

# Identifikasi Secara Serologi Galur Virus Flu Burung Subtipe H5N1 *Clade 2.1.3* dan *Clade 2.3.2* pada Ayam Petelur

(*SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF AVIAN INFLUENZA STRAIN VIRUS SUBTYPE H5N1 CLADE 2.1.3 AND CLADE 2.3.2 FROM LAYER*)

Aprilia Kusumastuti<sup>1</sup>, Syamsidar<sup>1</sup>, Agustin Zaharia Paderi<sup>1</sup>,  
Arini Nurhandayani<sup>1</sup>, Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research & Development PT Sanbio Laboratories,  
Jln. Melati RT.02/09, Desa Wanaherang, Kecamatan Gunung Putri, Bogor

<sup>2</sup>Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Udayana, Jalan Sudirman, Denpasar.  
Telepon (0361) 223791 Email: yuniatikencana@gmail.com

## ABSTRAK

Penelitian pemeriksaan serologi ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui keterpaparan ayam petelur oleh virus *Avian Influenza* (AI) subtipe H5N1 di tiga kawasan peternakan ayam wilayah pemasaran vaksin AI. Ketiga kawasan pemasaran vaksin tersebut adalah *Area Marketing* Barat, *Area Marketing* Tengah, dan *Area Marketing* Timur. Sampel uji yang digunakan adalah serum ayam petelur dari peternakan di masing-masing *Area Marketing* sedangkan untuk uji serologi digunakan uji hemaglutinasi inhibisi (HI). Sebanyak empat galur antigen virus AI subtipe H5N1 dari *clade 2.1.3* yang digunakan untuk uji hemaglutinasi yakni (A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007, A/Chicken/WestJava-Nagrak/30/2007, A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007) dan dua galur virus AI subtipe H5N1 dari *clade 2.3.2* (AI strain A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 dan A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 93,33% peternakan ayam yang diperiksa serumnya dari 3 area marketing PT. Sanbio Laboratories ternyata memiliki antibodi positif terhadap AI subtipe H5N1 *clade 2.1.3*. Sebanyak 15 peternakan ayam yang dijadikan sampel didapatkan hasil 92,86% positif terhadap virus AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2 strain* A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 dan sebanyak 92,31% peternakan ayam positif terhadap A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012 meskipun peternakan tersebut belum pernah mendapatkan vaksinasi AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2*. Adanya titer antibodi terhadap virus AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2* ini disebabkan oleh *cross protection* dari vaksin AI subtipe H5N1 *clade 2.1.3* atau karena adanya infeksi lapang virus AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2*.

Kata-kata kunci: *avian influenza*, uji hemaglutinasi, AI H5N1 *clade 2.1.3*, AI H5N1 *clade 2.3.2*

## ABSTRACT

The aim of the study was to know avian influenza (AI) infection in field by using serology test in three marketing area of AI vaccines. Haemagglutination inhibition methode was used in this test. There were four antigen strains of AI subtype H5N1 *clade 2.1.3* (AI strain A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, AI strain A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007, AI strain A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007, and AI strain A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007) and 2 antigen strains of AI subtype H5N1 *clade 2.3.2* (AI strain A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 and AI strain A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012) was used in this study for HI test. The result presents that 93,33% chicken farms in three marketing area of PT. Sanbio Laboratories have positive antibody titre to AI subtype H5N1 *clade 2.1.3*. This titre may be obtained from AI *clade 2.1.3* vaccination. From 15 samples, 92,86% are positive to AI subtype H5N1 *clade 2.3.2* A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 and 92,31% are positive to A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012 even without AI *clade 2.3.2* vaccination. This antibody titre may be obtained from AI *clade 2.1.3* vaccine cross protection or field infection.

Key words : Avian influenza, hemagglutination test, *clade 2.1.3* of AI H5N1, *clade 2.3.2* of AI H5N1

## PENDAHULUAN

Flu burung atau *Avian Influenza* (AI) termasuk ke dalam kelompok penyakit menular strategis dan bersifat zoonosis mematikan baik pada hewan maupun manusia yang terinfeksi. Di dalam penanggulangan penyakit menular strategis, flu burung merupakan penyakit zoonosis prioritas. Saat ini penyakit flu burung telah bersifat endemik di Indonesia. Penyakit flu burung disebabkan oleh virus AI subtipe H5N1 yang sangat ganas (*highly pathogenic avian influenza/HPAI*) dari familia *Orthomyxoviridae*, genus influenza tipe A (Swayne dan Suarez, 2000). Virus penyakit flu burung telah bersirkulasi di Indonesia sejak lebih dari lima tahun silam yang menginfeksi berbagai spesies. Langkah-langkah strategis untuk mengatasi masalah flu burung dilakukan dengan berbagai cara, di antaranya melalui pencegahan, pengendalian, dan pemberantasan penyakit.

Sebagai virus RNA, *Orthomyxovirus* memiliki potensi tinggi untuk mengalami mutasi. Mutasi tersebut dapat berupa substitusi, delesi, dan insersi materi genetik yang disebabkan oleh kegagalan mekanisme *proof reading* RNA polimerase sehingga terjadi kesalahan dalam replikasi materi genetik. Kesalahan ini diperkirakan terjadi dalam satu basa dari setiap  $10^4$  basa (Holland *et al.*, 1982). Dharmayanti (2012) juga menyatakan bahwa mutasi virus AI sebagian besar kemungkinan disebabkan oleh seleksi positif protein hemagglutinin (HA) yang merupakan *binding site* dari virus tersebut. Mutasi virus pada *binding site* sangat berperan dalam pembentukan antibodi spesifik dalam tubuh ayam. Antibodi spesifik hasil infeksi virus sebelum dan setelah mutasi protein HA dapat sangat berbeda sehingga proteksi silang yang dihasilkan menjadi tidak maksimal. Mutasi juga disebabkan oleh tekanan imunologis yang dapat menimbulkan perubahan antigenisitas virus (Dharmayanti dan Darminto, 2009) dan mutasi tertinggi terjadi pada dua virus H5N1, yaitu A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006 dan Ck/WestJava/Smi-Pat/06. Lebih lanjut Dharmayanti *et al.*, (2012) melaporkan bahwa pengujian vaksin yang dilakukan dengan berbagai vaksin dari beberapa *strain* virus AI (H5N1, H5N2, H5N9) yang beredar, ternyata tidak mampu memberikan proteksi yang baik terhadap tantangan virus AI A/Ck/West Java/ Pwt-Wij/2006.

