

## **Virulensi Virus Newcastle Disease Isolat Lapang Berdasarkan Analisis Bioinformatika Gen Protein Hemagglutinin - Neuraminidase**

### *Virulence of Field Isolates of Newcastle Disease Virus Based on Bioinformatic Analysis of Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Genes*

**Fedry Rell<sup>1</sup>, Anak Agung Mirah Adi<sup>2</sup>, I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>1,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler FKH-Unud, Denpasar

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi Veteriner FKH-Unud, Denpasar

<sup>3</sup>Direktur *Indonesian Biodiversity Research Center* Unud, Denpasar

\*Corresponding author: gnmahardika@gmail.com

#### **ABSTRACT**

Newcastle disease virus (NDV) is very contagious disease agent, and causes many outbreaks trough out the country of Indonesia. This study was conducted to determine the virulence of Bali field isolate of NDV based on haemagglutinin-neuraminidase (HN) protein genes. Four field isolates from different locations were propagated at fertilized chicken eggs of 9 days old. Allantoic fluid was harvested and NDV was confirmed using standard haemagglutination (HA) and haemagglutination inhibition test (HI) methods. The fragment of HN protein gene was amplified using RT-PCR. The product was sequenced using Big-Dye termination method. All four isolates grew well with the titer of  $2^5$ - $2^9$  HA unit and could be confirmed using HI test. The HN genes, however, exhibited variations at its 3-D structure and hydrophobicity between the virus that previously circulated in Indonesia and vaccine virus. It is concluded that all four Bali's isolates under this study are virulent VND of the genotype VII. Further testing is needed to justify the best formula of NDV vaccine to be used trough out Indonesia.

Key words : Newcastle disease virus, genotype VII, HA, HI, RT-PCR, vaccine

#### **ABSTRAK**

Virus *Newcastle disease* (VND) merupakan agen penyakit yang sangat kontagius dan setiap tahun mewabah pada beberapa peternakan unggas di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan virulensi VND isolat lapangan secara molekuler berdasarkan gen penyandi protein hemagglutinin-neuraminidase. Empat isolat VND yang berasal dari lokasi berbeda diperbanyak pada telur ayam bertunas (TAB) umur 9 hari melalui ruang allantois. Cairan alantois dipanen dan dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi (HA) baku. Konfirmasi dilakukan dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI) baku. Fragmen gen protein HN diamplifikasi dengan RT-PCR. Hasil RT-PCR divisualisasikan pada gel agarosa 1% dan disekuensing dengan *Big-Dye termination method*. Hasil uji HA keempat isolat VND memiliki titer kisaran  $2^5$ - $2^9$  dan dapat dikonfirmasi dalam uji HI. Analisis sekuen asam amino protein HN menunjukkan variasi dalam struktur tiga dimensi dan hidrofobisitas antar VND yang pernah bersirkulasi di Indonesia dan virus vaksin. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa 4 isolat VND adalah virulen dengan genotype VII. Uji lanjutan perlu dilakukan untuk mendapatkan formulasi vaksin terbaik yang dapat digunakan di seluruh Indonesia.

Kata kunci : virus *Newcastle disease*, genotype VII, HA, HI, RT-PCR, vaksin

#### **PENDAHULUAN**

*Newcastle disease* (ND) merupakan penyakit virus yang sangat kontagius yang menyebabkan penurunan produksi dan kerugian ekonomi pada peternakan ayam (Alexander, 2000; Dortmans, 2011). Penyakit

ND bersifat endemik di Indonesia dan ditemukan di berbagai daerah (Saepulloh dan Darminto, 2005). Sejauh ini penanggulangan wabah ND dilakukan dengan program vaksinasi namun sampai sekarang wabah ND tetap menjadi masalah yang serius di industri peternakan ayam (ADHPI, 2011; Xiao *et al.*,

2012). Sesuai dampak yang ditimbulkan maka *Newcastle disease* merupakan salah satu penyakit unggas yang termasuk daftar A oleh *Office International des Epizooties* (OIE) (Alexander, 2000).

Penyakit ND disebabkan oleh virus *Newcastle disease* (VND) yang disebut *Avian paramyxovirus serotype 1* (APMV-1), genus *Avulavirus*, famili *Paramyxoviridae* (OIE, 2012). Genom virus ND tersusun atas RNA berserat tunggal, polaritas negatif dengan panjang  $\pm 15.200$  nukleotida (nt). Genom itu menyandi 6 protein struktural, yaitu nukleoprotein (NP), *phosphoprotein* (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), *hemagglutinin-neuraminidase protein* (HN) dan *large polymerase* (L) (Alexander, 1987; 2000). Selain protein struktural diatas, terdapat dua protein non struktural yang disandi oleh gen P, yaitu protein V dan M (Yusoff dan Tan, 2001).

*Avian paramyxovirus serotype 1* menginfeksi sebagian besar spesies unggas, namun ayam merupakan spesies yang paling peka. Berdasarkan virulensi VND dalam membunuh ayam dan telur ayam bertunas, virus ini dikelompokkan menjadi lima sub tipe yaitu : 1) tipe velogenik viscerotropik adalah tipe VND yang menyebabkan kematian akut dengan perdarahan pada saluran pencernaan dan banyak ditemukan di Asia; 2) tipe velogenik neurotropik yang menimbulkan gangguan pernapasan dan saraf dengan tingkat kematian yang tinggi pada kebanyakan unggas di Amerika; 3) tipe mesogenik yang menimbulkan gangguan pernapasan dan saraf dengan mortalitas rendah; 4) tipe lentogenik yang menimbulkan penyakit ringan dengan gangguan pernapasan; 5) tipe asimptomatik enterik yang bereplikasi pada saluran pencernaan namun tidak menimbulkan kematian (Alexander, 1987; 2000). Umumnya, virulensi VND ditentukan dengan uji patogenesis menggunakan *mean death time* (MDT), *intravenous pathogenicity index* (IVPI), dan *Intracerebral pathogenicity index* (ICPI) (OIE, 2004; Dortmans *et al.*, 2011). Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan bioteknologi, virulensi VND dapat ditentukan secara molekuler

berdasarkan sekuen gen penyandi protein F dan HN menggunakan *software* yang tersedia (Ke *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

Infeksi APMV-1 sampai sekarang masih sulit diberantas. Vaksinasi merupakan upaya pencegahan paling utama dari infeksi virus ND. Vaksin virus ND dapat berasal dari tipe velogenik, mesogenik, dan lentogenik. Umumnya, vaksin yang banyak beredar di Indonesia dibuat dari tipe letogenik, yaitu virus La Sota dan Hitchner B1 asal Amerika, dan tipe asimptomatik enterik, yaitu virus ND Ulster dan PHY-LMV asal Eropa. Jauhnya jarak genetik dengan virus lokal akan berkorelasi pada tingkat protektifitas dari hasil vaksinasi dan menjadi sebab merebaknya wabah ND walaupun program vaksinasi lengkap dan berulang telah dilakukan (ADHPI, 2011).

