

Respon Antibodi dan Protektivitas pada Ayam Pasca Vaksinasi Menggunakan Vaksin Nd Aktif Lv12

Antibody Response and Protectivity in Chickens After Vaccination With Nd Lv12 Active Vaccine

¹Nanik Sianita, ²Ziaul Hasan, ¹Kusriningrum R

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : mkh_ua@yahoo.com

Abstract

The purpose of this study was to determined the antibody response and protectivity in chickens after vaccination using an active ND LV12 lentogenic vaccine. This study used 10 chickens as experimental animals, in which 7 chickens are given ND LV12 lentogenic active vaccine and 3 chickens are given physiological NaCl solution. Vaccination was performed 2 times at the age of 3 weeks and 5 weeks. Whereas blood sampling performed 3 times at the age of 3 weeks, 5 weeks and, 7 weeks. The method used for antibody titration was HI test. An age of 8 weeks, all chickens was challenged with velogenic ND virus. The result shows an increasing in antibody level with HI-titers ($\log_2 \geq 9,43$ after vaccination. On challenge test, the vaccine provide 100% protection in chickens. Therefore, it is suggested for further research in field trial under natural condition.

Keywords : HI test, Newcastle Disease, active vaccine.

Pendahuluan

Ternak ayam merupakan komoditas peternakan yang paling banyak dipelihara oleh para petani-peternak di pedesaan. Produk komoditas peternakan ini adalah sumber protein hewani yang dapat dijangkau oleh lapisan masyarakat secara luas. Sejalan dengan meningkatnya jumlah penduduk, perubahan gaya hidup, kesadaran gizi, dan perbaikan tingkat pendidikan, permintaan akan produk peternakan (telur, daging, dan susu) terus meningkat (Delgado *et al.* 1999).

Tujuh puluh lima persen dari dua ratus juta populasi ayam di Indonesia masih dipelihara secara ekstensif. Hal ini mempersulit pelaksanaan pengendalian dan pemberantasan penyakit, sehingga mengakibatkan kerugian yang tidak sedikit. Sedangkan dua puluh lima persen ternak ayam lainnya dipelihara secara intensif sehingga ternak dapat terhindar dari penyakit karena peternak mempunyai cukup pengetahuan mengenai

cara pemeliharaan dan pengendalian penyakit (Sri Murtini, 1999).

Ternak unggas terutama ayam senantiasa mendapat ancaman yang serius dari berbagai macam penyakit. Di antara penyakit-penyakit ayam, penyakit *Newcastle Disease* (ND) merupakan penyakit yang sangat penting di Indonesia, karena telah menyebar di seluruh Indonesia dan menimbulkan kerugian yang sangat besar. Kerugian yang diakibatkan oleh kematian ayam dan penurunan produksi telur selalu mengancam lebih dari 200 juta ekor ayam di Indonesia, dan diperkirakan mencapai lebih dari 10 juta dolar AS jika penyakit ND tidak ditanggulangi (Rukmana, 2007).

Wabah ND dapat terjadi sepanjang tahun dan kejadian tertinggi terjadi pada musim peralihan dari musim kemarau ke musim penghujan. ND dapat menyebabkan mortalitas hingga 100% pada ayam yang peka dan mempunyai titer antibodi rendah (Darminto dan Ranohardjo, 1996). Salah satu cara pengendalian yang cukup efektif dan efisien adalah dengan vaksinasi ND.

Vaksin *ND* dibedakan menjadi dua, yaitu vaksin aktif (*live*) dan vaksin inaktif (*killed*). Vaksin aktif yaitu vaksin yang mengandung virus hidup, atau mengandung virus yang dilemahkan kegasannya, diantaranya adalah vaksin *Hitchner B-1*, *RIVS2* dan *La-Sota*. Vaksin inaktif tidak mempunyai kemampuan untuk berkembang biak di dalam tubuh hewan yang di vaksinasi, tetapi mampu merangsang pembentukan antibodi (Fenner et al., 1987). Pemberian vaksin aktif dapat dilakukan dengan cara semprot, tetes (mata, hidung, mulut), air minum dan suntikan. Akan tetapi yang paling banyak digunakan adalah dengan cara tetes mata dan air minum.

