antibodinya habis yaitu sekitar 10-20 hari setelah menetas (Tizard 1987).

Peternakan itik milik Bapak Nyoman terletak di Desa Baha, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung. Peternak ini memelihara itik dengan sistem ekstensif atau masih tradisional, pemeliharaan itik diangon secara berpindah-pindah untuk mencari tempat penggembalaan yang banyak tersedia pakan. Pada siang hari itik digembalakan dan pada malam hari akan dikumpulkan. Peternak membeli itik dari tempat penetasan itik yang sudah divaksin dengan vaksin AI inaktif (Medivac Avian Influenza[®], PT.Medion, Bandung, Indonesia). Dalam pemeliharanya peternak tidak melakukan vaksinasi lagi. Peternak berasumsi bahwa ternaknya masih memiliki kekebalan dari vaksinasi yang dilakukan di tempat pembibitan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui titer antibodi flu burung subtype H5N1 pascavaksinasi tunggal pada peternakan itik di Desa Baha, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung, Bali.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini jenis sampel yang diambil berupa serum darah itik petelur yang hanya sekali mendapatkan vaksinasi AI sub tipe H5N1. Vaksinasi dilakukan saat itik berusia 18 hari, ketika masih berada di tempat pembibitan, sebelum dijual pada saat itik-itik tersebut berumur tiga bulan. Sampel yang dipakai adalah sampel serum itik petelur berusia enam bulan berjumlah 60 sampel. Darah diambil dari vena bagian sayap (*vena brachialis*) menggunakan spuit 3 mL tanpa koagulan. Sebelum pengambilan, pada daerah tempat pengambilan darah diusap dengan kapas beralkohol 70% untuk mencegah kontaminasi, kemudian darah diambil sebanyak 1 mL dan didalam spuit diberi ruang kosong sampai 3 mL. Setelah darah masuk ke spuit posisikan spuit pada posisi datar, kemudian diamkan pada suhu ruangan selama 1-2 jam hingga serum keluar. Setelah itu serum dimasukkan kedalam *cool box* dan dimasukkan ke dalam *freezer* dengan suhu 4°C. Sampel kemudian dikeluarkan dari *freezer* guna memisahkan serum dari bekuan darah. Serum ditampung dalam tabung mikro lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Sebelum digunakan untuk uji, serum dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 56°C di dalam penangas air/*waterbath* selama 30 menit, kemudian disentrifugasi, lalu diencerkan 10 kali kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk uji hambatan hemaglutinasi cepat (Damanik *et al.*, 2013). Menurut Kencana *et al.* (2015) serum perlu diinkubasi sebelum melakukan uji yakni untuk menginaktifkan autohemolisin yang terkandung dalam serum sehingga tidak mengganggu hasil pemeriksaan titer antibodi HI.

Pembuatan Suspense Eritrosit 1%

Darah ayam diambil sebanyak 2,5 mL menggunakan spuit 3 mL yang telah diisi dengan antikoagulan EDTA (konsentrasi 0,1-0,2%) sebanyak 0,5 mL. Darah dicuci dengan cara menambahkan 5 mL *posphate buffer saline* (PBS), lalu homogenkan perlahan-lahan agar tidak rusak. Kemudian masukkan kedalam sentrifugator selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Setelah itu, pisahkan *buffy coat* dan *supernatant* dari endapan eritrosit. Pencucian dan pemisahan eritrosit dilakukan hingga tiga kali. Selanjutnya endapan eritrosit diencerkan hingga 1% dalam larutan PBS (OIE, 2012; Bhakty *et al.*, 2018).

Uji Hemaglutinasi (HA)

Sebanyak 0,025 mL PBS ditambahkan ke dalam tiap-tiap lubang (1-12) dan selanjutnya diaduk dengan pengocok mikro. Suspensi sel darah merah 1% ditambahkan ke dalam setiap lubang masing-masing 0,05 mL dan kemudian digoyang seperti diayak selama 30 detik. Plat mikro didiamkan pada suhu kamar selama satu jam dan diamati timbul atau tidaknya reaksi sel darah 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 (Mahardika *et al.*, 2015).

Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

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 digoyang seperti 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 digoyang seperti diayak kembali selama 30 detik. *Microplate* diinkubasikan pada suhu kamar selama satu 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

Data yang diperoleh dari pemeriksaan serum darah itik dengan uji HI, dianalisis secara deskriptif yaitu persentase jumlah sampel positif AI dibagi dengan total sampel kali 100%, dan persentase prevalensi flu burung dapat diketahui dengan rumus menurut Budiharta dan Suardana (2007): Seroprevalensi = [(Jumlah sampel diperiksa positif) x (Jumlah seluruh sampel yang diperiksa)⁻¹] x 100%.

Pengambilan sampel dilakukan tiga kali dengan selang waktu antara pengambilan sampel selama dua minggu, dengan jumlah sampel positif AI H5N1 sebanyak dua dari 60 sampel dengan persentase seroprevalensi 3,33%. Hasil uji sidik ragam satu arah menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hasil rerata titer antibodi AI subtipe H5N1 pada 60 sampel itik petelur ditampilkan pada Tabel 1. Pengambilan pertama dari 20 sampel tidak ditemukan sampel positif. Pada pengambilan kedua dari 20 sampel juga tidak ditemukan sampel positif. Pengambilan ketiga dari 20 sampel ditemukan dua sampel positif mengandung antibodi terhadap AI H5N1 dengan rerata titer antibodi $0,45 \pm 1,395$ HI log 2.

