

## **Peneguhan Diagnosis Avian Influenza pada Ayam Petelur yang Mengalami Gejala Penurunan Produksi**

### ***Diagnosis Confirmation of Avian Influenza Virus in Layers with Symptoms of Decreased in Egg Production***

**Rina Isnawati<sup>1</sup>, Hastari Wuryastuti<sup>2</sup>, R. Wasito<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Balai Litbangkes Kelas 1 Donggala

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Email: rina.isnawati79@gmail.com

Email : prof\_wst@yahoo.com

Naskah diterima : 7 November 2018, direvisi : 11 Januari 2019, disetujui : 18 Januari 2019

#### **Abstract**

Decreasing egg production is an initial symptom of various diseases that infect commercial layer chickens. Diagnosis of diseases causing the decrease in egg production without high mortality rate is often thought to be caused by other poultry diseases because of the many similarities in manifestation between one disease and another. Avian influenza is a zoonotic infectious disease in poultry that can lead to high economic losses. This study aims to determine the contribution of avian influenza virus (AIV) infection to commercial laying hens showing symptoms of decreased production. The samples were oropharyngeal swabs of commercial laying hens which had symptoms of decreased production at productive age. Laboratory tests were carried out by histopathological examination, detection and identification of AIV with real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and isolation with the viral culture technique on fertile chicken eggs. The results showed that there was type A AIV infection based on the qRT-PCR (matrix) test, but the subtypes were not identified (H5, H7, H9). The results of the isolation of the virus in the fertile chicken eggs showed embryonic death in which all embryonic organs show hemorrhages. Allantoic fluid does not agglutinate chicken red blood cells. Histopathological features of the pathognomonic lesions in lungs infected with AIV were severe congestion and hemorrhages. Based on the results of the study, it was concluded that there was a contribution of type A AIV infection. Early diagnosis of AIV could determine more appropriate actions, including control, prevention and eradication.

**Keywords** : AIV; layer chicken; decreasing egg production; qRT-PCR; hemorrhages

#### **Abstrak**

Penurunan produksi telur merupakan gejala awal dari berbagai macam penyakit yang menginfeksi ayam petelur komersial. Diagnosa terhadap penyakit yang menyebabkan turunnya produksi telur tanpa disertai kematian yang tinggi seringkali diduga disebabkan oleh penyakit unggas lainnya karena begitu banyak persamaan manifestasi antara satu penyakit dengan penyakit lain. Penyakit *Avian Influenza* merupakan salah satu penyakit infeksius pada unggas yang bersifat zoonotik dan menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya kontribusi infeksi virus *Avian Influenza* (VAI) pada peternakan ayam petelur komersial dengan gejala penurunan produksi. Sampel yang digunakan berupa usap orofaring pada ayam layer komersial yang mengalami gejala penurunan produksi pada umur produktif. Pengujian di laboratorium dilakukan dengan pemeriksaan histopatologis, deteksi dan identifikasi VAI dengan *real time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR) dan isolasi dengan teknik kultur VAI pada telur ayam bertunas. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat infeksi VAI tipe A berdasarkan uji qRT-PCR (matrik), tetapi tidak teridentifikasi subtipe (H5, H7, H9). Hasil isolasi VAI pada TAB terjadi kematian embrio, seluruh organ embrio mengalami hemoragis. Cairan alantois tidak mengaglutinasi sel darah merah ayam. Gambaran histopatologis pada paru-paru adalah patognomonik terinfeksi VAI berupa kongesti berat dan hemoragis. Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan, bahwa terdapat kontribusi infeksi VAI tipe A. Peneguhan diagnosis lebih dini VAI akan dapat menentukan tindakan yang lebih tepat, termasuk kontrol pencegahan dan eradikasi.

**Kata kunci** : VAI; ayam Petelur; penurunan produksi telur; qRT-PCR; hemoragis

## Pendahuluan

Penyakit *avian influenza* (AI) disebabkan oleh virus yang tergolong dalam famili *Orthomyxoviridae* tipe A, virus influenza A diklasifikasikan berdasarkan antigenitas dari glikoprotein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang diekspresikan pada permukaan partikel virus. Virus *avian influenza* (VAI) mempunyai 18 subtipe HA dan 11 subtipe NA (Tong *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014; Heider *et al.*, 2015). Berdasarkan patogenitasnya, VAI 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 (Alexander, 2000; Harimoto and Kawaoka, 2001). Wabah VAI HPAI H5N1 terjadi di peternakan ayam pada delapan negara di Asia (Li *et al.*, 2004; Viseshakul *et al.*, 2004), sedangkan di Indonesia diidentifikasi pertama kali pada akhir tahun 2003 di peternakan ayam petelur komersial di beberapa daerah di pulau Jawa (Dharmayanti dkk., 2004; Wiyono dkk., 2004). Bentuk VAI yang sangat patogenik sampai saat ini ditimbulkan oleh subtipe H5 dan H7 (Wasito *et al.*, 2014).