Protein HN pada amplop VND berperan penting dalam proses infeksi sekaligus sebagai penentu virulensi serta merangsang pembentukan antibodi protektifitas pasca vaksinasi (Mahon *et al.*, 2008). Protein HN terdiri atas HA yang berperan dalam perlekatan pertikel virus dengan reseptor pada sel target dan NA yang berperan dalam pelepasan virus dari sel terinfeksi. Selain itu, protein HN juga berperan sebagai promoter aktivasi protein F (McGinnes dan Morrison, 2006; Takimoto *et al.*, 2000).

Gen penyandi protein HN tersusun  $\pm 2031$  nt yang memiliki *open reading frame* (ORF) yang menyandi beberapa asam amino. Sekuen asam amino protein HN terdiri dari domain – domain penting, seperti posisi pengikat reseptor (*receptor binding*), posisi glikosilasi (*N-linked glycosylation*), posisi antigenik (*antigenic sites*), transmembran domain, posisi *C-terminal extension*, dan epitop sel B (Ponnusamy *et al.*, 2009). Posisi antigenik dan epitop sel B berperan untuk mengenali sistem imun hospes yang berkontribusi dalam menentukan keberhasilan pasca vaksinasi. Transmembran domain bersifat hidrofobik berperan dalam perlekatan protein HN. Posisi *C-terminus extension* berperan menentukan panjang asam amino protein HN (Yusoff dan Tan, 2001). Panjang asam amino protein HN dapat dipakai dalam

pengelompokan virus ND. Virus ND virulen memiliki panjang *C-terminus extension* pada posisi asam amino 571 (Oberdorfer *et al.*, 2003). Homologi protein HN virus vaksin dengan virus lapang akan sangat berkontribusi terhadap keberhasilan vaksinasi. Penelitian ini ditujukan untuk menentukan virulensi virus ND isolat lapangan yang menimbulkan wabah di beberapa lokasi dan waktu di Bali dengan melihat variasi gen protein HN.

## MATERI DAN METODE

### Rancangan Penelitian

Jenis rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif observasional. Sekuen asam amino protein HN VND isolat lapang dianalisis untuk mengetahui virulensi VND secara molekuler, struktur 3-dimensi, hidrofobitas dan hubungan genetiknya dengan data sekunder yang di akses dari *GenBank*.

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, pada bulan Desember 2013 sampai dengan Agustus 2014.

### Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah virus *Newcastle disease* isolat lapang dari beberapa tempat di pulau Bali pada tahun 2013 – 2014. Sebanyak empat VND yang diobservasi dalam penelitian ini yaitu *VND/ayam/lokal/Badung/Bali/2014*, *VND/ayam/ras/Klungkung/Bali/2014*, *VND/ayam/ras/Tabanan1/Bali/2014*, dan *VND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014*.

### Teknik Pengambilan Sampel

Cara pengambilan sampel menggunakan teknik *purposive sampling* yaitu mengambil sampel berdasarkan kejadian wabah ND pada suatu tempat.

### Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah sekuen nukleotida gen penyandi protein HN.

Sekuen gen penyandi protein HN dianalisis untuk menentukan virulensi VND secara molekuler dan filogenetik dengan isolat dari data sekunder serta struktur 3-dimensi dan hidrofobitasnya. Data lainnya adalah data sekunder berupa sekuen nukleotida gen penyandi fragmen protein HN pada posisi asam amino 6418-8133 dari Negara lain dan virus vaksin yang diakses dari *GeneBank*.

## Prosedur Penelitian

### Sampel virus *Newcastle Disease*

Sebanyak empat sampel VND isolat lapang yang diisolasi dari kasus ND pada beberapa tempat di pulau Bali. Keempat VND isolat lapang yaitu *VND/ayam/lokal/Badung/Bali/2013* yang diisolasi dari kasus ND pada peternakan ayam lokal di Kabupaten Badung pada bulan Desember 2013, *VND/ayam/ras/Klungkung/Bali/2014* yang diisolasi dari kasus ND pada peternakan ayam broiler di Kabupaten Klungkung pada bulan Januari 2014, *VND/ayam/ras/Tabanan1/Bali/2014* yang diisolasi dari kasus ND pada peternakan ayam broiler di Kabupaten Tabanan pada bulan Maret 2013, dan *VND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014* yang diisolasi dari wabah ND pada peternakan ayam di Desa Payangan Kabupaten Tabanan pada bulan Mei 2014. Keempat sampel tersebut disimpan di Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

### Propagasi Virus *Newcastle Disease*

Keempat sampel VND isolat lapang dipropagasi pada telur ayam bertunas (TAB) umur 9-10 hari melalui ruang alantois (*allantoic cavity*). Propagasi pada TAB diawali dengan pengamatan telur (*candling*) untuk mengetahui keadaan embrio. Kemudian virus ND isolat lapangan diinjeksikan ke dalam ruang alantois sebanyak 0,1-0,2 ml/butir telur dengan menggunakan *tuberculin syringe*. Lubang bekas tusukan pada cangkang ditutup dan selanjutnya TAB diinkubasikan pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 4 hari. Selanjutnya cairan alantois

dipanen dari telur embrio yang mati dan dilanjutkan dengan uji serologi dan RT-PCR.

### **Uji Hemaglutinasi**

Uji hemaglutinasi (HA) adalah salah satu uji serologi untuk mengetahui adanya virus yang menghemaglutinasi sel darah merah (SDM). Sampel yang positif ditandai dengan adanya *aggregate* SDM seperti pasir pada dasar sumuran mikroplat (Kencana *et al.*, 2012). Uji HA dari keempat sampel VND isolat lapang mengacu pada prosedur standar dari OIE (2004) yang telah dimodifikasi oleh Kencana *et al.* (2012). Uji HA dilakukan dengan cara : menyiapkan mikroplat steril kemudian pada masing-masing lubang (1 – 12) ditambahkan dengan 25 µl NaCl 0,9%. Selanjutnya pada lubang pertama dan kedua ditambahkan antigen VND sebanyak 25 µl dan selanjutnya diencerkan berseri kelipatan dua mulai dari lubang kedua sampai lubang kesebelas dengan menggunakan pengencer mikro. Tambahkan NaCl 0,9% sebanyak 25 µl pada semua lubang (1 – 12). Kemudian ditambahkan ke dalam setiap lubang 50 µl suspensi sel darah merah ayam konsentrasi 1% kemudian diayak selama 30 detik. Selanjutnya dieramkan pada suhu kamar selama 1 jam dan reaksi diamati setiap 15 menit ada atau tidaknya reaksi hemaaglutinasi sel darah merah.

### **Uji Rapid Hambatan Hemaglutinasi**

Uji *rapid* hambatan hemaglutinasi (HI) adalah uji cepat untuk mengetahui adanya hambatan hemaglutinasi virus oleh serum VND. Sampel yang positif ditandai dengan adanya gumpalan SDM pada dasar sumuran mikroplat. Rapid HI dilakukan dengan cara: menyiapkan mikroplat steril kemudian pada masing – masing lubang (1-12) ditambahkan 25 µl NaCl 0,9%. Lubang pertama sampai kesepuluh ditambahkan serum VND. Selanjutnya ditambahkan antigen sebanyak 4 unit HA pada lubang pertama sampai kesebelas. Kemudian dieramkan pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu, sebanyak 50 µl suspensi sel darah merah ayam konsentrasi 1% ditambahkan pada semua lubang dan diayak kembali selama 30 detik.