Tabel 1. Rerata titer antibodi flu burung subtype H5N1 itik petelur (HI log 2)

Waktu pengambilan (per dua minggu)	Rerata titer antibodi AI H5N1 (HI log 2)
Pengambilan pertama	$0 \pm 0,000^a$
Pengambilan kedua	$0 \pm 0,000^a$
Pengambilan ketiga	$0,45 \pm 1,395^b$

Keterangan: Huruf (superskrip) yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,01$), sebaliknya huruf (superskrip) yang berbeda menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)

Dari hasil pemeriksaan sampel pengambilan pertama dan kedua bernilai negatif. Namun, pada pengambilan yang ketiga terdapat dua sampel positif, dengan nilai titer antibodi masing-masing $\log 2^4$ dan $\log 2^5$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada itik enam bulan pascavaksinasi primer menggunakan vaksin H5N1 tidak terdeteksi antibodi lu burung subtype H5N1 pada dua kali pengambilan sampel. Ini mengindikasikan bahwa titer antibodi akibat vaksinasi primer tidak terbentuk. Menurut Subowo (1996), penyuntikan substansi asing dosis tunggal 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, akan menyusul periode biosintesis antibodi yang dibedakan dalam tiga 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 bertambahnya banyaknya sel plasma sebagai hasil pembelahan berulang sel-sel B. Kemudian terjadi fase datar yaitu jumlah antibodi yang diproduksi sel plasma 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 dan ini akan terjadi tiga minggu pascavaksinasi primer.

Pada pengambilan sampel yang ke tiga ditemukan dua sampel positif mengandung antibodi flu burung subtype H5N1, ini mengindikasikan antibodi tersebut bukan akibat vaksinasi melainkan sebagai akibat terjadinya infeksi alami dengan patogenitas yang rendah. Infeksi alami bisa terjadi baik melalui pakan atau melalui air saat penggembalaan pada daerah persawahan. Kemungkinan infeksi virus H5N1 juga bisa terjadi melalui penularan secara tidak langsung dari ternak unggas lain seperti ayam kampung yang juga mencari pakan di persawahan yang baru habis dipanen. Desa Baha juga berdekatan dengan Pasar Hewan Beringkit sebagai pusat pasar ternak di Bali, hal ini menyebabkan lalu lintas ternak unggas di Desa Baha sangat tinggi dan memungkinkan terjadinya infeksi alam. Selain itu pemeliharaan itik petelur secara ekstensif di Desa Baha, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung

memudahkan penyebaran terjadi. Itik petelur tersebut dapat menjadi sumber penularan ke itik dan unggas lainnya di sekitar peternakan. Penularan virus AI terjadi melalui kontak langsung dan tidak langsung. Sumber penularan virus AI secara langsung adalah ekskreta yang berasal dari hidung, mulut, dan konjungtiva serta feses unggas yang menderita. Virus AI dikeluarkan dari hidung, konjungtiva, dan kloaka unggas yang terinfeksi, oleh karena virus tersebut bereplikasi pada saluran pernafasan, pencernaan, ginjal, dan/atau organ reproduksi (Swayne dan Suarez, 2000; Helmi *et al.*, 2015). Penularan juga terjadi secara tidak langsung misalnya melalui udara yang tercemar material atau debu yang mengandung virus flu burung (aerosol), pakan atau air minum, alat atau perlengkapan peternakan, kandang, pakaian, kendaraan, peti telur, *egg tray*, burung, mamalia, dan insekta yang mengandung virus AI. Beberapa tindakan strategis yang dapat dilakukan untuk mengendalikan penyakit AI yaitu peningkatan biosekuriti, vaksinasi, melakukan depopulasi dan pemusnahan (*stamping-out*) terhadap unggas sakit di daerah tertular, pengendalian lalu lintas ternak, serta monitoring terhadap unggas sakit.

SIMPULAN

Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 3 kali dengan jarak waktu pengambilan sampel yaitu dua minggu. Setelah dilakukan pemeriksaan titer antibodi didapatkan hasil rerata titer antibodi pada tiga kali pengambilan secara berurutan adalah $0 \pm 0,000$, $0 \pm 0,000$ dan $0,45 \pm 1,395$ HI log₂. Ditemukan 2 sampel positif AI dengan persentase seroprevalensi 3,33% yang berarti telah terjadi infeksi virus AI secara alami pada ternak itik yang digembalakan di Desa Baha, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung, Bali.

