

Perbandingan Dua Desinfektan dalam Mengeliminasi Virus *Avian Influenza H5N1* pada Telur Tetes

Comparison between Two Disinfectants in Eliminating Avian Influenza Virus H5N1 on Hatching Eggs

Umar Suryanaga^{1*}, Retno D. Soejoedono², Ni Luh Putu Ika Mayasari²

¹Balai Karantina Pertanian Banjarmasin, Jl. M Soetoyo M. No 1134 Banjarmasin

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor

*Email : umarsuryanaga@gmail.com

Naskah diterima : 29 Agustus 2017, direvisi : 28 Mei 2018, disetujui : 30 Mei 2018

Abstract

Avian Influenza (AI) is a zoonotic viral disease in birds which demands priority on control and measures. Spread of AI virus can occur directly or indirectly. The use of disinfectant and handling of hatching egg waste is one of the actions that must be applied in hatchery to control the spread of AI virus. This research was aimed to compare two types of disinfectant in eliminating AI virus. The research was designed into 6 groups. Group I was SAN (Specific Antibody Negative) eggs as untreated negative control, group II was SAN egg treated by fumigation using potassium permanganate (KMnO₄) and formalin in room temperature for 20 minutes, group III was SAN eggs soaked in benzalkonium chloride (BKC) in room temperature for 30 seconds, group IV was SAN contaminated by AI H5N1 virus and fumigated by potassium permanganate and formalin in room temperature for 20 minutes, group V was SAN eggs contaminated by AI H5N1 virus and then soaked in benzalkonium chloride in room temperature for 30 second, and group VI was SAN eggs contaminated by AI H5N1 virus in room temperature for 10 minutes as positive control. AI H5N1 virus detection was done by using RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). The result of this research showed that the use of potassium permanganate and formalin disinfectant gave better performance compared to benzalkonium chloride in eliminating AI H5N1 virus on hatching eggs.

Key word: Benzalkonium chloride, Contamination, Formalin, KMnO₄, RT-PCR

Abstrak

Avian Influenza (AI) merupakan penyakit viral akut pada unggas dan bersifat zoonosis yang memerlukan prioritas untuk dikendalikan dan ditanggulangi. Penyebaran virus AI dapat terjadi secara langsung ataupun tidak langsung. Penggunaan desinfektan dan penanganan limbah telur tetes menjadi salah satu tindakan yang harus diterapkan di *hatchery* untuk mengendalikan penyebaran virus AI. Tujuan penelitian ini adalah membandingkan dua jenis desinfektan dalam mengeliminasi virus AI pada telur tetes. Penelitian ini dirancang dalam 6 kelompok menggunakan telur ayam berembrio (TAB) *Specific Antibody Negative (SAN)* umur 18 hari sebanyak 30 butir. Kelompok I adalah telur SAN sebagai kontrol negatif tanpa perlakuan, kelompok II adalah perlakuan telur SAN dengan fumigasi menggunakan Kalium Permanganat (KMnO₄) dan formalin pada suhu ruang selama 20 menit, kelompok III adalah perlakuan telur SAN yang direndam dalam benzalkonium klorida selama 30 detik pada suhu ruang. Kelompok IV adalah perlakuan kontaminasi telur SAN dengan virus AI H5N1 dan difumigasi dengan Kalium Permanganat dan formalin pada suhu ruang selama 20 menit, kelompok V adalah perlakuan kontaminasi telur SAN dengan virus AI H5N1 kemudian direndam dalam benzalkonium klorida pada suhu ruang selama 30 detik dan kelompok VI adalah kontrol positif yang dikontaminasi dengan virus AI H5N1 pada suhu ruang selama 10 menit. Deteksi keberadaan virus AI H5N1 setelah kontaminasi dan desinfeksi dilakukan dengan menggunakan metode *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan desinfektan formalin dan KMnO₄ lebih baik dibandingkan dengan benzalkonium klorida untuk mengeliminasi virus AI H5N1 pada telur tetes.