Selanjutnya dieramkan pada suhu kamar selama 1 jam dan diamati setiap 15 menit ada tidaknya aglutinasi sel darah merah (Kencana *et al.*, 2012).

### **Isolasi RNA Virus Newcastle Disease**

Sebanyak 250 µl sampel dalam tabung eppendorf ditambahkan dengan 750 µl *Trizol LS Reagent* (Invitrogen). Campuran divorteks selama 1 menit kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 200 µl, lalu divorteks selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Campuran selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rcf selama 15 menit. Bagian aqueus dipindahkan ke dalam tabung eppendorf steril dan ditambahkan isopropil alkohol sebanyak 500 µl. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rcf selama 10 menit. Supernatan dibuang, lalu ditambahkan alkohol 70% sebanyak 1000 µl. Kemudian larutan disentrifuse dengan kecepatan 7.500 rcf selama 5 menit. Supernatan dibuang dan peletnya di *air dry* di inkubator selama 5-10 menit. Setelah peletnya agak mengering, lalu ditambahkan 20 µl *treated water*. Kemudian disimpan dalam *freezer* sampai digunakan.

### **Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction dan Elektroforesis**

RNA VND yang telah diisolasi dengan menggunakan protokol *Trizol* dilanjutkan dengan teknik transkripsi balik dan diamplifikasi menggunakan *reverse transcriptase – polymerase chain reaction* (RT-PCR) standar dengan tiga pasang primer yang mengamplifikasi daerah protein HN pada posisi nukleotida 6418-8133. Informasi ketiga pasang primer dapat dilihat pada Tabel 1.

Teknik RT-PCR dilakukan dengan cara: tabung eppendorf diisi dengan R-mix (dNTP, MgSO<sub>4</sub> dan buffer) sebanyak 5 µl, primer depan dan primer belakang sebanyak 0,6 µl, enzim *SuperScript™ III onestep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) 0,25 µl, aquabides 2,55 µl dan RNA virus sebanyak 1 µl. Tabung eppendorf

kemudian dimasukkan dalam mesin *thermocycler* dan diprogram sebagai berikut: *reverse* RNA menjadi cDNA pada suhu 50°C selama 1 jam, *pre-denaturasi* pada suhu 95°C selama 7 menit dan *denaturasi* 94°C selama 45 detik. Selanjutnya proses *annealing* pada suhu 52°C selama 45 detik dan tahap *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap *denaturasi*, *annealing*, dan *extension* diulangi sampai 39 kali. Terakhir tahap penyempurnaan kerja enzim pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah tahapan penyempurnaan selesai mesin *thermocycler* kembali pada suhu 22°C (Kencana *et al.*, 2012). Produk RT-PCR disimpan ke dalam *freezer* sebelum dielektroforesis.

Tabel 1. Sekuen basa primer untuk untuk mengamplifikasi gen penyandi protein HN se besaran produk PCR yang diharapkan.

No Primer	Sekuen basa	Produk
1 <sup>b</sup> HN61F	TGCTAYMTRATGTAYAARCARAAGGC	966 bp
HN700B	CTAAATTGATGGAACGAGAGTAG	
2 <sup>b</sup> NDVFF	GTTGCACTCGGATACCCAT	700 bp
NDVFB	ACTTCTGTACCAACGAGGGTC	
3 <sup>b</sup> HN1100F	CCATCTTATCTATCGAAGTGC	823 bp
HN83B	GGACCGAGCCGCCATGTCCTACCCGT	

Ket. <sup>b</sup>Peneliti

Hasil RT-PCR dari keempat VND isolat lapang kemudian dilanjutkan dengan elektroforesis dengan cara sebagai berikut: sebanyak 3 ul produk RT-PCR yang ditambahkan dengan *blue juice* (*bromphenol-blue* dan *cyline cyanol*) sebanyak 1 µl yang dielektroforesis pada gel agarose 1% yang telah dicampur dengan *etidium bromide* pada mesin elektroforesis dengan tegangan 100 V (Volt) selama 30 menit. Hasil uji divisualisasikan dengan sinar ultraviolet dan didokumentasikan dengan kamera (Kencana *et al.*, 2012).

**Sekuensing dan Analisis Materi Genetik**

Produk RT-PCR dikirim ke *Berkeley Sequencing Facility, University of California, USA* untuk disekuensing. Runutan nukleotida hasil sekuensing VND isolat lapang dan turunan asam aminonya disepadankan dan dibandingkan dengan sekuen virus ND pada vaksin dan isolat dari Negara lain yang diakses dari *GeneBank* dengan *Clustal W Method* dari *Mega5*. Dilanjutkan dengan

analisis jarak genetik menggunakan *Pairwise Distance Method* dan filogenetik menggunakan *Phylogeny Construct/test Neighbor-Joining Tree Method* dengan substitusi nukleotida menggunakan *Kimura 2-parameter model* dari *Mega5* (Tamura *et al.*, 2011).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

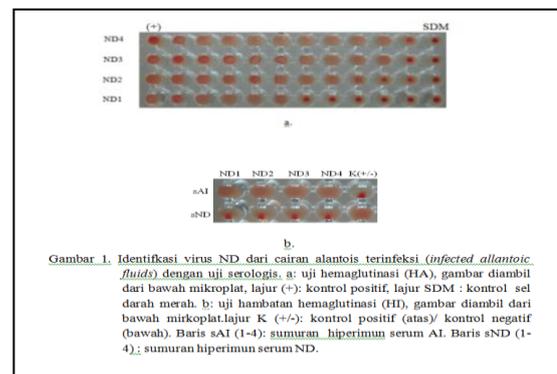
**Isolasi dan Propagasi Virus Newcastle Disease**

Uji HA dari keempat sampel VND menunjukkan reaksi positif (Gambar 1a) dengan titer kisaran 2<sup>5</sup> - 2<sup>9</sup> (Tabel 2). Uji *Rapid HI* menunjukkan reaksi positif bahwa keempat sampel merupakan virus ND karena tidak terjadi hemaglutinasi pada sumuran mikroplat yang berisi hiperimun serum ND (Gambar 1b).

Tabel 2. Hasil uji hemaglutinasi terhadap keempat sampel VND pada sel darah merah ayam.

No	Isolat	Kode	Titer HA
1	VND/ayam/lokal/Badung/Bali/2013	ND1	2 <sup>5</sup>
2	VND/ayam/ras/Klungkung/Bali/2014	ND2	2 <sup>7</sup>
3	VND/ayam/ras/Tabanan1/Bali/2014	ND3	2 <sup>9</sup>
4	VND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014	ND4	2 <sup>9</sup>

Ket. Semua embrio TAB mati pada hari kedua pasca inokulasi.



