

Respons Antibodi Sekunder Terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam Petelur Pascavaksinasi Ulangan dengan Vaksin Tetelo Aktif

(NEWCASTLE DISEASE SECONDARY ANTIBODY RESPONSE AFTER REVACCINATION IN LAYER WITH THE ACTIVE ND VACCINE)

Andika Budi Kurnianto¹, Gusti Ayu Yuniati Kencana²,
I Nyoman Mantik Astawa²

¹Mahasiswa Program Pendidikan Dokter Hewan,
²Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayana, Jalan Sudirman Denpasar, Bali, Indonesia
Telp. Fax (0361) 223791; E-mail: yagamiandika@yahoo.co.id

ABSTRAK

Untuk mencegah kejadian berulang penyakit tetelo/*Newcastle Disease* (ND) pada ayam petelur maka diperlukan vaksinasi ulangan. Salah satu vaksin yang digunakan untuk vaksinasi ulangan tetelo adalah vaksin tetelo aktif. Vaksin ND aktif merupakan vaksin dalam bentuk kering beku yang tiap dosisnya mengandung virus $10^{6.5} \text{EID}_{50}$. Vaksinasi ulangan dilakukan untuk memicu respons antibodi sekunder pada ayam petelur agar dapat mencapai titer antibodi protektif terhadap tetelo yang dapat dipantau melalui uji hambatan hemaglutinasi (HI). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons antibodi sekunder tetelo pada ayam petelur pascavaksinasi ulangan dengan vaksin tetelo aktif. Titer antibodi berasal dari 20 ayam petelur berumur 20 minggu sebelum vaksinasi ulangan (minggu ke 0) dan setelah vaksinasi ulangan (minggu ke-1 hingga minggu ke-9). Vaksinasi pertama menggunakan vaksin ND-IB (*Newcastle Disease-Infectious Bronchitis*) pada umur 2 hari melalui tetes mata dan injeksi subkutan pada umur 5 hari menggunakan dosis 1 ampul. Vaksinasi diulang pada umur 20 minggu dengan dosis $1 \frac{1}{2}$ ampul melalui air minum. Pengambilan darah pada vena sayap (vena *cutane ulnaris*). Darah didiamkan 5-10 menit sampai terbentuk serum. Serum kemudian disimpan didalam freezer sebelum digunakan dalam uji HI. Nilai titer antibodi tetelo dianalisis secara statistik dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi sebelum vaksinasi ulangan adalah 3,47 HI log 2 dan setelah vaksinasi ulangan adalah 4,02; 5,22; 6,52; 7,85; 8,4; 8,6; 7,7; 5,92; dan 3,87 HI log 2 untuk titer pada minggu ke-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9. Pemberian vaksin aktif ND sangat nyata ($P < 0,01$) meningkatkan titer antibodi ayam petelur. Vaksin ND aktif mampu meningkatkan respons antibodi ayam petelur mulai minggu ke-1 hingga minggu ke-6 namun minggu ke-7 hingga minggu ke-9 titer antibodi mengalami penurunan. Disimpulkan titer antibodi sejak tetelo meningkat setelah vaksinasi ulangan dan protektif sampai minggu ke-8.

Kata-kata kunci: vaksin tetelo aktif ND; respons antibodi sekunder; vaksinasi ulangan; ayam petelur; serologi.

ABSTRACT

Revaccination is required in order to prevent *Newcastle Disease* (ND) recurrence in layers chickens. One of vaccine for ND revaccination is freeze-died ND active vaccine containing $10^{6.5} \text{EID}_{50}$. Revaccination is done to trigger a faster secondary antibody responses in layers and can achieve protective antibody titers against ND that can be monitored by a hemagglutination inhibition (HI). The aim of this study was to determine the ND secondary antibody responses in layers after revaccination with ND active vaccine. Antibody titer of 20 layers chickens of 20 week old were determined before revaccinations (week 0) and after revaccinations (week 1 until week 9). The first vaccination was conducted using ND-IB (*Newcastle Disease-Infectious Bronchitis*) at the age of 2 days through eye drops and subcutaneous injection at the age of 5 days using a dose of 1 ampoule. Vaccination is repeated at the age of 20 weeks at a dose of $1 \frac{1}{2}$ ampoule