Kata kunci: Benzalkonium klorida, Formalin, KMnO₄, Kontaminasi, RT-PCR

Pendahuluan

Avian Influenza (AI) merupakan penyakit viral akut pada unggas dan bersifat zoonosis yang memerlukan prioritas untuk dikendalikan dan ditanggulangi. Penelitian tentang penyebaran virus AI melalui komoditas telur tetas belum banyak dilakukan dan belum ada bukti ilmiah yang meyakinkan bahwa penyebaran virus AI dapat terjadi secara vertikal melalui telur tetas. Penelitian yang dilakukan oleh Cappucci *et al.* (1985) menemukan virus AI di kuning telur, albumin dan cangkang telur pada telur yang berasal dari daerah wabah AI di Pennsylvania dan Virginia, Amerika Serikat. Promkuntod *et al.* (2006) juga menemukan hal yang sama pada campuran putih telur dan cairan alantois burung Puyuh Jepang yang terinfeksi virus AI secara alami di Thailand bagian selatan. Kedua penelitian tersebut mendeteksi keberadaan virus AI di telur ketika terjadi infeksi atau wabah. Beato *et al.* (2009) menyatakan bahwa rute infeksi virus pada telur diperkirakan terjadi melalui kontaminasi kerabang telur setelah *ovoposition* yaitu saat telur keluar dari kloaka dan keberadaan virus AI pada kuning telur dapat terjadi melalui penularan secara vertikal.

Desinfeksi adalah suatu kegiatan untuk mematikan atau menghentikan pertumbuhan hama penyakit patogen yang terdapat pada bermacam-macam permukaan (benda hidup dan benda mati) dengan menggunakan desinfektan. Desinfeksi merupakan hal yang penting dalam proses penetasan baik dari awal telur menetas sampai akhir penetasan. Fumigasi dengan formaldehid adalah cara yang paling efektif untuk desinfeksi telur tetas namun kelemahan bahan kimia ini dapat merusak embrio jika fumigasi dilakukan dengan prosedur yang tidak tepat (Cadirci, 2009). Furuta dan Maruyama (1981) menyatakan bahwa telur tetas yang dipindahkan dari *setter* ke *hatcher* dapat terinfeksi dengan mudah oleh mikroorganisme meskipun telur tetas dalam keadaan

bersih.

Telur tetas masih menjadi komoditas utama yang dilalulintaskan di wilayah kerja Balai Karantina Pertanian Banjarmasin. Selama tahun 2015 tercatat sebanyak 5.1 juta butir telur tetas yang keluar melalui BKP Banjarmasin, sementara pemasukan dari luar pulau tercatat sebanyak 15.9 juta butir (BKP BJM, 2015). Pemasukan ini berasal dari daerah lumbung peternakan ayam di Jawa Barat dan Jawa Timur yang belum dinyatakan bebas AI. Kondisi ini menyebabkan AI masih merupakan ancaman serius bagi industri perunggasan di Kalimantan Selatan.

Lalulintas telur tetas antar area dari daerah tertular ke daerah bebas AI diperbolehkan dengan beberapa persyaratan yaitu berasal dari peternakan yang tidak terjadi kasus AI sekurang-kurangnya 30 hari terakhir baik secara klinis maupun patologi anatomi, telur telah didesinfeksi sebelum pengeluaran dan persyaratan lainnya terkait kotak telur (BARANTAN, 2006). Badan Kesehatan Hewan Dunia, *Office Internationale des Epizooties* (OIE), telah memberikan rekomendasi terkait dengan potensi penyebaran AI melalui perdagangan telur tetas. Rekomendasi tersebut berupa tindakan desinfeksi telur tetas yang diperdagangkan dengan fumigasi, *spraying*, imersi (pencelupan) dan tindakan desinfeksi lain yang dibakukan oleh otoritas veteriner pada suatu negara. Jenis desinfektan yang direkomendasikan untuk telur tetas adalah formalin dan virkon (OIE, 2008). Desinfeksi yang dilakukan selama ini di Indonesia adalah dengan metode fumigasi menggunakan kalium permanganat (KMnO₄) dan formalin (Sudaryani dan Santoso, 1999). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan dua jenis desinfektan dalam mengeliminasi virus AI H5N1 pada telur tetas sehingga dapat menentukan desinfektan yang tepat.

