

Asosiasi c.248 A>G gen CD1B dengan IgY dan Titer ND pada Ayam Sentul Galur Sensi-1 Agrinak

Association of c.248 A>G CD1B Genes with IgY and ND Titer in Sensi-1 Agrinak Chicken

M. F. Al-Habib¹, S. Murtini², A. Gunawan¹, N. Ulupi¹, & C. Sumantri^{*}

¹Department of Animal Production and Technology, Faculty of Animal Science, IPB University

²Department of Animal Disease and Veterinary Public Health, Faculty Veterinary Medicine, IPB University
Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, Indonesia

*Corresponding author: csumantri12@gmail.com

(Received 14-12-2019; Revised 31-12-2019; Accepted 13-01-2020)

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the polymorphism of the CD1B gene in c.248 in exon 3 and its association with IgY and ND titers in sentul chicken Sensi-1 Agrinak line. IgY is the main antibody of chickens while the ND titer is an ND specific antibody, both of which have an important role in the response of disease resistance. The Cluster of differentiation 1B (CD1B) gene is one of the major genes of disease resistance that functions in representing antigens through specific immune responses. This study used 17 sensi-1 chicken lines. The study was conducted by PCR sequencing method, ELISA test, and HI test. The result showed mutation on c248 A>G in exon 3. The SNP were polymorphic and Hardy Weinberg equilibrium. There were two A and G alleles and 3 genotypes namely AG, GG, and AA. The frequency of the GG genotype was higher (0.41) compared to other genotypes. The AG genotype were associated with IgY production and were not associated with ND titers.

Keywords: CD1B gene, immunity, IgY, line Sensi-1 Chicken, ND titer

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi keragaman gen CD1B pada SNP c.248 ekson 3 dan mengasosiasikannya dengan titer IgY dan ND pada ayam sentul galur Sensi-1 Agrinak. IgY merupakan antibodi utama ayam sedangkan titer ND adalah antibodi spesifik penyakit ND, keduanya memiliki peran penting dalam respon ketahanan penyakit. Gen Cluster of differentiation 1B (CD1B) adalah salah satu gen utama ketahanan penyakit yang berfungsi dalam merepresentasikan antigen melalui respons imun spesifik. Penelitian ini menggunakan 17 ekor ayam sentul galur Sensi-1 Agrinak. Penelitian dilakukan dengan metode PCR sekuensing, uji ELISA, dan uji HI. Hasil menunjukkan bahwa SNP c.248 A>G diekson 3 bersifat polimorfik dan berada kesetimbangan Hardy Weinberg. Mutasi membentuk 2 alel yaitu A dan G dan 3 genotipe yaitu AG, GG, dan AA. Frekuensi genotipe GG lebih tinggi (0.41) dibandingkan dengan genotipe lainnya. Genotipe AG berasosiasi dengan produksi IgY dan tidak berasosiasi dengan titer ND.

Kata kunci: Gen CD1B, ketahanan, IgY, galur Sensi-1 Agrinak, titer ND

PENDAHULUAN

Galur Sensi-1 Agrinak merupakan ayam sentul asli yang dilakukan seleksi ke arah pertumbuhan selama 6 generasi sehingga diperoleh rata-rata bobot badan 900 g ekor⁻¹ pada umur 10 minggu (Hasnelly *et al.* 2017). Galur Sensi-1 telah resmi dilepas Kementerian Pertanian Republik Indonesia sebagai rumpun ayam penghasil daging melalui

SK No.39/KPTS/PK.020/1/2017. Pelepasan galur ayam tersebut ke masyarakat dituntut memiliki ketahanan penyakit yang baik, karena pemeliharaan di masyarakat umumnya dilakukan secara ekstensif tradisional, tanpa adanya program *biosecurity* dan vaksinasi. Pertumbuhan bobot badan dan sifat ketahanan pada ayam memiliki korelasi yang negatif, artinya seleksi kearah pertumbuhan akan berdampak pada penurunan tingkat ketahanan

penyakit. Sehingga meskipun dalam program seleksi galur Sensi-1 ditujukan kearah pertumbuhan namun tidak boleh mengabaikan aspek ketahanan penyakit.

