

DETEKSI VIRUS *Avian influenza* PADA AYAM PEDAGING KOMERSIAL YANG DI SUPLEMENTASI *WATER ADDITIVE*

¹Rina Isnawati, ²I Putu Cahyadi Putra, ³Rina Dwi Susiani,
⁴Hastari Wuryastuti, ⁴R. Wasito

¹Balai Litbang Kesehatan Donggala, Jl. Masjid No.58, Labuan, Donggala, Sulawesi Tengah

²Pascasarjana Program Studi Sain Veteriner Universitas Gajah Mada Jl.Fauna No.2 Karangmalang, Yogyakarta

³Pascasarjana Program Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada, Jl. Teknik Utara, Sleman, Yogyakarta

⁴Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada, Jl.Fauna No.2 Karangmalang, Yogyakarta

Email:rina.isnawati79@gmail.com

Abstrak

Penyakit *Avian influenza* (AI) merupakan penyakit infeksius pada unggas yang disebabkan oleh *avian influenza virus* (AIV) telah mewabah dan menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup besar pada industri perunggasan di Indonesia serta bersifat zoonosis. Penurunan kejadian AI pada manusia perlu difokuskan pada pencegahan dan kontrol infeksi pada unggas. Tujuan penelitian ini adalah deteksi dini dengan pendekatan molekuler dan imunologis untuk mencegah penyebaran AIV dengan menjaga kesehatan ayam pedaging komersial yang di suplementasi *water additive*. Lima puluh lima ekor DOC ayam pedaging *strain Cobb* digunakan sebagai hewan coba selama 35 hari. Lima ekor *day old chick* (DOC) dipilih secara acak dan ditekrosi untuk diambil organ paru-paru. Lima puluh ekor ayam yang tersisa di bagi menjadi dua kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P). Setiap minggunya (minggu ke-1 sampai ke-5) sebanyak lima ekor ayam pada masing-masing kelompok di pilih secara acak untuk ditekrosi diambil organ paru-paru. Deteksi AIV dilakukan dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) terhadap gen matrix (MA) dan hemagglutinin (H5, H7, H9), sedangkan deteksi imunologis imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK-SB) diamati dengan mikroskop. Hasil penelitian ini adalah sampel paru-paru (P) minggu pertama dan kedua terdeteksi MA, namun tidak terdeteksi H5, H7, H9. Hasil IHK-SB pada kelompok K positif VAI, sedangkan pada kelompok P positif VAI pada minggu pertama dan kedua, minggu ketiga negatif. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat infeksi alami VAI tipe A, *Water additive* yang tersedia secara komersial dapat mencegah infeksi alami VAI pada minggu ketiga setelah pemberian.

Kata Kunci: AIV, RT-PCR, IHK-SB, ayam pedaging, *water additive*

1. PENDAHULUAN

Virus *avian influenza* (AI) terbagi atas tiga tipe, yaitu tipe A, B, dan C, berdasarkan atas perbedaan antigen pada protein inti (*nucleoprotein*) dan protein matriks. Virus influenza A dapat menginfeksi berbagai spesies unggas, mamalia, dan manusia, dan merupakan patogen utama yang berperan dalam pandemi influenza di seluruh dunia. Virus influenza A dikelompokkan berdasarkan pada dua antigen permukaan virus, yaitu protein hemagglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA), yang sampai saat ini telah ditemukan 18 HA (H1-H11) dan 11 NA (N1-N11) (Tong *et al.*, 2013). Diantara subtipe virus influenza A, subtipe H5, H7 dan kadang-kadang H9 telah diketahui mempunyai patogenisitas yang tinggi (HPAI) (Alexander, 2000., Tumpey *et al.*, 2002; Focier *et al.*, 2005; Asmara, 2006; Pattnaik *et al.*, 2006). Bentuk AIV yang sangat patogen sampai saat ini ditimbulkan oleh subtipe H5 dan H7 (Wasito *et al.*, 2014). AIV *highly pathogenic* (HPAI) menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi dan sering menimbulkan wabah, sedangkan semua subtipe virus dikategorikan sebagai *low pathogenic* (LPAI) menyebabkan gejala ringan atau tidak memiliki gejala pada unggas yang terinfeksi (Alexander, 2000; Harimoto and Kawaoka, 2001). Wabah AIV 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 *et al.*, 2004; Wiyono *et al.*, 2004).