Materi dan Metode

Isolat yang digunakan adalah virus AI H5N1

clade 2.3.2 yang sudah dikarakterisasi sebelumnya yang diperoleh dari Kabupaten Sidang Rappang Provinsi Sulawesi Selatan dengan kode DK/Sidrap/(N10)/2015. Konsentrasi virus yang digunakan berkisar antara 10^7 – 10^9 EID (*Egg Infection Dose*) 50/ml dan titer *hemagglutination Unit* (HAU) 2^8 . Nilai ini didasarkan pada referensi bahwa jumlah virus AI yang terkandung dalam 1 gram feses adalah $10^{8.7}$ EID50/ml (Kamps *et al.* 2006).

Penelitian ini menggunakan TAB umur 18 hari yang dibagi menjadi 6 kelompok berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Federer (Supranto, 2000), setiap perlakuan minimal 5 ulangan, total telur yang digunakan 30 telur SAN (*specific antibody negative*). Kelompok I adalah kontrol negatif tanpa perlakuan, kelompok II adalah perlakuan fumigasi telur SAN dengan kalium permanganat (KMnO₄) dan formalin, dan kelompok III adalah perlakuan perendaman telur SAN dengan benzalkonium klorida. Kelompok IV adalah perlakuan kontaminasi telur SAN dengan virus AI H5N1 di dalam *biosafety cabinet* level 3 dan difumigasi dengan KMnO₄ dan formalin pada suhu ruang selama 20 menit, kelompok V adalah perlakuan kontaminasi telur SAN dengan virus AI H5N1 kemudian direndam dalam benzalkonium klorida selama 30 – 40 detik pada suhu ruang. Kelompok VI adalah telur SAN yang dikontaminasi dengan virus AI H5N1 sebagai kontrol positif.

Fumigasi bertujuan untuk mengeliminasi kontaminan yang menempel pada permukaan telur menggunakan KMnO₄ dan formalin dengan dosis 1:2 untuk ruang 1 m³, pada suhu ruang selama 15 – 20 menit (Sudaryani dan Santoso, 1999). Desinfeksi TAB menggunakan benzalkonium klorida dilakukan dengan cara merendam TAB selama 30 – 40 detik dengan dosis 10 ml/ 1 liter air sesuai petunjuk perusahaan. Fumigasi dan desinfeksi dilakukan pada TAB umur 18 hari. Telur tetas diinkubasi pada mesin tetas dengan kisaran suhu 37.4 °C – 37.5 °C dan

pengamatan dilakukan setiap hari untuk mendeteksi embrio yang mati.

Telur yang berhasil menetas dan embrio yang mati diperiksa terhadap keberadaan virus AI H5N1. Sampel usap trakea dari DOC hidup diuji terhadap keberadaan virus AI H5N1 dengan menggunakan konvensional *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Embrio yang mati diambil organ pernafasan dan pencernaan kemudian digerus dan dicampur dengan PBS selanjutnya dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 ×g selama 15 menit (Yamamoto *et al.* 2010). Supernatan diuji terhadap keberadaan virus AI H5N1 dengan menggunakan konvensional RT-PCR.

Isolasi RNA virus AI dilakukan dengan menggunakan kit Geneaid[®]. Prosedur isolasi RNA dilakukan sesuai dengan panduan perusahaan. Uji *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan dengan menggunakan kit komersial My Taq One Step RT-PCR[®]. Identifikasi virus AI H5N1 menggunakan primer H5 dan N1 seperti yang ditampilkan pada Tabel 1. Hasil uji RT-PCR divisualisasi pada gel agarose 1.5% yang mengandung etidium bromida (0.5 µg/ml) di dalam buffer TAE 1×. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita spesifik berwarna jingga pada panjang 313 bp untuk H5 (Slomka *et al.* 2007) dan 616 bp untuk N1 (WHO, 2007). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Daya Tetas Telur (*Hatchability*) dan Efektivitas Desinfektan dalam Mengeliminasi Virus Avian Influenza H5N1