Banyak sekali program vaksinasi yang sudah diterapkan di lingkungan peternak, namun masih banyak ditemukan adanya kegagalan. Salah satu indikasi akibat kegagalan vaksinasi adalah rendahnya titer antibodi pasca vaksinasi dan masih ditemukannya kejadian *ND* di peternakan ayam yang telah melakukan vaksinasi.

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk menguji protektivitas vaksin aktif *ND lentogenik LV12*. Untuk memantau tingkat kekebalan ayam pasca vaksinasi cara yang paling efisien yaitu dengan mengukur zat kebal (antibodi) terhadap *ND* pada serum darah ayam, menggunakan uji hambatan hemaglutinasi / *haemagglutination inhibition (HI)* dan ujiantang / (*challenge test*).

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi dan *Teaching Farm* milik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, pada September 2010 sampai Desember 2010. Pelaksanaan *Challenge test* dilakukan di kandang BSL3 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Rancangan Penelitian

Prosedur perlakuan terhadap hewan coba adalah sebagai berikut :

Sebanyak 10 ekor anak ayam layer (DOC) dibagi menjadi 2 kelompok, dimana :

- 1) Kelompok P : berisi 7 ekor ayam, diberi vaksin aktif *ND lentogenik (LV-12)* sebagai perlakuan
- 2) Kelompok K : berisi 3 ayam, di berikan *NaCl* fisiologis sebagai kontrol.

Pemberian vaksin dilakukan secara peroral, sedangkan untuk dosis vaksin aktif *ND lentogenik (LV-12)* dan *NaCl* fisiologis adalah 0,3 ml/ekor. Vaksinasi dilakukan pada saat ayam berumur 3 minggu, 5 minggu. Sedangkan peng-

ambilan darah dilakukan pada saat ayam berumur 3 minggu (sebelum vaksinasi I), umur 5 minggu (2 minggu pasca vaksinasi I), 7 minggu (2 minggu pasca vaksinasi ulang).

Pengambilan darah pada ayam dilakukan untuk mengetahui titer antibodi yang ditimbulkan dengan menggunakan uji *Haemagglutination Inhibition (HI)* secara mikroteknik (Ernawati et al, 2008). Untuk mengetahui protektivitas vaksin maka semua ayam dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dilakukan uji *challenge* pada saat ayam berumur 8 minggu.

Cara Pengambilan Serum

Darah diambil melalui jantung ketika ayam masih berumur 3 minggu, karena pada ayam umur 3 minggu pembuluh darah pada ayam masih kecil sehingga pengambilan darah harus diambil lewat jantung. Setelah itu pengambilan darah selanjutnya (pada ayam umur 5 dan 7 minggu) dilakukan melalui pembuluh darah yang ada di sayap (vena *brachialis*). Darah diambil menggunakan *spuit* secara aseptik lalu darah yang ada didalam spuit tersebut didiamkan hingga terjadi pemisahan serum (diberikan sedikit ruang udara pada *spuit*), kemudian serum darah dipindahkan ke dalam tabung *microtube*. Apabila serum darah yang didapatkan kurang jernih maka dilakukan *sentrifuge* dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. kemudian disimpan pada suhu 4°C atau -20°C.

Cara Pembuatan Suspensi Eritrosit 0,5 %

Pada uji *HA* mikroteknik dan *HI* mikroteknik digunakan suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5%. Cara untuk mendapatkan suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5 % adalah sebagai berikut : Darah ayam diambil dari vena secukupnya (± 3 ml) kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan *EDTA*. Darah tersebut kemudian di sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm, setelah disentrifugasi kemudian supernatannya dibuang dan disisakan endapannya. Selanjutnya pencucian terhadap endapan dengan *NaCl* fisiologis dan disentrifugasi kembali selama 10 menit. Setelah terjadi endapan, supernatant dibuang lagi dan dilakukan pencucian lagi dengan *NaCl* diulang sampai 3 kali seperti cara yang ada di atas. Untuk mendapatkan suspensi eritrosit 0,5 % sebanyak 20 ml, maka endapan eritrosit murni diambil 0,1 ml kemudian di tambahkan *NaCl* fisiologis 19,9 ml.

