

Conference Paper

AMINO ACID ANALYSIS OF FUSION (F) GENE AND PREDICTION OF EPITOPE B-CELL NEWCASTLE DISEASE SURABAYA ISOLATE AS VACCINE CANDIDATE

Indah Laili Rahmawati¹, Fedik Abdul Rantam², and Wiwik Tyasningsih^{3,1}¹Mahasiswa²Departemen Mikrobiologi Veteriner³Departemen Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan patotipe berdasarkan susunan *cleavage site* asam amino protein F dan prediksi epitop sel-B protein F dari virus ND isolat Surabaya. Sampel penelitian berupa usapan kloaka 28 ekor ayam kampung yang diambil dari lima pasar unggas dalam wilayah Surabaya, 9 isolat positif milik Laboratorium Virologi dan Imunologi Departemen Mikrobiologi Universitas Airlangga serta Isolat positif LaSota (ATCC). Sampel diisolasi pada TAB dan diidentifikasi melalui uji HA yang dikonfirmasi dengan uji HI. Kemudian dilakukan PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* dengan target 687 bp. Prediksi epitop menggunakan program *online software* IEDB. Hasil prediksi epitop sel B dari masing-masing isolat menunjukkan terdapat 11-12 kandidat epitop sel B pada protein F sehingga disimpulkan sampel Surabaya dapat berpeluang sebagai kandidat imunogen yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin.

Kata kunci: Newcastle Disease, Cleavage site, Fusion protein, Surabaya.

Corresponding Author:
Indah Laili Rahmawati

Received: 03 October 2017

Accepted: 10 October 2017

Published: 29 November 2017

Publishing services provided
by Knowledge E

© Indah Laili Rahmawati
et al. This article is distributed
under the terms of the
Creative Commons Attribution
License, which permits
unrestricted use and
redistribution provided that
the original author and source
are credited.

Selection and Peer-review
under the responsibility of the
VMIC Conference Committee.

1. Pendahuluan

Newcastle Disease merupakan penyakit endemik yang terjadi setiap tahun di Indonesia. Tempat yang paling rentan untuk terjadinya infeksi ND adalah di peternakan dan pasar unggas. Kedua tempat tersebut memiliki potensi paling tinggi untuk tertular dan merupakan sarana untuk menyebarkan virus ND (Yuliana *et al*, 2015). Munculnya keragaman virus dapat menyebabkan kegagalan vaksinasi sehingga diperlukan pemilihan strain vaksin yang tepat untuk menanggulangi infeksi virus ND (Miller *et al.*, 2013).

Program vaksinasi pada berbagai tingkatan umur serta didukung dengan manajemen pemeliharaan yang optimal merupakan satu upaya penanggulangan penyakit ND. Tetapi tidak dipungkiri bahwa sampai saat ini kasus ND masih banyak ditemukan di

OPEN ACCESS

lapangan. Infeksi ND pada ayam yang telah divaksinasi dapat disebabkan ayam tersebut memiliki respon antibodi yang rendah terhadap vaksin yang digunakan (Tizard, 1987; Wibawan dkk., 2003). Vaksin berbasis epitop memiliki potensi besar untuk rancangan pembuatan vaksin, pencegahan penyakit, diagnosis, dan pengobatan. Menggunakan teknologi rDNA, epitop tertentu bisa diisolasi sehingga bisa menggantikan keseluruhannya dalam vaksin (Guerra *et al.*, 2015). Protein F merupakan target utama respon imun dan memiliki sifat imunogenik yang tinggi sehingga dapat dijadikan epitop imunogenik (Samal, 2012). Susunan asam amino protein F pada bagian *cleavage site* menentukan kecepatan replikasi virus dan menentukan tingkat virulensi virus ND (de Leeuw *et al.*, 2003). Perbedaan virulensi tersebut akan menentukan patotipe dari virus ND (Samal, 2012). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan patotipe berdasarkan *cleavage site* gen F dari virus ND isolat Surabaya dan prediksi epitop sel-B gen *fusion* (F) yang memiliki sifat imunogenik yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk pengembangan vaksin berbasis epitop di Indonesia.