Telur tetas sebagai salah satu media pembawa Hama Penyakit Hewan Karantina (HPHK) harus melewati prosedur tindakan karantina hewan jika dilalulintaskan. Tindakan karantina yang dimaksud adalah perlakuan untuk membebaskan media pembawa dari HPHK. Menurut Kepmentan No. 3238

tahun 2009 bahwa telur tetes diklasifikasikan sebagai media pembawa *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan termasuk ke dalam HPHK Golongan I. Upaya yang dilakukan untuk membebaskan telur tetes dari risiko penyebaran HPAI di Indonesia adalah dengan melakukan desinfeksi. Hasil pengamatan terhadap daya tetes telur (*hatchability*) dengan beberapa perlakuan ditampilkan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa terdapat kematian embrio pada semua kelompok, baik kelompok perlakuan maupun kontrol. Kematian embrio pada kelompok I atau kontrol negatif adalah kejadian yang

biasa pada proses penetasan bahkan dengan tidak lebih dari 1 kematian berarti daya tetes kelompok I adalah 80%. Di Indonesia, daya tetes untuk ayam petelur adalah 80% dan untuk ayam potong 82% (USAID, 2013). Kelompok II dan Kelompok III memiliki daya tetes yang sama dengan kelompok kontrol negatif yaitu 80%. Kematian yang terjadi pada kelompok II dan III kemungkinan disebabkan karena faktor yang tidak spesifik dan bukan karena perlakuan desinfektan. Kematian yang tidak spesifik ini bisa terjadi secara alami yang dipengaruhi oleh faktor nutrisi, manajemen dan faktor keturunan (Jassim *et al.* 1996).

Tabel 1. Sekuen basa primer untuk mengamplifikasi gen H5 dan N1 serta besaran produk yang diharapkan

Primer	Sekuen Basa	Produk (bp)
1 ^a	H5-Kha1 :5'-CCTCCAGARTATGCMAYAAAA TTGTC -3' - H5 Kha3: 5' TACCAACCGTCTACCATKCCYTG 3'	313
2 ^b	N1-1 :5'-TTG CTT GGT CAGCAA GTGCA-3' N1-2 :5'-TCT GTC CAT CCA T TA GGATCC -3'	616

^a: Slomka *et al.* (2007), ^b: WHO (2007)