Uji Haemagglutination (HA) mikroteknik

Uji HA dilakukan untuk mengetahui titer antigen ND yang akan digunakan pada uji HI. Prosedur untuk melakukan HA mikroteknik adalah sebagai berikut :

- 1) Lubang *microplate* nomor 1 sampai nomor 12 pada baris pertama dan kedua diisi 0,025 ml NaCl fisiologis. Alat yang digunakan untuk mengisi *microplate* adalah *micropipet* dengan volume 0,025 ml.
- 2) Pada lubang nomor 1 (baris nomor 1 dan nomor 2) diisi dengan 0,025 ml antigen ND
- 3) Antigen ND dan NaCl fisiologis pada lubang nomor 1 dicampur dengan cara di *mixing* beberapa saat, kemudian *micropipet* dipindahkan ke lubang berikutnya sebanyak 0,025 ml, demikian seterusnya sampai lubang nomor 11, sedangkan lubang nomor 12 digunakan sebagai kontrol eritrosit.
- 4) Setelah dilakukan pengenceran diatas kemudian semua lubang *microplate* diisi dengan eritrosit 0,5 % sebanyak 0,05 ml.
- 5) Setelah itu *microplate* diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit atau sampai kontrol sel darah merah pada lubang nomor 12 tampak sebagai endapan eritrosit di dasar lubang.

HA sempurna (100 %) adalah aglutinasi terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata pada dasar lubang dan penjernihan dari cairan di bagian atas tanpa adanya pengendapan sel darah merah berbentuk titik tengah lubang. Titer antigen adalah kebalikan dari pengenceran tertinggi yang masih mampu menunjukkan reaksi aglutinasi (Ernawati et al, 2008).

Pembuatan Kontrol Antigen 4 HA Unit

Pembuatan kontrol antigen 4 HA unit sebagai berikut :

- 1) Pada lubang *microplate* nomor 1 sampai nomor 5 diisi satu tetes NaCl fisiologis dengan menggunakan mikropipet 0,025 ml.
- 2) *Micropipet* 0,025 ml di masukkan ke dalam antigen 4 HA unit dan di *mixing*, kemudian di campur pada lubang nomor 1, setelah itu dipindahkan ke lubang nomor 2 dan selanjutnya sampai ke lubang nomor 4. Sedangkan lubang nomor 5 digunakan sebagai kontrol.
- 3) Dengan menggunakan *micropipet* 0,05 ml, pada lubang nomor 1 sampai nomor 5 di tambahkan suspensi eritrosit 0,5 % sebanyak 1 tetes (0,05 ml).
- 4) *Microplate* di inkubasi pada suhu kamar sampai kontrol eritrosit dapat dibaca, aglutinasi terjadi sampai pada lubang nomor

2 (4 HAU). Bila antigen ND 4 HAU maka hemaglutinasi terjadi pada lubang nomor 1 dan 2 (Ernawati et al, 2008).

Uji Haemagglutination Inhibition (HI) mikroteknik
Metode dari uji *Haemagglutination Inhibition (HI)* mikroteknik adalah sebagai berikut :