2. Metode Penelitian

Sampel isolat surabaya dalam penelitian ini merupakan sampel yang berasal dari swab unggas ayam kampung yang diambil di Pasar Bratang 4 sampel, Pasar Rungkut 8 sampel, Pasar Keputran 6 sampel, Pasar Kapasan 6 sampel, dan Pasar Wonokromo 4 sampel. Terdapat tambahan 9 isolat yang telah diidentifikasi positif ND oleh Laboratorium Virologi dan Imunologi Universitas Airlangga serta kontrol positif yaitu isolat positif LaSota (ATCC). Virus diinokulasikan 0,1 ml pada cairan allantois telur ayam berembrio (TAB) *specific antibody negative* (SAN) yang berumur 10 hari. Pengamatan kematian embrio pada TAB dilakukan setiap 24 jam selama 5 hari dengan cara *candling*. Pada hari ke-5 pasca inokulasi cairan alantois dipanen dari TAB kemudian dilakukan identifikasi virus dengan uji HA dan HI. Sampel yang menunjukkan hasil positif pada uji HA yang telah dikonfirmasi dengan uji HI selanjutnya dilakukan ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA dilakukan dari cairan alantois menggunakan *Trizole* (Invitrogen).

Hasil cDNA virus ND dengan metode PCR. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan kit PCR Master Mix (Invitrogen) menggunakan primer *forward* dan *reverse*, 687 bp sebagaimana terlihat pada tabel 1.

Produk hasil PCR divisualisasikan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel agarose 1%, kemudian produk PCR yang dihasilkan harus dipurifikasi terlebih

Tabel 1: Sekuen nukleotida primer *forward* dan *reverse*.

| Primer | Sekuen 5'-3' | Produk | Posisi |
|----------------|-----------------------------|--------|-----------|
| <i>Forward</i> | GAG GTT ACC TCT ACT AAG CTG | 687 bp | 4319-4339 |
| <i>Reverse</i> | AAG TCG GAG GAT GTT GGC AGC | | 4985-5005 |

(Rantam, 2008).

dahulu untuk persiapan sekuensing. Prediksi epitop protein F dilakukan melalui program *online B Cell Epitope Prediction Tools* yang dapat diakses dengan bebas menggunakan internet browser.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi dan Identifikasi Virus ND dari Pasar Unggas di Surabaya

Hasil isolasi 28 sampel swab kloaka ayam kampung yang berasal dari pasar unggas di Surabaya, 9 isolat milik Laboratorium Virologi dan Imunologi Departemen Mikrobiologi Universitas Airlangga serta kontrol positif LaSota (ATCC). Sampel diinokulasikan pada cairan alantois TAB SAN umur 10 hari diamati selama 5 hari. Identifikasi virus dilakukan dengan uji HA dan HI. Uji HI menggunakan anti serum ND. Hasil inokulasi, uji HA dan HI cairan alantois yang dipanen terlihat pada Tabel 2. Waktu kematian TAB, uji HA dan uji HI.

Adanya pertumbuhan virus ND dalam cairan alantois diketahui dengan melihat kemampuan hemaglutinasi eritrosit dan dikonfirmasi dengan uji hemaglutinasi inhibisi menggunakan anti serum ND. Hasil isolasi dan identifikasi virus terlihat pada Tabel 1. yang menunjukkan hasil uji HA dan uji HI positif pada sampel ND1, ND2, ND3, ND6, ND7, ND8, ND9, SBY1, SBY2 dan Kontrol Positif LaSota. Virus famili Paramyxoviridae mempunyai sifat dapat mengaglutinasi sel darah merah unggas. Proses hemaglutinasi pada uji HA terjadi akibat aktivitas hemaglutinin yang terdapat pada amplop virus tersebut (Kencana dkk., 2012). Hasil uji HI positif menunjukkan bahwa terdapat kecocokan antara virus dan serum yang dipakai dalam uji, oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa secara serologi sampel yang diuji positif virus ND (Wibowo *et al.*, 2012).