through drinking water. Blood samples were collected on the wing vein (*venous cutane ulnar*) and left for 5-10 minutes at room temperature. Sera were then collected and stored at -20°C until use. HI antibody titer was determined by micro titration system. The HI mean titers were analyzed by Duncan test. The study results showed that antibody titer before revaccination was 3,47 HI log₂ and the HI titers after revaccination were 4,02; 5,22; 6,52; 7,85; 8,4; 8,6; 7,7; 5,92; dan 3,87 HI log₂ respectively at weeks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9. The NDV revaccination with ND active vaccine significantly ($P < 0.01$) increased in antibody titer in layers starting from week 1 to week 6, but decreased following week 7 to week-9. It can be concluded that revaccination with ND active vaccine increases the antibody titers in layer chickens.

Keywords: ND active vaccine, a secondary antibody response, revaccination, layers.

Keywords: ND active vaccine; a secondary antibody response; revaccination; layers; serology.

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) merupakan salah satu penyakit penting pada unggas, seperti halnya pada ayam petelur. Penyakit tetelo ditemukan hampir di seluruh belahan dunia. Kerugian yang ditimbulkan akibat penyakit tetelo pada ayam petelur meliputi morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi hingga mencapai 100%, penurunan produksi telur, biaya eradikasi, vaksinasi, serta program karantina yang memerlukan biaya tinggi (Aldous dan Alexander, 2010). Penyakit tetelo dilaporkan dapat menginfeksi lebih dari 240 spesies unggas di 27 negara (Hadipour, 2009). Di Indonesia, penyakit tetelo masih bersifat endemis yang ditunjukkan dengan ditemukannya kasus sepanjang tahun terjadi karena beberapa faktor seperti kualitas vaksin yang buruk, perlakuan terhadap vaksin yang tidak memenuhi standar seperti suhu saat penyimpanan, dan kesalahan vaksinator (Saepulloh dan Darminto, 2005; Kencana, 2013).

Pencegahan terhadap penyakit tetelo yang masih endemis, khususnya pada ayam petelur, menjadi dasar dikembangkannya vaksin tetelo aktif, sebagai vaksin ulangan. Vaksinasi ulangan dilakukan karena titer antibodi pada vaksinasi tetelo sebelumnya tidak protektif. Menurut Lima *et al.* (2004) pada saat ayam berumur tiga hari peternak memberikan vaksin aktif atau kombinasi vaksin aktif dengan vaksin inaktif. Keefektifan vaksin hanya berlangsung 1-2 bulan sehingga perlu dilakukan vaksinasi ulangan. Vaksin tetelo aktif diharapkan mampu memberikan perlindungan terhadap penyakit tetelo pada ayam umur muda pascavaksinasi ulangan (Al-Zubeedy, 2009). Saat ini telah dikembangkan vaksin aktif strain lentogenik diatenuasi kemudian dikeringbekukan (*freeze dried*) setiap dosisnya mengandung $10^{6,5}$ EID₅₀. Vaksin tersebut tidak menyebabkan ayam stres. Pemberian vaksin tetelo lentogenik

efektif, menghemat waktu, serta mudah dalam aplikasinya, dan salah satu caranya bisa diberikan melalui air minum (Lima *et al.*, 2004). Namun, pemberian vaksin melalui air minum, harus memperhatikan populasi ayam, sehingga dibutuhkan dosis yang lebih banyak dengan tujuan supaya ayam dapat memperoleh vaksin secara merata dan titer antibodi yang terbentuk menjadi seragam (Wibowo dan Amanu, 2010).

