

Respon Imun Itik Bali terhadap Berbagai Dosis Vaksin Avian Influenza H5N1

(IMMUNE RESPONSE OF BALI DUCK TO VARIOUS DOSES
OF AVIAN INFLUENZA H5N1 VACCINE)

Ida Bagus Kade Suardana*, Ni Made Ritha Krisna Dewi,
I Gusti Ngurah Kade Mahardika

¹⁾Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Udayana
Jl PB Sudirman, Denpasar, Bali
Telp. 0361-223791; Faks. 0361-701808
email: idasuardana@yahoo.co.id

ABSTRACT

A study was carried out to investigate the immune response of Bali ducks against various doses of Avian Influenza H5N1 vaccine. The study was carried out using a complete Random-Split in Time research design as many as 40 of Bali ducks of 3 months age were kept separately in 4 groups. The ducks were vaccinated twice in two week interval with AI H5N1 vaccine of 0 (as negative control), 1/2, 1, and 2 doses. Sera were collected one day before first vaccination, then every week until three weeks after the second vaccination. All sera were tested by hemagglutination inhibition (HI) test. The result shows that antibody level with double dose was significantly higher than single dose, half dose, and negative control ($P < 0.01$). However antibody level in ducks vaccinated with single and half dose did not show any significant difference ($P > 0.05$).

Key word : Bali duck, AI H5N1 Vaccine, antibody HI

PENDAHULUAN

Wabah Avian Influenza (AI) oleh subtype H5N1 yang terjadi di berbagai negara telah menimbulkan kepanikan pada industri perunggasan karena menyebabkan kematian unggas yang sangat tinggi (hampir 90%) dan kerugian ekonomi bagi peternak (Deptan, 2005). Penyakit tersebut merupakan penyakit eksotik dan termasuk daftar A, Office International des Epizootiq ics, yaitu penyakit yang harus dilaporkan (*notifiable*) yang penyebarannya sangat cepat dan melewati batas-batas negara (Alexander, 1996 ; WHO, 2002).

Penyakit AI H5N1 sekarang ini telah menyebar ke seluruh dunia dan menyerang berbagai jenis unggas peliharaan termasuk kalkun, ayam, burung puyuh, angsa, dan itik (Buxton dan Freser, 1977 ; Cann, 1993 ; Soares *et al.*, 2004 ; Hassan, 2005). Penyakit AI beragam mulai dari yang ringan dengan sedikit atau tanpa kematian hingga yang berat dengan tingkat penularan dan kematian yang tinggi dan mengakibatkan epidemik ganas yang

disebut dengan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) (Stephenson dan Zambon, 2002; Hall, 2004 ; Doan dkk., 2005 ; Harder dan Warner, 2006). Penyakit AI tersebut mulai berjangkit di Asia pada akhir tahun 2003 (WHO, 2005). Virus AI di Bali sudah dilaporkan dan diisolasi sejak tahun 2004 (Mahardika *et al.*, 2004).

Itik merupakan salah satu ternak unggas air yang berpotensi sebagai *reservoir* dalam penyebaran virus AI (Laudert *et al.*, 1993 ; Sturm-Ramirez *et al.*, 2004 ; Fouchier *et al.*, 2005) Data hasil dari Tim Surveillance AI FKH-UNUD menunjukkan bahwa seroprevalensi terhadap penyakit AI ini lebih tinggi pada itik dan unggas air lainnya dibandingkan dengan ayam kampung (Tim AI FKH UNUD, 2005). Virus AI juga lebih banyak dapat dideteksi pada itik dan unggas air dibandingkan dengan ayam kampung (Tumpey *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2004). Virus AI tersebut tidak menyebabkan penyakit yang nyata pada unggas air. Namun, unggas air dapat menjadi sumber penyebaran penyakit AI sehingga dapat

bertahan lama di alam (Stephenson dan Zanbon, 2002 ; Deptan, 2005).

Virus AI Pada itik tidak bersifat ganas (*low pathogenic*) karena merupakan *reservoir* alaminya dan tetap berevolusi membentuk strain virus baru (Li *et al.*, 2004 ; Hulse-Post *et al.*, 2005). Kebanyakan isolat lapangan diambil dari itik yang tidak menunjukkan gejala klinis dan VAI ditemukan hanya pada saluran pernapasan dan pencernaan (Horimoto dan Kawaoka, 2005). Mengingat pentingnya peran itik sebagai penyimpan dalam penyebar VAI, maka untuk menekan sekresi dan replikasi virus AI khususnya subtipe H5N1, program vaksinasi pada unggas ini perlu dilakukan (Webster *et.*, 1985 ; Terrence *et.*, 2005 ; Deptan, 2005). Akan tetapi, penelitian tentang respon imun itik terhadap pemberian vaksin influenza belum banyak dilakukan.