Penyakit AI lebih banyak mendapat perhatian jika dibandingkan dengan penyakit unggas lainnya karena sifatnya yang menular dari hewan ke manusia (zoonosis) dan dapat menyebabkan kematian pada manusia (McLeod *et al.*, 2007; Ilham dan Yusdja, 2010). Oleh karena itu, penurunan kejadian AI pada manusia perlu difokuskan pada pencegahan dan kontrol infeksi unggas serta perlunya strategi pengendalian pada unggas untuk mencegah penyebaran virus dan menyebabkan wabah terutama di negara-negara berkembang (Dharmayanti *et al.*, 2005; Chon *et al.*, 2008; Zeynalova *et al.*, 2015).

Langkah awal untuk mencegah penyebaran

VAI pada unggas adalah deteksi dan identifikasi terhadap agen penyebab penyakit. Hal tersebut merupakan bagian yang penting dalam penanganan kasus penyakit unggas. Unggas dapat menunjukkan gejala klinis maupun tidak menunjukkan gejala (subklinis). Gejala-gejala seperti penurunan produksi telur, hemoragis pada permukaan serosa dan mukosa organ visceral, terutama hemoragis pada jaringan lemak koroner dan otot jantung (epikardium) dapat mengarahkan diagnosis disebabkan oleh VAI (Swayne, 2008). Namun, gejala penurunan produksi telur juga merupakan gejala yang timbul akibat infeksi selain virus AI diantaranya adalah *Newcastle diseases virus* (NDV), *egg drop syndrome* (EDS) dan *infectious bronchitis* (IB) (Swayne *et al.*, 2013). Gejala penyakit berupa penurunan produksi telur yang tidak menimbulkan kematian yang besar seringkali diabaikan oleh peternak karena tidak menimbulkan kerugian ekonomis yang berarti. Meskipun demikian keberadaan peternakan tersebut dapat membahayakan bagi unggas di daerah sekitarnya karena dapat merupakan sumber penularan infeksi VAI bagi ayam yang lainnya, dan kemungkinan juga pada manusia terutama petugas kandang yang bekerja di peternakan tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemungkinan adanya kontribusi infeksi VAI pada penurunan produksi ayam petelur dengan metode molekuler, yaitu qRT-PCR, konvensional dengan isolasi virus pada telur ayam berembrio (TAB), lesi patologis anatomis dan histopatologis.

## Materi dan Metode

### Koleksi sampel

Sampel penelitian ini berupa usap orofaring dalam BD<sup>TM</sup> universal *viral transport medium* (UVTM) diperoleh dari peternakan ayam petelur komersial di Desa Umbulharjo, Kecamatan Cangkringan, Sleman, Yogyakarta. Ayam-ayam

tersebut mengalami gejala penurunan produksi telur 5-10 % tanpa menunjukkan gejala klinis yang lain, atau ayam tampak normal (sehat). Organ paru-paru diperoleh dari 3 ekor ayam yang mengalami penurunan produksi telur.

### **Peneguhan Diagnosis**

#### ***Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain reaction***

Uji *real time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR), ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan *viral nucleic Acid Kit II* (Geneaid) yang tersedia secara komersial sesuai instruksi dengan modifikasi. Reaksi qRT-PCR dilakukan dengan menggunakan *AgPath-ID™ one Step RT-PCR Kit* (Ambion). Primer matrik, H5, H7 dan H9 (AAHL, 2012). Program qRT-PCR yang digunakan adalah sebagai berikut 45°C selama 10 menit (*reverse transcriptase*), 95°C selama 10 menit sebanyak satu kali, kemudian 95°C selama 15 detik (denaturasi), dilanjutkan *annealing* dan ekstensi 60°C selama 45 detik sebanyak 45 kali.

#### **Isolasi virus pada telur ayam bertunas**

Uji isolasi virus pada telur ayam bertunas (TAB) digunakan sampel usap orofaring, dibuat suspensi dengan menambahkan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,0-7,4, dan antibiotik. Suspensi diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1-2 jam, selanjutnya diinokulasikan pada telur ayam berembrio *spesific pathogen free* (SPF) umur 9-11 hari kemudian telur diinkubasikan pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam sampai hari ke-4. Pada hari ke-4 semua telur dikeluarkan dari inkubator dan disimpan pada suhu 4°C, kemudian virus dipanen dengan cara mengambil cairan korioalantois (WHO, 2011; OIE, 2015).