Setelah vaksinasi ulangan dilakukan dengan vaksin tetelo aktif, diharapkan terbentuk antibodi sekunder dalam tubuh ayam. Antibodi sekunder memiliki titer dan afinitas yang lebih tinggi serta fase *lag* yang lebih pendek dibanding respons imun primer. Hal tersebut disebabkan sel memori yang terbentuk pada respons imun primer, akan cepat mengalami transformasi dan diferensiasi menjadi sel penghasil antibodi. Apabila kelak mendapat paparan antigen yang sama dapat memberikan respons yang lebih kuat dan lebih cepat (Davidson *et al.*, 2008; Banu *et al.*, 2009). Pemantauan titer antibodi pascavaksinasi ulangan dilakukan pada ayam petelur karena umur panen ayam yang lebih panjang, yakni ayam petelur dipanen umur 5-6 minggu dengan bobot antara 200-3000 g/ekor dan masa afkir ayam yang lama yaitu sampai ayam berumur 15-20 bulan (Wibowo dan Amanu, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun sekunder tetelo pada ayam petelur pascavaksinasi ulangan dengan vaksin tetelo aktif. Dengan mengetahui titer antibodi sekunder pascavaksinasi ulangan dengan vaksin tetelo aktif diharapkan dapat memperkirakan protektivitas ayam petelur terhadap serangan penyakit tetelo.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah serum dari 20 ekor ayam petelur yang divaksin tetelo saat berumur 20 minggu,

dipelihara di Banjar Temasa, Desa Tiga, Kabupaten Bangli, Bali. Vaksin yang digunakan ini adalah vaksin ND aktif (Sanovac-ND *Clone* PT. Sanbio, Bogor) galur lentogenik. Setiap dosis vaksin ND *Clone* mengandung $10^{6.5}$ EID 50.

Seminggu sebelum vaksinasi ulangan, dilakukan pengambilan darah sebanyak dua kali untuk mengkonfirmasi titer antibodi melalui uji serologi hambatan hemaglutinasi (HI). Sebelum vaksinasi ulangan, ayam telah divaksin pada umur dua hari dengan vaksin tetes mata dan pada umur lima hari dengan vaksin vaksin *Newcastle Disease-Infectious Bronchitis* (ND-IB). Ayam divaksin pada minggu ke-0 di hari ke-1 (setelah pengambilan darah melalui vena brakialis sebelum vaksinasi ulangan) dengan vaksin tetelo aktif *Clone* dengan 1,5 dosis melalui air minum.

Pengambilan darah setelah vaksinasi ulangan dilakukan dua kali setiap minggu pada minggu ke-1 hingga minggu ke-9. Darah kemudian didiamkan 10-15 menit sampai terbentuk serum, kemudian ditampung dan disimpan di dalam *freezer* sebelum digunakan dalam uji HI. Konfirmasi titer antibodi setelah vaksinasi ulangan pada minggu ke-1 hingga minggu ke-9 juga dilakukan dengan uji HI.

Uji hambatan Hemaglutinasi (HI). Sebanyak 0,025 mL *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dimasukan ke setiap sumuran plat mikro. Sumuran 1 dan sumuran 2 diisi dengan 0,025 mL serum kemudian diencerkan secara berseri kelipatan dua mulai dari sumuran ke-2 sampai ke-10 dengan pengencer mikro lalu dari sumuran nomor 10 suspensi dibuang sebanyak 0,025 mL. Pada sumuran ke-1 sampai sumuran ke-11 ditambahkan 0,025 mL suspensi antigen tetelo sebanyak 4 unit HA, sedangkan pada sumuran ke-12 hanya diisi 0,025 mL PBS. Plat mikro digoyang-goyang selama 30 detik dengan *mikroshaker* kemudian dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruangan. Suspensi eritrosit 1% ditambahkan ke dalam sumuran ke-1 sampai sumuran ke-12 sebanyak 0,025 mL lalu digoyang-goyang kembali selama 30 detik. Kemudian biarkan plat mikro selama satu jam pada suhu ruangan dan diamati tiap 15 menit. Pembacaan hasil uji HI dilakukan bila pada sumuran nomor 11 sudah tampak adanya aglutinasi eritrosit dan pada sumuran nomor 12 tampak endapan eritrosit. Titer HI dibaca dengan memiringkan plat mikro dan melihat ada atau tidak sel darah merah yang turun (*tear-shaped*). Titer antibodi HI ditentukan dengan melihat pengenceran serum tertinggi yang

masih mampu menghambat aglutinasi eritrosit (OIE, 2008). Pemeriksaan titer antibodi terhadap tetelo dilakukan dengan dua kali ulangan (*duplo*). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi Veteriner, FKH Unud.