3.2. Elektroforesis Hasil Polymerase Chain Reaction (PCR)

Uji RT-PCR menggunakan primer pada region gen F pada bagian *cleavage site*, F-for 5' GAG GTT ACC TCT ACT AAG CTG 3' dan F-rev 5' AAG TCG GAG GAT GTT GGC AGC

Tabel 2: Waktu Kematian TAB, uji HA dan uji HI.

| Pasar | Hour post infection | Uji HA | Uji HI | Pasar | Hour post infection | Uji HA | Uji HI |
|-------------------|---------------------|----------------|--------|-----------------------|---------------------|----------------|--------|
| Bratang 1 | ≤ 48 | - | - | Kapasan 2 | ≤120 | - | - |
| Bratang 2 | ≤120 | - | - | Kapasan 3 | ≤120 | - | - |
| Bratang 3 | ≤120 | - | - | Kapasan 4 | ≤ 72 | - | - |
| Bratang 4 | ≤ 48 | - | - | Kapasan 5 | ≤ 48 | - | - |
| Rungkut 1 | ≤ 72 | - | - | Kapasan 6 | ≤ 72 | - | - |
| Rungkut 2 | ≤ 48 | - | - | Wonokromo 1 | ≤ 24 | - | - |
| Rungkut 3 | ≤ 48 | - | - | Wonokromo 2 | ≤ 24 | - | - |
| Rungkut 4 | ≤120 | - | - | Wonokromo 3 | ≤ 24 | - | - |
| Rungkut 5 | ≤ 48 | - | - | Wonokromo 4 | ≤ 24 | - | - |
| Rungkut 6 | ≤120 | - | - | ND1 | ≤ 96 | 2 ⁶ | + |
| Rungkut 7 | ≤120 | - | - | ND2 | ≤120 | 2 ⁶ | + |
| Rungkut 8 | ≤ 48 | - | - | ND3 | ≤120 | 2 ⁹ | + |
| Keputran 1 | ≤120 | - | - | ND4 | ≤120 | - | - |
| Keputran 2 (SBY1) | ≤120 | 2 ⁹ | + | ND5 | ≤ 48 | 2 ⁴ | + |
| Keputran 3 (SBY2) | ≤120 | 2 ⁸ | + | ND6 | ≤120 | 2 ⁶ | + |
| Keputran 4 | ≤120 | - | - | ND7 | ≤ 72 | 2 ⁹ | + |
| Keputran 5 | ≤ 72 | - | - | ND8 | ≤ 96 | 2 ⁵ | + |
| Keputran 6 | ≤ 72 | - | - | ND9 | ≤120 | 2 ⁹ | + |
| Kapasan 1 | ≤120 | - | - | Sampel positif LaSota | ≤120 | 2 ⁸ | + |

Keterangan: +/-: Hasil positif/negatif




3'. Primer pada posisi 4319-5005 dari *whole* genom virus ND dengan produk PCR 687 bp. Hasil PCR positif terdapat pada 5 isolat dan kontrol positif dari 38 isolat yang diuji sebagaimana terlihat pada Gambar 1. Hasil Elektroforesis Produk PCR.

3.3. Analisis Cleavage Site Asam Amino Virus ND

Sekuen asam amino yang didapatkan dilakukan *multiple alignment* bersama dengan isolat lain yang berasal dari *GenBank*, yang kemudian dianalisis pada region *cleavage site*. Virus lentogenik mempunyai motif *single basic amino acid* pada F *cleavage site* 112G/E-K/R-Q-G/E-R116 dan L (leucine) pada residu 117 dan dapat dibelah oleh enzim protease seperti tripsin yang ditemukan pada saluran pencernaan dan pernafasan (Kim

Tabel 3: Cleavage Site Asam Amino Protein F.

| Sampel | Cleavage site asam amino protein F 112 113 |
|-----------------------------------|--|
| | 114 115 116 117 118 |
| LaSota /JF950510 | G R Q G R L I |
| Isolat Positif LaSota | G R Q G R L I |
| SBY1/2016 | G R Q G R L I |
| SBY2/2016 | G R Q G R L I |
| ND1/2003 | G R Q G R L I |
| ND3/2003 | G R Q G R L I |
| ND9/2003 | G R Q G R L I |
| BHG/Sweden/GQ918280.1/I | G K Q G R L I |
| B1/AF309418.1/II | G R Q G R L I |
| HB92/V4/AY225110.1/II | G R Q G R L I |
| Komarov/KT445901.1/II | R R Q K R F I |
| Beaudette/JN872154.1/II | R R Q K R F I |
| Mukteswar/EF201805.1/III | R R Q R R F I |
| Indonesia/Moluccan/AY444497/VI | R R R K R F V |
| HN1007/ /III | R R Q R R F I |
| Herts/AY741404.1/IV | R R Q R R F I |
| Italien/EU293914.1/IV | R R Q R R F I |
| Cormorant/DQ839244.1/V | R R Q K R F V |
| Cockatoo/Indonesia/AY562985/VII | R R Q K R F V |
| Banjarmasin/HQ697254.1/VII | R R Q K R F I |
| Bali-1/AB605247.1/VII | R R Q K R F I |
| Sukorejo/Indonesia/HQ697155.1/VII | R R R K R F I |