#### **Pembuatan preparat histopatologis**

Organ paru-paru difiksasi dengan larutan formalin bufer netral 24 jam kemudian di potong kecil

3x3x3 mm diletakkan dalam *embedding cassette* dan dimasukkan ke dalam mesin *tissue processor* untuk dilakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai 70% sampai absolut, kemudian diblok parafin. Untuk pewarnaan dengan hematoksilin-eosin (HE), blok parafin paru-paru dipotong dengan mikrotom ketebalan 3-5µm dideparafinisasi dengan xilen 3x masing-masing 5 menit, etanol dengan konsentrasi menurun (absolut dan 95% masing-masing 5 menit) kemudian dicuci dengan aquades. Langkah selanjutnya berturut-turut dicelupkan ke dalam harris-hematoksilin 20 menit, dicuci aquades, dicelup *acid alcohol* 2-3 kali celupan, dicuci aquades 1 menit dan 15 menit, dicelupkan ke dalam larutan eosin 2 menit, dimasukkan ke dalam etanol absolut 2x masing-masing 3 menit, dicuci xilen 2x, masing-masing 5 menit. Selanjutnya, sediaan histopatologis paru-paru tersebut diberi medium perekat gliserol dan ditutup dengan gelas penutup untuk diamati di bawah mikroskop. Sediaan paru-paru yang telah diwarnai dengan pewarna HE diamati dengan mikroskop untuk pengamatan lesi histopatologis.

#### **Analisis Data**

Data hasil qRT-PCR dan preparat histopatologis paru-paru dianalisis secara deskriptif.

#### **Hasil dan Pembahasan**

Sampel usap orofaring diperoleh dari peternakan ayam petelur yang mengalami penurunan produksi sebesar 5-10%, selanjutnya dilakukan *screening* untuk menentukan tipe dari virus AI dengan cara melakukan amplifikasi terhadap gen matriks (MA) (AAHL, 2012). Amplifikasi dilakukan dengan metode *one step real time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Berdasarkan 12 sampel *pooling* (4-5 ekor dalam 1 tabung) yang didapatkan (L1-L12) diperoleh nilai *cycle threshold* (Ct) sampel (L11) sebesar 36,52 hasil tersebut berdasarkan

pedoman pembacaan dari AAHL Geelong Australia (<37) (AAHL, 2006) mengindikasikan positif *virus avian influenza* (VAI) tipe A. Nilai *Ct value* diperoleh dari nilai yang dihasilkan perpotongan antara garis *threshold* dengan *cycle*. *Threshold* yang digunakan sebagai penentuan positif atau negatif mempunyai titik potong setara dengan  $10^2$  *copy/μl* (Payungporn *et al.*, 2006). Deteksi VAI menggunakan RT-PCR terhadap gen matrik (MA) bertujuan untuk mendeteksi keberadaan virus influenza A. Gen MA sangat konsisten terhadap semua subtipe VAI dari beberapa negara di dunia, sehingga gen tersebut ideal untuk mendeteksi awal adanya VAI (Spackman *et al.*, 2002). Pada penelitian ini, nilai *Ct* yang tinggi (36,52) mengindikasikan bahwa titer virus dalam jumlah relatif kecil. Sedangkan, tidak terdeteksinya virus AI pada sampel lainnya kemungkinan yang terjadi adalah karena konsentrasi atau jumlah RNA virus belum mencukupi untuk dideteksi meskipun dengan metode yang paling sensitif seperti qRT-PCR. Pada pemeriksaan selanjutnya sampel tersebut tidak teridentifikasi subtipe H5, H7, H9 dengan primer AAHL. Hasil diagnosis lebih akurat dan untuk menghindari hasil negatif semu akibat ketidakcocokan primer dengan virus lapang, sebaiknya diagnosis subtipe virus AI digunakan lebih dari satu pasang primer (Dharmayanti *et al.* 2016). Tidak terdeteksinya VAI subtipe H5 kemungkinan disebabkan VAI yang bersirkulasi sepanjang tahun 2012 sampai dengan sekarang mengalami mutasi yang bertepatan dengan lokasi rancangan primer sehingga primer tidak cocok dalam proses amplifikasi VAI yang bersirkulasi di lapangan pada saat ini (Dharmayanti *et al.*, 2016; Hewajuli *et al.*, 2017)

Pengumpulan sampel usap secara *pooling* (4-5 sampel dalam 1 tabung) tidak berpengaruh secara signifikan terhadap sensitivitas qRT-PCR jika dibandingkan dengan sampel individu dalam jumlah