Artikel ini mengungkap hasil penelitian respon imun itik bali terhadap vaksin AI. Dalam penelitian ini, itik lokal divaksinasi dengan vaksin AI H5N1 inaktif.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Antigen AI 4 unit HA virus standar H5N1 Balivet (Bogor), serum itik bali sebanyak 240 sampel, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,2-7,4 dan suspensi eritrosit 0,1%. Dalam penelitian ini menggunakan vaksin AI H5N1 (Vaksiflu^a) inaktif (*killed vaccine*) yang diproduksi oleh PT Vaksindo dengan menggunakan strain lokal.

Hewan coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah itik bali dewasa sehat umur 3 bulan yang belum divaksinasi dengan jumlah 40 ekor yaitu 10 ekor tanpa vaksinasi (sebagai kontrol) dan 30 ekor divaksinasi dengan vaksin AI H5N1 dalam berbagai tingkat dosis. Semua itik ini dibeli dari peternakan itik yang ada di Kecamatan Kediri, Kabupaten Tabanan.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola *Split in Time*, dengan faktor utamanya adalah tingkat dosis (D) dan faktor tambahannya adalah periode pengambilan sampel (P). Itik penelitian dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu D₀, D_{1/2}, D₁, dan D₂. D₀ adalah kelompok itik yang tidak divaksinasi yaitu sebagai kontrol, sedangkan D_{1/2}, D₁, dan D₂ adalah kelompok itik yang

divaksinasi masing-masing dengan setengah dosis, satu dosis, dan dua kali dosis anjuran. Sehari sebelum divaksinasi darah itik dari 4 kelompok perlakuan diambil untuk mengetahui antibodi awal dan sampel tersebut diberi kode 'P₀'. Sehari setelah pengambilan darah, kelompok perlakuan (D_{1/2}, D₁, dan D₂) divaksinasi dengan vaksin AI inaktif sesuai dengan tingkatan dosisnya. Hari ke-7 pasca vaksinasi darahnya diambil dari keempat kelompok perlakuan dan sampelnya diberi kode 'P₁'. Selanjutnya hari ke-14 pascavaksinasi sampel diambil lagi dari keempat kelompok perlakuan dan sampelnya ini diberi kode 'P₂'. Kemudian hari ke-21 pascavaksinasi darah itik diambil lagi dan sampelnya diberi kode 'P₃'. Sehari setelah pengambilan darah pada hari ke-21, itik percobaan dari kelompok perlakuan (D_{1/2}, D₁, dan D₂) divaksinasi lagi sesuai dengan tingkatan dosisnya. Hari ke-7 pasca vaksinasi kedua darah itik diambil dari keempat kelompok perlakuan dan sampelnya diberi kode 'P₄'. Empat belas hari setelah vaksinasi kedua darah itik diambil lagi dan sampelnya ini diberi kode 'P₅'.

Pengumpulan Sampel Serum

Pengambilan darah itik dilakukan sebanyak enam kali yaitu sekali pascavaksinasi, tiga kali pascavaksinasi I dan dua kali pasca vaksinasi II. Darah diambil dari vena brachialis dengan menggunakan spuit 3 ml tanpa antikoagulan. Darah dibiarkan membeku dalam suhu kamar sampai serumnya keluar. Serum yang masih bercampur dengan sel darah merah dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* steril kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatannya dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang baru untuk mendapatkan serum.

Uji Hambatan Hemaglutinasi (titrasi)

Untuk mengetahui tingkat kekebalan suatu hewan dapat diketahui melalui 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.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer Antibodi pada Berbagai Dosis Vaksinasi

Titer antibodi terhadap virus AI pada itik bali selama 6 minggu pengamatan dari setiap kelompok perlakuan (D_0 , $D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) disajikan pada Tabel 1. Tampak bahwa titer antibodi pada itik yang divaksin dengan satu dosis (2,98 unit HI) tidak berbeda nyata dengan yang divaksin setengah dosis (2,68 unit HI), tetapi sangat nyata lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif (0,00 Unit HI), serta sangat nyata lebih rendah ($P < 0,01$) bila dibandingkan dengan dua kali dosis anjuran (3,22 unit HI).