Titer antibodi yang diperoleh setelah vaksinasi ulangan dihitung rataannya setiap minggu sampai minggu ke-9.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan titer antibodi ayam petelur pada minggu ke-0 (sebelum vaksinasi ulangan) dan minggu ke-1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8, dan ke-9 (setelah vaksinasi ulangan dengan vaksin tetelo aktif, dinyatakan dalam rata-rata *titer* dengan satuan HI log 2, disajikan dalam Tabel 1.

Pada minggu ke-0 atau sebelum vaksinasi, rata-rata titer antibodi ND adalah 3,47 HI log 2. Pengamatan titer antibodi setelah vaksinasi dari minggu ke-1 hingga minggu ke-9 berturut-turut adalah 4,02; 5,22; 6,52; 7,85; 8,4; 8,6; 7,7; 5,92; dan 3,87 HI log 2. Gambaran hasil pemeriksaan titer antibodi tetelo setiap minggunya disajikan pada Gambar 1.

Hasil uji sidik ragam menunjukkan bahwa pengamatan titer antibodi tetelo pascavaksinasi tiap minggunya berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap rata-rata titer antibodi tetelo tersebut.

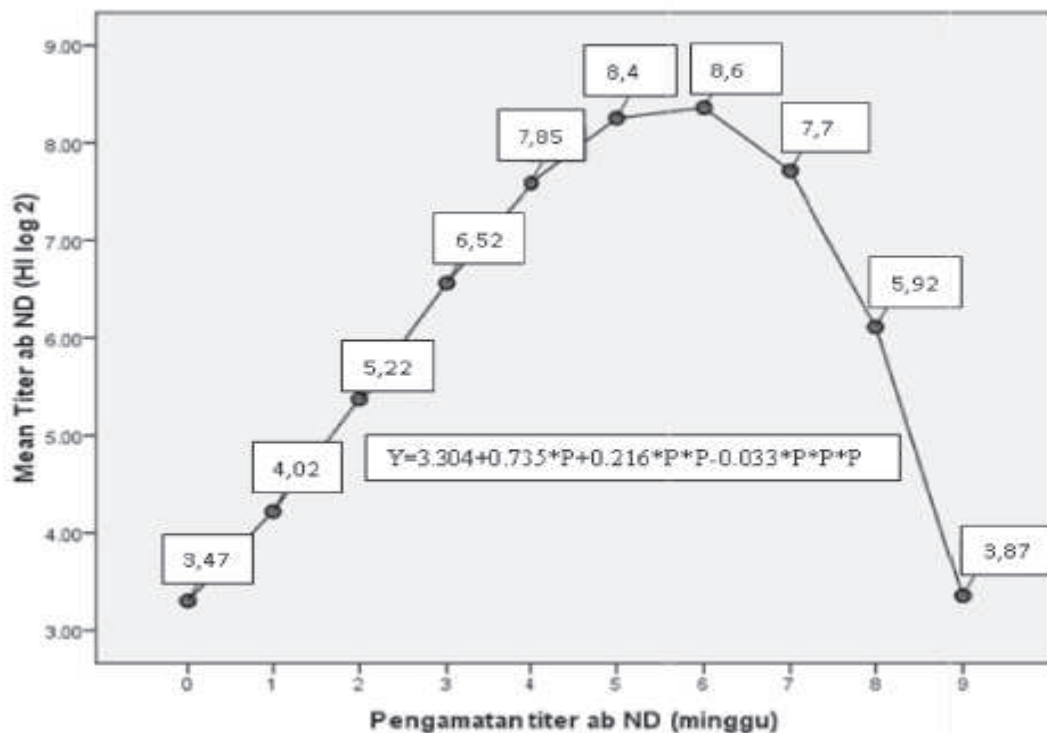
Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terjadi kenaikan titer antibodi tetelo yang sangat nyata ($P < 0,01$) dari minggu ke-1 hingga minggu ke-6. Namun, dari minggu ke-7 hingga minggu ke-9 terjadi penurunan titer antibodi tetelo yang sangat nyata pula.

Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa garis regresi dari persamaan $Y = 3,304 + 0,735 * P + 0,216 * P * P - 0,033 * P * P * P$ sangat nyata. Dari persamaan tersebut, Y merupakan nilai rata-rata titer antibodi tetelo (GMT) dan P merupakan variabel regresi yang menyatakan waktu (minggu) sebelum dan setelah vaksinasi. Melalui persamaan Y tersebut dapat diketahui nilai rata-rata titer antibodi tetelo pascavaksinasi dari minggu ke-1 hingga minggu ke-9 pascavaksinasi maupun meramalkan nilai titer rata-rata antibodi tetelo setelah minggu ke-9.

Hasil pemeriksaan serologi titer antibodi ayam terhadap tetelo sebelum vaksinasi ulangan menunjukkan nilai GMT 3,47 HI log 2. Titer 3,47 HI log 2 merupakan titer yang berasal dari hasil vaksinasi pertama pada ayam petelur.

Tabel 1. Rataan titer antibodi sebelum vaksinasi dan sesudah vaksinasi ulangan pada ayam petelur yang divaksin tetelo aktif

No urut	Rataan titer antibodi (HI log 2) minggu ke-									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	4	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	8,5	7,5	5,5	4,5
2	3	3,5	5,5	6,5	8	8,5	9	8	6,5	4
3	3	4,5	5,5	6	7,5	8	8,5	7,5	5,5	4
4	4	4	5	6,5	7,5	8,5	8,5	7,5	6,5	4
5	3	4	4,5	6,5	8	8,5	9	7,5	5,5	3,5
6	3	4	5,5	7	8	8	8,5	7,5	5,5	3,5
7	4	5	5,5	7,5	8	8	8,5	7,5	6	4
8	4	4,5	5,5	7,5	8	8,5	8,5	8,5	6,5	4,5
9	4	4	5,5	6,5	7	8	9	7,5	5,5	3,5
10	3	4	4,5	6	7,5	7,5	8,5	8	6,5	4
11	3	3,5	4,5	6,5	8	8,5	8	7,5	5,5	4,5
12	3	3,5	5,5	7,5	8	8,5	9	8,5	6,5	3,5
13	4	4	4,5	6,5	8	8,5	8,5	7,5	5,5	3,5
14	3,5	4,5	5,5	7,5	8	8,5	8,5	8,5	6,5	3,5
15	4	4	5,5	7,5	8,5	9	8,5	7,5	5,5	4,5
16	3	4	5,5	6,5	7,5	8	9	7,5	5,5	3,5
17	3	3	5,5	5,5	7,5	8,5	8,5	8	6,5	3,5
18	4	4	4,5	6,5	8	8,5	9	7,5	5,5	3,5
19	4	4,5	5,5	7	8,5	9	8,5	7	5,5	3,5
20	3	3,5	5,5	6,5	8	9	8	7,5	6,5	4,5
Rataan	3,47	4,02	5,22	6,52	7,85	8,4	8,6	7,7	5,92	3,87



Gambar 1. Pengamatan titer antibodi ND (HI log 2) pada ayam petelur sebelum vaksinasi (minggu ke-0) dan setelah vaksinasi (sejak minggu ke-1 hingga minggu ke-9). Keterangan : Y = titer antibodi (HI log 2), P = waktu (minggu ke - n), dan *(tanda asteriks) = dikalikan

Vaksinasi pertama yang diberikan menggunakan vaksin tetelo kombinasi aktif dan inaktif. Keefektifan vaksin tersebut berlangsung selama dua bulan. Titer antibodi tersebut merupakan titer yang tidak protektif pada ayam petelur terhadap serangan tetelo lapang. Hal ini sesuai pernyataan Banu *et al.* (2009) bahwa titer antibodi tetelo di bawah 4 HI log 2 hanya memiliki daya proteksi 40% sehingga kurang mampu melindungi ayam terhadap infeksi virus tetelo lapang.