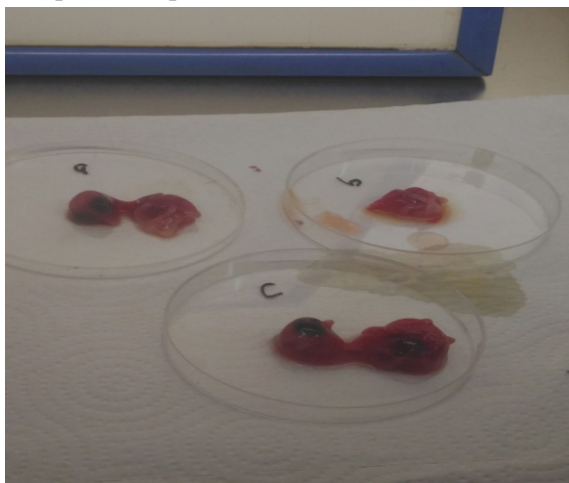
yang sama. Pengumpulan sampel dalam satu kelompok (*pooling*) merupakan metode yang efektif untuk mengurangi jumlah uji yang akan dilakukan dalam peneguhan diagnosis dan untuk biosurveilans (Arnold *et al.*, 2013). Meskipun demikian, pemilihan jenis sampel diduga dapat mempengaruhi tingkat deteksi VAI. Sekresi VAI melalui orofaring lebih banyak jika dibandingkan dengan sekresi melalui kloaka (Swayne, 2005; Jeong *et al.*, 2009). Pada penelitian yang berbeda, diperoleh hasil pengumpulan sampel dalam satu kelompok (*pooling*) antara usap orofaring dan usap kloaka yang digabungkan di lapangan memiliki tingkat deteksi tertinggi (4,3 %), sedangkan usap kloaka 4,0% dan usap orofaring 0,4% (Ip *et al.*, 2012). Dengan demikian, pemilihan jenis sampel yang tepat perlu dipertimbangkan untuk menentukan keberhasilan deteksi yang lebih cepat, tepat dan akurat.

Pada penelitian ini proses *screening* dilakukan dengan uji qRT-PCR terhadap gen matrik (MA) menggunakan sampel langsung tanpa inokulasi pada telur ayam bertunas (TAB). Hal tersebut menurut Haryanto dkk. (2012) menjadi kurang sensitif mendeteksi virus AI dengan titer rendah. Oleh karena itu, perlu dilakukan kultur virus pada TAB, sampel positif terhadap gen MA pada penelitian ini (L11) kemudian diinokulasikan pada TAB 9-11 hari, namun sampel tidak menunjukkan aglutinasi dengan uji HA cepat, hal tersebut seperti pada penelitian Muflihanah dkk. (2017). Menurut Stevens *et al.* (2006) protein HA yang terdapat pada virus influenza akan melekat pada reseptor eritrosit pada berbagai jenis unggas dan mamalia, sehingga aktivitas ini digunakan sebagai dasar dalam mendeteksi keberadaan virus AI dalam cairan korioalantois (Helmi dkk., 2016). Kemungkinan tidak terjadi aglutinasi sel darah merah disebabkan VAI yang berada dalam sampel usap orofaring tersebut tidak aktif ataupun dalam

konsentrasi sedikit sehingga tidak berhasil untuk dipropagasi (Hewajuli dkk., 2017). Virus sudah tidak aktif lagi kemungkinan terjadi selama transportasi dari lapangan ke laboratorium atau selama masa penyimpanan sampai dilakukan isolasi virus. Isolasi virus hanya dapat mendeteksi virus hidup, sedangkan VAI yang diinaktivasi selama transportasi atau yang mungkin ditemukan pada sampel dari lingkungan, hanya dapat dideteksi atau memberikan hasil positif dengan metode amplifikasi RT-PCR. Kemungkinan lain adalah VAI belum siap beradaptasi untuk tumbuh dan belum mencapai titer virus tersebut dapat ditumbuhkan pada TAB. Hal tersebut dapat menjelaskan mengapa sampel positif pada

pemeriksaan qRT-PCR tetapi negatif ketika di isolasi pada TAB seperti pada penelitian Saberfar *et al.* (2007) dan Haryanto dkk. (2012).

Hasil inokulasi tersebut menunjukkan kematian pada embrio ayam rata-rata 24-48 jam setelah inokulasi dan seluruh organ menunjukkan perdarahan (Gambar 1). Agen penyakit (VAI) dapat menyebabkan kematian embrio apabila diinokulasikan pada TAB, seperti pada penelitian Wiyono dkk. (2004) kematian embrio terjadi 18-24 jam setelah inokulasi sedangkan penelitian Hagag *et al.* (2015) kematian terjadi dalam waktu 48 jam setelah diinokulasi, dan menunjukkan adanya kongesti dan hemoragis pada embrio.



