

**PENGARUH DOSIS VAKSIN NEWCASTLE DISEASE INAKTIF PADA ITIK BETINA
TERHADAP JUMLAH SEL DARAH PUTIH DAN TITER ANTIBODI**

*The Effect of Inactivated Newcastle Disease Vaccine Doses in Female Duck to The Population of
White Blood Cells and Antibody Titers*

Luthfi Pratama^a, Purnama Edy Santosa^b, Siswanto^b

^aThe Student of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

^b The Lecture of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture Lampung University

Soemantri Brojonegoro No.1 Gedung Meneng Bandar Lampung 35145

e-mail : jipt_universitaslampung@yahoo.com

ABSTRACT

This study are determines to: 1) the effect of ND vaccine dose to the number of white blood cells produced in the female ducks; 2) the effect of ND vaccine doses to the amount of antibody titers produced in the female ducks. This research was conducted in December 2015 until January 2016, located in the Sabah Balau, District of Tanjung Bintang, South Lampung regency. Analysis of white blood cells (WBC) conducted in the Central Veterinary of Lampung, while the number of antibody titer was conducted in PT. Vaksindo, Jakarta. The experimental design used in this study is completely randomized design with three replications and 6 treatments (P0: injected 0.5 ml of distilled water, P1: 0.1 ml of ND inactivated vaccine doses, P2: 0.2 ml of ND inactivated vaccine doses, P3: 0.3 ml of ND inactivated vaccine doses, P4: 0.4 ml of ND inactivated vaccine doses, P5: 0.5 ml of ND inactivated vaccine doses). The treatment given to 5 days old female ducks with inactivated ND vaccine. White blood cells are tested by using the WBC test while antibody titers were tested by using the HI test. The data result were analyzed by ANOVA at 5% significance level and will be continued by Least Significant Difference (LSD) in white blood cells because the value of analysis of variance showed tangible results. The results of this study showed that giving of inactivated ND vaccine doses significantly ($P < 0.05$) to the number of white blood cells, but did not significantly affect ($P > 0.05$) titer of antibodies.

Keywords: Antibody Titer, Female Ducks, Inactivated ND Vaccine, White Blood Cells

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang jumlah penduduknya terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Peningkatan jumlah penduduk tersebut diimbangi dengan meningkatnya permintaan bahan pangan yang memiliki nilai gizi yang baik. Bahan pangan yang bergizi baik berasal dari produk hewani dan nabati. Salah satu contoh bahan pangan yang berasal dari produk hewani adalah telur. Telur berasal dari ternak unggas. Ternak unggas yang dapat menghasilkan telur salah satunya adalah itik betina. Jenis itik yang biasanya dternakkan di Indonesia untuk dimanfaatkan telurnya adalah itik Mojosari.

Pemeliharaan itik di Indonesia umumnya masih secara tradisional sehingga produksinya rendah. Itik dapat berkembang biak, bertelur, mencari makan, dan mengerami telurnya sendiri tanpa dikontrol oleh pemiliknya, oleh sebab itu sistem pemeliharaan itik masih tergolong sederhana. Sistem

pemeliharaan yang masih tradisional dan sederhana ini menyebabkan itik sangat rentan terkena berbagai macam penyakit. Salah satu jenis penyakit viral yang menular dan sangat merugikan bagi peternak unggas adalah *Newcastle Disease* (ND). Penyakit ini sangat berbahaya dan sewaktu-waktu dapat menyerang ternak unggas. ND merupakan masalah besar bagi dunia peternakan karena penyakit ini dapat menimbulkan angka kematian yang sangat tinggi mencapai 100% dan waktu penyebarannya yang sangat cepat (Tabbu, 2000), oleh karena itu kasus ND merupakan ancaman serius bagi industri peternakan di Indonesia (Tabbu, 2000; Santhia, 2003). Pencegahan penyakit virus yang efektif pada hewan adalah menjalankan program manajemen yang ketat berupa program vaksinasi.