- 1) Pada lubang nomor 1 sampai dengan lubang nomor 12 dari *microplate* diisi NaCl fisiologis sebanyak 0,025 ml dengan menggunakan *micropipet*.
- 2) Pada lubang 1 ditambahkan serum yang akan diuji sebanyak 0,025 ml
- 3) Selanjutnya *micropipet* di masukkan ke lubang nomor 1 untuk dilakukan *mixing*, kemudian dilakukan pengenceran secara seri dengan memindahkan *micropipet* 0,025 ml dari lubang 1 ke lubang 2 lalu dilakukan pencampuran dan dipindahkan lagi ke lubang ke 3 dan seterusnya sampai lubang nomor 11.
- 4) Pada lubang nomor 12 digunakan sebagai kontrol eritrosit.
- 5) Lubang 1 sampai 11 diisi antigen 4 HAU sebanyak 0,025 ml dengan *micropipet* lalu di inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar.
- 6) Pada lubang 1 sampai lubang 12 ditambahkan eritrosit ayam 0,5 % sebanyak 0,05 ml. selanjutnya *microplate* digoyang-goyangkan secara perlahan lalu dibiarkan selama 30 menit atau sampai kontrol eritrosit dapat dibaca.

Hambatan aglutinasi sempurna (100%) adalah terjadinya pengendapan eritrosit pada dasar lubang *microplate* yang terlihat seperti pada kontrol. Titer antiserum adalah kebalikan dari pengenceran tertinggi antiserum yang masih mampu menghambat aglutinasi dengan sempurna (Ernawati et al., 2008).

Challenge Test

Semua ayam perlakuan dan kontrol diinfeksi dengan virus ND *Velogenik*. Infeksi virus dilakukan secara *peroral* dengan dosis *challenge* 0,5 ml (10^7 EID₅₀) pada setiap individu. Setelah itu dilakukan pengamatan selama satu minggu.

Pengolahan Data

Pada penelitian ini yang akan diukur adalah titer antibodi ayam umur 3 minggu, 5 minggu, 7 minggu. Data yang di peroleh di sajikan dalam bentuk deskriptif dengan menghitung rata-rata hasil titer antibodi ayam umur 3 minggu, 5 minggu dan, 7 minggu. Serta prosentase protektivitas ayam yang pasca *challenge test* (umur 8 minggu) yang meliputi pengamatan selama 1 minggu terhadap adanya gejala klinis ND, ke-

matian, serta adanya perubahan patologi anatomi pada ayam yang mati.

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji *Haemagglutination Inhibition (HI)* yang telah dilakukan, diketahui bahwa terdapat peningkatan titer antibodi dari ayam yang telah diberi vaksin *ND* aktif *lentogenik LV-12*, sementara untuk ayam kontrol yang diberikan *NaCl* fisiologis tidak menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi. Pemberian vaksin diberikan secara peroral dan antigen yang digunakan dalam uji *HI* didapatkan dari Pusvetma Surabaya.

Pada ayam yang diberi vaksin *ND* aktif *lentogenik LV-12* menunjukkan peningkatan rata-rata titer HI-ND (log 2) yang cukup tinggi mulai umur 5 minggu (2 minggu pasca vaksinasi pertama) yaitu 9,43. Kemudian pada umur 7 minggu (2 minggu pasca *booster*) juga terdapat peningkatan titer HI-ND (log 2) adalah 10,14. Semakin tinggi titer antibodi pada uji *HI* menunjukkan makin tingginya tingkat kekebalan suatu individu terhadap antigen yang sesuai walaupun hal ini tidak selalu mutlak.

Sedangkan untuk ayam kontrol yang diberikan *NaCl* fisiologis titer HI-ND (log 2) cenderung menurun, dari minggu ke-3 (sebelum dilakukan vaksinasi) titer antibodi HI-ND (log 2) adalah 2,66 turun menjadi 2,33 pada minggu ke-5, dan 2 pada minggu ke-7. Hal ini diakibatkan antibodi maternal yang dimiliki oleh anak ayam tidak akan bertahan dalam jangka waktu yang lama dan antibodi maternal ini akan berkurang (menurun) secara periodik.