Gambar 1. Lesi embrio ayam yang terinfeksi VAI (L-11), secara makroskopis terlihat mengalami perdarahan pada seluruh organ embrio.

Isolasi VAI pada TAB dianggap sebagai uji yang sensitif namun tidak spesifik, karena uji tersebut mampu menumbuhkan berbagai macam agen infeksi lain (bakteri) sehingga menyebabkan tingkat keberhasilan uji tersebut berkurang (Moresco, 2010). Namun menurut OIE (2015) isolasi virus pada TAB tetap digunakan sebagai *gold standart* untuk diagnosis VAI.

Ayam petelur yang mengalami penurunan produksi 5-10% dan tidak menunjukkan gejala klinis lain dikategorikan terinfeksi persisten (subklinis). Infeksi VAI subklinis terjadi pada peternakan unggas

yang menerapkan vaksinasi secara rutin. Hal tersebut pada penelitian ini dibuktikan dengan pemeriksaan titer antibodi yang protektif rata-rata  $9 \text{ Log } 2 (2^9)$ . Titer antibodi yang protektif terhadap penyakit AI bernilai lebih dari  $2^4 (\geq 16)$  (Angraini dkk., 2014). Kemungkinan yang terjadi jika ayam memiliki kekebalan protektif yang maksimal, infeksi VAI tidak menimbulkan gejala klinis (subklinis) dan ayam tidak mengeksresikan virus dalam jumlah yang dapat dideteksi dengan teknik uji yang sensitif misalnya PCR ataupun isolasi virus (Capua *et al.*, 2003; Tarigan, 2015). Dengan demikian, pada penelitian ini,

kekebalan maksimal yang dimiliki unggas tersebut cukup untuk melindungi terhadap infeksi VAI, tetapi VAI masih tetap mengalami replikasi, sehingga keberadaannya sangat membahayakan bagi unggas di daerah sekitar karena dapat merupakan sumber penularan bagi unggas lainnya yang peka (Tarigan, 2015). Infeksi VAI subklinis pada peternakan ayam komersial dapat dideteksi dengan RT-PCR, tetapi kurang praktis karena sampel yang diperiksa dalam jumlah banyak. Untuk menetapkan suatu flock unggas terinfeksi VAI diperlukan jumlah sampel yang sangat banyak karena unggas tampak normal (sehat) atau tidak menunjukkan gejala klinis (Indriani dkk., 2011).

Pada penelitian ini, nekropsi dilakukan terhadap 3 ekor ayam yang mengalami penurunan produksi telur. Hasil pemeriksaan lesi patologis anatomis dilakukan melalui pemeriksaan terhadap paru-paru yang merupakan organ target VAI (Wasito

*et al.*, 2017), ditemukan perubahan *petechial hemorrhages* (Gambar 2). Pada organ-organ yang lain tidak ditemukan perubahan secara signifikan kecuali adanya hambatan perkembangan *ovarium* dan *oviduct*. Pemeriksaan histopatologis pada paru-paru, terlihat lesi berupa kongesti berat multifokal dengan ukuran bervariasi pada pembuluh darah dan parabronki, serta adanya hemoragi (Gambar 3). Mekanisme terjadinya kongesti pada paru-paru yang terinfeksi VAI diduga merupakan upaya dari tubuh untuk memobilisasi sel-sel darah dengan peningkatan tekanan vaskular (Setiyono dan Bermawie, 2014), sehingga terjadi akumulasi eritrosit dalam darah yang diakibatkan adanya gangguan sirkulasi pada pembuluh darah. Selanjutnya darah keluar dari pembuluh darah (hemoragi) akibat kerusakan dinding pembuluh darah (Kumar *et al.*, 2003).



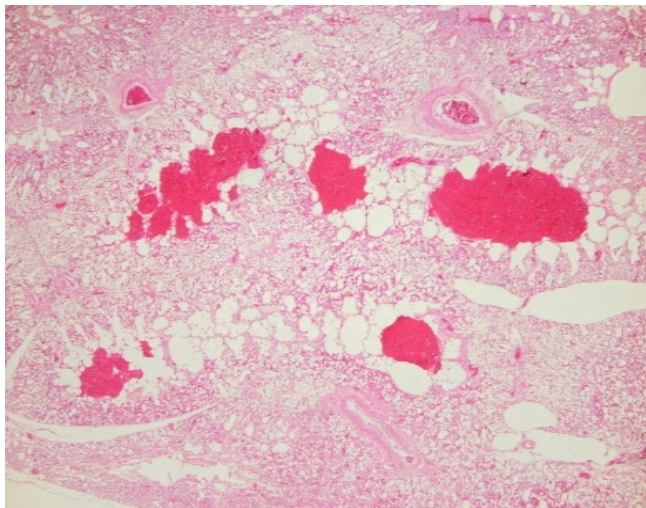
Gambar 2. Paru-paru ayam petelur yang terinfeksi VAI dengan lesi patologis anatomis berupa *petechial hemorrhages*