Keterangan:  : Lentogenik
 : Mesogenik
 : Velogenik

et al., 2008; Choi et al., 2010), sedangkan patotipe mesogenik dan velogenik mempunyai motif *multiple basic amino acid* (arginine atau lysine) pada protein F *cleavage site* 112R/K-R-Q/K/R-K/R-R116 dan F (phenylalanine) pada residu 117 (Meulemans et al., 2002). Perbedaan *cleavage site* dapat dilihat pada Tabel 3 *Cleavage Site Asam Amino Protein F*.

Tabel 4: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino strain LaSota (JF950510.1).

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|------------------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLEKGHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 37 | AHSPRSSH | 8 |
| 3 | 58 | 85 | TRVEDSGSRLAPSRCKMGSRPSTKNPAP | 28 |
| 4 | 102 | 111 | ANSIDGRPLA | 10 |
| 5 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 6 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 7 | 167 | 167 | P | 1 |
| 8 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 9 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 10 | 205 | 209 | AAQIT | 5 |
| 11 | 217 | 221 | AKQNA | 5 |

Tabel 5: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino Isolat positif LaSota.

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|------------------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLGKEHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 37 | AHSPRSSH | 8 |
| 3 | 58 | 85 | TRVEDSGSRLAPSRCKMGSRPSTKNPAP | 28 |
| 4 | 102 | 111 | ANSIDGRPLA | 10 |
| 5 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 6 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 7 | 167 | 167 | P | 1 |
| 8 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 9 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 10 | 205 | 209 | AAQIT | 5 |
| 11 | 217 | 221 | AKQNA | 5 |

Berdasarkan susunan *cleavage site* asam amino protein F menunjukkan bahwa isolat positif LaSota, SBY1/2016, SBY2/2016, ND1/2003, ND3/2003 dan ND9/2003 memiliki kesamaan susunan *cleavage site* dengan patotipe lentogenik yaitu dengan motif *cleavage site* berupa 112G-R-Q-G-R116 dan L (leucine) pada residu 117.

Tabel 6: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino Isolat SBY1/2016.

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|------------------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLGKGGHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 37 | AHSPRSSH | 8 |
| 3 | 58 | 85 | TRVEDSGSRLAPSRCKMGSRPSTKNPAP | 28 |
| 4 | 102 | 111 | ANSIDGRPLA | 10 |
| 5 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 6 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 7 | 167 | 167 | P | 1 |
| 8 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 9 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 10 | 205 | 209 | AAQIT | 5 |
| 11 | 217 | 221 | AKQNA | 5 |

Tabel 7: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino Isolat SBY2/2016.

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|------------------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLGKGGHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 37 | AHSPRSSH | 8 |
| 3 | 58 | 85 | TRVEDSGSRLAPSRCKMGSRPSTKNPAP | 28 |
| 4 | 102 | 111 | ANSIDGRPLA | 10 |
| 5 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 6 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 7 | 167 | 167 | P | 1 |
| 8 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 9 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 10 | 205 | 209 | AAQIT | 5 |
| 11 | 217 | 221 | AKQNA | 5 |

3.4. Prediksi Epitop Sel B Protein F Virus ND

Hasil prediksi epitop protein yang didapat berupa fragmen-fragmen peptida disertai posisinya dan sekuen untuk tiap fragmen peptida yang diberikan berdasarkan afinitas epitop terhadap sel B pada protein F dapat dilihat pada tabel di bawah.