Salah satu usaha pencegahan dan penanggulangan penyebaran AIV adalah dengan pemberian senyawa biologis berupa *feed additive* yang mampu mengaktifkan jalur utama dalam sistem kekebalan tubuh untuk merangsang sistem imun (Awaad *et al.*, 2010). Kemampuan fungsional *feed additive* yang umumnya dimanfaatkan pada unggas meliputi,

antimikroba, antioksidan, imunomodulator, agen pengatur pH dan enzim (Hashemi and Davoodi, 2010). Penelitian mengenai potensi imunomodulator dan antiviral yang telah dilakukan adalah penggunaan probiotik sebagai antiviral sub tipe H9N2 pada ayam pedaging (Ghafoor *et al.*, 2005). Beberapa penelitian telah melaporkan khasiat bakteri asam laktat (BAL) yang berfungsi sebagai *immunomodulator* dan *natural antiviral* diantaranya adalah *Lactobacillus plantarum* yang sama efektifnya dengan Oseltamivir untuk menetralkan virus H9N2 dan mengurangi jumlah ekskresi virus pada trakhea ayam yang terinfeksi secara eksperimental (Chon *et al.*, 2008). Kebanyakan BAL dihasilkan oleh fermentasi makanan diantaranya adalah Kimchi. Seo *et al.* (2012) membuktikan bahwa BAL yang diisolasi dari kimchi (*Leuconostoc mesenteroides* YML003) memiliki aktivitas anti influenza virus-H9N2 in vitro menggunakan kultur sel (*cell line*) dan in vivo menggunakan ayam *spesies pathogen free* (SPF).

Berdasarkan kajian dan manfaat yang terkandung dalam kimchi, telah dikembangkan produk komersial kimchi yaitu suplementasi *water additive* (KimchiStoc[®]). KimchiStoc[®] mengandung metabolit dari bakteri asam laktat (BAL) yang memiliki aktivitas anti bakteri (pengganti AGPs) dan anti virus yang sudah dipatenkan di Korea. Produk tersebut dikembangkan sebagai upaya untuk mencegah penyebaran AIV dengan menjaga kesehatan ayam pedaging komersial. Sebagian besar kasus infeksi AIV patogen dikaitkan dengan kontak langsung atau tidak langsung dengan unggas hidup atau mati yang terinfeksi sehingga mengontrol penyakit pada sumber hewan sangat penting untuk mengurangi risiko penularan pada manusia (WHO, 2016) serta didukung adanya metode deteksi yang tepat menggunakan *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang memiliki keunggulan jika dibandingkan dengan metode yang lain. Metode RT-PCR dapat digunakan sebagai metode diagnosis cepat untuk mendeteksi dan menentukan sub tipe virus AI secara spesifik (Payungporn *et al.*, 2004). Sejumlah kecil RNA AIV dapat dideteksi bahkan ketika virus sudah terinaktivasi dengan menggunakan teknik RT-PCR. Keunggulan yang lainnya yaitu cepat, akurat dan memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi (Lee *et al.*, 2001; Wuryastuti and Wasito, 2013).