Antibodi memiliki peranan utama dalam sistem ketahanan penyakit. Antibodi bekerja dengan menetralisasi agen penyakit sehingga tidak bisa menginfeksi sel (Wibawan dan Soejoedono 2013). *Immunoglobulin Yolk* (IgY) dan *Newcastle Disease* (ND) titer merupakan salah satu antibodi yang dimiliki ayam. IgY merupakan salah satu antibodi dan merupakan parameter ketahanan penyakit secara umum pada unggas (Michael *et al.* 2018). Titer ND merupakan antibodi spesifik penyakit ND yang merupakan penyakit virus yang menyebabkan kematian yang tinggi pada ayam (Kapczynski *et al.* 2013). Respon ketahanan penyakit dapat dilihat dari konsentrasi antibodi IgY dan ND yang dihasilkan dan kualitas genetik ketahanan penyakit dapat diseleksi berdasarkan marka gen pengontrol produksi antibodi tersebut.

Cluster of Differentiation 1B (CD1B) merupakan salah satu gen yang berperan dalam produksi antibodi melalui komunikasi antar sel APC dengan sel limfosit (Taheri *et al.* 2019; Haan *et al.* 2014). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa gen CD1B berasosiasi dengan produksi IgY (Zhang *et al.* 2015). Gen CD1B juga berkaitan dengan produksi antibodi, dan penyajian antigen (Bagachi *et al.* 2016; Shahine *et al.* 2017). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi keragaman gen CD1B pada SNP c.248 di ekson 3 dan mengasosiasikannya dengan IgY serta titer ND pada ayam sentul galur Sensi-1 Agrinak.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Lapang Pemuliaan dan Genetika Fakultas Peternakan, dan Laboratorium Genetika Molekuler Ternak Fakultas Peternakan IPB, serta di Laboratorium Mikrobiologi Medik Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juli 2019 sampai Oktober 2019.

Alat

Alat yang digunakan untuk koleksi sampel berupa *syringe* 2 mL. Prosedur ekstraksi dan amplifikasi PCR menggunakan alat mikropipet, gelas ukur, *microcentrifuge*, *refrigerator*, *freezer*, *microtube*, *vortex*, mesin PCR, dan UV *Transiluminator*. Alat yang dipergunakan dalam pengujian ELISA dan HI adalah gelas ukur, *microtube* 1.5 mL, *microplate U bottom* 96 wells, *micropipet*, *multi micropipet*, *vortex*, *refrigerator* (Sanyo), *freezer*, inkubator, ELISA *reader* (Benchmark).

Bahan

Bahan berupa sampel darah dari 17 ekor (5 ekor jantan dan 12 ekor betina) ayam sentul Sensi-1 Agrinak umur 12 minggu. Bahan ekstraksi DNA dan PCR adalah DW, Prot-K, SDS 10%, 1xSTE, CIAA, NaCl 5M, EtOH, *elution buffer* dan TE 80%, *premix PCR master mix* (PROMEGA *Green Master Mix*), *primer forward*, *primer reverse*, dan *Nuclease Free Water* (NFW), serbuk *agarose*, 0.5 x *Tris-Borat* EDTA (TBE), *Flourosafe*, marker 100 pb.

Bahan analisis titer ND (HI test) dan IgY (ELISA) adalah suspensi virus standar (4 HAU), dan suspensi sel darah merah 1%, *phosphat buffer saline* (PBS), *aquadest*, *buffer bicarbonate* (Na₂NO₃), *bovine serum albumin* (BSA), alkohol 70%, *substrat tetramethylbenzidine* (TMB), PBS *tween* 0.05% (PBST 0.05%), IgY standar (PROMEGA®), anti IgY.

Prosedur

Koleksi Sampel dan Ekstraksi DNA

Sampel darah diambil pada *Vena Brachialis* menggunakan *syringe* 2 mL. Ekstraksi DNA menggunakan metode *phenol-chloroform* mengikuti McKiernan & Danielson (2017). Sampel darah 20 µL ditambahkan 1 000 µL *Delution Water* (DW), kemudian disentrifuse dengan kecepatan 8 000 rpm selama 5 menit. Tambahkan 400 µL SDS 10%, 10 µL Prot K 5 mg ml⁻¹, dan 1xSTE 400 µL. Tambahkan larutan *Phenol* 400 µL, 400 µL CIAA, dan 40 µL NaCL 5 M (goyangkan pelan-pelan dalam suhu ruang selama satu jam). Pindahkan DNA (supernatant) larutan bening ke tabung *eppendorf* 1.5 mL baru. Tambahkan 800 µL EtOH absolut dan 40 µL NaCL 5 M (*freezing* -20 °C selama 12 jam). Supernatant dibuang kemudian ditambah 800 µL EtOH 70%. Sampel dikeringkan dan ditambah TE 80% atau *Elution Buffer*.