Vaksinasi merupakan usaha yang paling efektif untuk melindungi unggas pada berbagai tingkat umur terhadap penyakit *Newcastle Disease*. Beberapa faktor penting yang harus

diperhatikan dalam vaksinasi adalah metode vaksin, jadwal vaksin, waktu pemberian vaksinasi, cara penyimpanan vaksin, jenis kelamin, dosis vaksin (Yudhie, 2010), serta status imunologi ternak (Arzey, 2007). Dosis vaksin sangat berpengaruh terhadap kekebalan tubuh itik terhadap serangan penyakit.

Roy *et al.* (2000) telah membuktikan dengan melakukan vaksinasi terhadap ayam yang berumur 59 hari dengan vaksin ND, kemudian terhadap kelompok ayam tersebut ditantang (*Challenge*) dengan virus ND galur ganas asal itik. Hasil program vaksinasi tersebut menunjukkan bahwa vaksin ND protektif 100%. Sementara itu, pada kelompok ayam yang tidak divaksin, tidak satupun yang masih hidup setelah ditantang. Dengan demikian, program vaksinasi sangatlah efektif untuk pencegahan penyakit tetelo yang disebabkan oleh virus ND asal itik.

Itik dan ayam termasuk dalam ternak unggas, oleh sebab itu pemberian dosis vaksin pada itik diasumsikan sama dengan ayam. Menurut PT. Mitrakultiva Utama (2016), pemberian dosis vaksin ND untuk DOC (*Day Old Chick*) atau ayam muda sebanyak 0,2 ml/ekor sedangkan untuk ayam dewasa sebanyak 0,5 ml/ekor, sehingga pada penelitian ini digunakan dosis vaksin ND berkisar antara 0,1 [-] 0,5 ml/ekor.

Pemberian dosis vaksin ND yang tepat untuk itik sampai saat ini belum diketahui, oleh sebab itu pada penelitian ini akan diteliti mengenai pengaruh dosis vaksin ND terhadap jumlah Sel Darah Putih dan titer antibodi yang dihasilkan pada itik betina.

MATERI DAN METODE

Materi

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat pemeliharaan itik, *soccorex*, tabung *disposable syringe* 3 ml untuk mengambil sampel darah itik sebanyak 18 buah, tabung *appendoft* untuk wadah serum darah sebanyak 18 buah, tabung EDTA untuk wadah sampel darah sebanyak 18 buah, dan termos es (*cooler*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Day Old Duck* (DOD) betina 54 ekor, pakan itik, vaksin *Newcastle disease* (ND) inaktif, kapas, es, aquades.

Metode

Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan 6 perlakuan dan 3 kali ulangan.

Rancangan perlakuan pada penelitian ini adalah:

1. PO : kontrol (disuntik aquades sebanyak 0,5 ml SC)
2. P1 : dosis vaksin *Newcastle disease* (ND) sebanyak 0,1 ml SC
3. P2 : dosis vaksin *Newcastle disease* (ND) sebanyak 0,2 ml SC
4. P3 : dosis vaksin *Newcastle disease* (ND) sebanyak 0,3 ml SC
5. P4 : dosis vaksin *Newcastle disease* (ND) sebanyak 0,4 ml SC
6. P5 : dosis vaksin *Newcastle disease* (ND) sebanyak 0,5 ml SC

Perlakuan Penelitian

1. Menyediakan *Day Old Duck* (DOD) atau itik betina umur 1 hari yang tidak pernah divaksin dengan vaksin *Newcastle Disease* (ND);
2. Melakukan pemeliharaan terhadap DOD betina selama 32 hari;
3. Pada hari ke-5 masa pemeliharaan, 45 ekor itik betina divaksin menggunakan vaksin ND inaktif secara *subcutan* dan 9 ekor lainnya disuntik aquades 0,5 ml secara *subcutan* sebagai kontrol. Pemberian dosis vaksin pada itik betina dilakukan berdasarkan rancangan penelitian yang telah ditentukan;
4. Sampel darah diambil menggunakan *disposable syringe* sebanyak 4 cc melalui *vena brachialis* setelah itik betina berumur 32 hari;
5. Sampel darah yang telah diambil (sebanyak 4 cc) kemudian dibagi menjadi 2 bagian. Bagian pertama dimasukkan dalam tabung EDTA untuk perhitungan jumlah sel darah putih (SDP), sedangkan bagian kedua ditampung menggunakan *sput dissposable syring*, kemudian dibiarkan pada suhu kamar selama 1 hingga 2 jam sampai terjadi pemisahan antara sel darah dengan serum darah. Serum darah kemudian dipindah dalam tabung *appendof*;
6. Serum darah tersebut dikirim ke PT. Vaksindo, Jakarta dalam kondisi beku untuk dihitung titer antibodinya;
7. Sampel darah dalam tabung EDTA dikirim dalam kondisi dingin ke Balai Veteriner Lampung untuk dihitung jumlah sel darah putihnya;
8. Selanjutnya data yang diperoleh, dianalisis ragam pada taraf 5% dan apabila hasil analisis menunjukkan pengaruh nyata, maka dapat dilanjutkan dengan uji BNT;
9. Tata letak penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tata letak perlakuan