Monitoring pada ayam yang terinfeksi VAI dapat dilakukan dengan metode imunopatologis imunohistokimia (IHK). Imunopatologis imunohistokimia merupakan metode uji kualitatif yang sangat akurat, efektif, mudah dilakukan dan biaya terjangkau, serta ramah lingkungan untuk mendeteksi antigen VAI pada unggas (Chamnanpood *et al.*, 2011). Imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK-SB) mempunyai sensitifitas dan spesififikasi yang tinggi dalam mendeteksi keberadaan patogen VAI (Wasito, 1991; Howarth *et al.*, 2006). Metode IHK dapat menentukan keberadaan VAI pada organ atau jaringan. Deteksi VAI pada DOC dengan IHK terbukti positif 65,8%, sedangkan metode *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) hanya positif 7,5% pada sampel paru-paru, trakea, usus, hati dan ginjal (Setyawati, 2010). Virus AI berkembang di saluran pernapasan karena kecenderungan bereplikasi di sel-sel epitelia bersilia (Chaves *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi kemungkinan adanya infeksi alami virus AI pada ayam pedaging komersial yang disuplementasi *water additive* secara molekuler dan imunologi.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di peternakan ayam komersial bertempat di Kecamatan Pandowoharjo, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Pengujian deteksi virus AI pada organ paru-paru dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta. Uji Imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada. Penelitian ini telah memperoleh *Ethical clearance* No.00083/04/LPPT/VII/2017.

2.2. Rancangan Penelitian

Ayam pedaging *strain Cobb* sebanyak 55 ekor digunakan dalam penelitian eksperimental ini. Lima ekor DOC pada hari ke-1 diambil secara acak kemudian dinekropsi untuk diambil organ paru-parunya. Lima puluh ekor ayam sisanya dibagi secara acak menjadi dua perlakuan yaitu kelompok pertama (K1) adalah kelompok kontrol tanpa suplementasi *water additive*. Kelompok kedua (P) adalah kelompok perlakuan dengan suplementasi *water additive* 0,2% (2 gram/1000 ml). Waktu pemberian suplementasi adalah 5 hari berturut – turut per minggu selama masa pemeliharaan 35 hari. Sampel yang digunakan untuk RT PCR adalah organ paru-paru yang dimasukkan dalam ependorf *RNAse* free. Sampel yang digunakan untuk uji IHK adalah berupa organ paru-paru, difiksasi formalin dan digunakan untuk uji imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* untuk melacak VAI.

2.3. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah air minum, pakan komersial ayam pedaging dan *water additive* kimchi komersial (KimchiStoc[®]). Pakan terdiri dari dua tipe pakan, yaitu pakan masa *brooder* dan pasca *brooder*. *Water additive* KimchiStoc[®] mengandung metabolit hasil fermentasi BAL yang berasal dari kimchi Korea. *Water additive* yang digunakan diberikan dengan cara mencampurkan melalui air minum dengan dosis 4 ml *water additive* per dua liter air (0,2 %), selama 5 hari secara berturut-turut per minggu, diberikan selama 35 hari masa pemeliharaan. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi RNA virus adalah *Viral Nucleic Acid Kit II* (Geneaid[™]). Untuk uji RTPCR menggunakan *SuperScript[™] III One-Step RT-PCR* dengan Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen[™]). Bahan untuk uji imunohistokimia adalah xilen, etanol, metanol, pewarna streptavidin biotin, antibodi primer, Hemaxtocilin eosin.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction

Hasil pengujian RT-PCR terhadap gen MA virus AI dari sampel (*pooling*) paru-paru DOC, ayam pedaging kontrol tanpa perlakuan (K) dan dengan perlakuan *water additive* kimchi 0,2% (P) disajikan pada Gambar 1, hasil tersebut menunjukkan bahwa pada sampel DOC dan K tidak terdeteksi gen MA virus AI, namun terdeteksi pada minggu pertama dan kedua pada P. Virus AI yang terdeteksi positif memiliki ukuran ampikon 220 bp. Pada pemeriksaan selanjutnya tidak teridentifikasi subtipe H5, H7 dan H9. Hal tersebut seperti penelitian Isnawati dkk, 2019 tidak teridentifikasinya subtipe virus AI disebabkan adanya mutasi yang bertepatan dengan lokasi rancangan primer sehingga primer tidak cocok dalam proses amplifikasi virus AI yang bersirkulasi di lapangan (Hewajuli *et al*, 2017).