SARAN

Peternak hendaknya melakukan sampling pemeriksaan antibodi pascavaksinasi. Selain itu perlu juga dilakukan penyuluhan atau sosialisai mengenai vaksinasi yang benar dan vaksinasi ulang (*booster*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana atas fasilitas yang diberikan sehingga penelitian dapat selesai pada waktunya. Serta semua pihak yang telah membantu sampai selesainya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Capua I, Marangon S, Selli L, Alexander DJ, Swayne DE, Pozza MD, Parenti EFM, Cancellotti FM. 1999. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza (H5N2) in Italy during October 1997 to January 1998. *Avian Pathol* 28: 455-460.
- Chaves AJ, Busquets N, Valle R, Rivas R, Vergara-Alert J, Dolz R, Ramis A, Darji A, Majo N. 2011. Neuropathogenesis of a highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in experimentally infected chickens. *Vet Res* 42: 106.
- Damanik EG, Kencana GAY, Mahardika IGN K. 2013. Seroprevalensi Penyakit Avian Influenza pada Itik di Kabupaten Klungkung. *Buletin Veteriner Udayana* 5(2): 139-146
- De Jong MD, Hien TT. 2006. Avian Influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 35: 2-13.
- Haryanto A, Ermawati R, Purwaningrum M, Yudianingtyas DW, Wibowo MH, Tabbu CR. 2010. Penerapan Metode Diagnosis Cepat Virus Avian Influenza H5N1 dengan Metode Single Step Multiplex RT-PCR. *Jurnal Veteriner* 11(4): 210-219.
- Helmi TZ, Yulisma R, Panjaitan B, Tabbu CR, Haryanto A. 2015. Deteksi dan Identifikasi Cemaran Virus Avian Influenza pada Pasar Tradisional di Kabupaten Aceh Besar dan Kota Banda Aceh. *Jurnal Sain Veteriner*. 33(2): 205-215.
- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2008. Karakterisasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza (AI). *Wartazoa* 18(2): 86-100.
- Isnawati R, Wuryastuti H, Wasito R. 2019. Peneguhan Diagnosis Avian Influenza pada Ayam Petelur yang Mengalami Gejala Penurunan Produksi. *Jurnal Sain Veteriner* 37(1): 1-10.
- 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.
- Kencana GAY. Suarta IN, Symbolonn MP, Handayani AN, Ong S, Syamsidar. Kusumastuti A. 2015. Respons Antibodi terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang divaksin Tetelo dan Tetelo-Flu Burung. *Jurnal Veteriner* 16(2): 283-290.
- Kwon YK, Sung HW, Joh SJ, Lee MC, Choi JG, Lee EK, Wee SH, Kim JH. 2005. An outbreak of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 in broiler breeders. *Korea J Vet Med Sci* 67: 1193-1196.
- Mahardika IGNK. 2005. Tim Surveilans Pembebasan Penyakit AI, Kajian AI FKH Unud. Laporan Surveilans Pembebasan Penyakit Avian Influenza di Propinsi Bali, Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur. Denpasar. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.
- Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. 2005. In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* 86: 1131-1139.
- Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. 2006. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol* 50: 73-81.
- Office International des Epizooties (OIE). 2004. Manual of Diagnostic test and vaccines for terrestrial animals: Avian Influenza. 5thed. <http://www.oie.int/> (22 November 2019)
- Park CH, Ishinaka M, Takada A, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. 2002. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Arch Virol* 147: 1425-1436.
- Perkins EL, Swayne DE. 2001. Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol* 38: 149-164.

- Pracoyo N. 2009. Penyebab infeksi avian influenza A (H5N1) di Indonesia. *Jurnal Ekologi Kesehatan* 8(4): 1094-1099.
- Suartha IN, Antara IMS, Wiryana IKS, Sukada IM, Wirata IW, Dewi NMRK, Mahardika IGNK. 2010. The Role of Poultry Trader's in Transmitting Avian Influenza Virus. *Jurnal Veteriner* 11(4): 220-225.
- Suardana IBK, Dewi NMRK, Mahardika IGNK. 2009. Respons Imun Itik Bali terhadap Berbagai Dosis Vaksin Avian Influenza H5N1. *Jurnal Veteriner* 10(3): 150-155.
- Subowo. 1996. *Imunobiologi*. Bandung: Angkasa. Hlm 55-57
- Suharno B, Setiawan T. 2012. *Beternak Itik Petelur di Kandang Baterai*. Jakarta. Penebar Swadaya. Hlm. 10
- Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bisset L, Dryting K, Rehg JE, Poon Y, Guan Y, Peiris M, Webster RG. 2004. Reemerging H5N1 Influenza Viruses in Hongkong in 2002 Are Highly Pathogenic to Ducks. *Journal of Virology* 78: 4892-4901.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* 19: 463-482.
- Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. 2013. *Diseases of Poultry*. 13th Ed. New Jersey (US). Wiley-Blackwell.
- Tizard. 1987. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Edisi II. Partodiredjo M, penerjemah. Terjemahan dari: Introduction to Veterinary Immunology. Surabaya. Airlangga University Press. Hlm. 18-120.
- Wibawa H, Bingham J, Nuradji H, Lowther S, Payne J, Harper J, Wong F, Lunt R, Junaidi A, Middleton D, Meers J. 2013. The pathobiology of two Indonesian H5N1 avian influenza viruses representing different clade 2.1 sublineages in chickens and ducks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36: 175-191.