Gambar 1. Identifikasi virus ND dari cairan alantois terinfeksi (*infected allantoic fluids*) dengan uji serologis, a: uji hemaglutinasi (HA), gambar diambil dari bawah mikroplat, lajur (+); kontrol positif, lajur SDM : kontrol sel darah merah. b: uji hambatan hemaglutinasi (HI), gambar diambil dari bawah mikropelat.lajur K (+/-): kontrol positif (atas)/ kontrol negatif (bawah). Baris sAI (1-4): sumuran hiperimun serum AI. Baris sND (1-4): sumuran hiperimun serum ND.

**Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction dan Elektroforesis**

Setelah diidentifikasi dengan uji serologis dilanjutkan dengan isolasi RNA virus dan diuji dengan RT-PCR *one step* menggunakan tiga pasang primer yang menangkap gen penyandi protein HN. Identifikasi gen penyandi protein HN menggunakan pasangan primer HN61F dan HN700B untuk mengamplifikasi daerah

pertemuan dengan gen protein F, pasangan primer NDVFF dan NDVFB dipakai untuk mengamplifikasi daerah tengah gen protein HN, dan pasangan primer HN1100F dan HN83B dipakai untuk mengamplifikasi gen HN daerah pertemuan dengan gen penyandi protein L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat isolat positif VND (Gambar 2).

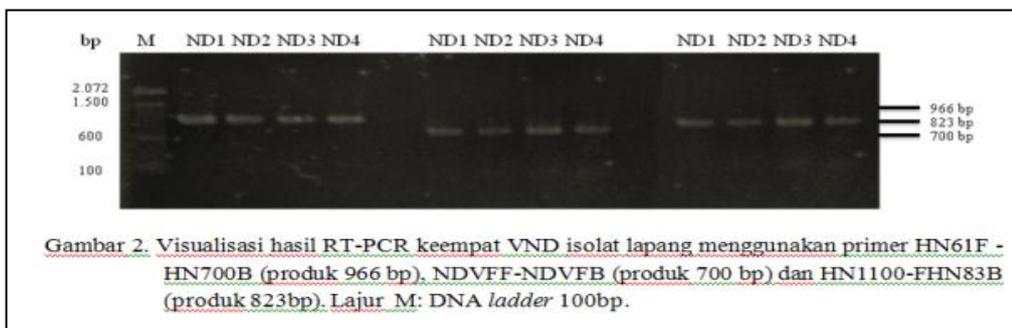
**Sekuen Asam Amino Protein Hemaglutinin-Neuraminidase**

Hasil analisis sekuen gen penyandi protein HN dari keempat VND isolat lapang menunjukkan daerah yang variabel terdapat pada posisi asam amino 1-80. Terdapat 13 residu *cysteine* berada pada asam amino 123, 172, 186, 196, 238, 247, 251, 344, 455, 461, 465, 531, dan 542. Tiga residu asam amino pada posisi 411 (E), 416 (R), dan 526 (Y) pada protein HN ditemukan pada sekuen asam amino protein HN VND isolat lapang. Residu glikosilasi (NxT/NxS) terdapat pada asam amino 119, 341, 433, 481, dan 538 kecuali pada isolat ND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014. Kehilangan residu glikosilasi pada asam amino 119. Residu *Arginine* pada asam amino 174, 416, 498, dan 516 ditemukan pada

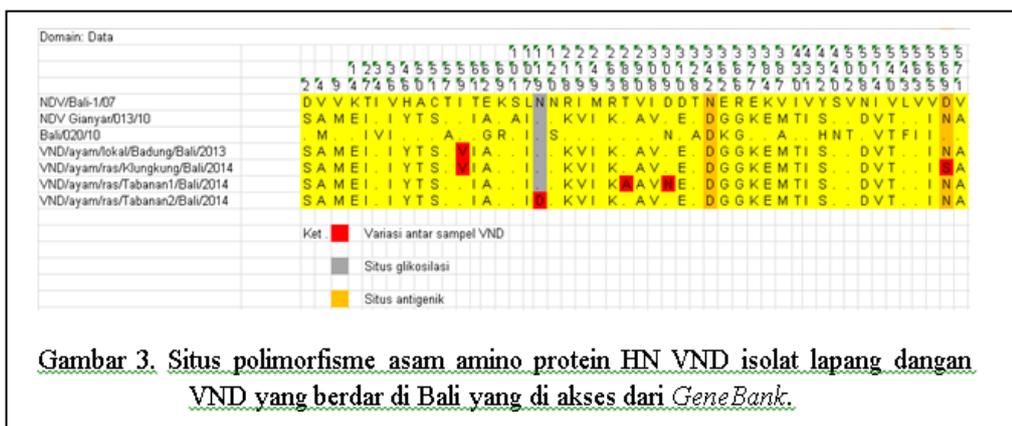
ke empat VND isolat lapang. Residu asam amino ujung *C-terminal* protein HN dari keempat VND isolat lapang yaitu 571.

**Polimorfisme Sekuen Asam Amino Protein Hemaglutinin-Neuraminidase**

Terdapat polimorfisme asam amino protein HN antar VND isolat lapang yaitu pada asam amino 59 (I/V), 119 (N/D), 288 (T/A), 309 (D/N) dan 569 (N/S). Jumlah situs polimorfisme asam amino protein HN antar VND yang pernah beredar di Bali terdapat sebanyak 48 situs (Gambar 3). Analisis pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen penyandi protein HN menunjukkan bahwa VND yang pernah beredar di Bali berbeda kluster dengan virus LaSota. Sama hal dengan VND yang pernah beredar di Bali terbagi menjadi dua kluster besar. Keempat VND isolat lapang (garis tebal) satu kluster dengan isolat Gianyar/013/10, Sragen/10, Banjarmasin/10, Kudus/10 dan isolat dari Pakistan/2011. Sedangkan NDV/Bali-1/07 dan Bali/020/10 juga terdapat satu kluster yang terpisah dengan keempat VND isolat lapang (Gambar4).