Selain mutasi genetik, lalu lintas

perdagangan unggas juga berperan dalam mewabahnya penyakit flu burung di Indonesia. Pada akhir tahun 2012 telah ditemukan virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang disinyalir telah masuk ke Indonesia melalui lalu lintas perdagangan unggas. Virus tersebut memiliki homologi sekuens DNA hanya 91-93% dengan virus AI galur 2.1.3 yang ada di Indonesia. Namun, terhadap virus AI *clade* 2.3.2 yang telah lama berjangkit di Hong Kong, Vietnam, dan Cina, virus tersebut memiliki homologi sekuens hingga 97-98% (Wibawa *et al.*, 2012).

Identifikasi secara serologi adalah suatu cara surveilans untuk mengetahui pola penyebaran penyakit AI di lapang. Darmawi *et al.*, (2012) menyatakan bahwa untuk mengetahui penyebaran virus dalam suatu daerah dapat dilakukan dengan cara surveilans keterpaparan virus pada hewan. Secara alami keterpaparan virus pada hewan akan merangsang respon kekebalan humoral dalam tubuh yang membentuk antibodi. Titer antibodi dapat dideteksi melalui uji serologi yakni uji hemagglutinati inhibisi (HI). Menurut OIE (2012), nilai titer antibodi dibawah  $2^4$  atau 16 HI Unit menunjukkan hasil negatif. Sementara pada ayam kampung, titer tidak kurang dari  $2^3$  HI Unit pada tiga minggu postvaksinasi menunjukkan titer protektif terhadap infeksi virus AI subtipe H5N1 (Indriani *et. al.*, 2004).

Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan melakukan surveilans virus terutama virus RNA yang beredar di lapang. Penelitian ini sangat penting untuk dilakukan dan manfaat penelitiannya adalah terkait dengan protektivitas dan kecocokan antara program vaksinasi dengan virus AI yang beredar di lapang.

## METODE PENELITIAN

Sampel uji adalah serum ayam petelur pascavaksinasi AI subtipe H5N1, yang berasal dari berbagai peternakan ayam di wilayah PT Sanbio melakukan pemasaran produk vaksinnnya. Wilayah tersebut adalah *Area Marketing* Barat (lima peternakan), *Area Marketing* Tengah (lima peternakan), dan *Area Marketing* Timur (lima peternakan). *Area Marketing* Barat meliputi pulau Sumatera, Jakarta, dan sebagian Jawa Barat. *Area Marketing* Tengah meliputi sebagian Jawa Barat, Jawa Tengah dan Yogyakarta. *Area Marketing* Timur meliputi Jawa Timur, Bali.

Peternakan yang berada di Area *Marketing* Barat diberi kode A (A-1, A-2, A-3, A-4, A-5). Peternakan yang berada pada Area *Marketing* Tengah diberi kode B (B-1, B-2, B-3, B-4, B-5). Peternakan yang berada pada Area *Marketing* Timur diberi kode C (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5). Semua peternakan tersebut sudah pernah divaksin AI dengan kandungan virus AI *clade* 2.1.3, kecuali peternakan C-2.

Jadwal vaksinasi di setiap peternakan mengikuti jadwal masing-masing peternakan yang bersangkutan. Sampel darah diambil dari ayam petelur berumur 17-80 minggu dengan rentang waktu pengambilan satu minggu sampai 34 minggu pascavaksinasi. Darah diambil melalui vena brakialis ayam yang diambil secara acak di setiap kandang masing-masing sebanyak 10 ekor.

Sebanyak enam galur antigen AI subtipe H5N1 yang digunakan diperoleh dari Departemen Pertanian (Deptan) Republik Indonesia. Dari enam galur antigen AI tersebut, empat galur termasuk AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 (AI *strain* A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, AI *strain* A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007, AI *strain* A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007, serta AI *strain* A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007) dan dua galur termasuk AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 (AI *strain* A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 dan AI *strain* A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012) dengan titer 4 HIU. Penggunaan empat galur virus AI H5N1 *Clade* 2.1.3 tersebut didasarkan pada surat edaran Dirjen Peternakan No.3009/PD.620/F/9/2009 yang menetapkan empat *master seed* vaksin lokal H5N1 berdasarkan karakterisasi genetik virus AI di Indonesia yang dilakukan oleh Laboratorium Referensi OIE Regional Gelong, Australia.

Virus AI *clade* 2.3.2 yang digunakan sebagai antigen dalam uji ini telah dikarakterisasi secara molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta *sequencing* (Dharmayanti *et.al.*, 2013; Wibawa *et al.*, 2012). Selain antigen, bahan lain yang digunakan adalah sel darah merah 1% dan *Phosphate buffered saline* (PBS) dengan pH 7,0.

Uji serologi dilakukan dengan metode hemaglutinasi inhibisi (HI) sesuai standar (OIE, 2012). Masing-masing sumuran plat mikro *v bottom* diisi dengan PBS pH 7,2 sebanyak 25  $\mu$ L menggunakan pipet mikro. Sampel serum yang diuji sebanyak 25  $\mu$ L diencerkan berseri kelipatan dua mulai dari sumuran plat mikro ke-1 sampai sumuran ke-10. Sebanyak 25  $\mu$ L

antigen AI 4 HIU ditambahkan ke dalam setiap sumuran plat mikro mulai dari sumuran ke-1 hingga ke-11 kemudian di-*shaker* dengan *minishaker* selama 20 detik dengan kecepatan 300 rpm lalu didiamkan selama 15 menit.

Penghitungan nilai antigen 4 HIU dilakukan dengan membagi titer antigen dengan empat (karena titer antigen yang digunakan adalah 4 HIU). Hasil pembagian kemudian dibuat rasio, satu bagian adalah antigen dan sisa rasionya adalah PBS. Setelah didiamkan selama 15 menit, ke dalam sumuran ke-1 sampai ke-12 ditambahkan dengan sel darah merah 1% sebanyak 25  $\mu$ L kemudian di-*shaker* kembali selama 20 detik dengan kecepatan 300 rpm. Hasil uji hemaglutinasi dapat dibaca setelah dilakukan inkubasi selama 30 menit. Hambatan hemaglutinasi ditandai dengan adanya *tear drop* sel darah merah yang muncul bersamaan dengan kontrol ketika plat mikro dimiringkan 45 derajat. Titer serum dibaca sampai pengenceran yang menunjukkan *tear drop* sel darah merah yang muncul dan turun bersamaan dengan kontrol.