Perancangan Primer

Primer dirancang mengacu pada kode SNP Gga_rs16057130 (Zhang *et al.* 2015) dan sekuens DNA pada Gen Bank (NM_001024582). Primer didesain dengan bantuan program aplikasi primer BLAST dengan target pada ekson 3. Primer didesain dengan panjang sekuens 543 bp dan sekuens primer sebagai berikut: Forward: 5'-GGGAGCAATAGGGTGGCTATC-3' dan Reverse: 5'-TGGATCAGGGAAGGGGAAAC-3'.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi dilakukan dengan mencampurkan 0.5 µL DNA, 0.2 µL primer *Forward*, 0.2 µL primer *Reverse*, 11.1 µL *Nuclease Free Water*, dan 12.5 µL *Green master mix*. 24.5 µL total volume PCR direaksikan menggunakan mesin PCR selama 35 siklus dan suhu *annealing* 60 °C. Elektroforesis mengikuti prosedur Lee *et al.* (2012) dengan menggunakan *agarose gel*. Pembuatan *agarose gel* dilakukan dengan mencampurkan serbuk *agarosa* 45 g dan 30 mL larutan 0.5xTBE. Elektroforesis menggunakan *amplikon* 5 µL dan dimigrasikan dengan marker 100 pb dan difoto menggunakan UV *Transiluminator*. Identifikasi keragaman menggunakan metode *sekuensing* dan analisis menggunakan jasa *Ist Base* di Selangor, Malaysia.

Uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Uji dilakukan secara *Indirect ELISA* berdasarkan prosedur Lin (2015). Tahap pertama, *microplate* dilapisi dengan 2.5 µg mL⁻¹ antigen IgY sebagai antibodi penangkap, yang telah diencerkan 250 µL dengan *Buffer Bicarbonat* (Na₂NO₃), lalu diinkubasi semalam pada suhu 4 °C. *Plate* lalu dicuci tiga kali dengan larutan *phosphate buffered saline and tween-20* (PBST-20, pH 7.4). Tahap kedua dilakukan *blocking* dengan BSA 1% 100 µL lubang⁻¹, lalu

diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C dan dicuci dengan PBST 0.05% 3 kali.

Sampel serum kemudian dimasukkan sebanyak 100 µL setiap lubang dengan pengenceran 1:150 dan diinkubasi selama 1 jam suhu 37 °C. IgY standar sebagai antibodi pendeteksi dimasukkan dan dinkubasi 1 jam suhu 37 °C. Antibodi sekunder dimasukkan 50 µL setiap sumur yaitu IgG anti rabbit yang telah dikongjugasi dengan enzim *peroksidase* (IgG HRP anti rabbit), lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Plate* dicuci kembali dengan PBST 1% sebanyak tiga kali, terakhir substrat 50 µL setiap sumur dimasukkan dalam kondisi tanpa cahaya. Optical Density (OD) dibaca menggunakan ELISA reader.

Uji Hemagglutination Inhibition (HI)

Uji HI berfungsi untuk mengetahui adanya respon antibodi terhadap antigen dan mengetahui korelasi antara titer antibodi dan ketahanan (Indriani 2013). Prinsip uji HI adalah menghambat aglutinasi sel darah merah oleh virus akibat terikatnya virus tersebut oleh antibody spesifik (Syukron *et al.* 2013).