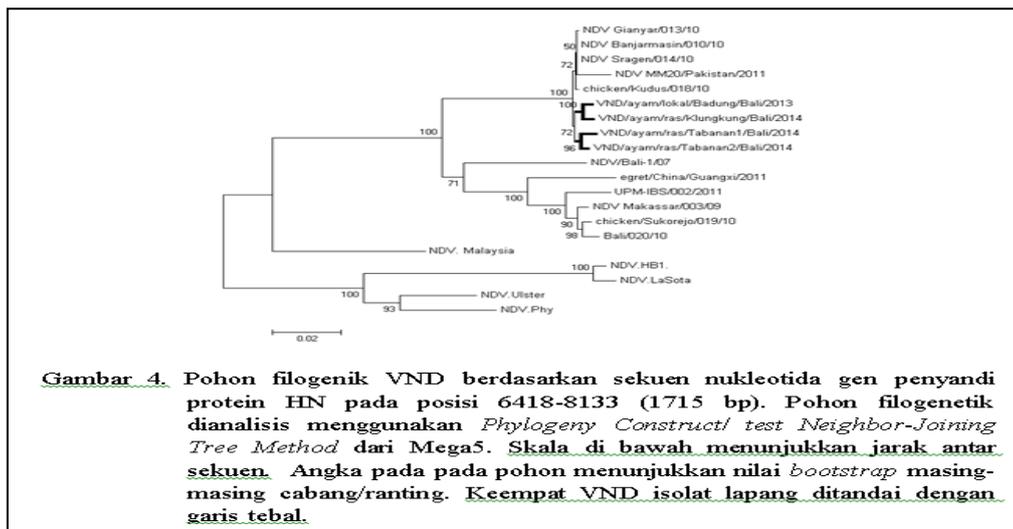
Gambar 2. Visualisasi hasil RT-PCR keempat VND isolat lapang menggunakan primer HN61F - HN700B (produk 966 bp), NDVFF-NDVFB (produk 700 bp) dan HN1100-FHN83B (produk 823bp). Lajur M: DNA ladder 100bp.



Gambar 3. Situs polimorfisme asam amino protein HN VND isolat lapang dengan VND yang beredar di Bali yang di akses dari GeneBank.

Hasil analisis jarak genetik berdasarkan sekuen asam amino protein HN menunjukkan jarak genetik VND yang pernah beredar di Bali dengan virus vaksin cukup jauh (Tabel 3) dengan kisaran 18 – 22%. Sedangkan jarak genetiknya dengan virus NDV-La Sota berkisar 21-22% (kolom yang berwarna

hitam). Jarak genetik yang satu kluster dengan keempat VND isolat lapang berkisar 0 - 1% (kolom yang berwarna merah). Sedangkan jarak genetik keempat VND isolat lapang dengan virus ND lain di Indonesia yang berbeda kluster berkisar 8 – 9% (kolom berwarna kuning).



**Gambar 4.** Pohon filogenik VND berdasarkan sekuen nukleotida gen penyandi protein HN pada posisi 6418-8133 (1715 bp). Pohon filogenetik dianalisis menggunakan *Phylogeny Construct/ test Neighbor-Joining Tree Method* dari *Mega5*. Skala di bawah menunjukkan jarak antar sekuen. Angka pada pada pohon menunjukkan nilai *bootstrap* masing-masing cabang/ranting. Keempat VND isolat lapang ditandai dengan garis tebal.

**Tabel 3.** Jarak genetik VND yang pernah beredar di pulau Bali dan dari beberapa tempat di Indonesia dengan virus vaksin yang di akses dari *GeneBank* menggunakan *Mega5*.

No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	NDV.Phy																
2	NDV.Ulster	5%															
3	NDV.LaSota	11%	11%														
4	NDV.HB1	11%	10%	1%													
5	Bali/020/10	19%	19%	22%	21%												
6	chicken/Sukorejo/019/10	19%	18%	22%	21%	1%											
7	NDV/Bali-1/07	19%	19%	23%	23%	7%	6%										
8	NDV_Makassar/003/09	19%	18%	21%	21%	1%	1%	6%									
9	NDV_MM20/Pakistan/2011	19%	18%	23%	22%	10%	9%	9%	9%								
10	NDV_Sragen/014/10	18%	17%	22%	22%	9%	8%	8%	8%	1%							
11	chicken/Kudus/018/10	18%	17%	22%	22%	9%	8%	8%	8%	1%	0%						
12	NDV_Gianyar/013/10	18%	17%	22%	22%	9%	8%	8%	8%	1%	0%	0%					
13	NDV_Banjarmasin/010/10	18%	17%	22%	22%	9%	8%	8%	8%	1%	0%	0%	0%				
14	VND/ayam/lokal/Badung/Bali/2013	18%	18%	22%	22%	9%	9%	8%	8%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
15	VND/ayam/ras/Klungkung/Bali/2014	18%	18%	22%	22%	9%	9%	8%	9%	1%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
16	VND/ayam/ras/Tabanan1/Bali/2014	18%	18%	22%	22%	9%	9%	8%	9%	1%	0%	1%	1%	0%	1%	1%	1%
17	VND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014	18%	18%	22%	22%	9%	9%	8%	9%	1%	0%	1%	1%	0%	1%	1%	0%

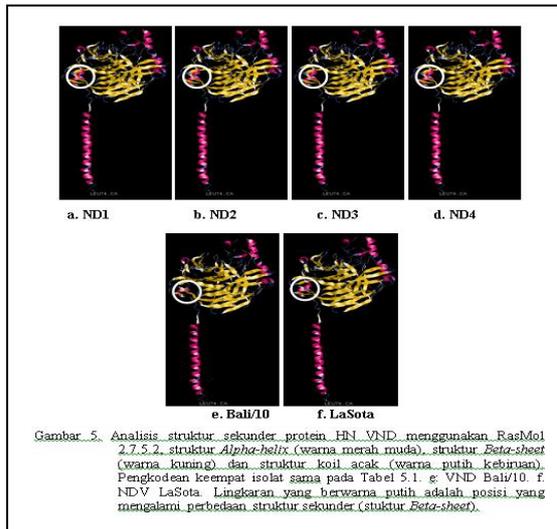
**Ket.** Kolom yang berwarna hitam : jarak genetik dengan virus Lasota, kolom berwarna kuning : jarak genetik dengan virus ND di Indonesia yang berbeda kluster, kolom berwarna merah : jarak genetik yang satu kluster dengan keempat isolat.

**Analisis Struktur Tiga Dimensi**

Hasil analisis stuktur sekunder protein HN keempat VND isolat lapang menunjukkan bahwa keempat isolat memiliki struktur yang sama. Struktur protein HN terbagi menjadi dua bagian utama yaitu bagian batang dan kepala yang berbentuk globular. Struktur protein HN ini terdiri dari: 1) struktur pilinan rantai asam-asam amino berbentuk seperti

spiral yang disebut struktur *alpha-helix*, 2) struktur lembaran-lembaran lebar yang tersusun dari sejumlah rantai asam amino yang disebut struktur *Beta-sheet*, dan 3) struktur seperti kawat yang disebut struktur koil acak (Gambar 5). Hasil perbandingan struktur sekunder dengan virus ND isolat Bali dan NDV LaSota ditemukan perbedaan struktur (lingkaran putih). Keempat isolat