Vaksinasi diperlukan dalam penanganan *Newcastle Disease* karena dapat mengurangi angka mortalitas dan morbiditas yang disebabkan oleh virus *ND*. Dengan vaksinasi maka akan mengurangi jumlah ayam yang rentan terhadap serangan virus *ND* (Tabbu, 2000). Kunci keberhasilan vaksinasi ditentukan oleh penggunaan vaksin yang berkualitas tinggi, harus didukung oleh manajemen yang optimal, terutama biosekuriti yang ketat (Bwala *et al.* 2011). Penyebab dari kegagalan vaksinasi adalah vaksin yang sudah melewati batas ekspirasi atau tidak memenuhi standar optimal potensi, menggunakan vaksinasi dari galur yang tidak tepat, serta cara dan jadwal vaksinasi (Yongolo *et al.* 2006).

Pembentukan titer antibodi pada saat vaksinasi pertama tidaklah secepat dan setinggi vaksinasi ulang (ke-2, dst). Saat vaksinasi pertama di dalam tubuh ayam belum terbentuk sel memori, akibatnya respon pembentukan antibodinya

membutuhkan waktu yang relatif lama dibandingkan vaksinasi ulang, dimana telah terbentuk sel memori (Hsiang-jung *et al.* 2000). Virus yang terdapat pada vaksin aktif berkembang biak dalam tubuh hewan yang ditulari untuk merangsang pembentukan antibodi secara aktif, sehingga pemberian *booster* (vaksinasi ulangan) sangat diperlukan, supaya mempunyai imunitas yang cukup (Rantam, 20005).

Antibodi dikatakan baik jika titernya protektif ($ND \geq 64$ dengan *HI test*) dengan persentase kebal di atas standar ($\geq 80\%$). Kondisi titer antibodi seperti itu akan mampu memberikan perlindungan yang optimal (Tabbu, 2000). Kondisi titer antibodi tersebut tidak akan selamanya protektif, setelah beberapa periode waktu, titer antibodi di dalam tubuh ayam akan menurun dan kecepatan penurunan titer antibodi ini dipengaruhi oleh tantangan bibit penyakit maupun kondisi ternaknya. Agar pembentukan titer antibodi bisa mencapai optimal maka pelaksanaan vaksinasi harus dilakukan secara tepat.

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin *ND* dalam bentuk aktif yaitu *ND* aktif *lentogenik*. Kelompok vaksin *ND* aktif *mesogenik* baik digunakan untuk vaksinasi ulangan oleh karena virulensinya yang masih lumayan tinggi (Van Eck *et al.* 1999). Walaupun demikian, kelompok vaksin *ND* *lentogenik* juga bervariasi dalam virulensinya, yang diukur berdasarkan indeks stress yang terjadi setelah pelaksanaan vaksinasi *ND*. Respon imun juga meningkat sejalan dengan meningkatnya patogenesis dari virus vaksin (Kapczynski *et al.* 2005).

Penggunaan vaksin perlu dilakukan pemeriksaan secara serologis dengan menggunakan serum darah ayam untuk mendeteksi terbetuknya antibodi sebagai respon terhadap vaksin yang diberikan. Pemeriksaan serologis dilakukan secara berkala setiap 2 minggu pasca vaksinasi untuk menghitung titer antibodi yang dihasilkan dengan uji *HI*. Uji *HI* merupakan standart semua spesies unggas untuk mengukur titer antibodi, namun syarat dari uji *HI* adalah jika antibodi yang diperiksa terhadap virus memiliki *haemagglutinin*. *Haemagglutinin* merupakan protein virus yang mampu mengaglutinasikan sel darah merah sehingga uji *HI* dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi *ND* karena virus *ND* memiliki *haemagglutinin*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ayam yang telah divaksin dengan *ND* aktif *lentogenik LV-12* (P) memiliki titer antibodi yang lebih tinggi daripada ayam yang diberikan *NaCl*

fisiologis. Berdasarkan *challenge test* (menggunakan virus *ND velogenik*), kematian ayam yang divaksin *ND* aktif *lentogenik LV12* (P) prosentasenya adalah 0 % yang berarti semua ayam (P) hidup setelah dilakukan *challenge test*. Hal ini membuktikan bahwa vaksin *ND* aktif *lentogenik LV-12* mampu memberikan protektivitas kepada ayam.