Analisis data dilakukan dengan menghitung nilai *Geometric Mean Titre* (GMT) titer antibodi dari masing-masing peternakan yang dibedakan berdasarkan atas antigen yang digunakan dalam uji HI. *Geometric Mean Titre* merupakan nilai anti- $\log_2$  dari *arithmetic mean titre* (AMT) yang merupakan nilai rata-rata titer antibodi dari sejumlah sampel. Nilai GMT kemudian dapat ditentukan dari tabel logaritma terhadap *base* 10 dari nilai AMT yang sebelumnya diperoleh (Thrusfield, 1991). Nilai GMT yang merupakan nilai rata-rata dari titer antibodi dari satu kelompok sampel, kemudian dibandingkan antar peternakan dalam area *marketing* yang sama dan antara area *marketing* yang berbeda untuk melihat *strain* virus yang dominan di area peternakan dan area *marketing* tersebut.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

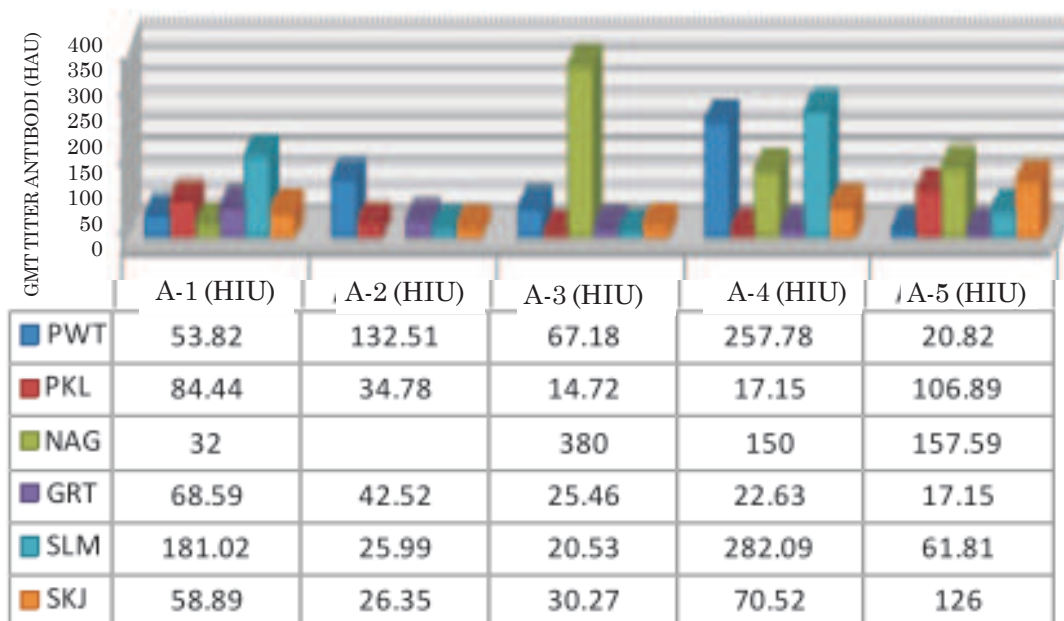
Serum ayam yang diambil dari peternakan di tiga Area *Marketing* telah diuji titer antibodinya terhadap antigen AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 (*strain* A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, *strain* A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007, *strain* A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007, serta *strain* A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007) dan antigen AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 (*strain* A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 dan *strain* A/duck/Sleman/BBVW-

1463-10/2012). Uji HI menunjukkan hasil positif untuk semua antigen AI sub tipe H5N1 galur 2.1.3 pada semua Area *Marketing* dengan tingkat titer antibodi yang berbeda-beda kecuali C-2 di Area *Marketing* Timur. Hasil pengujian titer antibodi terhadap antigen AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 juga menunjukkan hasil positif pada semua Area *Marketing* dengan tingkat titer antibodi yang cukup protektif kecuali C-2 di Area *Marketing* Timur. Hal yang cukup menarik adalah antigen AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang mulai muncul di Indonesia pada akhir 2012 ini pada awalnya dilaporkan hanya menginfeksi unggas air namun tidak ada laporan resmi mengenai infeksi pada ayam. Menurut Wibawa *et. Al.*, (2012), kasus kematian itik akibat AI pada September hingga November 2012 telah terjadi di berbagai wilayah di Pulau Jawa dengan tingkat kematian antara 8,3-100%. Gambar 1, 2, dan 3 adalah gambaran titer antibodi ayam pada peternakan di Area *Marketing* Barat, Area *Marketing* Tengah, dan Area *Marketing* Timur yang menunjukkan adanya titer antibodi terhadap paparan virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2. walaupun vaksinasinya menggunakan vaksin virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.1.3.

Hasil uji serologi sampel serum dari semua peternakan di Area *Marketing* Barat menunjukkan adanya titer antibodi terhadap semua antigen AI sub tipe H5N1 *clade* 2.1.3. Nilai GMT antibodi ayam pada peternakan di

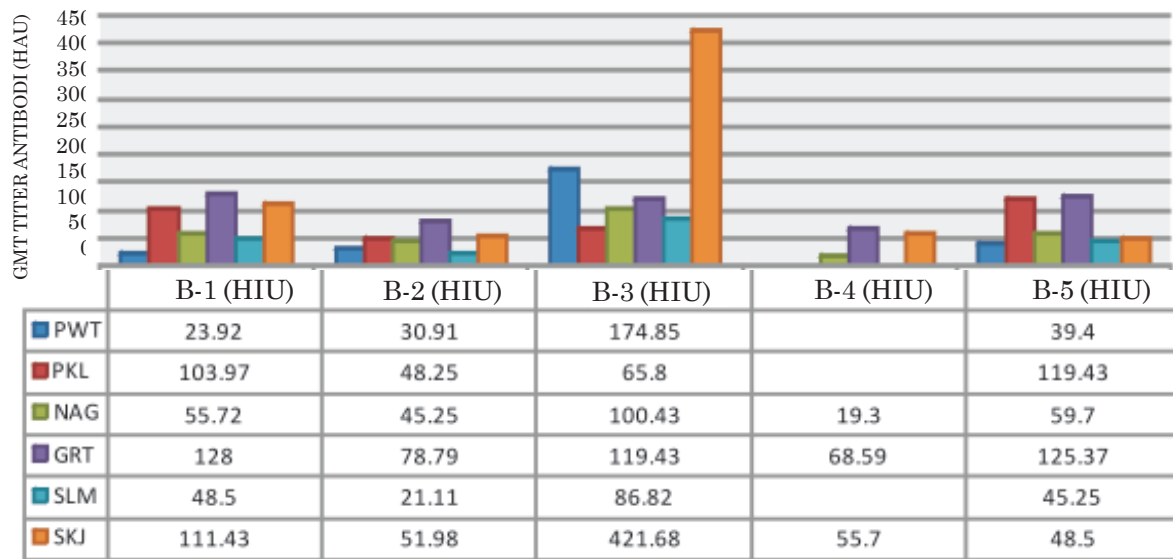
Area *Marketing* Barat (Gambar 1) menunjukkan titer HI di atas 16 HIU terhadap antigen AI *strain* A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 dan AI *strain* A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007. Titer HI dikatakan positif jika terjadi inhibisi pada pengenceran serum 1/16 ( $2^4$  atau  $\text{Log}_2 4$ ) atau lebih terhadap antigen 4 HIU (OIE, 2012). Nilai GMT terhadap AI *strain* A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006 yang terendah adalah 20,82 HIU pada wilayah A-5 dan tertinggi pada A-2 yaitu 132,51 HIU. Nilai titer antibodi HI terhadap antigen AI *strain* A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007 terendah adalah 32 HIU pada A-1 dan tertinggi 380 HIU pada wilayah A-3. Hasil uji serologi terhadap antigen AI *strain* A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007 ini tidak dilakukan pada wilayah A-2 karena volume serum yang tidak mencukupi.