Deteksi AI menggunakan RT-PCR terhadap gen MA bertujuan untuk mendeteksi keberadaan virus influenza A. Gen MA sangat konsisten terhadap semua subtipe virus AI dari beberapa negara di dunia, sehingga target gen ini ideal untuk deteksi awal virus (Spackman *et al.*, 2002). Penggunaan gen MA untuk mendeteksi keberadaan virus AI tanpa melalui proses inokulasi dan propagasi virus di telur ayam bertunas (TAB) dapat dilakukan (Haryanto *et al.*, 2012). Pada penelitian ini tidak diketahui kemungkinan infeksi yang terjadi berasal dari subtipe virus yang patogenik tinggi atau rendah, sehingga penggunaan gen MA tepat digunakan untuk deteksi AI secara umum



Gambar 1. Hasil elektroforesis amplifikasi gen MA dengan panjang 220 bp terhadap sampel paru DOC, ayam broiler kelompok kontrol tanpa suplementasi (K1 s/d K5) dan dengan suplementasi *water additive* kimchi 0,2% (P1 s/d P5). Keterangan: 1. Marker (M), 2. Kontrol positif (K+), 3. Sampel paru DOC (negatif), 4 s/d 8. Kelompok kontrol minggu pertama sampai kelima (negatif), 9 s/d 10. Kelompok perlakuan minggu pertama sampai kedua (positif), 11 s/d 13. Kelompok perlakuan minggu ketiga sampai kelima (negatif). 14. Kontrol negatif (K-) dan 15. *No template control* (NTC).

Infeksi AI yang terjadi pada P1 dan P2 merupakan infeksi subklinis, karena tidak tampak adanya gejala klinis AI. Infeksi subklinis AI pernah dilaporkan di China pada ayam layer. Ayam tidak menunjukkan gejala klinis, namun terdeteksi HPAI A/chicken/Qingdao/1/2014(H5N2). Kejadian infeksi subklinis tersebut disebabkan oleh vaksinasi masal yang dilakukan di negara tersebut (Ma *et al.*, 2014). Infeksi subklinis HPAI H5N1 pada DOC telah terbukti terjadi (Setyawati, 2010). Keberadaan infeksi subklinis di Indonesia disebabkan oleh kondisi endemik, kegagalan vaksinasi dan kemampuan mutasi virus (Wibawa, 2012).

Infeksi subklinis terjadi karena kekebalan yang dimiliki ayam cukup untuk melindungi dari penyakit klinis, tetapi virus masih mengalami replikasi, sehingga ayam dapat mensekresikan virus ke lingkungan (Tarigan, 2015). Kejadian ini ditimbulkan oleh penggunaan vaksin yang hanya memiliki kesamaan genetik parsial terhadap virus penantang yang ada di lingkungan (Spackman dan Swayne, 2013). Keberadaan infeksi subklinis pada peternakan ayam komersial dapat dideteksi dengan RT-PCR, namun kurang praktis. Hal tersebut dikarenakan jumlah sampel yang harus diperiksa sangat banyak, akibat tidak teridentifikasi indikasi yang digunakan untuk menduga ayam yang terinfeksi. Metode *Differentiation Infected from Vaccinated Animals* (DIVA) berbasis deteksi antibodi M2e dapat digunakan untuk deteksi AI subklinis, namun metode ini belum ada di Indonesia (Capua *et al.*, 2004; Tarigan, 2015). Pendeteksian antibodi protein NS1 juga dapat digunakan untuk mendeteksi AI subklinis, karena NS1 hanya disintesis pada saat replikasi dan tidak ditemukan pada vaksin inaktif (Capua dan Maragon, 2007).

Ayam yang terinfeksi AI subklinis tidak disadari oleh peternak, sehingga virus bersirkulasi di peternakan dalam jangka waktu yang tidak diketahui. Keberadaan virus akan terungkap apabila penyakit klinis dan kematian terjadi. Peternakan yang mengalami infeksi subklinis dapat membahayakan peternakan lain disekitarnya, karena berperan sebagai sumber penularan laten (Tarigan, 2015). Suplementasi *water additive* kimchi 0,2% terbukti dapat menghambat perkembangan infeksi subklinis menjadi klinis, serta mengeliminasi virus pada ayam broiler di minggu ke-3 setelah pemberian. Potensi *water additive* kimchi diharapkan mengurangi *shedding* virus ke lingkungan.