Hasil uji serologi setelah vaksinasi (sejak minggu ke-1 sampai minggu ke-6) memperlihatkan titer antibodi tetelo yang mengalami peningkatan secara bertahap (Gambar 1). Hal tersebut karena adanya respons imun sekunder yang menyebabkan sel memori yang berasal dari respons imun primer berkembang lebih cepat, menghasilkan limfosit lebih banyak, respon imun lebih cepat, dan lebih spesifik apabila ayam terserang virus atau antigen yang sama. Hal inilah yang menjadi dasar memilih vaksin tetelo aktif sebagai *booster* pada vaksinasi berikutnya. Vaksin aktif yang mengandung virus hidup namun telah dilemahkan mampu menggertak pembentukan antibodi protektif pada tubuh ayam dalam waktu tiga minggu pascavaksinasi ulangan. Menurut Hewajuli dan Dharmayanti (2011), respons imun seluler mencapai puncak setelah tiga minggu atau lebih, pascavaksinasi tetelo. Respons imun seluler adalah respons imun yang diperankan oleh sel limfosit T dalam membunuh mikroorganismenya atau antigen melalui sistem efektor ekstraseluler oleh sel T sitotoksik dan sel T *helper* (*Th*). Sementara itu respons imun humoral merupakan respons imun yang diperankan oleh sel limfosit B dan produknya adalah antibodi. Pada respons humoral juga berlaku respons primer yang membentuk klon sel B memori. Setiap klon diprogram untuk memproduksi satu jenis antibodi spesifik terhadap antigen tertentu (*clonal selection*). Antibodi spesifik tersebut berikatan dengan antigen, membentuk ikatan antigen-antibodi yang dapat mengaktivasi komplemen dan menghancurkan antigen tersebut. Kaitan sel limfosit T dengan limfosit B adalah limfosit B memerlukan bantuan limfosit *Th* yang memberikan sinyal dari makrofag untuk sel B berdiferensiasi membentuk antibodi (Kresno, 2001). Pada minggu ke-3 setelah vaksinasi ulangan, terlihat titer antibodi sebesar 6,52 dan 7,85 HI log 2 sehingga mampu melindungi ayam

petelur hingga 100%. Menurut Ronohardjo dan Yusuf (1995) titer antibodi 5 HI log 2 atau lebih mempunyai daya proteksi 100%.

Hasil uji hambatan hemaglutinasi (HI) setelah vaksinasi sejak minggu ke-7 sampai minggu ke-9 memperlihatkan penurunan titer antibodi tetelo. Hal tersebut tidak terlepas dari sifat vaksin tetelo aktif itu sendiri bahwa kekebalan yang terbentuk juga akan cepat turun. Keefektifan vaksin tetelo aktif, dapat bertahan selama 1-2 bulan (Makoui dan Feizi, 2014). Hal tersebut terlihat pada titer antibodi tetelo yang mencapai puncak pada minggu ke-6 dan mulai menurun pada minggu ke-7. Pernyataan senada juga dikemukakan oleh Erganus dan Ucan (2003) bahwa sifat respons imun sekunder, setelah mencapai puncak akan menurun. Titer antibodi tetelo meskipun penurunan tetap terpantau protektif hingga minggu ke-8, namun setelah memasuki minggu ke-9, titer antibodi tetelo sebagian besar kurang protektif. Hal tersebut terlihat dari nilai rata-rata titer pada minggu ke-9 yaitu 3,87 HI log 2.