Prosedur Uji HI mengikuti Alfonso *et al.* (2012), diawali dengan masing-masing sumur *microplate U bottom* nomor 1-12 diisi dengan 25 µL suspensi virus standar (4 HA Unit). Sebanyak 25 µL serum ditambahkan dan dihomogenkan di dalam sumur nomor 1. Sebanyak 25 µL campuran virus standar dan serum pada sumur nomor 1 dipindahkan dan dihomogenkan ke dalam sumur nomor 2, dan dilakukan hal serupa hingga sumur ke-12. *Microplate* digoyang-goyangkan, dan diinkubasi pada temperatur ruangan selama 15 menit. Sebanyak 25 µL suspensi sel darah merah 0.5% (sebagai antibodi) ditambahkan ke dalam seluruh sumur, dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Hasil dibaca jika eritrosit pada sumur kontrol telah mengendap.

Analisis Data

Hasil sekuensing dianalisis menggunakan aplikasi BioEdit, *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versi 7.0 dan Fich TV (Tamura *et al.* 2013). Keragaman gen diidentifikasi berdasarkan frekuensi gen dan genotipe, nilai chi square test (χ^2) dan nilai heterosigositas pengamatan (H_o) dan heterosigositas harapan (H_e) (Nei dan Kumar 2000). Asosiasi gen CD1B terhadap IgY dan titer ND dianalisis dengan software SAS 9.4. Model matematis menggunakan general linier model (GLM) dan nilai rata-rata genotipe dibandingkan menggunakan uji t (Kayan *et al.* 2011; Mattjik dan Sumertajaya 2002).

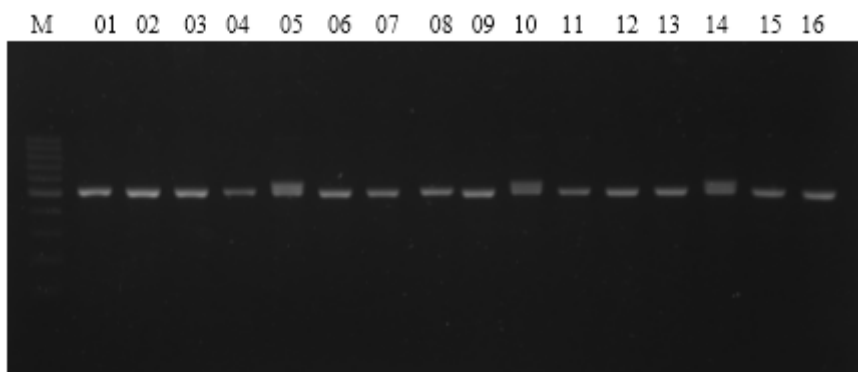
$$Y_{ij} = \mu + G_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan : Y_{ij} : nilai pengamatan akibat pengaruh genotipe ke- i pada ulangan ke- j ; μ : nilai tengah umum; G_i : pengaruh genotipe ke- i , ϵ_{ij} : pengaruh galat percobaan pada ulangan ke- j dengan genotipe ke- i .

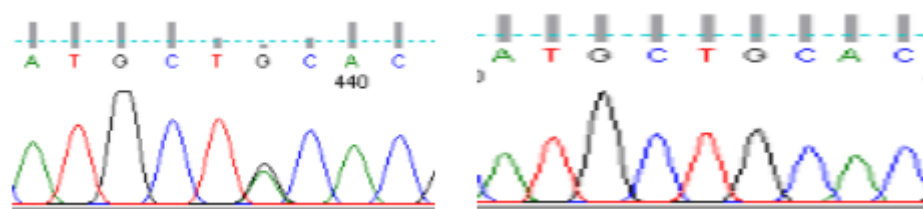
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen CD1B

Amplifikasi DNA menggunakan suhu annealing 60 °C selama 20 detik dan dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil amplifikasi diperoleh produk PCR dengan panjang 543 pb (Gambar 1). Hasil sekuensing (Gambar 2) ditemukan target SNP (*single nucleotide polymorphism*) pada ekson 3 yaitu pada titik SNP c.248 dengan perubahan basa adenin menjadi guanin. SNP tersebut pada penelitian sebelumnya juga telah ditemukan oleh Zhang *et al.* (2015) dengan kode SNP Gga_rs16057130 dan berasosiasi terhadap konsentrasi IgY. SNP c.248 A>G merupakan mutasi substitusi yang menyebabkan perubahan sintesis asam amino. C.248 A>G menunjukkan terjadi mutasi transisi, bahwa mutasi tidak menyebabkan perubahan struktur ikatan DNA (Luo *et al.* 2016).