3.2. Imunohistokimia Streptavidin biotin (IHK-SB)

Kemampuan *water additive* Kimchi 0,2 % dalam mencegah infeksi alami virus *avian influenza* virus (VAI) didasarkan pada hasil pemeriksaan lesi patologis anatomis, histopatologis dengan pewarnaan rutin hematoksilin-eosin (H&E) dan imunopatologis imunohistokimia streptavidin biotin (IHK SB).

Infeksi VAI H5N1 pada ayam dapat mengakibatkan lesi sistemik pada organ internal, misalnya lesi pada jantung, sistema syaraf dan kulit. Sedangkan, lesi patologis anatomis yang disebabkan oleh infeksi VAI subtipe H9N2 dapat menyebabkan lesi pada saluran pernafasan (paru-paru) dengan eksudat purulenta pada percabangan trakea dan bronki sekunder (Pantin-Jackwood, 2008).

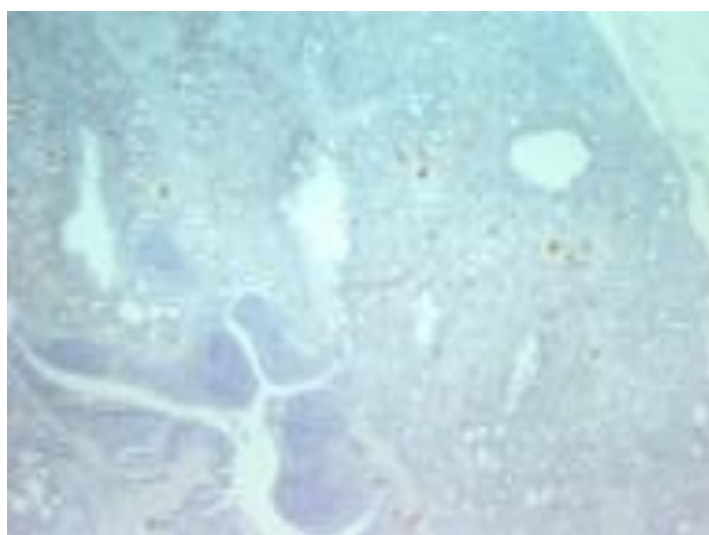
Hemoragis berbintik dan linear merupakan lesi patologis anatomis yang menciri pada paru-paru ayam yang terinfeksi *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Ayam yang terinfeksi VAI menunjukkan adanya lesi hemoragis yang signifikan (Kamps *et al.*, 2006). Berdasarkan patogenesis VAI, VAI diduga mengalami viremia di dalam tubuh hospes dengan cara yang sama seperti virus endoteliotropik yang lainnya. Aktivasi sel-sel radang polimorfonuklear dna mononuklear dan ekskresi sitokin secara sistemik berakibat predisposisi lesi pada organ (Kamps *et al.*, 2006). Nukleoprotein virus RNA, seperti halnya VAI dapat dideteksi melalui darah, sera dan monosit ayam yang terinfeksi (Hagag *et al.*, 2005).

Paru-paru merupakan organ utama pernafasan sehingga jika terjadi lesi patologis pada paru-paru akan dapat mengakibatkan gangguan sistemik organ sehingga dapat terjadi morbiditas dan mortalitas yang cukup signifikan (Kamps *et al.*, 2006). Kongesti merupakan akumulasi cairan darah pada lumen pembuluh darah (vena) akibat terhambatnya proses drainase vena. Pada umumnya, kongesti merupakan proses pasif sehingga mengakibatkan terjadi kelebihan cairan darah pada sel, jaringan atau organ. Kongesti dapat menyebabkan hipoksia dan edema sehingga mengganggu fungsi normal organ. Dengan demikian, pada ayam yang terinfeksi VAI subtipe HPAI, maka akan dapat menyebabkan mortalitas yang signifikan pada ayam yang terinfeksi, paru-paru mengalami kongesti dan hemoragis sehingga fungsi paru-paru sangat terganggu. Kongesti dan hemoragis berat dapat terjadi pada hampir semua lobi paru-paru ayam yang terinfeski HPAI (Kumar *et al.*, 2005).