P0U3	P3U1	P4U3	P2U3	P5 U1	P1U1
P2U2	P0U2	P1U3	P3U2	P4 U1	P5U3
P5U2	P2U1	P1U2	P0U1	P4 U2	P3U3

Keterangan :

P0--P5 = perlakuan taraf dosis vaksin ND inaktif yang diberikan

U1--U3 = banyaknya ulangan perlakuan

Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah sel darah putih (SDP) dan titer antibodi yang dihasilkan pada itik betina pasca vaksin ND inaktif.

Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh akan dianalisis menggunakan analisis ragam pada taraf nyata sebesar 5%, apabila hasil analisis menunjukkan pengaruh nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) (Steel & Torrie, 1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Sel Darah Putih pada Itik Betina.

Data hasil penelitian pengaruh dosis vaksin ND inaktif pada itik betina terhadap jumlah sel darah putih yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data hasil penelitian sel darah putih pada itik betina.

Ulangan	Perlakuan					
	P0	P1	P2	P3	P4	P5
	-----10 ³ /mm ³ -----					
1	59.2	66.5	45.8	79.45	46.5	68.3
2	52.4	82.75	63	74.35	46.8	58.85
3	50.2	65.6	79.95	75.35	54.55	53.15
Jumlah	161.8	214.85	188.75	229.15	147.85	180.3
Rata-rata	53.93 ^a	71.62 ^{bc}	62.92 ^{abc}	76.38 ^c	49.28 ^a	60.1 ^{ab}

Keterangan:

Nilai dengan superskripsi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05) berdasarkan uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

P0 : 0,5 ml aquades

P1 : 0,1 ml vaksin ND inaktif

P2 : 0,2 ml vaksin ND inaktif

P3 : 0,3 ml vaksin ND inaktif

P4 : 0,4 ml vaksin ND inaktif

P5 : 0,5 ml vaksin ND inaktif

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis vaksin ND inaktif berpengaruh nyata (P<0.05) terhadap jumlah sel darah putih pada itik betina. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian dosis vaksin ND inaktif pada masing--masing perlakuan memengaruhi jumlah sel darah putih pada itik betina. Nilai rata--rata sel darah putih setiap perlakuan berada di atas kisaran normal. Jumlah sel darah putih pada itik menurut Sturkie (1976) adalah 20--40 ribu/mm.

Sel darah putih itik betina pada setiap perlakuan berada di atas kisaran normal diduga disebabkan oleh infeksi bibit penyakit akibat kondisi *litter* yang kotor dan stres pada saat perlakuan. Menurut Guyton dan Hall (1997), peningkatan jumlah sel darah putih dapat bersifat fisiologis ataupun sebagai indikasi terjadinya suatu infeksi dalam tubuh.

Frandsen (1992) menambahkan bahwa adanya peningkatan jumlah sel darah putih di dalam tubuh mengindikasikan bahwa tubuh sedang terkena infeksi bibit penyakit. Kondisi *litter* bercampur ekskreta yang mengakibatkan lembab dan basah, membuat itik terkena infeksi bibit penyakit pada saat di kandang. *Litter* yang bercampur dengan ekskreta sangat ideal untuk berkembangnya bakteri patogen, sehingga kemungkinan besar unggas terinfeksi oleh bakteri (Winters, 2004). Menurut Tamalluddin (2015), gas amonia mempunyai daya iritasi tinggi bagi ternak, terutama ternak unggas, sehingga bisa memicu infeksi penyakit dan menurunkan produktivitas ternak.