Tabel 2 Daya tetes telur pada beberapa perlakuan

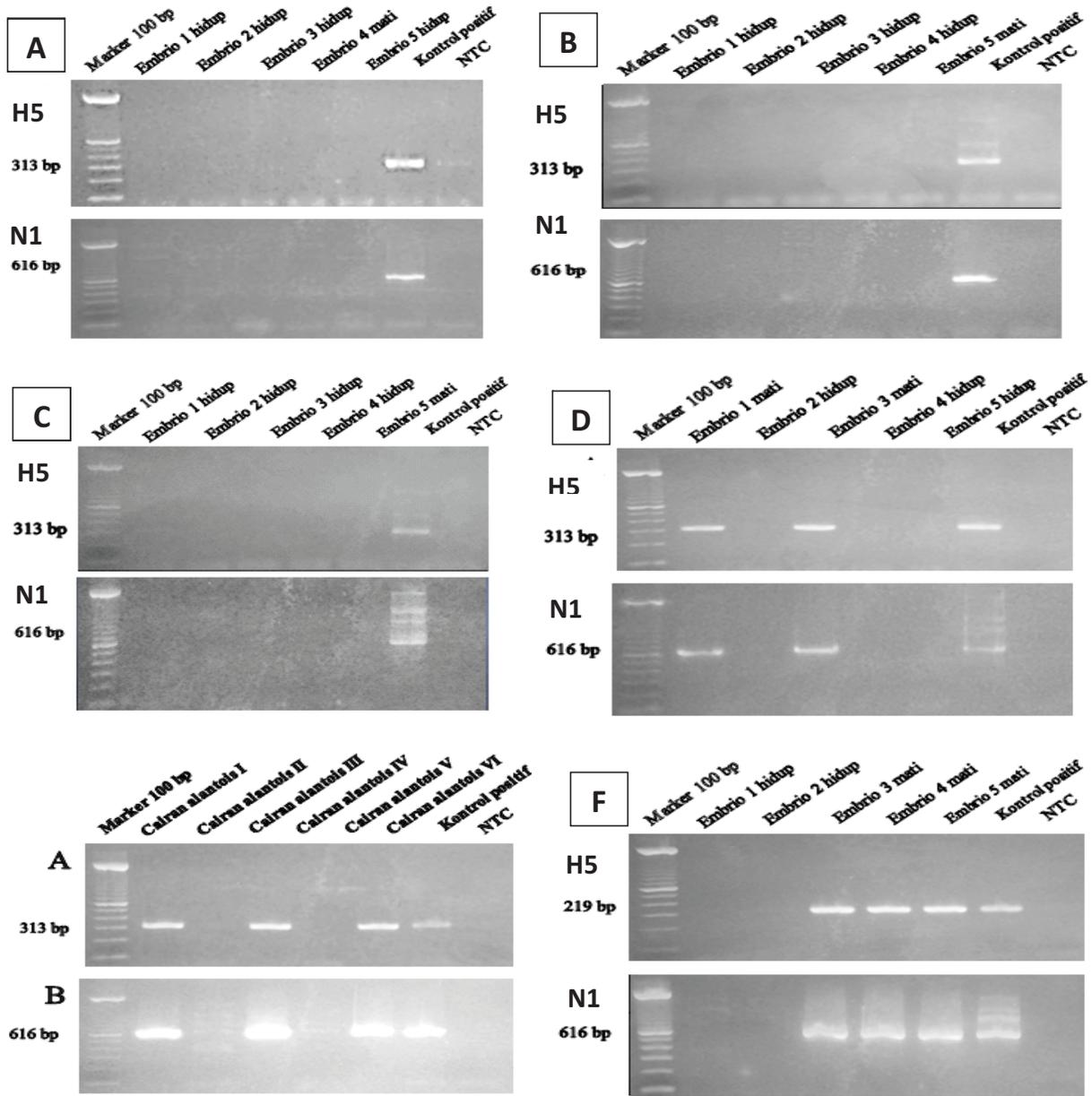
Kelompok	Perlakuan		Daya Tetes	Mortalitas
	Kontaminasi Virus	Desinfektan	Hidup ^a	Mati ^b
I	Tidak dikontaminasi	- (kontrol negatif)	4/5 (80%)	1/5 (20%)
II	Tidak dikontaminasi	KMnO ₄ dan formalin	4/5 (80%)	1/5 (20%)
III	Tidak dikontaminasi	Benzalkonium kl orida	4/5 (80%)	1/5 (20%)
IV	Virus AI H5N1	KMnO ₄ dan formalin	3/5 (60%)	2/5 (40%)
V	Virus AI H5N1	Benzalkoniumkl orida	2/5 (40%)	3/5 (60%)
VI	Virus AI H5N1	- (kontrol positif)	2/5 (40%)	3/5 (60%)

a: jumlah TAB hidup / total TAB b: jumlah TAB mati / total TAB

Kelompok IV dan V menunjukkan kematian yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok I, II dan III, daya tetes mengalami penurunan yaitu masing-masing 60% dan 40%. Pada perlakuan kelompok IV dan V terlihat bahwa tingkat daya tetes telur sedikit lebih baik jika eliminasi virus AI H5N1 dilakukan menggunakan KMnO₄ dan formalin. Tingkat daya tetes pada kelompok kontrol positif yaitu kelompok VI menunjukkan hasil yang sama dengan kelompok V, artinya pada penelitian ini, benzalkonium klorida tidak memberikan tingkat eliminasi yang maksimal.