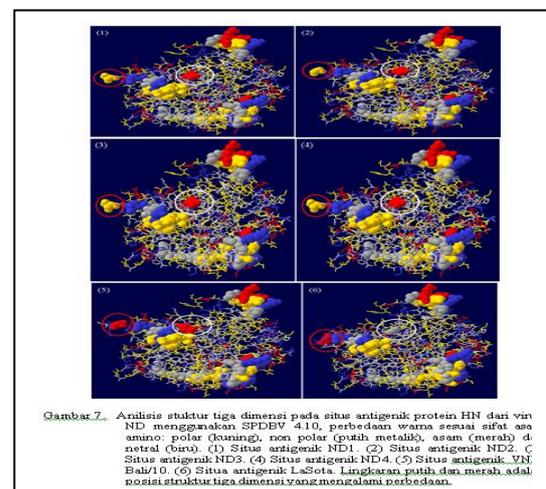
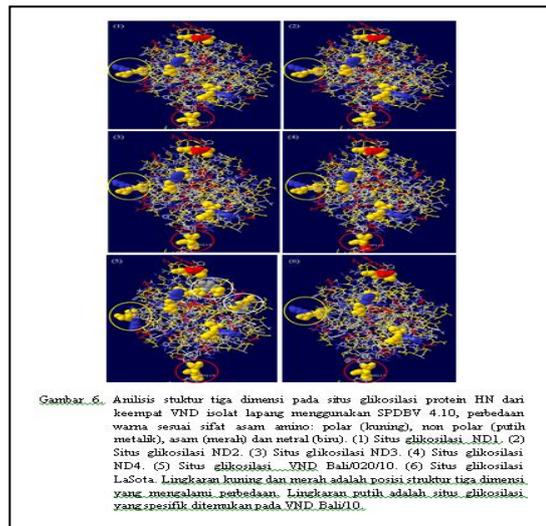
VND memiliki struktur sekunder yang sama dengan LaSota, sedangkan dengan isolat Bali/10 memiliki perbedaan. Perbedaan tersebut terletak pada posisi asam amino 156-158 yang membentuk struktur *Beta sheet* pada keempat isolat.



Hasil analisis struktur tiga dimensi pada situs glikosilasi protein HN antar keempat VND isolat lapang tidak menunjukkan perubahan struktur kecuali pada posisi asam amino 119 dari VND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014 (ND4) yang merupakan situs polimorfisme (N/D) antar keempat VND isolat lapang yang menunjukkan perubahan struktur dan sifat pada asam amino tersebut dimana terdapat perbedaan warna kuning menjadi merah. Sedangkan hasil analisis struktur tiga dimensi antara keempat VND isolat lapang dengan isolat Bali/020/10 dan virus LaSota menunjukkan perbedaan struktur pada situs glikosilasi pada posisi 433-435 (lingkaran kuning). Selain itu, struktur tiga dimensi isolat Bali/020/10 memiliki situs glikosilasi spesifik yang tidak ditemukan pada situs glikosilasi dari keempat VND isolat lapang dan LaSota (lingkaran putih) (Gambar 6).

Hasil analisis tiga dimensi situs antigenik protein HN antar keempat VND isolat lapang tidak menunjukkan perubahan struktur kecuali pada posisi asam amino 569 dari VND/ayam/ras/Klungkung/Bali/2014 (ND2) yang juga merupakan situs polimorfisme

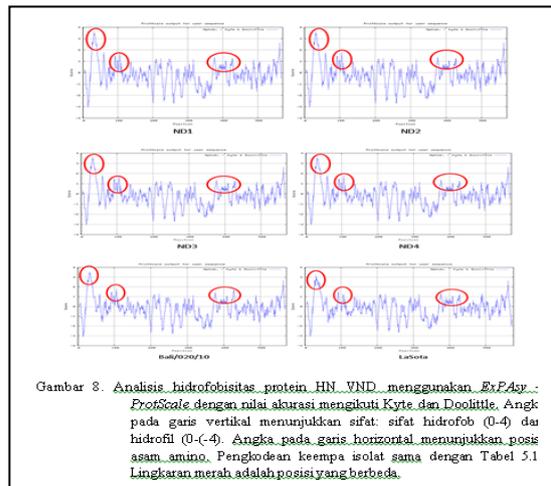
(N/S) antar keempat VND isolat lapang yang menunjukkan perubahan struktur asam amino pada situs tersebut (Gambar 7). Sedangkan hasil analisis struktur tiga dimensi situs antigenik protein HN antara keempat VND isolat lapang dengan isolat Bali/020/10 dan virus LaSota menunjukkan perbedaan struktur dan sifat dari asam aminonya. Situs antigenik yang mengalami perbedaan yaitu di posisi asam amino 494 (lingkaran putih) dan 569 (lingkaran merah).



**Analisis Hidrofobisitas**

Hasil analisis hidrofobisitas protein HN antar keempat VND isolat lapang menunjukkan tidak ada perbedaan. Namun, hasil analisis hidrofobisitas antara keempat VND isolat lapang dengan isolat Bali/020/10 dan virus LaSota menunjukkan perbedaan hidrofobisitas pada beberapa asam amino

seperti di posisi 1–300 dan 400–500 (Gambar 8).



## Pembahasan

Keempat isolat virus yang berhasil diisolasi dapat menghemaglutinasi SDM. Berdasarkan kemampuan menghemaglutinasi SDM unggas pada uji HA, keempat isolat dapat dikelompokkan virus golongan *Paramyxoviridae* (misal ND), *Orthomyxoviridae* (misal : AI), virus *Infectious Bronchitis* (IB) dan virus *Egg Drop Syndrome*'76 (EDS) (Miller dan Stanley, 1944; Kusmaedi, 2001). Pada uji HA titer dari keempat isolat berada dalam kisaran  $2^5$ - $2^9$  dengan waktu inokulasi dan panen yang tidak berbedah jauh (Tabel 2 dan Gambar 1a). Perbedaan titer dari keempat isolat dapat disebabkan oleh maternal antibodi embrio pada masing-masing pada TAB (Yeo *et al.*, 2003). Selain itu, virulensi virus ND mempengaruhi waktukematian embrio pada TAB dan titer virus (Khadzhiev, 1987; Absalón *et al.*, 2012). Identifikasi virus dilanjutkan dengan uji *Rapid HI* menggunakan hiperimun serum ND dan AI. Hambatan hemaglutinasi SDM terjadi pada sumuran mikroplat yang berisi hiperimun ND sedangkan pada sumuran yang berisi hiperimun AI hambatan hemaglutinasi tidak terjadi (Gambar 1b). Hambatan hemaglutinasi terjadi karena reaksi pengikatan hiperimun serum ND terhadap antigenik virus ND yaitu protein HN (Alexander, 2000; McGinnes dan Morrison, 2003). Sehingga

protein HN tidak dapat berikatan dengan asam sialat yang bertindak sebagai reseptor SDM. Protein HN adalah protein dalam VND yang berperan untuk berikatan dengan asam sialat sebagai reseptor SDM yang menyebabkan hemaglutinasi atau pada sel lain dalam memulai proses infeksi (Couceiro *et al.*, 1995; Panda, 2003).