Hasil pengamatan titer antibodi tetelo digambarkan dalam bentuk grafik parabola (Gambar 1). Hal tersebut dapat diartikan bahwa pada minggu ke-1 hingga minggu ke-6 pascavaksinasi terjadi kenaikan titer antibodi, karena virus dalam vaksin aktif bereplikasi dan menginduksi kekebalan dalam tubuh ayam. Semakin banyak virus yang bereplikasi semakin banyak pula antibodi yang terbentuk untuk menekan replikasi virus. Apabila replikasi virus telah berhasil ditekan hingga batas minimal maka timbul fase stasioner atau fase jumlah virus lebih sedikit atau sama dengan jumlah antibodi yang terbentuk. Jumlah virus setelah mengalami penurunan, maka hal tersebut juga menyebabkan antibodi menurun, sehingga memengaruhi bentuk grafik yang terlihat menurun ketika telah mencapai puncak. Penurunan titer antibodi mulai terjadi dari minggu ke-7 hingga minggu ke-9. Namun, pada minggu ke-7 dan ke-8, titer antibodi masih protektif karena titernya di atas 4 HI log 2, sedangkan pada minggu ke-9 kurang protektif karena nilai titer antibodi di bawah 4 HI log 2 sehingga pada minggu ke-9 disarankan untuk melakukan vaksinasi ulangan (*booster*) (Makoui dan Feizi, 2014). Secara umum, vaksin tetelo berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dalam memicu pembentukan antibodi protektif tetelo pada ayam petelur.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa titer antibodi tetelo meningkat setelah dilakukan vaksinasi ulangan dan titer antibodi tetelo pada ayam petelur yang divaksin tetelo aktif protektif sampai minggu ke-8 dengan titer rata-rata titer 5,92 HI log 2.

SARAN

Pengulangan vaksinasi (*booster*) pada ayam petelur yang divaksin tetelo aktif perlu dilakukan pada minggu ke-9 pascavaksinasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada PT. Sanbio Laboratories, Bogor atas kerjasama penelitian lapang vaksin ND *Clone* di Bangli, Bali.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Zubeedy AZ. 2009. Immune Response In Day Old Broiler Chicks Vaccinated Against Newcastle Disease Virus. *Iraqi J Vet Sci* 23: 143-146
- Aldous EW, Alexander DJ. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol* 30: 117-128
- Banu NA, Islam MS, Chowdhury MMH, and Islam MS. 2009. Determination Of Immune Response Of Newcastle Disease Virus. *J Bangladesh Agril Univ* 7(2): 329-334
- Erganis O, Ucan US. 2003. Evaluation Of Three Different Vaccination Regimes Against Newcastle Disease in Central Anatolia. *Turk J Vet Anim Sci* 27: 1065-1069
- Hadipour MM. 2009. Serological Survey of Newcastle Disease Virus Antibodies in Backyard Chickens Around Maharlou Lake in Iran. *J Anima and Vet Adv* 8(1): 59-61
- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2011. Patogenitas Virus Newcastle Disease Pada Ayam. *Wartoza* 21(2): 72-80
- Kencana GAY. 2013. Penentuan Kandungan Virus Vaksin Newcastle Disease Dari Dua Poultry Shops Yang Berbeda Pada Kultur Sel Primer Fibroblast Embrio Ayam. *Buletin Veteriner Udayana* 5(2): 61-69
- Kresno SB. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi 4. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Lima FS, Santin E, Paulillo AC, Junior LD, Morases VMB, Gama NMQ, Iturrino SRP. 2004. Evaluation of Different Program of ND vaccination in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Int J of Poult Sci* 3(5): 354-356
- Makoui MH, Feizi A. 2014. Efficacy Of Different Live Newcastle Disease Vaccines In Broiler Farms. *Europ J Zool Res* 3(1): 81-85
- OIE. 2008. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines For Terrestrial Animals*. 6th ed vol. 1. Paris: Office International Des Epizooties
- Ronohardjo P, Halim Y. 1995. Pengendalian Newcastle Disease Pada Ayam Buras. *Wartazoa* 4: 18-24
- Saepulloh M, Darminto. 2005. Kajian Newcastle Disease pada Itik dan Upaya Pengendaliannya. *Wartazoa* 15(2): 84-94
- Wibowo SE, Amanu, S. 2010. Perbandingan Beberapa Program Vaksinasi Penyakit Newcastle Disease Pada Ayam Buras. *J Sain Vet* 28: 27-35