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi fragmen gen CD1B dengan menggunakan gel agarosa 1.5% (M = marker DNA 100 bp; 01-16 = sampel DNA)



(a) Mutasi c.248 A>G

(b) Mutasi c.248 A>G

Gambar 2. Sekuen parsial gen CD1B pada mutasi c.248

SNP c.248 A>G merupakan mutasi *synonymous mutation*, yaitu tidak terjadi perubahan asam amino leucin. Mutasi *synonymous* memengaruhi konformasi (stabilitas struktur) dan mekanisme transkripsi serta regulasi RNA (Zuben dan Chava 2011).

Keragaman Gen CD1B c.248 A>G Ekson 3

Keragaman gen dalam populasi digambarkan dengan frekuensi gen atau alel polimorfik dan nilai heterosigositas pada kesetimbangan Hardy-Weinberg. Hasil penelitian (Tabel 1) menunjukkan bahwa pada titik SNP c.248 bersifat polimorfik dengan adanya 2 alel (Nei dan Kumar 2000). SNP menghasilkan 2 alel yaitu alel G dan A serta 3 genotipe yaitu GG, AG, dan AA. Frekuensi alel G lebih tinggi dibanding alel A dengan persentase 56%. Frekuensi genotipe juga menunjukkan bahwa genotipe GG memiliki frekuensi lebih dominan dibanding dengan genotipe AG dan AA.

Hasil uji *chi square* (χ^2) (Tabel 1) menunjukkan bahwa frekuensi gen atau genotipe berada dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg dimana nilai χ^2 hitung lebih kecil dibanding nilai χ^2 tabel (Wang dan Shete 2011). Mutasi berada dalam kesetimbangan berarti bahwa frekuensi alel dan genotipe bersifat tetap dari generasi ke generasi. Frekuensi tetap berarti telah terjadi perkawinan acak dalam populasi dan tidak ada faktor-faktor lain yang menyebabkan perubahan genetik (Allendorf *et al.* 2013). Nilai heterosigositas (Tabel 1) menunjukkan bahwa SNP c.248 keragamannya rendah yaitu nilai H_o lebih rendah dibanding H_e . Berdasarkan nilai heterosigositas pengamatan dan harapan, ayam Sensi-1 menunjukkan telah dilakukan program seleksi yang diindikasikan nilai heterosigositas objektif dan harapan tidak berbeda terlalu nyata (Sharma *et al.* 2016). Menurut Sumantri *et al.* (2008), nilai heterosigositas dipengaruhi oleh jumlah sampel dan frekuensi genotipe serta marka genetik yang digunakan.

Hubungan Keragaman Genotipe Gen CD1B c.248 A>G dengan Konsentrasi IgY dan Titer ND

Asosiasi genotipe gen CD1B c.248 A>G dengan konsentrasi IgY pada Tabel 2, menunjukkan rataan konsentrasi IgY genotipe AG berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan genotipe GG, dan genotipe AA tidak berbeda nyata dengan genotipe AG dan GG. Genotipe AG mempunyai konsentrasi IgY tertinggi dibanding dengan genotipe lainnya.

Berdasarkan data yang diperoleh menunjukkan SNP c.248 genotipe AG berpengaruh terhadap fungsi gen dalam meningkatkan konsentrasi IgY secara signifikan. Mutasi yang terjadi dapat mempengaruhi respon pembentukan antibodi melalui molekul CD1B yang berperan dalam adhesi sel T helper di kompleks MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (Batuwangala *et al.* 2004). Sebagaimana penelitian yang telah dilakukan oleh Zhang *et al.* (2015), menyebutkan SNP c.248 bersifat signifikan terhadap konsentrasi IgY. Penelitian lainya ditemukan bahwa gen CD1B berasosiasi dengan produksi antibodi spesifik bakteri (spesies *Salmonella*, *Mycobacterium*, dan *Staphylococcus*) (Jones *et al.* 2001; Rhijn *et al.* 2016).