Berdasarkan hasil penelitian semua paru-paru ayam (lima ekor) yang tidak diberi suplementasi *water additif* Kimchi 0,2 % (K) sampai pada akhir penelitian, yaitu minggu kelima (hari ke-35) (gambar 2) maupun pada paru-paru ayam yang diberi suplementasi *water additif* Kimchi 0,2 % (P) sampai pada minggu kedua (Gambar 3) setelah diuji imunopatologis imunohistokimia streptavidin biotin (IHK SB) dengan antibodi poliklonal antinukleoprotein VAI terbukti positif terinfeksi VAI. Partikel-partikel virus VAI (virion) terlihat sebagai deposit presipitasi warna kecoklatan pada parenkima paru-paru. Sedangkan, warna kecoklatan IHK SB sudah tidak terlihat lagi pada ayam (P) mulai minggu ketiga dan sampai akhir penelitian (minggu kelima). Hasil IHK SB pada paru-paru ayam Grup I adalah masih positif, sedangkan hasilnya pada paru-paru ayam (P) adalah negatif pada minggu ke-3 (Susiani *et al.*, 2019).



Gambar 2. Gambaran hasil imunopatologis imunohistokimia paru-paru berasal dari ayam potong yang tidak diberi suplementasi *water additive* Kimchi 0,2 % (K) yang dinekropsi pada minggu ketiga. Paru-paru terinfeksi positif virus *avian influenza* (VAI). Partikel VAI (virion) terlihat sebagai deposit presipitasi kecoklatan (Streptavidin biotin, 250x.).



Gambar 3. Gambaran hasil imunopatologis imunohistokimia paru-paru ayam pedaging yang disuplementasi *water additive* Kimchi 0,2 % (P) dinekropsi pada minggu ketiga. Paru-paru terlihat normal (tidak terlihat adanya deposit presipitasi kecoklatan partikel VAI atau virion) (Streptavidin biotin, 250x.).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa VAI memiliki kecenderungan berkembang biak pada sel-sel epitelia bersilia saluran pernafasan yang mengalami nekrosis dan infiltrasi limfosit. Infeksi presipitasi warna kecoklatan pada parenkima paru-paru. Sedangkan, warna kecoklatan IHC SB sudah tidak terlihat lagi pada ayam perlakuan mulai minggu ketiga dan sampai akhir penelitian (minggu kelima). Hasil IHC SB pada paru-paru ayam kontrol adalah masih positif, sedangkan hasilnya pada paru-paru ayam perlakuan adalah negatif pada minggu ke-3. AI secara *intranasal* akan menyebabkan penyebaran virus pada saluran pernafasan yang merupakan sasaran utama AIV, yaitu sel-sel epitelia saluran pernafasan yang peka terhadap infeksi AIV. Kepekaan sel-sel sasaran terhadap AIV dipengaruhi oleh reseptor spesifik yang ada di permukaan sel hospes. Reseptor yang ada di permukaan sel hospes berperan spesifik dalam endositosis AIV, melalui pelekatan antara virus dengan reseptor sel hospes. Reseptor AIV

adalah penentu tropisme, dan hamaglutinin VAI akan berikatan dengan reseptor galaktosa yang mengikat asam sialat SA α -2,3-Gal dan SA α -2,6-Gal pada permukaan sel hospes. Reseptor SA α -2,3-Gal dan SA α -2,6-Gal pada paru-paru ayam terdistribusi pada sel-sel epitelia bronki, parabronki dan sel-sel endotelia pembuluh darah (Chaves *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012). Organ yang mempunyai banyak vaskularisasi, seperti paru-paru dan jantung akan terpengaruh cukup fatal oleh infeksi AIV karena sel-sel endotelia pembuluh darah pada organ tersebut merupakan tempat utama reseptor AIV.