Peneguhan diagnosis infeksi VAI berdasarkan gejala klinis pada unggas yang mengalami penurunan produksi seringkali terjadi proporsi diagnosis positif dan negatif palsu, karena memiliki kemiripan dengan penyakit unggas yang lainnya, seperti *Newcastle disease* (ND) (Wasito *et al.*, 2018).

Bahkan, organ sasaran VAI banyak memiliki kesamaan dengan ND. Berdasarkan perubahan histopatologis yang konsisten pada paru-paru menunjukkan, bahwa paru-paru merupakan organ target dari VAI (Wasito *et al.*, 2017). Pemeriksaan histopatologis sebaiknya dilanjutkan dengan uji yang

lain untuk mendeteksi keberadaan VAI misalnya qRT-PCR dan imunohistokimia (Wasito *et al.*, 2014; Wasito *et al.*, 2018). Namun, untuk wilayah atau laboratorium yang mempunyai keterbatasan sarana infrastrukturnal

modern, pemeriksaan lesi patologis anatomis dan histopatologis tersebut akan sangat membantu peneguhan diagnosa VAI, karena uji tersebut relatif cepat dan biaya terjangkau (Webster & Hulse, 2004).



Gambar 3. Gambaran histopatologis paru-paru ayam petelur yang terinfeksi VAI tipe A. Terlihat kongesti berat multifokal ukuran bervariasi dan hemoragis berat pada paru-paru (perbesaran 1000x).

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa VAI tipe A berkontribusi terhadap penurunan produksi telur ayam petelur pada peternakan komersial meskipun dalam konsentrasi relatif kecil berdasarkan uji qRT-PCR. Keberhasilan isolasi VAI pada TAB dipengaruhi banyak faktor diantaranya titer virus dalam keadaan hidup. Lesi patologis anatomis dan histopatologis berupa kongesti berat dan hemoragi pada paru-paru ayam petelur dengan gejala penurunan produksi dapat digunakan sebagai pendukung peneguhan diagnosa cepat pada kasus-kasus VAI lapangan.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Badan PPSDMK Kemenkes RI dan Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi Dan Pendidikan Tinggi dan

Universitas Gajah Mada. Kepala Balai Besar Veteriner Wates dan seluruh staf yang terlibat dalam pengujian sampel di laboratorium, teknisi di laboratorium patologi Fakultas Kedokteran Hewan dalam pembuatan sediaan histopatologis.

### Daftar Pustaka

- AAHL. (2012). Avian influenza. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures. Australia. 1-32.
- AAHL. (2006). In House Australian Animal Health Laboratory. Geelong, Australia.
- Alexander, D.J., (2000). A Review of Avian influenza in Different Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74: 3-13.
- Anggraini, G.A., Santosa, P.E., Suharyati, S. (2014). Profil titer antibodi *Avian Influenza* (AI) dan Newcastle Disease (ND) pada itik pejantan di kecamatan Candirejo Kabupaten Pringsewu. *J. Ilmiah Pet. Terpadu.* 2: 101-106.
- Arnold, M.E., Slomka, M.J., Coward, V.J., Mahmood, S.J., Raleigh, P.J., Brown, I.H. (2013). Evaluation of the pooling of swabs for the real-time PCR detection of low titre shedding of low pathogenicity *Avian influenza* in turkeys. *Epidemiol. infect.* 141: 1286-1297.

- Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., Rodriguez, J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating infected from vaccinated animals) Strategy Using a Vaccine Containing a Heterologous Neuraminidase for the Control of Avian influenza. *J. Avian Pathol.* 32: 47-55.
- Chon, H., Choi, B., Jeong, G., Mo, I., (2008). Evaluation System for an Experimental Study of Low-pathogenic Avian influenza Virus (H9N2) Infection in Specific Pathogen Free Chickens using Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P. *J. Avian Pathol.* 37: 593–597.
- Dharmayanti, N.L.P.I., Damayanti, R., Wiyono, A., Indriani, R., dan Darminto. (2004). Identifikasi virus *Avian Influenza* isolat Indonesia dengan Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *J.I.T.V.* 9: 136–142.
- Dharmayanti, N.L.P. I., Damayanti, R., Indriani, R., Wiyono, A dan Adjid, R.M.A., (2005). Karakterisasi Molekuler Virus Avian Influenza Isolat Indonesia. *J.I.T.V.* 10: 127–133.
- Dharmayanti, N.L.P.I. dan Darminto. (2009). Mutasi virus AI di Indonesia: Antigenic drift protein Hemagglutinin (HA) virus influenza H5N1 tahun 2003-2006. *Media Kedokteran Hewan.* 25(1): 1-8).
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA. (2016). Pengembangan sejumlah primer untuk reverse transcriptase polymerase chain reaction guna melacak virus flu burung di Indonesia. *J. Vet.* 17: 183-196
- Hagag, I.T., Mansour, S.M.G., Zhang, Z., Ali, A.A. H.J., Ismael, E.B., Salama, A.A., Cardona, C.J., Collins, J., Xing, Z. (2015). Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 in Naturally Infected Poultry in Egypt. *Plos one.* 1-15
- Haryanto, A., Andinita, D., Irianingsih, S.R., Yudianingtyas, D.W. (2012). Diagnosa cepat virus *Avian influenza* tipe A subtype H5 dari spesimen lapangan dengan metode one step simplex RT-PCR. *J.Ked. Hewan.* 6: 6-10.
- Harimoto, T and Kawaoka, Y. (2001). Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- Heider, A., Mochalova, L., Harder, T., Tuzikov, A., Bovin, N., Wolff, A., Matrosovich, M., Schweiger, B. (2015). Alterations in Hemagglutinin Receptor-binding Specificity Accompany the Emergence of Highly Pathogenic Avian influenza Viruses. *J. Virol.* 89: 5395-405.
- Helmi, T.Z., Tabbu, C.R., Artama, W.T., Haryanto, A., Isa, M. (2016). Isolasi dan identifikasi virus *Avian influenza* pada berbagai spesies unggas secara serologis dan molekuler. *J.Ked. Hewan.* 10: 86-90.
- Hewajuli, D.A., Dharmayanti, N.L.P.I., Wibawan, I.W.T. (2017). Deteksi, isolasi dan identifikasi Avian influenza subtype H5N1 pada unggas di Pulau Jawa, Indonesia Tahun 2016. *J. Vet.* 18: 496-509.
- Indriani R, Dharmayanti, N.L.P.I, Adjid, R.M.A. (2011). Tingkat proteksi beberapa vaksin *Avian Influenza* unggas terhadap infeksi virus isolat lapang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008. *J.I.T.V.* 16: 153-161.
- Ilham, N. dan Yusdja, Y. (2010). Dampak flu burung terhadap produksi unggas dan kontribusi usaha unggas terhadap pendapatan peternakan skala kecil di Indonesia. *J. Agro. Ekonomi.* 28 : 39-68.
- Ip, H.S., Dusek, R.J., Heisey, D.M. (2012). The Effect of swab sample choice on the detection of Avian influenza in apparently healthy wild ducks. *Avian. Dis.* 56: 114-119.
- Jeong, O.M., Kim, M.C., Kang, H.M., Kim, H.R., Joh, S.J., Kwon, J.H., Lee, Y.J. (2009). Experimental infection of chickens, ducks, and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *J Vet Sci.* 10: 53-60.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (2003). Pathology basic disease 7<sup>th</sup> Ed. Elsevier, Missouri, USA.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J.D., Xu, K.M., Duan, L., Ronohardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepongastie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L.M., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S.M. (2004). Genesis of Highly Pathogenic and Potentially Pandemic H5N1