Berbeda dengan titer antibodi terhadap AI sub tipe H5N1 *strain* A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, titer antibodi yang diuji hemaglutinasi inhibisi terhadap antigen AI sub tipe H5N1 *strain* A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007 dan A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007 lebih bervariasi. Pada kelompok A-3 menunjukkan titer antibodi di bawah 16 HIU terhadap antigen AI sub tipe H5N1 *strain* A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007 yakni titernya sebesar 14,72 HIU, walaupun demikian titer antibodi yang tinggi dapat dicapai pada kelompok A-5 dengan titer antibodi sebesar 106,89 HIU. Titer antibodi HI terhadap antigen

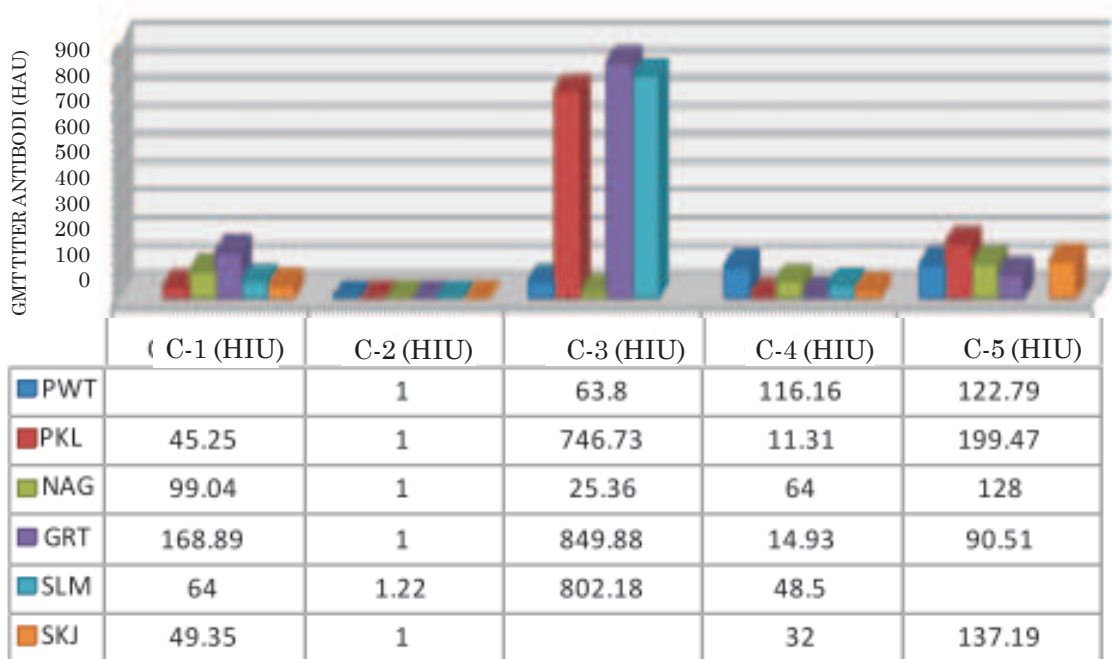


Gambar 1. Perbandingan hasil uji serologis peternakan-peternakan di Area *Marketing* Barat: Sumatra, Jakarta, dan Sebagian Jawa Barat





Gambar 2. Perbandingan hasil uji serologi terhadap AI di Area *Marketing* Tengah: Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Yogyakarta.



Gambar 3. Perbandingan hasil uji serologi terhadap AI di Area *Marketing* Timur: Jawa Timur dan Bali

Ket: A= Peternakan Area *Marketing* Barat; B= Peternakan Area *Marketing* Tengah; C=Peternakan Area *Marketing* Tmuur

PWT = antigen AI *strain* A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006;  
 PKL= antigen AI *strain* A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007;  
 GRT= antigen AI *strain* A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007;  
 NAG= antigen AI *strain* A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007;  
 SKJ= antigen AI *strain* A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012;  
 SLM= AI *strain* A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012;  
 GMT= Geometric Mean Titre.

Kotak kosong pada tabel menunjukkan serum untuk pengujian tidak mencukupi sehingga tidak dilakukan pengujian dengan antigen tersebut.

AI subtype H5N1 *strain A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007* mencapai di atas 16 HIU pada semua peternakan di Area *Marketing* Barat. Nilai titer antibodi HI yang terendah adalah 17,15 HIU pada wilayah A-5 sementara titer antibodi yang tertinggi dapat mencapai 68,59 HIU pada wilayah A-1.

Titer antibodi terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2* juga ditunjukkan oleh semua sampel serum yang berasal dari peternakan ayam di Area *Marketing* Barat, bahkan semua sampel serum yang diuji menunjukkan titer antibodi HI di atas 16 HIU. Nilai terendah titer antibodi terhadap antigen AI subtype H5N1 *strain A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012* adalah 26,35 HIU pada wilayah A-2 dan nilai antibodi tertinggi terdapat pada A-5 dengan 126 HIU. Titer antibodi terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012* bahkan memiliki nilai yang tinggi pada wilayah A-4, yaitu 282,09 HIU. Nilai titer antibodi GMT yang terendah yang ditemukan pada pemeriksaan serum menggunakan antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012* yakni sebesar 20,53 HIU yang diambil dari peternakan ayam kelompok wilayah A-3.