4. SIMPULAN, SARAN DAN REKOMENDASI

Terdapat infeksi virus Avian influenza tipe A pada ayam pedaging komersial yang disuplementasi dengan water additive yang di deteksi dengan metode RT-PCR dan IHK-SB. Water additive kimchi 0,2% pada ayam pedaging yang dipelihara di peternakan komersial dapat mencegah infeksi alami avian influenza tipe A yang bersifat subklinis setelah pemberian selama tiga minggu. Water additive kimchi diberikan mulai ayam broiler berumur satu hari dan minimal pemberian tiga minggu untuk menurunkan risiko kemungkinan infeksi AI subklinis yang ditularkan secara alami. Penelitian terhadap efektivitas water additive kimchi perlu dilanjutkan terhadap keberadaan gen HA dan NA untuk mengetahui sub tipe virus AI, kemudian diperlukan pengujian lebih lanjut terhadap patogenesis virus AI yang menginfeksi secara subklinis tersebut.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J., 2000. A Review of Avian influenza in Different Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74:3-13.
- Asmara, W., 2006. Diversitas Genetik dan Potensi Penularan Virus Avian Influenza ke Manusia. Makalah yang disampaikan dalam Seminar Ilmiah *Avian influenza: A Global New Life Threatening Disease* tanggal 18 Juni 2006. BEM FK UGM.
- Awaad, M.H.H., Abdel-alim, G.A., Sayed, K.S.S., Kawkab., Ahmed, A., Nada, A.A., Metwalli, A.S.Z., AlKhalaf, A.N., 2010. Immunostimulant Effect of Essential Oils of Pappermint and Eucalyptus in chickens. *J. Pakist. Vet.* 30: 61-66.
- Capua, I., and Alexander, D.J. 2004. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.* 33: 393-404.
- Capua, I., and Maragon, S. 2007. The challenge of controlling notifiable avian influenza by means of vaccination. *Avian Dis.* 51: 317-322.
- Chamnanpood, C., Sanguanserm Sri, D., Pongcharoen, S. and Sanguanserm Sri, P. 2011. Detection of Distribution of Avian Influenza H5N1 Virus by Immunohistochemistry, Chromogenic in Situ Hybridization and Real-Time PCR Techniques in Experimentally Infected Chickens. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 42: 303-310
- Chaves, A.J., Busquets, N., Valle, R., Rivas, R., Vergara-alert, J., Dolz, R. and Ramis, A. 2011. Neuropathogenesis of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H7N1) in Experimentally Infected Chickens. *Vet. Res.* 42: 1-12.
- 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.
- Costa, T., Chaves, A. J., Valle, R., Darji, A., van Riel, D., Kuiken, T., Majo, N. and Ramis, A. 2012. Distribution Patterns of Influenza Virus Receptors and Viral Attachment Patterns in the Respiratory and Intestinal Tracts of Seven Avian Species. *Vet. Res.* 43: 28-40.
- 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). *JITV.* 9: 136 - 142.
- Fouchier, R.A.M., Munster, V. Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B. and Osterhaus, A.D.M.E. 2005. Characterization of Novel Influenza A Virus Haemagglutinin Subtype (H16) Obtained Black-headed Gulls. *J. Virol.* 79: 2814-2822.
- Ghafoor, A., Naseem, S., Younus, M., Nazir, J., 2005. Immunomodulatory Effects of Multistrain Probiotics (Protexin™) on Broiler Chicken Vaccinated Against Avian influenza Virus (H9N2). *Int. J. Poult. Sci.* 4 : 777-780.