- Influenza Virus in Eastern Asia. *Nature*. 340: 209-213.
- McLeod, A., Morgan, N., Parakash, A. and Hinrichs, J. (2007). Economic and Social Impacts of Avian Influenza. FAO, Emergency Centre for Transboundary Animal Diseases Operations (ECTAD). Retrieved November 1, 2018, from <http://www.fao.org/avianflu/documents/Economic-and-social-impacts-of-avian-influenza-Geneva.pdf>
- Moresco, K.A. (2010). Evaluation of avian embryos and cell culture for isolation and propagation of low pathogenicity avian influenza viruses. *Thesis*, University of Georgia.
- Muflihanah., Andesfha, E., Wibawa, H., Zenal, F.C., Hendrawati, F., Siswani., Wahyuni., Kartini, D., Rahayuningtyas, I., Hadi, S., Mukartini, S., Poermadjaja, B., Tjatur Rasa, F.S. (2017). Kasus Pertama *Low Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H9N2 pada Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan Indonesia. *Diagnosa Veteriner*. 16: 1-13.
- OIE. (2015). Avian influenza, Chapter 2.3.4 terrestrial manual 2015. Retrieved October 28, 2018, from [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/2.03.04_AI.pdf).
- Payungporn, S., Chutinimitkul, S., Chaisingh, A., Damrongwantanapokin, S., Buranathai, C., Amonsri, A., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. (2006). Single step multiplex real time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J. Virol. Meth.* 131: 143-147.
- Saberfar, E., Forghani-Fard, M.M., Mosavi, M. (2007). Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. *I.B.J.* 11: 69-74
- Setiyono, A dan Bermawie, N. (2014). Gambaran histopatologis dan klinis ayam herbal setelah diuji tantang dengan virus Avian influenza H5N1. *J. Ked. Hewan*. 8: 30-34.
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L., (2002). Development of a real time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtype. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3256-3260.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., Wilson, I.A. (2006). Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 312: 404-410.
- Swayne, D.E and Patin, M., (2008). Pathobiology of *Avian influenza* virus infection in birds and mammals, dalam Swayne, D.E. (Ed) *Avian influenza*. Blackwell Publishing. Iowa. 87-88.
- Swayne, D.E., Suarez, D.L., Sims, L.D. (2013). Influenza. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nair, V., Nolan, L.K., Suarez, D.L. (Eds.), *Diseases of Poultry*, 13th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. 181–218.
- Tarigan, S., (2015). Infeksi Subklinis *Avian Influenza* H5N1 pada Peternakan Ayam yang Menerapkan Program Vaksinasi. *Wartazoa*. 25: 075-084.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Jing, Z., Bourgeois, M., Hua, Y., Chen, X., Sergio, R., Gomes, J., Chen, L.M., Johnson, A., Tao, Y., Drefus, C., Yu, W., Bride, R.M., Carney, P.J., Gilbert, A.T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C.T., Paulson, J.C., Steven, J., Rupprecht, C.E., Holmes, E.C., Wilson, I.A and Donis, R.O. (2013). New World Bats Harbor diverse influenza A viruses. *Plos Pathog.* 9: e1003657.
- Tong, S., Li, Y., Rivailler, P., Conrardy, C., Castillo, D.A., Chen, L.M., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., Turmelle, A.S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M.R., Tang, K., Rowe, L.A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Linblade, K.A., Cox, N.J., Anderson L.J., Rupprecht, C.E., and Donis, R.O. (2012). A Distinct Lineage of Influenza A Virus from Bats. *Proceed. Nat. Acad of Sci.* 109: 4269-4274.
- Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsri, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. (2004). The Genome Sequence Analysis of H5N1 A Virus Isolated from the Outbreak among Poultry Populations in Thailand. *Virology*. 328: 169-176.
- Wasito, R., Wuryastuti, H., dan Sutrisno, B. (2018). Detection of Mixed Infection of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses in Chickens in Indonesia by Immunopathologic

- Immunohistochemistry Double Staining. Pak Vet J. Retrieved November 1, 2018, from <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2018.078>.
- Wasito,R., Wuryastuti, H., dan Sutrisno, B. (2017). Pengembangan dan aplikasi *double staining*: Diagnosis dini, cepat dan akurat infeksi campuran kasus lapangan avian influenza virus dan Newcastle disease virus pada unggas. Laporan akhir. Kegiatan penelitian unggulan perguruan tinggi. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.
- Wasito,R., Wuryastuti, H., Tjahyowati, G., Irianingsih, S.H., Tyasasmaya,T., (2014). Detection and Differentiation of Pathogenic H5 and H7 Influenza A Virus Subtypes in Indonesia Poultry by Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Net. J.* 2: 27-31.
- Webster, R.G. and Hulse, D.J., (2004). Microbial adaptation and change: Avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 23: 453-465.
- WHO. (2011). WHO global influenza surveillance network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Retrieved Sept 13, 2018, from [https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/manual\\_diagnosis\\_surveillance\\_influenza/en/](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/)
- Wiyono, A., Indriani, R., Dharmayanti, N.L.P.I., Damayanti, R. dan Darminto. (2004). Isolasi dan Karakterisasi Virus *Highly Pathogenic* Subtipe H5 dari Ayam asal Wabah di Indonesia. *J.I.T.V.* 9: 61-71.
- Wu,Y., Tefsen,B., Shi Y, Gao,G.F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 22: 183-91.
- Zeynalova, S., Guliyev, F., Vatani, M., Abbasov, B. (2015). Biosurveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in thr Barda region of Azerbaijan using real time RT-PCR and hemagglutinin inhibition. *Frontiers in Microbiol.* 6: 1-10