Identifikasi virulensi dari keempat VND isolat lapang dilanjutkan dengan uji RT-PCR *one step* menggunakan pasangan primer FNDFP dan FNDBP dan produk RT-PCR disekuensing. Pasangan primer yang digunakan mengamplifikasi pada posisi nukleotida 4661-5016 yang merupakan daerah pemotongan (*cleavage site*) dengan produk 316 bp. Produk RT-PCR dielektroforesis pada gel agoresa 1% dan divisualisasikan dengan kamera digital menunjukkan hasil positif (hasil tidak dipublikasikan)

Gen penyandi protein HN VND yang multifungsional memiliki berat molekul 67.4 kDA (Yusoff *et al.*, 1996). Berdasarkan analisis sekuen asam amino protein HN dari keempat VND isolat lapang terdapat 13 residu *cysteine*. Residu *cysteine* 123 merupakan salah satu posisi asam amino yang variabel dengan virus La Sota (tryptophan/W) (data tidak dipublikasikan). *Cysteine* merupakan asam amino yang penting dalam interaksi ikatan disulfida intramolekul yang berperan dalam menstabilkan struktur protein HN VND (Takimoto *et al.*, 2000). Ponnusamy *et al.* (2009) menyatakan bahwa residu *cystine* posisi asam amino 123 merupakan spesifik ditemukan pada VND virulen. Namun, pernyataan tersebut tidak sesuai dengan hasil analisis yang diperoleh karena virus vaksin NDV-PHY dan NDV-Ulster juga memiliki residu *cysteine* pada posisi 123. Kemungkinan residu *cysteine* 123 mempengaruhi struktur fungsional protein HN tapi tidak berdiri sendiri karena asam amino lain juga berkontribusi.

Hasil perbandingan residu asam amino ujung *C-terminal* protein HN VND terdapat lima jenis panjang residu asam amino (data tidak dipublikasikan). Variasi panjang protein HN tersebut dipengaruhi oleh lokasi kodon *N-terminal* protein HN yang berbeda-beda pada

setiap tipe VND sehingga panjang asam amino yang diekspresikan oleh gen HN bervariasi (Adi dan Astawa, 2014). Panjang residu asam amino keempat VND isolat lapang adalah 571. Laporan penelitian Oberdorfer *et al.* (2003) menyatakan bahwa panjang residu asam amino 571 spesifik ditemukan pada VND yang sangat virulen. Namun berdasarkan perbandingan panjang residu asam amino *C-terminal* protein HN, VND avirulen juga memiliki panjang residu asam amino 571 seperti NDV. Strain Mukteswar, NDV.Herts/33, NDV. Italien, dan lain-lain. Hal serupa sama dengan laporan penelitian Ke *et al.* (2010) yang menunjukkan bahwa VND avirulen memiliki panjang residu asam amino *C-terminal* 571. Namun dapat dipastikan panjang residu asam amino ujung *C-terminal* protein HN VND turut serta mempengaruhi virulensi virus karena semua VND virulen hanya memiliki panjang protein HN yang sama yaitu 571.

Analisis situs polimorfisme asam amino protein HN menunjukkan bahwa keempat VND isolat lapang homogenus kecuali variasi di beberapa situs (Gambar 3). Variasi antar keempat VND isolat lapang terletak pada posisi 59 (V/I), 119 (N/D) dan 569 (N/S). Kedua posisi terakhir merupakan posisi penting yang mempengaruhi peran protein HN dalam perlekatan dan pelepasan virus dari sel terinfeksi. Posisi asam amino 119-121 yang memiliki residu asam amino *asparagine* (N) dan diakhiri *serine/ threonine* (S/T) merupakan daerah glikosilasi. Daerah glikosilasi pada protein HN berperan penting dalam afinitas terhadap reseptor pada sel target sehingga turut terlibat dalam mempengaruhi virulensi VND (Panda *et al.*, 2004). Posisi asam amino 569 merupakan daerah antigenik protein HN yang menginduksi antibodi netralisasi dari host (Iorio dan Bratt, 1984; Iorio *et al.*, 1991; Gong dan ZhiZhong, 2011).

Analisis pohon filogenetik juga menunjukkan bahwa VND yang pernah beredar di pulau Bali terpisah kluster dengan NDV (Gambar 4). La Sota. Selain itu, berdasarkan hasil analisis filogenetik kedua protein amplop diatas menunjukkan bahwa

pengelompokan kekerabatan VND selain menggunakan sekuen gen penyandi protein F juga dapat menggunakan sekuen gen penyandi protein HN.

Hasil analisis jarak genetik berdasarkan sekuen asam amino protein HN menunjukkan bahwa jarak genetik VND yang pernah beredar di pulau Bali dan dari beberapa tempat di Indonesia dengan virus vaksin cukup jauh (Gambar 5). Jarak genetik dengan virus vaksin kisaran 18 - 22%. Secara khusus, dengan virus vaksin LaSota sebagai vaksin komersial yang dipakai oleh sebagian besar para peternak di pulau Bali memiliki jarak genetik dengan VND lapang bali berada dalam kisaran 21 - 22 %. Perbedaan jarak genetik yang cukup jauh antara virus lapang dengan virus vaksin akan mempengaruhi keberhasilan vaksinasi. Keberhasilan vaksinasi sangat ditentukan oleh pengenalan antibodi terhadap virus lapang pasca vaksinasi. Pengenalan antibodi dipengaruhi oleh homologi virus vaksin dengan virus lapang (Hughes, 2009; Perozo *et al.*, 2012). Virus vaksin yang homolog dengan virus lapang akan merangsang produksi antibodi yang lebih cepat karena mengenali virus lapang yang menginfeksi. Pengenalan antibodi tersebut akan mempercepat netralisasi virus di dalam tubuh inang pada waktu infeksi awal. Sehingga, untuk membantu para peternak dalam pengendalian wabah ND diperlukan virus vaksin yang homologi dengan virus lapang.

Berdasarkan hasil analisis struktur tiga dimensi protein HN dari keempat VND isolat lapang tidak menunjukkan perbedaan kecuali pada analisis tiga dimensi daerah situs glikosilasi (119/D) dan antigenik (569/S). Pada ND/ayam/ras/Tabanan2/Bali/2014 yang mengalami variasi pada situs glikosilasi menunjukkan perbedaan tipe asam amino dan strukturnya (Gambar 6). Pada ND/ayam/ras/Klungkung/Bali/2014 mengalami variasi pada situs antigenik menunjukkan perbedaan struktur asam amino pada posisi tersebut. Hasil analisis struktur tiga dimensi protein HN antara VND isolat lapang dengan isolat Bali/020/10 dan virus LaSota menunjukkan perbedaan struktur pada

situs yang sama kecuali pada dua posisi situs glikosilasi yang hanya ditemukan pada isolat Bali/020/10 dan situs antigenik pada posisi 494 (Gambar 7). Perbedaan ini memberikan gambaran bahwa apabila terjadi variasi asam amino akan mempengaruhi tipe dan struktur asam amino tersebut. Perbedaan tipe dan struktur asam amino akan mempengaruhi fungsi dari protein HN tersebut (Crennel *et al.*, 2000; Takimoto *et al.*, 2000).