- Harimoto, T and Kawaoka, Y. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev.* 14: 129-149.
- Hashemi, S.R. and Davoodi, H. 2010. Phytogenics as new class of feed additive in poultry industry. *J. Anim. Vet. Adv.* 9 : 2295-304.
- Hewajuli, D.A., Dharmayanti, N.L.P., Wibawan, I.W.T. 2017. Deteksi, Isolasi dan Identifikasi Avian influenza subtype H5N1 pada Unggas di Pulau Jawa Indonesia Tahun 2016. *J.Veteriner.* 18:496-509
- Howarth, M., Chinnapen, D.J.F., Gerrow, K., Dorrestein, P.C., Grandy, M.R., Kelleher, N.L., Husseini, E., Ting, A., Alice, Y. 2006. A Monovalent Streptavidin with A Single Femtomolar Biotin Binding Site. *Nature Methods.* 3 : 267-73.
- Isnawati, R., Wuryastuti, H., Wasito, R. 2019. Peneguhan Diagnosis Flu Burung pada Ayam Petelur yang Mengalami Gejala Penurunan Produksi. *J. Sainvet.* 37: 1-10.
- Kamps, B.S., Wolfman, C., Preiser, W. (2006). Influenza Report 2006. Flying Publisher, Paris, France.
- Kumar, P., Khanna, M., Srivastava, V., Tyagi, Y.K., Raj, H.G., and Ravi, K. 2005. Effect of quercetin supplementation on lung antioxidants after experimental influenza virus infection. *Exp. Lung Res.* 31: 449-459.
- Lee, M-S., Chang, P-C., Shien, J-H., Cheng, M-C., and Shieh, H.K. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97: 13-22.
- 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.
- Pantin-Jackwood, M.J. 2008. Immunohistochemical Staining for the Detection of the Avian Influenza Virus in Tissues. *Methods Mol. Biol.* 436: 77-83.
- Seo, B.J., Rather, I.A., Kumar, V.J.R., Choi, U.H., Moon, M.R., Lim, J.H. and Park, Y.H. 2012. Evaluation of *Leuconostoc mesenteroides* YML003 as a Probiotic Against Low-pathogenic Avian influenza (H9N2) Virus in Chickens. *J. Appl Microbiol* 113: 163-171.
- Setyawati, S. 2010. *Kajian epidemiologi virus Avian influenza pada distribusi anak ayam umur satu hari.* Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Jawa Barat.
- Spackman, E., and Swaynes D.E. 2013. Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology. *Virus Res.* 178: 121-132.
- Susiani, R.D., Wasito, R., Wuryastuti, H. 2019. The Effect of Water Additive Commercial (KimchiStoc) on Natural Avian Influenza Virus Infection of Broiler Chickens: Pathological and Immunopathological Approach. *East African Scholars J Agri Life Sci* 2:155-162.
- Tarigan, S. 2015. Infeksi subklinis avian influenza H5N1 pada peternakan ayam yang menerapkan program vaksinasi. *WARTAZOA.* 25: 75-84.
- 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(10): e1003657
- Tumpey, T.M., Swayne, D.E., Huyuh, L.P., Nghiem, H.K., Nguyen, HH., Hoang, L.T., Cox, N.J., Katz, J.M., 2005. Isolation and Characterization of Avian Influenza Viruses, Including Highly Pathogenic H5N1, from Poultry in Live Bird Market in Hanoi, Vietnam in 2001. *J. Virol.* 79 :4201-4212
- Pattnaik, B., Pateriya, A.K., Khandia, R., Tosh, 25. C., Nagarayan, S., Gounalan, S., Murugkar, H.V., Shankar, B.P., Shrivastava, N., Behera, P., Bhagat, S., Peiris, J.S.M., Pradhan, H.K., 2006. Phylogenetic Analysis Revealed Genetic Similarity of The H5N1 Avian Influenza Viruses Isolated from HPAI Outbreaks in Chickens in Maharashtra, India with Those Isolated from Swan in Italy and Iran in 2006. *Current Science.* 91: 77-81.
- Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, 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. 1991. Penggunaan Imunositokimia untuk Diagnosis Penyakit Infeksi. Kursus Singkat Imunositokimia di PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- 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 journal* 2: 27-31.
- World Organization of Animal Health (OIE). 2015. Avian influenza (Infection with *Avian influenza* viruses) In: *OIE terrestrial animals*, Chapter 2.3.4. World Organization of Animal Health: Paris, France.
- Wibawa, I.W.T. 2012. *Manifestasi subklinis avian influenza pada unggas: ancaman keselamatan dan penanggulangannya*. Orasi Ilmiah Guru Besar IPB. Bogor.
- 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. *JITV*. 9: 61-71.
- World Health Organization (WHO). 2017. *Epidemiological and virological updates on influenza circulation*. <http://extranet.wpro.who.int/influenzaupdate/Avian>. Diakses Agustus 2017.