Pada Area *Marketing* Tengah, terdapat lima peternakan yang diuji sampel serumnya yaitu peternakan B-1, B-2, B-3, B-4, dan B-5. Kelima peternakan ini menunjukkan adanya titer antibodi terhadap semua antigen AI subtype H5N1 baik *clade 2.1.3* maupun *clade 2.3.2* (Gambar 2). Dalam pengujian ini, uji serologi dilakukan dengan menggunakan antigen AI subtype H5N1 *strain A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006*, *A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007*, dan *A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012* tidak dilakukan terhadap peternakan B-4 karena jumlah serum yang tidak mencukupi. Semua sampel serum dari peternakan di Area *Marketing* Tengah yang diuji menunjukkan nilai GMT antibodi ayam di atas 16 HIU terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.1.3 strain A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007*, *A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007* dan *A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007*. Nilai GMT antibodi ayam yang tertinggi terhadap antigen AI subtype H5N1 *strain A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006* adalah sebesar 174,85 HIU pada B-3 dan yang terendah adalah sebesar 23,92 HIU pada peternakan B-1. Nilai GMT antibodi ayam yang tertinggi terhadap antigen *A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007* adalah sebesar 100,43 HIU pada peternakan B-3 dan yang terendah

adalah 19,3 HIU pada peternakan B-4. Nilai GMT antibodi ayam yang tertinggi terhadap antigen *A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007* adalah sebesar 119,3 HIU pada peternakan B-5 dan yang terendah adalah 48,25 HIU pada peternakan B-2. Nilai GMT antibodi ayam yang tertinggi terhadap antigen AI *strain A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007* adalah sebesar 128 HIU pada peternakan B-1 dan yang terendah adalah sebesar 68,59 HIU pada peternakan B-4.

Hasil uji serologi sampel serum yang berasal dari peternakan B-1, B-2, B-3, B-4, dan B-5 juga menunjukkan adanya titer antibodi protektif terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2*. Hasil uji serologi HI ditemukan bahwa nilai GMT antibodi ayam yang tertinggi terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012* adalah sebesar 421,68 HIU pada peternakan B-3 dan yang terendah adalah sebesar 48,5 HIU pada peternakan B-5. Nilai GMT antibodi terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012* juga mencapai nilai titer protektif pada keempat peternakan yang diuji di Area *Marketing* Tengah, walaupun demikian nilai GMT tersebut mempunyai titer antibodi yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai GMT terhadap antigen AI subtype H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012*. Nilai GMT antibodi tertinggi ditemukan pada peternakan B-3 dengan titer sebesar 86,82 HIU sedangkan yang terendah ditemukan pada peternakan B-2 dengan titer sebesar 21,11 HIU.

Sampel serum di Area *Marketing* Timur diambil dari peternakan C-1, C-2, C-3, C-4, dan C-5. Hasil uji serologi (GMT) ayam terhadap AI subtype H5N1 pada C-2 adalah 1-1,22 HIU menunjukkan tidak ada titer antibodi terhadap AI subtype H5N1 baik terhadap *clade 2.1.3* maupun *clade 2.3.2* (Hasil tersebut disajikan pada Gambar 3). Menurut OIE (2012), nilai titer antibodi dibawah  $2^4$  atau 16 HIU menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan anamnesis dapat diketahui bahwa di peternakan tersebut juga tidak pernah dilakukan vaksinasi AI. Nilai GMT antibodi pada keempat peternakan di Area *Marketing* Timur lainnya menunjukkan titer antibodi yang positif terhadap AI subtype H5N1 *clade 2.3.2* dan *clade 2.1.3*. Nilai GMT antibodi tertinggi terhadap antigen AI subtype H5N1 *strain A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006* adalah sebesar 122,79 HIU pada peternakan C-5. Pengujian serologi terhadap peternakan C-1 dengan menggunakan antigen AI subtype H5N1

*strain A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006* tidak dilakukan karena volume serumnya tidak mencukupi. Hasil uji serologi terhadap antigen AI subtipe H5N1 *strain A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007* menunjukkan titer antibodi yang tertinggi adalah sebesar 128 HIU pada peternakan C-5. Nilai GMT antibodi terhadap antigen AI subtipe H5N1 *strain A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007* yang tertinggi adalah sebesar 746,73 HIU ditemukan pada peternakan C-3. Nilai GMT terhadap antigen AI subtipe H5N1 *strain A/Chicken/Garut/BBVW-223/2007* yang tertinggi adalah sebesar 849,88 HIU ditemukan pada peternakan C-3. Nilai GMT terhadap antigen AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012* yang tertinggi adalah sebesar 802,18 HIU ditemukan pada peternakan C-3. Sampel serum dari peternakan C-5 tidak dilakukan uji serologi terhadap antigen AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/2012* karena volume serum yang tidak mencukupi untuk uji HI. Nilai GMT antibodi yang tertinggi terhadap antigen AI subtipe H5N1 *clade 2.3.2 strain A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012* adalah sebesar 137,29 HIU ditemukan pada peternakan C-5.

Pembentukan antibodi dalam tubuh ayam terjadi setelah ayam terpapar oleh agen infeksi. Hal-hal yang memengaruhi terbentuknya respons imun dalam tubuh ayam setelah masuknya antigen di antaranya adalah umur, jenis kelamin, lingkungan, interaksi sosial, keterpaparan dengan agen toksik, stres, dan tipe pakan. Sistem pertahanan tubuh ayam mengenali adanya agen asing yang masuk ke tubuh dan membentuk antibodi untuk mengeliminasi agen infeksi. Masuknya agen infeksi dapat terjadi secara alami pada infeksi lapangan atau secara buatan dengan cara vaksinasi.

Riwayat vaksinasi yang mencakup umur ayam saat divaksinasi dan saat *booster* vaksin juga sangat berperan dalam tingginya titer antibodi yang terbentuk dalam tubuh ayam. Respons antibodi saat vaksinasi primer dan *booster* hasilnya berbeda. *Booster* vaksin mengaktifkan sel memori sistem imun sehingga akan terjadi peningkatan titer antibodi yang lebih cepat dan lebih tinggi. Riwayat vaksinasi AI terakhir juga berperan dalam pencapaian titer antibodi. Balqis *et al.*, (2011) melaporkan bahwa peningkatan titer antibodi dan keseragamannya berbeda pada bulan pertama, kedua, dan ketiga pascavaksinasi vaksin

komersial. Dalam laporan tersebut dinyatakan bahwa peningkatan titer antibodi serum ayam petelur pada bulan ke-1, ke-2, dan ke-3 pascavaksinasi adalah sebesar 80 %, 95 %, dan 75% dengan rata-rata titer antibodi adalah  $2^{5.15}$ ,  $2^{5.56}$ , dan  $2^{4.70}$ .

Tipe virus AI yang digunakan dalam vaksinasi juga memiliki peranan penting dalam keterpaparan ayam terhadap *strain* antigen AI subtipe H5N1 baik *clade* 2.1.3. maupun *clade* 2.3.2. Pada Tabel 1 disajikan riwayat vaksinasi pada peternakan yang diambil serumnya untuk sampel uji serologi dari tiga Area *Marketing*.