Analisis hidrofobitas protein HN VND yang pernah beredar di pulau Bali dengan virus LaSota menunjukkan perbedaan pada beberapa posisi seperti di posisi antara 1 - 300 dan 400 - 500. Posisi asam amino 1 - 300 adalah daerah yang memiliki beberapa situs penting seperti bagian batang (1-143), situs transmembran (27-48), situs glikosilasi (119), dan epitop antigenik (193-201). Posisi asam amino 400 - 500 adalah daerah yang juga memiliki beberapa situs penting seperti situs glikosilasi (433, 481, dan 500) dan situs pengikat reseptor (401 dan 416). Kesemua posisi di atas mengalami peningkatan sifat hidrofob. Secara khusus pada situs transmembran mengalami peningkatan dari nilai hidrofob dibawah 3 menjadi  $\pm 3,5$ . Laporan penelitian Botus *et al.* (2009) menyatakan bahwa Perbedaan hidrofobitas protein HN mempengaruhi sifat/ fungsi antigenik dari virus ND. Perubahan sifat/ fungsi antigenik akan mempengaruhi virulensi VND. Analisis hidrofobitas ini menunjukkan bahwa adanya variasi asam amino menyebabkan perubahan nilai hidrofobitas.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa keempat VND isolat lapang adalah VND virulen yang termasuk ke dalam virus ND genotipe VII dan VND yang bersirkulasi di Indonesia terbagi menjadi dua klaster besar. Diharapkan adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui patogenitas keempat VND isolat lapang dan uji tantangan silang untuk formulasi bibit vaksin isolat lapang.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada *Indonesian Biodeversity Research Center (IBRC)* Bali, atas bantuannya dalam penyediaan bahan dan data penelitian. Demikian pula, kepada teman-teman sejawat yang membantu penelitian ini, kami menyampaikan apresiasi.

### DAFTAR PUSTAKA

- Absalón AE., Mariano-Matías A, Vásquez-Márquez A, Morales-Garzón A, Cortés-Espinosa DV, Ortega-García R dan Lucio-Decanini E. 2012. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. *Virus Genes* .45(2): 304-310.
- ADHPI. 2011. Seminar ND Genotip 7B. <http://www.adhpi.org/seminar/seminar-nd-genotip-7b/>.
- Adi AAAM dan Astawa NM. 2014. Avian Paramyxovirus 1 : Biologi dan Polimorfisme Genetik. *Swasta Nulus*. hal 70.
- Alexander DJ. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 19 (2): 443-462.
- Alexander DJ. 1987. Taxonomy and Nomenclature of Avian Paramyxoviruses. *Avian Patholog.*16: 547-552.
- Botus D. 2009. Predicting antigenic sites of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein - Newcastle disease virus. *Romanian Biotechnological Letters*. 14(4):4589-4596.
- Couceiro ESS, Couceiro JNSS dan Cabral MS. 1995. Hemagglutinating and Fusogenic Activities of the Newcastle Disease Virus : Studies on Receptor Binding Specificity and pH-induced Conformational Changes. *Mern Inst Oswaldo Cruz*.90(4):515-520.
- Crennell S, Takimoto T, Portner A, dan Taylor G. 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nature Structural & Molecular Biology*.7: 1068 - 1074.
- Dortmans JCFM. 2011. Virulence Determinants of Newcastle Disease Virus. Dissertation. Universitas Utrecht, Nederlands.
- Dortmans JCFM, Koch G, Rottier PJM, Peeters BPH. 2011. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far?. *Veterinary Research*.42: 122.
- Gong YY dan ZhiZhong CUI. 2011. Epitope variation in the Newcastle disease virus HN gene under antibody immune selective

- pressure in cell culture. *Sci China Life Sci.* 54(5): 474–479.
- Hughes AL. 2009. Relaxation of Purifying Selection on Live Attenuated Vaccine Strains of the Family Paxamyxoviridae. *J Vaccine*, 27(11): 1685–1690.
- Iorio RM, Syddall RJ, Sheehan JP, Bratt MA, Glickman RL, dan Riel AM. 1991. Neutralization Map of the Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein of Newcastle Disease Virus: Domains Recognized by Monoclonal Antibodies That Prevent Receptor Recognition. *Journal of Virology.* 65(9): 4999–5006.
- Iorio RM dan Bratt MA. 1984. Neutralization of Newcastle Disease Virus by Monoclonal Antibodies to the Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein: Requirement for Antibodies to Four Sites for Complete Neutralization. *Journal of Virology.* 51(2):445–451.
- Ke GM, Chuang KP, Chang CD, Lin MY, Liu HJ, 2010. Analysis of sequence and haemagglutinin activity of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. *Avian Pathology.* 39(3): 235–244.
- Kencana GAY, Kardena IM, dan Mahardika IGN. 2012. Peneguhan diagnosis penyakit Newcastle disease lapang pada ayam buras di Bali menggunakan teknik RT-PCR *Jurnal Kedokteran Hewan.* 6(1).
- Khadzhiev G. 1987. Typing of Newcastle virus isolate by mean death time of chickens in the cloacal test. *Vet Med Naukil.* 24(5):16–26.
- Kusmaedi. 2001. Teknik uji hemagglutination inhibition Untuk mengukur tingkat kekebalan Terhadap newcastle disease dan egg drop Syndrome'76. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti, Balai Penelitian Veteriner.
- Mahon PJ, Mirza AM, Musich TA, dan Iorio RM. 2008. Engineered Intermonomeric Disulfide Bonds in the Globular Domain of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: Implications for the Mechanism of Fusion Promotion. *Journal of Virology.* 83(21):10386–10396.
- McGinnes LW dan Morrison TG. 2006. Inhibition of Receptor Binding Stabilizes Newcastle Disease Virus HN and F Protein-Containing Complexes. *Journal of Virology,* 80(6): 2894–2903.
- Miller GL dan Stanley WM. 1944. Quantitative Aspects of the Red Blood Cell Agglutination Test for Influenza Virus. *J Exp Med.* 79(2): 185–195.
- Oberdorfer AR, Werner O, Veits J, Mebatsion T, dan Mettenleiter TC. 2003. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *Journal of General Virology.* 84: 3121–3129.
- OIE. 2004. *Newcastle Disease.* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2:1–15.
- Panda A. 2003. "Role of Hemagglutinin-Neuraminidase Protein in Newcastle Disease Virus Pathogenesis" (*dissertation*). University of Maryland.
- Panda A, Elankumaran S, Krishnamurthy S, Huang Z, dan Samal SK. 2004. Loss of N-Linked Glycosylation from the Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Alters Virulence of Newcastle Disease Virus. *Journal of Virology,* 78 (10): 4965–4975.
- Perozo F, Marcano R, dan Afonsoc CL. 2012. Biological and Phylogenetic Characterization of a Genotype VII Newcastle Disease Virus from Venezuela: Efficacy of Field Vaccination. *Journal of Clinical Microbiology.* p:1204–1208.
- Ponnusamy P, Kirubakaran JJ, dan Chandramohan A. 2009. Sequence Analysis of HN and F Genes of a less Virulent Newcastle Disease Virus Isolated from Unvaccinated Village Chicken. *International Journal of Poultry Science.* 8 (10): 985–994.
- Saepulloh M dan Darminto. 2005. Kaman newcastle disease pada itik dan upaya Pengendaliannya *WARTAZOA,* Vol. 15 No . 2.