SNP c.248 genotipe AA memiliki titer ND yang tertinggi (tidak signifikan) dibandingkan dengan genotipe GG dan AG (Tabel 2). Titer ND tidak berbeda nyata antar genotipe disebabkan respon tubuh menghasilkan antibodi spesifik ND yang sama. Mutasi tidak berpengaruh terhadap penyajian antigen spesifik penyakit ND, sehingga antibodi yang dihasilkan tidak berbeda. Antibodi bersifat spesifik terhadap agen penyakit dan memiliki sensitifitas yang tinggi (Arnold dan Chung 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Brujeni *et al.* (2019) menyebutkan bahwa konsentrasi IgY dan titer ND memiliki korelasi positif, artinya kedua titer memiliki pola yang cenderung sama. Tabel 2 menunjukkan bahwa perbedaan signifikan hanya terjadi pada IgY, sedangkan titer ND tidak signifikan. Hal tersebut dapat menunjukkan bahwa gen CD1B SNP c.248 tidak berhubungan dengan produksi antibodi spesifik penyakit ND. Sebagaimana literatur yang telah ada, gen CD1B berhubungan dengan produksi antibodi IgY atau antibodi dari jenis-jenis bakteri (Zhang *et al.* 2015; Jones *et al.* 2001; Rhijn *et al.* 2016).

Titer ND positif jika mempunyai nilai lebih besar dari 2 log 4 (OIE 2012). Rataan titer ND pada Tabel 2, semua genotipe negatif terdapat titer ND. Titer antibodi positif menunjukkan genotipe tersebut memiliki proteksi yang cukup baik terhadap penyakit ND. Titer antibodi negatif dapat disebabkan ayam belum terpapar virus ND atau ayam terinfeksi tetapi respon pembentukan antibodi belum terbentuk atau lambat sehingga tidak memberikan nilai positif pada uji HI.

Tabel 1. Frekuensi genotipe, frekuensi gen, nilai heterosigositas dan χ^2 test gen CD1B pada ayam Sentul galur Sensi-1

SNP (n)	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Gen		χ^2	H_0	He
	GG	AG	AA	G	A			
c.248 G>A (17)	0.29	0.29	0.41	0.44	0.56	2.768	0.294	0.493

n = jumlah sample; χ^2 = Chi Square; $x^2(0.05;1)$: 3.84; H_o = Heterosigositas pengamatan; He = Heterosigositas harapan

Tabel 2. Asosiasi keragaman gen CD1B dengan konsentrasi IgY pada ayam sentul galur Sensi-1

SNP	Genotipe mg mL ⁻¹ (n)		
	AA	AG	GG
IgY (17)	7.52 ± 1.60 (7) b	10.81 ± 2.53 (5) a	6.82 ± 0.82 (5) b
ND (17)	1.71 ± 0.75 (7)	1.20 ± 0.44 (5)	1.40 ± 0.54 (5)

Huruf berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0.05$)