Vaksinasi yang dilakukan pada penelitian ini melalui suntikan ke area bawah kulit ternak (subkutan). Pada saat penyuntikan itik, perlakuan yang kasar dapat menimbulkan stres. Menurut Halvorson (2002), keberhasilan vaksinasi dipengaruhi oleh kualitas vaksin, program vaksinasi, vaksinator, dan peralatan vaksinasi. Fluktuasi jumlah sel darah putih pada tiap individu cukup besar pada kondisi tertentu, seperti cekaman atau stres panas, aktivitas fisiologi, gizi, umur, dan lain--lain (Dharmawan, 2002).

Mekanisme terjadinya stres pada itik yaitu menstimulir syaraf pada hipotalamus untuk aktif mengeluarkan *Corticotropic Relasing Hormone* (CRH). CRH akan mengaktifkan sekresi *Adrenocorticotropic Hormone* (ACTH) dalam jumlah banyak. Meningkatnya ACTH akan merangsang korteks adrenal untuk aktif mengeluarkan *kortikosteroid* serta menyebabkan peningkatan pada sekresi *Glukortikoid* (Nasem et al. 2005). Peningkatan kadar *kortikosteroid* dan *Glukortikoid* berpengaruh buruk terhadap

kesehatan itik karena menimbulkan *Immunosupresif* yang dapat menurunkan system pertahanan tubuh. Peristiwa tersebut mengakibatkan terjadinya *atropi* pada *nodus limfatikus* dan *thymus* (Prasetyo, 2010). Stres yang terjadi pada itik ini mengakibatkan peningkatan kadar sel darah putih dalam tubuh itik tersebut.

Hasil uji lanjut dengan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan kontrol (P0) berbeda nyata dengan perlakuan P1, P2, P3, dan P5, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan P4. Perlakuan yang hasilnya hampir mendekati kisaran normal sel darah putih pada itik adalah perlakuan P4.

Perlakuan kontrol (P0) berbeda nyata dengan perlakuan P1, P2, P3, dan P5, yang berarti bahwa dosis vaksin yang diberikan pada perlakuan P1, P2, P3, dan P5 menghasilkan jumlah sel darah putih yang berbeda dengan perlakuan yang tidak diberikan dosis vaksin (P0). Hasil yang berbeda nyata tersebut kemungkinan diakibatkan oleh respon dari tubuh terhadap antigen yang tidak dikenali karena dosis vaksin yang diberikan membuat tubuh itik menghasilkan sel darah putih diatas kisaran normal untuk memproduksi antibodi melawan antigen yang ada (Wordpress, 2010).

Perlakuan kontrol (P0) tidak berbeda nyata dengan perlakuan P4, yang berarti pemberian dosis pada perlakuan P4 menghasilkan jumlah sel darah putih yang tidak berbeda dengan perlakuan kontrol (P0). Perlakuan P4 menghasilkan jumlah sel darah putih yang hampir mendekati kisaran normal diduga dikarenakan kondisi kandang yang lebih bersih dibandingkan dengan perlakuan lainnya. *Litter* yang bercampur dengan ekskreta sangat ideal untuk berkembangnya bakteri patogen, sehingga kemungkinan besar unggas terinfeksi oleh bakteri (Winters, 2004).

Tamalluddin (2015) menambahkan bahwa gas amonia mempunyai daya iritasi tinggi bagi ternak, terutama ternak unggas, sehingga bisa memicu infeksi penyakit dan menurunkan produktivitas ternak. Kondisi kandang yang bersih pada perlakuan P4 menyebabkan bakteri patogen sulit berkembang dan gas amonia di dalam kandang menjadi sedikit, sehingga itik menjadi nyaman dan kemungkinan kecil terinfeksi penyakit yang akhirnya mengakibatkan jumlah sel darah putih pada perlakuan P4 hampir mendekati kisaran normal.

Pengaruh Perlakuan terhadap Titer Antibodi yang Dihasilkan pada Itik Betina

Data hasil penelitian pengaruh dosis vaksin ND inaktif pada itik betina terhadap titer antibodi yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data hasil jumlah titer antibodi ND pada itik betina.