Pendekatan bioinformatik yang dilakukan untuk mengetahui prediksi epitop melalui program ini menyatakan terdapat 11 kandidat epitop sel B pada protein F dari strain LaSota (JF950510.1), 11 kandidat epitop sel B pada protein F dari isolat positif Lasota,

Tabel 8: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino Isolat ND1/2003.

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|------------------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLEKGHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 37 | AHSPRSSH | 8 |
| 3 | 58 | 85 | TRVEDSGSRLAPSRCKMGSRPSTKNPAP | 28 |
| 4 | 102 | 111 | ANSIDGRPLA | 10 |
| 5 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 6 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 7 | 167 | 167 | P | 1 |
| 8 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 9 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 10 | 203 | 210 | ATAEQITA | 8 |
| 11 | 219 | 220 | QN | 2 |

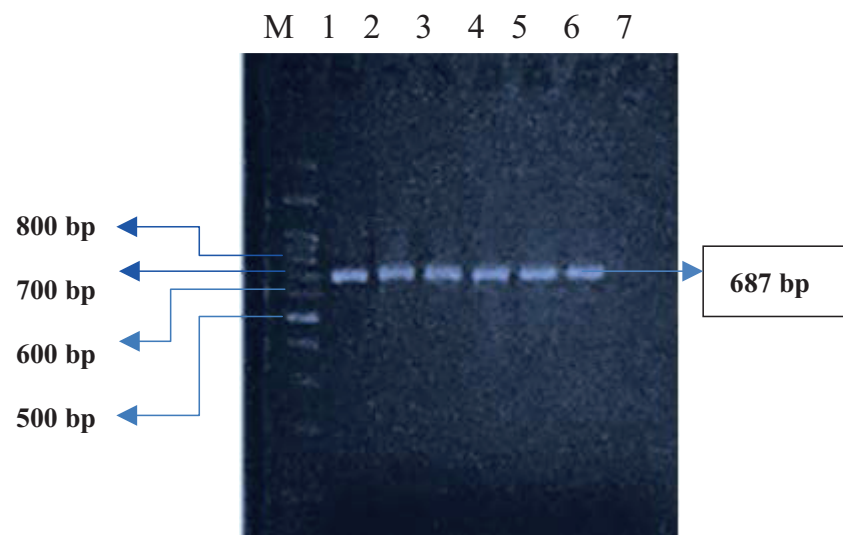
Tabel 9: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino Isolat ND3/2003.

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|-----------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLEKGHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 38 | AHSPRSSHQ | 9 |
| 3 | 58 | 67 | TRVEDSGSRL | 10 |
| 4 | 73 | 85 | KMGSRPSTKNPAP | 13 |
| 5 | 101 | 111 | PANSIDGRPLA | 11 |
| 6 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 7 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 8 | 167 | 167 | P | 1 |
| 9 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 10 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 11 | 205 | 209 | AAQIT | 5 |
| 12 | 215 | 221 | IQAKQNA | 7 |

11 kandidat epitop sel B pada protein F dari SBY1/2016, 11 kandidat epitop sel B pada protein F dari SBY2/2016, 11 kandidat epitop sel B pada protein F dari ND1/2003, 12 kandidat epitop sel B pada protein F dari ND3/2003 dan 11 kandidat epitop sel B pada protein F dari ND9/2003.

Tabel 10: Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino Isolat ND9/2003.

| No. | Start | End | Peptide | Panjang |
|-----|-------|-----|------------------------------|---------|
| 1 | 1 | 21 | EVTSTKLEKGHTLAKYNPFKK | 21 |
| 2 | 30 | 37 | AHSPRSSH | 8 |
| 3 | 58 | 85 | TRVEDSGSRLAPSRCKMGSRPSTKNPAP | 28 |
| 4 | 102 | 111 | ANSIDGRPLA | 10 |
| 5 | 116 | 132 | VVTGDKAVNIYTSSQTG | 17 |
| 6 | 141 | 159 | NLPKDKEACAKAPLDAYNR | 19 |
| 7 | 167 | 167 | P | 1 |
| 8 | 169 | 174 | GDSIRR | 6 |
| 9 | 177 | 189 | ESVTTSGGGRQGR | 13 |
| 10 | 205 | 209 | AAQIT | 5 |
| 11 | 217 | 221 | AKQNA | 5 |