Viabilitas dan Kemampuan Virus Avian Influenza H5N1 Menembus Kerabang Telur Tetes

Pada Tabel 3 dapat diketahui daya tahan virus AI H5N1 atau viabilitas virus yang dibuktikan dengan ketidakberhasilan desinfektan mengeliminasi virus sehingga terjadi infeksi dan kematian embrio. Hal ini menunjukkan bahwa virus AI H5N1 dapat menembus kerabang telur. Pada kelompok perlakuan IV dan V terlihat bahwa virus AI H5N1 lebih tahan terhadap benzalkonium klorida dibandingkan dengan KMnO₄ dan formalin yang ditunjukkan dengan kematian embrio yang lebih tinggi.



Gambar 1. Hasil visualisasi produk RT-PCR dari sampel individu. A) Kelompok I, B) Kelompok II, C) Kelompok III, D) Kelompok IV E) Kelompok V dan F) Kelompok 6, NTC: *no template control*

Pada kelompok I (kontrol negatif), kelompok II dan III yang tidak terpapar dengan virus AI H5N1, hasil deteksi molekuler menunjukkan tidak ada material genetik virus AI H5N1 yang dideteksi (Gambar 1 A, B dan C). Kematian embrio pada kelompok yang dikontaminasi dengan virus AI H5N1 dan didesinfeksi yaitu kelompok IV dan V juga dikonfirmasi dengan uji RT-PCR. Dari hasil uji RT-PCR, pada kelompok IV dideteksi adanya material genetik virus AI H5N1 pada embrio 1 dan 3 dari sampel gerusan organ dan negatif

pada sampel usap trakea DOC hidup (Gambar 1 D), pada kelompok V dideteksi adanya material genetik virus AI H5N1 pada embrio 1, 3 dan 5 dari sampel gerusan organ dan negatif pada sampel usap trakea DOC hidup (Gambar 1 E). Kelompok VI adalah kontrol positif dan konfirmasi kematian embrio pada kelompok ini menunjukkan hasil positif adanya material genetik virus AI H5N1 dari sampel gerusan organ embrio yang mati seperti terlihat pada Gambar 1 F sedangkan pada sampel usap trakhea DOC yang

hidup tidak terdeteksi virus AI H5N1.

Tabel 3 menunjukkan bahwa kelompok yang tidak kontak dengan virus AI yaitu kelompok I, II dan III tidak ditemukan adanya material genetik virus AI H5N1 pada usap trakea DOC yang hidup dan pada embrio yang mati. Kelompok yang dikontaminasi dengan virus AI kemudian didesinfeksi (kelompok IV dan V) serta kelompok VI sebagai kontrol positif, ditemukan adanya virus AI pada sampel gerusan organ dari embrio yang mati. Hasil positif hanya ditemukan pada sampel gerusan organ embrio yang mati dan tidak ditemukan pada sampel usap trakea DOC yang hidup. Tidak ditemukannya virus AI H5N1 pada kelompok IV, V dan VI dari sampel usap trakea DOC yang hidup

kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor selain dari efek desinfektan terhadap virus AI. Faktor yang dimaksud adalah ketebalan kerabang telur tetas. Amalia *et al.* (2013) menyatakan bahwa telur tetas yang dihasilkan dari indukan umur 25 – 55 minggu, menghasilkan telur dengan kerabang yang tebal dan kerabang yang tebal cukup sulit untuk ditembus oleh air. Telur yang dihasilkan dari indukan muda (dibawah 25 minggu) ataupun tua (diatas 55 minggu), memiliki kerabang telur yang tipis, sehingga kerabang mudah ditembus air. Kondisi seperti di atas diduga terjadi pada penelitian ini, sehingga ditemukan DOC yang hidup dengan usap trakea negatif virus AI H5N1.