Ulangan	Perlakuan					
	P0	P1	P2	P3	P4	P5
	-----Log 2-----					
1	5	5	6	6	4	6
2	6	6	6	6	5	7
3	8	7	9	8	6	7
Jumlah	19	18	21	20	15	20
Rata-rata	6.33	6.00	7.00	6.67	5.00	6.67

Keterangan:

P0 : 0,5 ml aquades

P1 : 0,1 ml vaksin ND inaktif

P2 : 0,2 ml vaksin ND inaktif

P3 : 0,3 ml vaksin ND inaktif

P4 : 0,4 ml vaksin ND inaktif

P5 : 0,5 ml vaksin ND inaktif

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan dosis vaksin berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap titer antibodi ND inaktif pada itik betina. Hasil ini berarti titer antibodi ND yang dihasilkan pada masing--masing perlakuan masih protektif terhadap penyakit ND. Titer yang dianggap protektif terhadap penyakit ND adalah berkisar 2^5 sampai 2^8 (Allan et al., 1978). Perlakuan dosis vaksin ND inaktif terhadap titer antibodi berpengaruh tidak nyata diduga disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu antibodi maternal dan infeksi virus akibat *shading*.

Pengaruh maternal antibodi dari induk diduga menjadi salah satu penyebab tidak berpengaruhnya perlakuan dosis vaksin ND inaktif pada itik betina. Antibodi maternal adalah antibodi yang berasal dari induk yang diturunkan kepada anak. Pada unggas, maternal antibodi diturunkan melalui kuning telur. Kegunaan antibodi tersebut adalah untuk ketahanan tubuh anak terutama pada tahap awal kehidupan (Beby, 2015). Antibodi maternal secara efektif mencegah keberhasilan vaksinasi sampai antibodi tersebut habis, yaitu sekitar 10--20 hari setelah unggas menetas (Rahayu, 2010).

Antibodi maternal yang terkandung dalam kuning telur mulai diserap oleh embrio sejak 1 minggu embrio terbentuk dan akan terus berlanjut hingga anak unggas ditetaskan. Sisa kuning telur yang masih menempel pada anak unggas setelah menetas, masih mengandung antibodi meternal sebesar 7%.

Antibodi maternal inilah yang paling berperan pada DOC/DOD karena sangat memengaruhi status kesehatannya. Kekebalan/antibodi yang terkandung dalam kuning telur dikenal dengan *gamma globulin*. Antibodi tersebut diturunkan dari induk melalui transfer kekebalan pasif (*passive immunity*) dengan tujuan melindungi anak unggas dari serangan mikroorganisme (Beby, 2015).

Imunoglobulin yang terbentuk dalam darah sebagai akibat paparan antigen tertentu, mudah ditransfer ke dalam kuning telur dan kemudian dikenal dengan nama IgY (Yolk imunoglobulin). Pada unggas, IgY dalam kuning telur menyebabkan kekebalan bawaan anak dari induk, yang kemudian dikenal dengan maternal antibodi. Antibodi maternal yang diperoleh secara pasif dapat menghambat pembentukan imunoglobulin, sehingga mempengaruhi keberhasilan vaksinasi. Vaksinasi yang dilakukan pada saat antibodi maternal masih ada dalam sirkulasi darah akan percuma, karena akan dinetralisir oleh antibodi maternal (Beby, 2015).

Pencemaran atau pelepasan virus ke lingkungan menyebabkan itik yang tidak divaksin maka seakan-akan terkena vaksin, sehingga pada perlakuan P0 (injeksi aquades) itik yang tidak divaksin mempunyai kekebalan tubuh yang tidak jauh berbeda dengan perlakuan P1--P5 (vaksin ND inaktif). Adanya infeksi virus ND di lingkungan kandang atau karena pengaruh *shading* virus yang berasal dari urine dan feses menyebabkan itik yang terinfeksi dapat mengekskresikan virus ND melalui feses dan urine sehingga menyebar ke lingkungan (Srigandono, 1997).