Titer Antibodi pada Berbagai Periode Pengambilan Serum

Rataan titer antibodi pada setiap pengambilan sampel serum (P_0 , P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , dan P_5) disajikan dalam Tabel 2. Tampak periode pengambilan sampel pada P_4 , menghasilkan rata-rata titer antibodi yang sangat nyata lebih tinggi ($P < 0,01$) bila dibandingkan dengan pada periode P_0 , P_1 , P_2 , dan P_3 tetapi sangat nyata lebih rendah bila dibandingkan dengan pada periode P_5 ($P < 0,01$). Sedangkan pada periode pengambilan sampel P_0 dan P_1 menghasilkan titer antibodi yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Sebagai ilustrasi tentang titer HI-H5 itik percobaan dengan pemberian berbagai dosis vaksin AI H5N1 (D_0 , $D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) dan periode pengambilan sampel (P_0 , P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , dan P_5) ditampilkan secara grafis pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan tentang rata-rata titer antibodi HI VAI pada masing-masing kelompok perlakuan vaksinasi AI H5N1 (D_0 , $D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) dalam setiap minggu pengamatan. Pada periode P_0 dan P_1 , kelompok perlakuan ($D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) menunjukkan grafik yang mula-mula datar yaitu dengan rata-rata titer antibodi 2^0 unit HI. Dari periode P_2 sampai P_5 grafiknya mengalami peningkatan dan peningkatannya terjadi secara bersamaan antara ketiga

Tabel 1. Pengaruh Dosis Vaksin AI H5N1 terhadap Rataan Titer Antibodi VAI (- Log 2 unit HI) pada Itik Bali Pasca Vaksinasi Pertama.

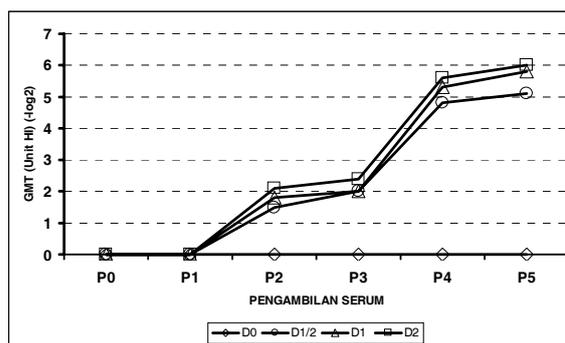
Perlakuan Dosis (D)	Titer Antibodi Pasca vaksinasi I	Titer Antibodi Pasca vaksinasi II	Rataan Titer Antibodi
D_0	0,00	0,00	0,00 ^a
$D_{1/2}$	1,17	4,95	2,68 ^b
D_1	1,26	5,05	2,98 ^b
D_2	1,50	5,80	3,22 ^c

Keterangan : Nilai Huruf yang berbeda ke arah kolom menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Tabel 2. Pengaruh Periode Pengambilan Sampel terhadap Rataan Titer Antibodi VAI (- Log 2 unit HI) Pasca Vaksinasi.

Periode Pengambilan Sampel (P)	Rataan Titer Antibodi
P_0	0,00 ^a
P_1	0,00 ^a
P_2	1,35 ^b
P_3	1,60 ^b
P_4	3,93 ^c
P_5	4,23 ^d

Keterangan : Huruf yang berbeda ke arah kolom menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)



Gambar 1. Rataan titer antibodi VAI (- Log 2 unit HI) pada setiap minggu pengamatan .

Keterangan : $P_0 - P_5$, pengambilan serum pada minggu pertama pre-vaksinasi AI dan diulang setiap minggu; Tanda wajik (E%): titer HI kontrol negatif (vaksin 0 dosis); Tanda lingkaran, segitiga, dan kotak berturut-turut adalah titer HI dengan setengah, satu, dan dua dosis; Tanda panah (o) adalah waktu vaksinasi I dan II.