Hasil uji serologi HI menunjukkan bahwa sebanyak 93,33% peternakan yang diuji (14 sampel dari 15 sampel peternakan) memiliki titer antibodi yang positif terhadap AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3. Sebanyak 12 dari 13 sampel serum dari peternakan yang diuji (92, 31%) menunjukkan hasil positif dengan titer lebih dari 16 HIU terhadap AI subtipe H5N1 *strain A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006*. Sebanyak 12 dari 14 sampel serum dari peternakan yang diuji (85,71%) menunjukkan hasil positif terhadap AI subtipe H5N1 *strain A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007*. Ada satu peternakan yakni A-3 yang memiliki GMT di atas dua, namun tidak mencapai 16 HIU terhadap antigen ini. Sebanyak 13 dari 14 sampel yang diuji (92,86%) menunjukkan hasil positif terhadap antigen AI subtipe H5N1 *strain A/Chicken/West Java-Nagrak/30/2007*. Sebanyak 13 sampel dari total 15 sampel serum yang diuji (86,6%) menunjukkan nilai yang positif terhadap *strain A/Chicken/Garut/BBVW223/2007*. Ada satu sampel peternakan (C-5) yang memiliki titer antibodi lebih dari dua HIU namun tidak mencapai 16 HIU terhadap antigen ini. Nilai titer antibodi yang positif terhadap antigen AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 tersebut sangat mungkin disebabkan oleh vaksinasi yang diberikan. Semua sampel serum dari peternakan yang memberikan hasil positif terhadap virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 ternyata sudah ada riwayat vaksinasi dengan vaksin AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3. Susetyo dan Wibowo, (2008) melaporkan bahwa ayam yang divaksinasi titer antibodinya berbeda secara signifikan dengan ayam yang tidak divaksinasi, sementara ayam muda yang sama-sama divaksinasi namun memiliki umur yang berbeda tidak memiliki perbedaan nyata.

Selain adanya antigen dari vaksin yang menginduksi munculnya antibodi, infeksi lapang juga dapat menyebabkan hasil positif

Tabel 1. Riwayat vaksinasi peternakan-peternakan ayam di Area *Marketing* Barat PT. Sanbio Laboratories (Sumatra, Jakarta, dan Sebagian Jawa Barat).

No	Nama Peternakan	Daerah Peternakan	Flok sampel saat disampling	Umur Ayam saat Vaksinasi AI Terakhir	Umur Ayam Vaksin AI	Kandungan				
1	A-1	Parung, Bogor	Kandang E10	39 minggu	35 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3				
			Kandang C1	60 minggu	35 minggu					
			Kandang A7	26 minggu	12 minggu					
			Kandang E4	44 minggu	35 minggu					
			Kandang C8	36 minggu	35 minggu					
			Kandang D1	17 minggu	12 minggu					
			Kandang A8	13 minggu	12 minggu					
			Kandang E3	44 minggu	35 minggu					
			Kandang A6	26 minggu	12 minggu					
			Kandang B3	63 minggu	35 minggu					
			Kandang E2	44 minggu	35 minggu					
			2	A-2	Candali, Bogor		Kandang 3	24 minggu	20 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3
							Kandang 7, 8	36 minggu	32 minggu	
Kandang 9	35 minggu	31 minggu								
3	A-3	Tegalari, Bogor	Kandang 2	19 minggu	15 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3				
			Kandang 6	63 minggu	59 minggu					
			Kandang 11	64 minggu	60 minggu					
			Kandang 14	24 minggu	20 minggu					
			Kandang 16	23 minggu	19 minggu					
			Kandang 15	67 minggu	63 minggu					
4	A-4	Parung, Bogor	Kandang B2B	50 minggu	40 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3				
			Kandang B2A	30 minggu	20 minggu					
			Kandang C1	74 minggu	40 minggu					
			Kandang D2	44 minggu	40 minggu					
			Kandang G1	67 minggu	40 minggu					
			Kandang HKI	55 minggu	40 minggu					
			Kandang HK4	34 minggu	20 minggu					
5	A-5	Cigudeg	Kandang D12	30 minggu	26 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3				
			Kandang E6	23 minggu	19 minggu					
			Kandang D8	14 minggu	10 minggu					
			Kandang C4	24 minggu	20 minggu					
			Kandang D11	21 minggu	17 minggu					

munculnya titer antibodi terhadap AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3. Walaupun demikian, saat sampel diambil dari peternakan, tidak ada kasus kematian atau gejala klinis muncul yang mengindikasikan adanya infeksi AI. Swayne (2009) menyatakan bahwa Indonesia merupakan salah satu negara yang menggunakan vaksin AI H5 karena keterpaparannya terhadap virus AI sejak tahun 2003. Walaupun demikian, *monitoring* terhadap hasil vaksinasi merupakan hal yang krusial sebagai evaluasi dari efikasi vaksin. Hal tersebut berdasarkan pandangan bahwa imunitas terhadap AI tidak bersifat absolut di lapang dan vaksinasi tidak akan

optimal, populasi ayam yang divaksin secara potensial terpapar oleh virus lapang, dan menjadi agen *shedding* virus ke lingkungan.

Dari riwayat vaksinasi di tiap peternakan, diperoleh data bahwa semua peternakan ayam yang diambil sampel serumnya ternyata belum pernah divaksin dengan vaksin AI yang mengandung virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2. Walaupun demikian, hasil uji serologi dengan antigen AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 *strain* A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 menunjukkan hasil positif sebanyak 92,86% (13 peternakan dari 14 sampel peternakan yang diuji) dan *strain* A/duck/Sleman/BBVW-1463-10/



Tabel 2. Riwayat vaksinasi peternakan-peternakan ayam di Area *Marketing* Tengah PT. Sanbio Laboratories (Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Yogyakarta).