Tabel 3 Jumlah dan hari kematian embrio telur tetas pada beberapa perlakuan

Kelompok	Perlakuan		Jumlah kematian hari ke		
	Kontaminasi vi rus	Desinfektan	19 ^a	20 ^b	21 ^c
I	Tidak dikontaminasi	Kontrol negatif	0/5	0/5	1/5
II	Tidak dikontaminasi	KMnO ₄ dan formalin	0/5	0/5	1/5
III	Tidak dikontaminasi	Benzalkoniumkl orida	0/5	0/5	1/5
IV	Virus AI H5N1	KMnO ₄ dan formalin	1/5	1/5	2/5
V	Virus AI H5N1	benzalkonium klorida	0/5	1/5	3/5
VI	Virus AI H5N1	Kontrol positif	1/5	1/5	3/5

keterangan : a: jumlah TAB mati / total TAB pada hari ke-19 (24 jam) b: jumlah TAB mati / total TAB pada hari ke-20 (48 jam) c: jumlah TAB mati / total TAB pada hari ke-21 (72 jam)

Efektivitas desinfektan dalam mengeliminasi virus AI H5N1 ditemukan lebih baik jika menggunakan KMnO₄ dan formalin dibandingkan dengan benzalkonium klorida. Hal ini terjadi karena benzalkonium klorida sangat rentan terhadap material organik seperti kotoran yang terdapat pada permukaan telur. Kotoran ini akan tertinggal dalam larutan desinfektan sehingga menurunkan aktivitas benzalkonium klorida dalam mengeliminasi virus (Turblin, 2008). Desinfeksi dengan fumigasi menggunakan KMnO₄ dan formalin akan menghasilkan gas formaldehid. Gas ini efektif menembus bahan organik seperti kerabang telur (Furuta dan Maruyama, 1981). Gas ini selalu dalam kondisi segar sehingga tidak menurun aktivitasnya

dalam mengeliminasi virus.

Kematian embrio telur tetas pada kelompok IV yang dikontaminasi virus AI H5N1 dan difumigasi dengan KMnO₄ dan formalin, dan kelompok V yang dikontaminasi dengan virus AI H5N1 lalu didesinfeksi dengan cara direndam dalam benzalkonium klorida serta kelompok VI (kontrol positif) adalah akibat infeksi virus AI. Sampel yang dideteksi positif adalah sampel gerusan organ embrio yang mati sedangkan sampel usap trakea DOC yang hidup memberikan hasil negatif.

Pada penelitian ini, perlakuan fumigasi dengan KMnO₄ dan formalin tidak sepenuhnya dapat mengeliminasi virus AI H5N1 pada telur tetas sehingga virus dapat menembus kerabang yang

mengakibatkan kematian embrio pada hari ke-1 (24 jam) dan ke-3 (72 jam) setelah kontaminasi (Tabel 3). Perkins dan Swayne, (2003) melaporkan bahwa kematian unggas yang terjadi dalam waktu 24–36 jam setelah infeksi, terutama terlihat pada beberapa spesies galliformis seperti kalkun, puyuh, merak dan ayam hutan hias. Gejala akut dari penyakit ini tidak menunjukkan terjadinya perubahan patologik yang besar, yang terlihat hanya hidroperikardium yang tidak jelas, kongesti usus yang ringan dan ada kalanya dijumpai perdarahan petekhial pada selaput serosa mesenteris dan perikardium meskipun tidak selalu.

Faktor lain yang menyebabkan kurang maksimalnya metode fumigasi adalah kecepatan melakukan fumigasi setelah *oviposisi*. Setelah *oviposisi* telur akan terus-menerus terkena kontaminan seperti bakteri, virus dan jamur. Oleh karena itu penting untuk menghancurkan mikroorganisme saat berada dipermukaan telur yaitu setelah pengumpulan telur dan telur masih hangat. Jika mikroorganisme telah menembus cangkang maka dalam hitungan menit akan mencapai membran kulit telur dan pada kondisi ini mikroorganisme akan terlindung dari fumigan (Cadirci, 2009).