Hasil dari *challenge test* menunjukkan dari 3 ayam kontrol pada hari ke-2 post infeksi terlihat adanya gejala penyakit *ND* yaitu ayam terlihat lemah dan mengalami kematian sebanyak 1 ekor pada hari ke-3, kemudian disusul dengan kematian 2 ekor lainnya pada hari ke-5. Sehingga dari keseluruhan ayam kontrol yang di *challenge* pada akhir pengamatan semua mengalami kematian sebanyak 100 %. Hal ini sesuai dengan masa inkubasi penyakit *ND* yang berkisar antara 2-15 hari pasca infeksi (Tabbu, 2000).

Bedah bangkai dilakukan pada ayam yang mati untuk melihat patologis anatominya. Didapatkan ciri-ciri ayam yang menunjukkan kematian disebabkan terserang penyakit *ND* yaitu terdapatnya nekrosis serta hemoragik pada proventrikulus. Hal ini sesuai dengan (Tabbu, 2000) yang menyatakan perubahan secara makroskopis pada saluran pencernaan meliputi proventrikulus, ventrikulus dan bagian usus (dari duodenum sampai sekum dan usus besar). Bagian yang mendapatkan perhatian adalah caeca tonsil, dimana terdapat nekrosis apabila dibuka dan perubahan hyperemia disebagian besar organ terutama otak (Tabbu, 2000 ; Fenner *et.al.*, 1993).

Kesimpulan

Berdasarkan atas penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Vaksinasi pada ayam menggunakan vaksin *ND* aktif *lentogenik LV-12* mampu menimbulkan titer antibodi HI-ND ($\log 2$) $\geq 9,43$
2. Vaksinasi menggunakan vaksin *ND* aktif *lentogenik LV-12* mampu memberikan protektivitas 100% kepada ayam pada saat dilakukan *challenge test*.

Daftar Pustaka

- Alexander, D.J. 1995. Newcastle Disease in Countries of the European Union. *Avian Pathology*. 24:1, 3-10.
- Alexander. 1991. Newcastle Disease and Other Paramyxovirus Infection In : Disease of Poultry. Calwick, B.W., H. J. Barnes., C. W. Beard., W. M. rerd and H. W. Yoder Jr. (Eds). Iowa University Press. Ames. Iowa. USA. 446-519.
- Bellanti, S. A. 1993. Immunologi III. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bruce, A. A., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K.Roberts and P.Walters. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. New York and London Garland Science.
- Bwala, D. G., F.O. Fasina, A.Van Wyk, and N.M.Duncan. 2001. Effect of Vaccination With Lentogenic Vaccine and Challenge With Virulent Newcastle Disease Virus (NDV) on Egg Production in Commercial and SPF Chickens. *International J. of Poultry Science* 10 (2): 98-105.
- Darminto., P. Ronohardjo., N. Suryana., M. Abubakar dan Kusnaedi. 1989. Vaksinasi Penyakit Newcastle Disease Melalui Makanan: Studi Pendahuluan Pemakaian Virus Penyakit Newcastle Disease Tahan Panas Sebagai Vaksin di Laboratorium Penyakit Hewan 21 (37). 35-39.
- Darminto. 1992. Efisiensi Vaksinasi Penyakit Tetelo (Newcastle Disease) Pada Ayam Broiler. *Penyakit Hewan XXIV* (43): 4-8.
- Darminto dan P. Ronohardjo. 1996. Newcastle Disease pada Unggas di Indonesia Situasi Terakhir dan Relevansinya terhadap Pengendalian Penyakit. *Balai Penelitian Veteriner*. 65-84.
- Delgado, C., M. Rosegrant., H. Stainfield., S. Ehui and C. Courbies. 1999. *Livestock to 2020 The Next Food Revolution*. IFPRI., FAO., and ILRI.
- Ernawati, R., Soelistiyanto., A. P. Rahardjo., N. Sianita., F. A. Rantam., J. Rahmahani dan Suwarno. 2002. *Virologi Veteriner. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Bagian Mikrobiologi Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya*.
- Ernawati, R., A. P. Rahardjo., N. Sianita., J. Rahmahani., F. A. Rantam dan Suwarno. 2008. *Petunjuk Praktikum Pemeriksaan Virologik dan Serologik. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya*.
- Fadhillah, R. 2004. *Kunci Sukses Beternak Ayam Broiler di Daerah Tropis. Edisi Satu. Agromedia Pustaka. Jakarta*.
- Fenner, F.J., E.P. Gibbs., F. A. Murphy., R. Rott., M. J. Studert., and D. O. White. 1993. *Detection of Serum Antibody Levels*