No	Nama Peternakan	Daerah Peternakan	Flok sampel saat disampling	Umur Ayam saat Vaksinasi AI Terakhir	Umur Ayam Vaksin AI	Kandungan
1	B-1	Cianjur	Kandang B13B	35 minggu	31 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3
			Kandang B21	81 minggu	71 minggu	
			Kandang B15B	31 minggu	27 minggu	
			Kandang B5	25 minggu	21 minggu	
			Kandang D 12	97 minggu	93 minggu	
			Kandang B17	23 minggu	19 minggu	
			Kandang C8	93 minggu	89 minggu	
			Kandang A10	32 minggu	28 minggu	
			Kandang B7	50 minggu	46 minggu	
			Kandang D11	54 minggu	50 minggu	
			Kandang C20	56 minggu	52 minggu	
			Kandang B11	27 minggu	23 minggu	
			Kandang A14	14 minggu	10 minggu	
			2	B-2	Cianjur	
Kandang C7	70 minggu	66 minggu				
Kandang D5	54 minggu	50 minggu				
Kandang F1	32 minggu	28 minggu				
Kandang C1	53 minggu	49 minggu				
Kandang E10, E7	34 minggu	30 minggu				
Kandang A2	69 minggu	64 minggu				
Kandang G4, B5	74 minggu	70 minggu				
Kandang A15	48 minggu	44 minggu				
Kandang H, G8	32 minggu	28 minggu				
Kandang E15	68 minggu	64 minggu				
Kandang B1, G5	32 minggu	28 minggu				
Kandang G7, B7, A5, F5, F4	30 minggu	26 minggu				
Kandang H5	81 minggu	76 minggu				
Kandang H3B	26 minggu	22 minggu				
Kandang C12, C8	31 minggu	27 minggu				
3	B-3	Cianjur	Kandang 24A, 24B, 25B, 25C, 26A, 26B	32 minggu	26 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3
			Kandang 15, 22	47 minggu	46 minggu	
			Kandang 2B, 5B, 4	57 minggu	56 minggu	
			Kandang 75, 83, 85	72 minggu	65 minggu	
			Kandang 71, 72	80 minggu	69 minggu	
			Kandang kawat	23 minggu	18 minggu	
4	B-4	Semarang	Kandang A, B, C, D, G, J	19 minggu	17 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3
5	B-5	Yogyakarta	Kandang pullet 1	9 minggu	2 minggu	AI <i>Clade</i> 2.1.3
			Kandang pullet 22	13 minggu	9 minggu	
			Kandang 3 A6	27 minggu	16 minggu	
			Kandang 3 B1	28 minggu	16 minggu	
			Kandang 21	45 minggu	30 minggu	
			Kandang 3 D2	36 minggu	30 minggu	

Tabel 3. Riwayat vaksinasi peternakan-peternakan ayam di tiga Area *Marketing* Timur PT. Sanbio Laboratories (Jawa Timur dan Bali)

No	Nama Peternakan	Daerah Peternakan	Flok sampel saat disampling	Umur Ayam saat Vaksinasi AI Terakhir	Umur Ayam Kandungan Vaksin AI	Kandungan
1	C-1	Lumajang	Kandang 1	39 minggu+ 3 hari	34 minggu+ 1 hari	AI <i>clade</i> 2.1.3
2	C-2	Jember	Kandang A1, C2 Kandang J2 Kandang A2 Kandang L Kandang I1 Kandang B2 Kandang D1 Kandang E2 Kandang F1	94 minggu 51 minggu 86 minggu 64 minggu - 84 minggu 78 minggu 80 minggu 65 minggu	Tidak pernah divaksin AI	
3	C-3	Blitar	Kandang 2D, 5B, 5B2, 5D, 6B, 7A, 7B2, 10B2, 12A	134-138 hari	62-63 hari	AI <i>clade</i> 2.1.3
4	C-4	Blitar	Kandang A Kandang B	16 Minggu 63 hari	13 Minggu 37 hari	AI <i>clade</i> 2.1.3
5	C-5	Blitar	Kandang 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	26 minggu	16 minggu	AI <i>clade</i> 2.1.3

2012 sebanyak 92,31% (12 dari 13 sampel peternakan yang diuji). Nilai antibodi terhadap AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 ini dapat disebabkan karena adanya reaksi *cross protection* dari antibodi yang diinduksi vaksin AI dari galur yang heterolog.

Secara molekuler, Andesfha *et al.*, (2013) menyatakan bahwa tingkat homologi antara virus AI *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2 cukup rendah, yaitu sebesar 90,4% sampai 90,9% sedangkan Wibawa *et al.*, (2012) menyatakan bahwa nilai homologi yang sedikit lebih tinggi yaitu sebesar 93-94%. Tingkat homologi yang cukup tinggi ini kelihatannya masih memungkinkan terjadinya reaksi *cross protection*. Suartha *et al.*, (2012) menyatakan bahwa dari pengujian silang berbagai serum ayam diperoleh hasil *arithmetic mean titre* (AMT) pada serum yang lebih homolog dengan antigen uji memiliki titer yang lebih tinggi dibandingkan AMT serum yang kurang homolog dengan *strain* uji. Penggunaan virus yang berbeda dengan serum untuk pengujian HI, menghasilkan rata-rata titer antibodi yang lebih rendah 1-2 log. Emilia *et al.*, (2013) menyatakan bahwa hasil potensi vaksin AI yang mengandung virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.1.3 (A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006) masih dapat memberikan

potensi 80% terhadap uji tantang virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 (A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012) pada ayam *Specific Pathogen Free* (SPF). Protein hemagglutinin dari virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 masih mengenal *avian receptor* ( $\alpha 2,3$ ) karena mempunyai residu asam amino glutamat pada posisi 222 (pada H3 posisi 226) dan glisin pada posisi 224 (pada H3 posisi 228). Jumlah tempat glikosilasi pada protein HA sebanyak delapan dan tidak mengalami kenaikan maupun penurunan sama seperti halnya pada sebagian besar profil virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.1.3 asal Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2013).

Keterpaparan ayam terhadap agen infeksi virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 di peternakan juga dapat terjadi secara alami yang berasal dari lingkungan. Lebarbenchon *et al.*, (2010) menyatakan bahwa penyebaran virus AI dari satu lingkungan ke lingkungan sekitarnya dapat disebarkan oleh unggas liar, terutama unggas air. Suardana *et al.*, (2009) menyatakan bahwa itik merupakan reservoir yang penting dalam menyebarkan penyakit AI pada unggas lain seperti halnya pada ayam. Virus AI tersebut tidak menimbulkan gejala klinis pada itik sehingga virus dapat bertahan lama di alam tanpa ada penanganan lebih lanjut. Faktor-

faktor yang berperan di lingkungan dalam hal persistensi dan juga penyebaran virus AI dari lingkungan satu ke tempat yang lain belum banyak diketahui. Berbagai perbedaan kondisi lingkungan dan alam berperan dalam perbedaan patogenitas virus AI. Penyebaran virus AI dapat terjadi melalui lalu lintas perdagangan unggas. Suartha *et al.*, (2010) menyatakan bahwa perlakuan pedagang unggas hidup terhadap unggas yang dijual di pasar unggas berperan dalam penyebaran penyakit AI. Pemisahan jenis unggas dan pelakuan desinfeksi dalam hal perdagangan unggas hidup sangat berperan untuk mencegah penyebaran penyakit AI.