Kesimpulan

Efektivitas desinfektan KMnO₄ dan formalin dengan metode fumigasi dalam mengeliminasi virus AI H5N1 pada telur tetap memberikan hasil yang lebih baik setelah dilakukan kontaminasi dibandingkan dengan menggunakan benzalkonium klorida yang diaplikasikan dengan cara perendaman.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Badan Karantina Pertanian Kementerian Pertanian atas beasiswa yang telah diberikan. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Drh Ahmad Nadif atas pemberian isolat virus Avian Influenza H5N1 yang

digunakan dalam penelitian ini. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Daftar Pustaka

- Amalia, R., Trihandaru, S., Rondonuwu, F.S. (2013). Identifikasi telur ayam dari induk muda dan tua menggunakan spektroskopi inframerah dekat. *Berkala Fis.* 16(4): 125-130.
- BARANTAN. Badan Karantina Pertanian. (2006). Keputusan Badan Karantina Pertanian Nomor 316.a/Kpts/PD.670.320/L/11/06 tentang Petunjuk Teknis Tindakan Karantina Hewan terhadap Media Pembawa HPAI. Badan Karantina Pertanian. Jakarta.
- BKP BJM. Balai Karantina Pertanian Kelas I Banjarmasin. (2015). Laporan Tahunan 2015. Balai Karantina Pertanian Kelas I Banjarmasin. Banjarmasin.
- Beato, M.S., Capua, I., Alexander, D.J. (2009). Avian influenza viruses in poultry products: a review. *Avian. Pathol.* 38(3):193-200.
- Cadirci, S. (2009). Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation – a review. *Arch. Geflügelk.* 73(2): 116-123.
- Cappucci Jr, D.T., Johnson, D.C., Brugh, M., Smith, T.M., Jackson, C.F., Pearson, J.E., Senne, A.D. (1985). Isolation of Avian Influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak. *Avian. Disease.* 29(4):1195-2000.
- Furuta, K., Maruyama, S. (1981). Bacterial contamination on eggs during incubation and hatching, and of fluffs of newly-hatched chicks. *Brit. Poult. Sci.* 22(3): 247-254.
- Kamps, B.S., Hoffmann, C., Preiser, W. (2006). Influenza Report 2006. Flying Publisher. South Africa.
- OIE. World Organization for Animal Health. (2008). Avian Influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 6.3.8. World Organization for Animal Health. France.
- OIE. World Organization for Animal Health. (2009). Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter

- 2.3.4. World Organization for Animal Health. France.
- OIE. World Organization for Animal Health. (2015). Terrestrial Manual Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses). Chapter 2.3.4. World Organization for Animal Health. France.
- Perkins, L.E.L., Swayne, D.E. (2003). Comparative Susceptibility of Selected Avian and Mammalian Species to a Hong Kong–Origin H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Virus. *J. American. Associ. Avian. Patol.* 958-965.
- Promkuntod, N., Antarasena, C., Prommuang, P., Prommang, P. (2006). Isolation of avian influenza virus a subtype H5N1 from internal contents (albumen and allantoic fluid) of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs and oviduct during a natural outbreak. *Annals. New York. Academy. Scienc.* 1081:171-173.
- Slomka, M.J., Coward, V.J., Banks, J. *et al.* (2007). Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. *Avian. Dis.* 51(1 Suppl): 227-234.
- Sudaryani, T., Santoso. (1999). Pembibitan Ayam Ras. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Supranto, J. (2000). Teknik Sampling untuk Survei dan Eksperimen. PT Rineka Cipta. Jakarta.
- Turblin, V. (2008). Disinfection of hatching eggs importance and practical aspects. Hatchery expertise online. Ceva animal health Asia Pasific. ceva.asiapacific@ceva.com. Diunduh Juli 12, 2017.
- USAID. United States Agency International Development. (2013). Indonesia's Poultry Value Chain. Diunduh Juli 12, 2017.
- WHO. World Health Organization. (2007). Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases. World Health Organization. Geneva.
- Yamamoto, Y., Nakamura, K., Yamada, M., Mase, M. (2010). Persistence of avian influenza virus (H5N1) in feather detached from bodies infected domestic ducks. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5496-5499.