kelompok perlakuan ($D_{1/2}$, D_1 , dan D_2). Pada periode P_2 grafiknya meningkat dengan rata-rata titer antibodi pada kelompok perlakuan $D_{1/2}$ menjadi $2^{1.5}$ unit HI, D_1 menjadi $2^{1.8}$ unit HI dan D_2 menjadi $2^{2.1}$ unit HI. Pada periode P_3 grafiknya juga meningkat, tetapi peningkatannya kecil yaitu $D_{1/2}$ dan D_1 ($2^{2.0}$ unit HI) sedangkan D_2 ($2^{2.4}$ unit HI). Grafik meningkat tajam pada periode P_4 yaitu pada kelompok $D_{1/2}$ menjadi $2^{4.8}$ unit HI, D_1 menjadi $2^{5.3}$ unit HI dan D_2 menjadi $2^{5.6}$ unit HI. Pada periode P_5 grafiknya juga meningkat, tetapi peningkatannya kecil yaitu $D_{1/2}$ ($2^{5.1}$ unit HI), D_1 ($2^{5.8}$ unit HI) dan D_2 ($2^{6.0}$ unit HI). Sedangkan pada kelompok perlakuan D_0 (kelompok yang tidak divaksinasi AI) cenderung menunjukkan tampilan grafik yang tetap bertahan dengan titer antibodi 2^0 unit HI.

Respon imun primer dimulai pada saat tubuh itik terpapar imunogen untuk pertama kalinya, pada penelitian ini, umumnya titer antibodi yang terbentuk relatif rendah. Peristiwa tersebut dapat dilihat pada Gambar 1, yaitu pada P_0 (pada saat itik divaksinasi AI pertama) dari kelompok perlakuan ($D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) menghasilkan titer antibodi pada P_1 dan P_2 dalam jumlah relatif kecil. Sedangkan respon imun sekunder adalah peristiwa pengenalan kembali terhadap imunogen yang sama, pada peristiwa ini antibodi yang dihasilkan relatif tinggi dan cepat sekali terbentuk, sebagai akibat dari reaksi sel-sel memori. (Alexander, 1996; Bellanti, 1993; Tizard, 2000). Peristiwa tersebut dapat dilihat pada Gambar 1 yaitu setelah vaksinasi AI kedua, rata-rata titer antibodi pada kelompok perlakuan ($D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) pada P_4 dan P_5 relatif meningkat tajam. Hal yang sama dapat dilihat dari waktu peningkatan titer antibodi. Pada vaksinasi pertama waktu yang dibutuhkan adalah 2 minggu sedangkan pada vaksinasi kedua hanya 1 minggu.

Dari Gambar 1 juga terlihat bahwa titer antibodi itik bali sebelum diberikan perlakuan (P_0) adalah 2^0 unit HI. Ini berarti itik bali percobaan tersebut dalam tubuhnya belum pernah terpapar oleh antigen. Satu minggu pascavaksinasi AI pertama (P_1) semua itik bali percobaan titer antibodinya masih tetap 2^0 unit HI. Hal ini disebabkan karena vaksin yang digunakan pada saat vaksinasi pertama adalah vaksin inaktif. Vaksin tersebut berbentuk emulsi dan mengandung *adjuvant* sehingga mikroorganisme yang ada di dalam vaksin dilepaskan sedikit demi sedikit dengan demikian proses pembentukan antibodi terjadi lebih lama.

Rataan titer antibodi itik percobaan kemudian meningkat pada minggu kedua dan ketiga (P_2 dan P_3) berkisar antara $2^{1.5}$ sampai $2^{2.4}$ unit HI. Guna memantau keberhasilan program vaksinasi yang menggunakan vaksin inaktif sebaiknya pengambilan darah dilakukan 3 minggu setelah vaksinasi karena pengambilan darah yang terlalu cepat akan menyebabkan kesalahan analisis (Widjaja, 2005). Sedangkan respon imun sekunder pada perlakuan ($D_{1/2}$, D_1 , dan D_2) terjadi pada minggu pertama (P_4) dan minggu kedua (P_5) pascavaksinasi AI kedua. Titer antibodi meningkat secara tajam, peningkatan titer antibodi tersebut karena sel-sel memori dalam tubuh itik bali bersangkutan telah mengenal imunogen yang sama sehingga titer antibodi yang dihasilkan relatif lebih cepat dan lebih tinggi daripada vaksinasi pertama. Respon tersebut disebut dengan respon imun sekunder (Bellanti, 1993; Tizard, 2000).