Diagnosis virus AI subtipe H5N1 di area peternakan menjadi lebih akurat jika dilanjutkan dengan pemeriksaan secara molekuler menggunakan uji *Polymerase Chain Reaction* untuk mengetahui galur virus AI yang pernah menginfeksi peternakan ayam sampel (Kencana *et al.*, 2012).

### SIMPULAN

Hasil identifikasi *strain* virus AI subtipe H5N1 secara serologi diketahui bahwa 93,33% telah terpapar virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 yang merupakan reaksi vaksinasi. Dari peternakan tersebut sebanyak 92,86% menunjukkan hasil positif terhadap virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2. Adanya titer antibodi terhadap AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 ini disebabkan oleh *cross protection* dari vaksin AI yang mengandung virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.1.3 atau karena adanya infeksi lapang virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2.

### SARAN

Identifikasi virus AI dengan uji serologi merupakan langkah memonitoring adanya keterpaparan virus AI di wilayah peternakan ayam berdasarkan atas respon antibodi ayam terhadap masuknya antigen (baik melalui vaksinasi ataupun akibat infeksi virus lapang). Adanya indikasi masuknya agen infeksi virus avian influenza terutama *clade* 2.3.2 yang awalnya hanya menginfeksi itik dapat ditindaklanjuti dengan melakukan uji *Polymerase Chain Reaction* sehingga hasilnya lebih akurat.

Bagi peternak ayam komersial, sangatlah penting untuk melakukan monitoring hasil vaksinasi terhadap virus AI subtipe H5N1 baik *clade* 2.1.3 maupun *clade* 2.3.2. Upaya tersebut sangat bermanfaat dalam pemilihan jenis vaksin AI yang sesuai dengan kondisi lapang agar lebih mudah untuk melakukan pencegahan terhadap masuknya virus baru di area peternakan ayam.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Bapak Dani Ong selaku Direktur Utama PT Sanbio Laboratories, Wanaherang, Gunung Putri, Bogor, yang telah memberikan ijin, sarana, dan prasarana sehingga penelitian ini dapat dilakukan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Andesfha E, Ramlah, Natih IKKN, Djusa ER, Mucharini H. 2013. *Identifikasi Molekular Dinamika Genetik Virus Avian Influenza subtype H5N1 clade 2.1.3 dan 2.3.2*. Gunung Sindur, Bogor. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan. <http://bbpmsoh.ditjennak.pertanian.go.id>
- 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.
- Darmawi, Manaf ZH, Darniati, Fakhrurrazi, Abrar M, Erina. 2012. Deteksi Antibodi Serum Terhadap Virus Avian influenza pada Ayam Buras. *Agripet* 12 (1): 23-27.
- Dharmayanti NLPI. 2009. Molecular Analysis of H5N1 Avian Influenza Virus from Avian Species: Compared with Genbank Data of the Indonesian H5N1 Human Cases. *Microbiology* 3 (2): 77-84.
- Dharmayanti NLP, Darminto. 2009. Mutasi virus AI di Indonesia: Anti-genic drift protein hemagglutinin (HA) virus influenza H5N1 tahun 2003-2006. *Majalah Kedokteran Hewan* 25(1): 1-8.
- Dharmayanti NLPI, Diwyanto K, Bahri S. 2012. Mewaspada Perkembangan Avian Influenza (AI) dan Keragaman Genetik virus AI / H5N1 di Indonesia. *Perkembangan Inovasi Pertanian* 5(2):124-141.

- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajui DA, Hardiman, Wibawa H, Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik Molekuler dan Patogenesis Virus H5N1 *Clade* 2.3.2 asal Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 18(2): 99-113
- Emilia, Ramlah, Rahajeng S, Suryati Y. 2013. Pengkajian Mutu Vaksin Avian Influenza (AI) pada Beberapa Provinsi di Indonesia. Gunung Sindur, Bogor. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan. <http://bbpmsoh.ditjenk.pertanian.go.id>
- Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *J Science* 215: 1577-1585.
- Indriani R, Dharmayanti NLPI, Wiyono A, Darminto, dan Parede L. 2004. Deteksi Respon Antibodi dengan Uji Hemaglutinasi Inhibisi dan Titer Proteksi terhadap virus Avian Influenza Subtipe H5N1. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9(3): 204-209.
- Kencana GAY, Kardena IM, Mahardika IG NK. 2012. Peneguhan diagnosis penyakit Newcastle Disease lapang pada ayam buras di Bali menggunakan teknik RT-PCR. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6 (1): 28-31.
- Lebarbenchon C, Feare, Renaud CJ, Thomas F, Gauthier-Clerc M. 2010. Persistence of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Natural Ecosystem. *Emerging Infectious Disease* 16 (7): 1057-1062.
- OIE. 2012. Terrestrial Manual Chapter 2.3.4. Avian Influenza. Hal: 11
- Suardhana IBK, Dewi NMRK, Mahardika IG N. 2009. Respon Imun Itik Bali Terhadap Berbagai Dosis Vaksin Avian Influenza H5N1. *J Veteriner* 10 (3): 150-155
- Suartha IN, Anthara IMS, Wiryana IKS, Sukada IM, Wirata IW, Dewi NMRK, Mahardika IG NK. 2010. Peranan Pedagang Unggas dalam Penyebaran Virus Avian Influenza. *J Veteriner* 11 (4): 220-225
- Suartha IN, Wirata IW, Putra IG NN, Dewi NMRK, Anthara IMS, Wibawan IWT, Mahardika IG NK. 2012. Vaksin Polivalen untuk Mencegah Penyakit Flu Burung. *J Veteriner* 13 (2): 113-117
- Susetyo U, Wibowo MH. 2008. Perbandingan Perbandingan Titer Antibodi Ayam Broiler yang Divaksin pada Umur 7 dan 14 Hari Menggunakan Vaksin Avian Influenza Heterolog Subtipe H5N2. *J Sain Vet* 26(2): 78-87.
- Swayne DE. 2009. Avian Influenza Vaccine and Therapies for Poultry. *Comp Immun Microbiol Infec Dis* 32: 351-363.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *J Rev Sci Tech* 19: 463-482.
- Tabbu CR, 2000. *Penyakit Ayam dan Pengulangannya*. Yogyakarta. Kanisius. Hal: 232-243
- Thrusfield M. 1991. *Veterinary Epidemiology*. Oxford Butterworth-Heinemann Ltd. P. 175.
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, Rohmah A, Andesyha E, Romlah, Daulay RSD, Safitria K. 2012. Investigasi Wabah Penyakit pada Itik di Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Timur; Identifikasi Sebuah *Clade* Baru Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 di Indonesia. *Buletin Laboratorium Veteriner* 12(4): 2-9.