Gambar 1: Hasil Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis Produk PCR dengan 1,0% Agarose. Kolom M adalah marker DNA ladder 100 bp, kolom 1 sampel ND1, kolom 2 sampel ND3, kolom 3 sampel ND9, kolom 4 sampel SBY1, kolom 5 sampel SBY2, kolom 6 sampel isolat positif LaSota, kolom 7 adalah kontrol negatif ND. Hasil elektroforesis virus ND terlihat pada gambar 1. menunjukkan hasil positif dengan terlihat adanya fragmen DNA sebesar 687 bp hal ini menunjukkan bahwa kelima sampel yang diuji adalah positif virus ND sesuai dengan kontrol positif yang digunakan.

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa berdasarkan hasil analisis *cleavage site* asam amino protein F, sampel dari Surabaya merupakan virus ND patotipe lentogenik dan hasil prediksi epitop imunogen protein F virus ND menunjukkan sampel ND3/2003 lebih berpeluang sebagai kandidat imunogen

yaitu memiliki 12 kandidat epitop sel B pada protein F, dibandingkan sampel SBY1, SBY2, ND1 dan ND9, yang memiliki 11 kandidat epitop imunogen sel B pada protein F.

Daftar Pustaka

- [1] de Leeuw, O.S., G. Koch., L. Hartog., N. Ravenshorst and B.P. Peeters. 2005. Virulence of Newcastle Disease Virus is Determined by the Cleavage Site of the Fusion Protein and by both the Stem Region and Globular Head of the Haemagglutinin-Neuraminidase Protein. *The Journal of General Virology*. 86: 1759-1769.
- [2] Guerra, R.E.S., R.N. Gomez., D.O.G. Alonso and S.R. Mendoza. 2015. An Overview of Bioinformatics Tools for Epitope Prediction: Implications on Vaccine Development. *Mexico. Journal of Biomedical Informatics* 405-414.
- [3] Kencana, G. A. Y., I Made, K., dan I Gusti, N. K. M. 2012. Peneguhan Diagnosis Penyakit Newcastle Disease Lapang pada Ayam Buras di Bali Menggunakan Teknik RT-PCR. *Fakultas Kedokteran Hewan Udayana. Denpasar. Bali*.
- [4] Meulemans, G., T.P. Van der Berg., M. Decaesstacker and M. Boschmans. 2002. Evolution of Pigeons Newcastle Disease Virus Strains. *Avian Pathology*. 2002 Oct;31(5): 515-519.
- [5] Miller P.J., C.L. Afonso., J.E. Attrache., K.M. Dorsey., S.C. Courtney., Z. Guo and D.R. Kapczynski. 2013. Effects of Newcastle Disease Virus Vaccine Antibodies on the Shedding and Transmission of Challenge Viruses. *Developmental and Comparative Immunology* 41: 505-513.
- [6] OIE (Office International des Epizooties). 2012. Newcastle Disease. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.3.14.
- [7] Rantam, F. A. 2008. *Immunologi Molekuler*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- [8] Samal, S.K. 2012. Role of Fusion Protein in Newcastle Disease Virus Pathogenesis. *Faculty of the Graduate School of the University of Maryland. University of Maryland*.
- [9] Tizard, I.R. 1987. *Pengantar Immunologi Veteriner*. AUP
- [10] Samal, S.K. 2011. Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses, In Samal SK, editor. (ed), *The biology of paramyxoviruses*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. 69-114.
- [11] Wibawan, I.W.T., D.S. Retno., C.S. Damayanti dan T.B. Tauffani. 2003. *Diktat Immunologi*. Bogor. FKH-IPB.

- [12] Wibowo, M. H., W. Asmara dan C. R. Tabbu. 2006. Isolasi dan Identifikasi Serologis virus Avian Influenza dari Sampel Unggas yang Diperoleh di Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jawa Tengah. *J Sain Vet*, Vol.24 No.1: 77-83.
- [13] Yuliana, I.K.W., G.A.Y. Kencana dan I.N. Suartha. 2015. Seroprevalensi penyakit tetelo pada Peternakan Itik dan Pasar Galiran di Kabupaten Klungkung, Bali. *Jurnal Veteriner*, Vol.16 No.3: 383-388.