SIMPULAN

Simpulan

1. Perlakuan dosis vaksin ND inaktif berpengaruh nyata ($P < 0,5$) terhadap jumlah sel darah putih pada itik betina;
2. perlakuan dosis vaksin ND inaktif tidak berpengaruh nyata ($P > 0,5$) terhadap jumlah titer antibodi yang dihasilkan pada itik betina.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh disarankan untuk mengambil sampel darah pada umur lebih dari 4 minggu karena menurut Suryana (2006), titer antibodi pasca vaksinasi akan mengalami peningkatan setelah unggas berumur 5 minggu.

DAFTAR PUSTAKA

- Allan, W. H., J. E. Lancaster and B. Torn. 1978. Newcastle Disease Vaccines. Their Production And Use. Food And Agricultural Organisation. Rome.
- Arzey, G. 2007. Newcastle Disease-compulsory vaccination. New South Wales : NSW Department of Primary Industries.
- Beby. 2015. Maternal Antibody. <http://bebypratiwy.blogspot.co.id/2015/06/maternal-antibody.html>. diakses pada 30 Maret 2016
- Dharmawan, N. S. 2002. Pengantar Patologi Klinik Veteriner Hematologi Klinik. Cetakan II. Pelawa Sari. Denpasar.
- Frandsen, R. D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi keempat. Alih Bahasa oleh B. Srigandono dan Koen Praseno. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Guyton, A. C. dan J. E. Hall. 1997. Fisiologi Kedokteran. Terjemahan Irawati, Ramadani D, Indriyani F. Penerbit EGC. Jakarta.
- Halvorson, D. A. 2002. The Control of H5 or H7 Mildly Pathogenic Avian Influenza: a role for inactivated vaccine. Avian- pathol. Carfax Publishing Ltd. Oxford.
- Nasem, M. T., S. Naseem, M. Yunus, Z. Iqbal Ch., A. Ghafor, A. Aslan and S. Akhter. 2005. Efek of Potassium of Chloride and Sodium Bicarbonate Supplementation on Thermotolerance of Broiler Exposed to Heat Stress. Int journal of poultry science.
- Prasetyo, L. Hardi, T. Susanti, P. P. Ketaren, E. Juwarini, S. Sopian, A. Suparyanto, A. R. Setioko. 2010. Panduan Budidaya dan Usaha Ternak Itik. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- PT. Mitrakultiva Utama. 2016. Vaksin. <http://www.kesehatanhewan.com/vaksin.html>. Diakses pada 2 Januari 2016
- Rahayu, I. D. 2010. Penyakit viral unggas. Fakultas Pertanian - Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Roy, P., A. T. Venugopalan and R. Manvell. 2000. Characterization of Newcastle disease virus isolated from chickens and ducks in Tamilnadu. India.
- Santhia, K. 2003. Strategi Diagnosa dan Penanggulangan Newcastle Disease. Universitas Udayana. Denpasar.

- Srigandono, B. 1997. *Produksi Unggas Air*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Stell, R. G. D. and J. H. Torrie. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistic Suatu Pendekatan Biometrik*. Terjemahan: PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sturkie, P. D. 1976. *Blood Physical Characteristic, Formed, Element, Hemoglobin*.
- Suryana, 2006. *Kewirausahaan Pedoman Praktis: Kiat dan Proses menuju Sukses, Edisi Ketiga*. Penerbit Salemba. Jakarta.
- Tabbu, C. R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya: Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral*. Kanisius. Yogyakarta.
- Tamalluddin, F. 2015. *Bahaya Amonia Terhadap Ayam Petelur Dan Broiler*. <http://www.ternakpertama.com/2015/02/bahaya-amonia-terhadap-ayam-petelur-dan.html>. diakses pada 22 April 2016
- Winters, J. L. 2004. *Adventorial*. PT. Supreme Indo Pertiwi. <http://www.sip-mlm.com/adventorial.htm>. Diakses pada 22 April 2016
- Wordpress. 2010. *Vaksinasi*. <https://infeksi.wordpress.com/vaksinasi/>. Diakses pada 2 Januari 2016
- Yudhie. 2010. *Program Vaksinasi Ayam Petelur (Layer) dan Broiler*. <http://yudhiestar.blogspot.com/2010/01/program-vaksinasi-ayam-petelur-layer.html>. Diakses pada 25 Oktober 2015