Hewan akan protektif terhadap VAI apabila prevalensi antibodi hewan dalam suatu populasi lebih dari 70% dan nilai GMT atau Rataan Titer Geometriknya lebih dari 2^4 unit HI (Disnak, 2004). Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa itik bali percobaan mempunyai protektifitas terhadap VAI, karena setelah vaksinasi kedua rata-rata titer antibodinya mencapai $2^{5.3}$ sampai $2^{6.0}$ unit HI (pada periode P_5). Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa titer antibodi protektif pada itik bali percobaan dicapai setelah dibooster, karena sebelum booster titer antibodinya hanya mencapai 2^2 sampai $2^{2.4}$ unit HI.

Penelitian ini dapat membuktikan bahwa itik bali memberikan respon imun yang baik terhadap vaksin AI. Titer antibodi protektif dapat dicapai dua minggu setelah vaksinasi kedua. Dalam upaya menekan peluang itik bali sebagai sumber penular virus AI vaksinasi AI dengan minimum dua kali ulangan berinterval 3 minggu dapat direkomendasikan. Tian *et al.*, (2005) juga melaporkan bahwa vaksin AI hasil reverse-genetik yang diemulsikan dalam minyak dapat menghasilkan proteksi selama 52 minggu setelah dua kali pemberian. Vaksin homolog, atau heterolog dan vaksin rekombinan aktif virus H5 juga dilaporkan memberi kekebalan pada unggas air (Qiao *et al.*, 2006). Hasil tersebut memberikan informasi yang penting untuk penerapan vaksinasi dalam pengendalian virus AI pada unggas air. Selain itu, penelitian ini juga membuktikan bahwa jika vaksin tersedia terbatas, pemberian setengah dosis dapat dilakukan dan respon imun protektif akan dapat

dicapai jika dilakukan dua kali vaksinasi. Akan tetapi, protektifitas respon imun itik bali terhadap AI perlu diteliti lebih lanjut dengan ujiantang, untuk mengetahui daya lindung terhadap gejala klinis, kematian, dan eksresi virus pada itik bali yang divaksin.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Titer antibodi itik divaksin dengan menggunakan dua kali dosis anjuran memiliki titer antibodi yang sangat nyata lebih tinggi ($p < 0,01$) daripada menggunakan satu atau setengah dosis, dan kontrol negatif. Tetapi titer antibodi yang timbul dengan menggunakan satu atau setengah dosis tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Titer antibodi protektif dapat dicapai setelah vaksinasi ulang (booster).

Saran :

Vaksinasi Avian Influenza H5N1 perlu dilakukan pada itik, karena dapat meningkatkan antibodi atau kekebalan tubuh. Dalam keadaan persediaan vaksin terbatas, maka dapat digunakan setengah dosis dari yang direkomendasikan, karena antibodi yang ditimbulkan tidak berbeda nyata dengan satu dosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lab Biomedik FKH UNUD atas fasilitas yang diberikan sehingga penelitian dapat selesai pada waktunya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander DJ. (1996). *Highly Pathogenic Avian Influenza*. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. OIE. 155-160.
- Bellanti JA. (1993). *Imunologi III*. Penerjemah A.A. Wahab. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.
- Buxton A. And Fraser G. (1977). *Animal Microbiology*. 2nd ed., Eidenburgh. Blackwell Scientific Publications.
- Cann AJ. (1993). *Principles of Molecular Virology*. 2nd ed. Eidenburgh. Blackwell Scientific Publications.
- Chen HG, Deng Z, Li G, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG and Yu K. (2004). The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. PNAS. July 13, 2004, vol. 101(28): 10452-10457.
- Dinas Peternakan (2004). *Buku Pedoman Pencegahan, Pengendalian dan Pembebasan Penyakit Influenza Unggas Ganas Menular di Propinsi Bali*. Denpasar. Tim P3AI Propinsi Bali.
- Departemen Pertanian (2005). *Buku pedoman dan Pencegahan Flu Burung (Avian Influenza) pada Peternakan Unggas skala kecil. Buku Petunjuk Mengenai Avian Influenza*. Jakarta. Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian.
- Doan C, Nguyen, Timothy M, Uyeki Samadhan Jadhao, Taronna Maines. (2005). Isolation and Characterization of Avian Influenza Viruses Including Highly Pathogenic H5N1 From Poultry in Live Bird Market in Hanoy Vietnam in 2001. *Journal of Virology*. 79 ; 4201-4212.
- Fouchier RA, Munster V, Wollensten A, Besterbroer T M, Helfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus. (2005). Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black Headed Gulls. *Jurnal Virology*. Vol 79 : 2814-2822.
- Hall C. (2004). Impact of Avian Influenza on U.S. Poultry trade Relation-2002; H5 or H7 Low Pathogenic avian Influenza. *Acad Sci*. 1026 : 47-53.
- Harder TC and Warner O. (2006). Avian Influenza. www.Influenza-report.com.
- Hassan JANM. (2005). New Serological Technique for Large Scale Surveillance of Bird Flu Virus. www.researchsea.com
- Horimoto T dan Kawaoka Y. (2005). Influenza : Lesson From Past Pandemics, Warning From Current Incidents. *Nature Reviews Microbiology*. 3 (8):591-600. www.nature.com.
- Hulse-Post DK, Sturm-Ramirez M, Humberd J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai TD, Nguyen HT, Long TSP, Naipospos H, Chen TM, Ellis Y, Guan JSM, Peiris and Webster RG. (2005). Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia, PNAS. July 26, 2005 , vol. 102 (30)": 10682-10687.

- Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y. (1980). Duck Influenza Lacking Evidence of Disease Signs and Immune Response. *Infect Immun.* 30 (2): 547-553. Kishinda N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H. (2005). Pathogenicity of H5 Influenza Viruses for Duck. www.entrez-pubmed.com.
- Laudert E, halverson D, Sivanandan V, Shaw D. (1993). Comparative Evaluation of Tissue Tropism Characterization in Turkey and Mallard Ducks After Intravenous Inoculation of Type A Influenza Viruses. *Avian Disease.* 37(3): 773-780.
- Li KS, Xu KM, Peiris JSM, Poon LLM. (2004). Characterization of H9 Subtype Influenza Viruses from the Duck in Southern China. *J. Virol.* 2003 June; 77 (12): 6988-6994.
- Mahardika IGNK, Sibang M, Suamba M, Adnyana KA, Dewi NMS, Meidiyanti KA, Paulus YA. (2004). Isolasi Virus Avian Influenza Pada Ayam Kampung Di Bali. *Jurnal Veteriner* 1:35-45.
- Qiao C, Tian G, Jiang Y, Li Y, Shi J, Yu K, Chen H. 2006. Vaccines developed for H5 highly pathogenic avian influenza in China. *Ann N Y Acad Sci.* 1081:182-92.
- Stephenson I and Zambon M. (2002). The Epidemiology of Influenza. *Occup. Med.* 5:241-247.
- 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.
- Suarez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe, Bender C, Huang J and Swayne DE. (2004). Comparison of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated From Humans and Chickens From Hong Kong. *J Virol* 72 (8) : 6678-6688.
- Tumpey TM, Rene Alvares, David E. Swayne and Suarez DL. (2005). Diagnostic Approach for Differentiating Infected from Vaccinated Poultry on The Basis of Antibodies to NS1 The Nonstructural Protein of Influenza A Virus. *Journal of Clinical Microbiology.* 43 ; 676-682.
- Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H. 2005. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology.* 341 (1):153-62.
- Tim AI FKH UNUD. (2005). Kajian Dinamika Virus Avian Influenza di Bali, Nusa Tenggara Barat dan Timur. FKH UNUD Bali.
- Tizard L. (2000). Pengantar Immunologi Veteriner, Terjemahan oleh M. Partadiredja. Airlangga University, Press. Surabaya ; 18 – 120.
- Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LE, Senne DA, Lee YJ, Mo I, Swayne DE. (2003). Evolution of a High-Pathogenicity H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated From Duck Meat. *Avian Disease.* Vol 47 (3 suppl) : 951-955
- Webster, Kawaoka Y, Bean WJ, Beard CW and Brugh M. (1985). Chemotherapy and Vaccination A Possible Strategy for The Control of Highly Virulent Influenza Virus. *Journal Of Virology,* 55 ; 173-176.
- WHO (2002). WHO Global Influenza Programme. www.who.int
- WHO (2005). Geographical spread of H5N1 avian influenza in bird – update 28 Situation assessment and implication for human health 18 Agustus 2005. www.who.int
- Widjaja H. (2005). Mendalami Uji Serologis Titer Antibodi. *Majalah Poultry Indonesia.* Ed. Okt-Nop 2005.