- Against Newcastle Disease in Broiler Chickens. John Hopkins University. London. pp: 84-90.
- Hsiang jung, T.S.A, and L. Dih-Fa. 2000. Evaluation of the Protection Efficacy of Newcastle Disease Vaccination Programs. Department of Veterinary Medicine National Taiwan University. Taiwan. 35-41
- Kapczynski, D.R. and D.J. King, 2005. Protection of Chickens Against Overt Clinical Disease and Determination of Viral Shedding Following Vaccination With Commercially Available Newcastle Disease Virus Vaccines Upon Challenge With Highly Virulent Virus From the California 2002 exotic Newcastle Disease Outbreak. *Vaccine*. 23: 3424-3433.
- Lamb, R.A., and D.Kolakofsky. 2001. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*. 1305-1340.
- Mayo, M. A., 2002^a. Virus Taxonomy-Huston 2002. *Arch. Virol*. 147 :1071-1079
- Mayo, M. A., 2002^b. A Summary of Taxonomy Change Recently Approved by ICTV. *Arch. Virol*. 147: 1655-1663.
- Momayez, R., Khakpour, B., Pourbakhsh, S.A., Banani, M. 2007. Evaluation of Maternal Antibody Levels for Establishing The Vaccination Program Against Newcastle Disease in Ostrich Chicks. *Archives of Razi Institute*. 62(2) : 155-159.
- OIE (Office International des Epizooties). 2002. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. Chapter.2.1.14. Newcastle Disease. http://www.oie.int/eng/norms/manual/A_00037.htm. Officer International des Epizooties.
- Rantam, F. A. 2005. Virologi. Airlangga University Press. Surabaya. 213-214.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi: Cetakan 1. Airlangga University Press. Surabaya.
- Ressang, A.A. 1984. Patologi Khusus Veteriner: Edisi Kedua. Departemen Urusan Research Nasional Republik Indonesia. 567-574.
- Ronohardjo, P. 1980. Beberapa Masalah yang Menyangkut Pengendalian Penyakit Tetelo (Newcastle Disease) di Indonesia. Makalah Seminar Penyakit Reproduksi dan Unggas. LPPH. Bogor. 127-141.
- Rukmana, R. 2007. Ayam Buras. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sri Murtini., Malome, M. B. M. 1999. Ketahanan Hidup Virus Vaksin ND pada berbagai media pembawa. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB. Bogor
- Subowo. 1993. Immunologi Klinik. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Tabbu, C.R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya : Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral Volume I. Kanisius. Yogyakarta.
- Tabbu, C. R. 2000. Newcastle Disease (ND) Pada Ayam Umur Tiga Minggu ke Bawah. J. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 22-23
- Tizzard. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Edisi Kedua. Airlangga University Press. Surabaya.
- Yongolo, M. G., A.P. Muhairwa, M.A.Mtambo and U.M.Minga. 2006. Immunogenecity and Protection Ability of Candidates Newcastle Disease Virus Isolates for Vaccine production. Animal Research Disease Institute, Ministry of Water and Livestock Development. Tanzania.
- Van Eck, J.H.H., and E. Goren. 1999. An Ulster 2C Strain-Derived Newcastle Disease Vaccine: Vaccinal Resction in Comparison With Other Lentogenic Newcastle Disease Vaccine. *Intern. J. Poultry Science* 20. 497-508.