KESIMPULAN

SNP c.248 A>G gen CD1B ekson 3 pada ayam sentul galur Sensi-1 merupakan mutasi synonymous, bersifat polimorfik, dan berada dalam kesetimbangan Hardy Weinberg. Mutasi c.248 A>G membentuk 2 alel dan 3 genotipe yaitu AG, GG, dan AA. Konsentrasi IgY pada genotipe AG berbeda signifikan dengan genotipe AA dan GG.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, yang telah mendanai penelitian ini melalui kolaborasi penelitian *Word Class Research* (WCR), dengan nomor kontrak: 121 / SPH / LT / DPRM / 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Afonso, C. L.,** P. J. Miller, C. Grund, G. Koch, B. Peeters, P. W. Selleck & G. B. Srinivas. 2012. *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE. 2012:555-573.
- Allendorf, F. W.,** G. Luikart, & S. N. Aitken. 2013. *Conservation and The Genetics of Population*. Edisi ke-2. West Sussex (UK): Wiley-Blackwell Publishing.
- Arnold, K. B., & A. W. Chung.** 2018. Prospects from systems serology research. *Immunology*. 153(3): 279-289.
- Batuwangala, T.,** D. Shepherd, S. D. Gadola, K. J. Gibson, N. R. Zaccai, A. R. Fersht, G. S. Besra, V. Cerundolo, & E. Y. Jones. 2004. The crystal structure of human CD1b with a bound bacterial glycolipid. *J Immunol*. 174: 2382-2388.
- Brujeni, G. N.,** M. Hassanzadeh, H. Al-Karagoly, T. Tolouei, & A. Esmailnejad. 2019. Evaluation of humoral immune responses to enterotropic lentogenic VG/VA vaccine of Newcastle disease in commercial turkey poults (*Meleagris gallopavo*). *Acta Vet Scand*. 61:1-6.
- Haan, D.,** M. M. Joke, Arens, Ramon, Zelm, & C. Menno. 2014. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells, and B cells. *Immunology Letters*. 162: 103-112.
- Hasnelly, H.,** S. Iskandar, & T. Sartika. 2017. Qualitative and quantitative characteristics of Sensi-1 Agrinak chicken. *JITV*. 22:68-79.
- Indriani, R., & I. N. L. P. Dharmayanti.** 2013. Studi efikasi vaksin bivalen AI isolat lokal terhadap beberapa karakter genetik virus AI subtype H5N1. *J Biologi Indonesia*. 9(1): 21-30.
- Jones DC,** Gelder CM, Ahmad T, Campbell IA, Barnardo MC, Welsh KI, Marshall SE, Bunce M. 2001. CD1 genotyping of patients with mycobacterium malmoense pulmonary disease. *Journal Tissue Antigens*. 58(1): 19-23.
- Kapczynski, D. R.,** C. L. Afonso, & P. J. Miller. 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology* 41:447-453.
- Lee, P. Y.,** J. Costumbrado, C. Y. Hsu, & Y. H. Kim. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis Exp*. 62: 3923.
- Lin, A. V.** 2015. *Indirect ELISA*. In: *ELISA: Methods and Protocols* (H. Robert, eds). Humana Press. New York. P. 51-59.
- Luo, G.,** X. Li, Z. Han, Z. Zhang, Q. Yang, H. Guo, & J. Fang. 2016. Transition and Transversion Mutations Are Biased towards GC in Transposons of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Gene* 7: 1-12.
- Kayan, A.,** M.U. Cinar, M.J. Uddin, C. Phatsara, K. Wimmers, S. Ponsuksili, D. Tesfaye, C. Looft, H. Juengs, E. Tholen, and K. Schellander. 2011. Polymorphism and expression of the porcine Tenascin C gene associated with meat and carcass quality. *Meat Sci*. 89(1):76-83.
- Mattjik, A. A. & M. Sumertajaya.** 2002. *Experimental Design with SAS and Minitab Applications*. 2nd ed. IPB Pr. Bogor.
- McKiernan, H. E., & P. B. Danielson.** 2017. Molecular diagnostic applications in forensic science. *Molecular Diagnostics* 21:371-394.
- Michael, A.,** S. Rajeswari, C. Ankit, & Y. Z. Xiao. 2018. Applications of chicken egg yolk antibodies (IgY) in healthcare: A Review. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2: 2161-2163.
- Nei, M. & S. Kumar.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford Univ Pr. New York.
- Rhijn V,** Ly D, Moody DB. 2016. CD1a, CD1B, and CD1c in immunity against mycobacteria. In: Divangahi M. (eds) the new paradigm of immunity to tuberculosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 783.

- Sharma, R.**, B. Kumar, R. Arora, S. Ahlawat, A. K. Mishra, & M. S. Tantia. 2016. Genetic diversity estimates point to immediate efforts for conserving the endangered Tibetan sheep of Indian. *Meta gene* 8:14-20.
- Sumantri, C.**, R. Diyono, A. Farajallah, & I. Inounu. 2008. Polimorfisme gen calpastatin (CAST-Msp1) dan pengaruhnya terhadap bobot hidup domba lokal. *JITV*. 13(2): 117-126.
- Syukron, M. U.**, I. N. Suartha, & N. S. Dharmawan. 2013. Serodeteksi penyakit tetelo pada ayam di Timor Leste. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(3):360-368.
- Taheri, M.**, H. Danesh, F. Bizhani, G. Bahari, M. Naderi, & M. Hashemi. 2019. Association between genetic variants in CD1A and CD1D genes and pulmonary tuberculosis in an Iranian population. *Biomedical Reports*. 10: 259-265.
- Tamura, K.**, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30(12): 2725–2729.
- Wang, J.** & S. Shete. 2012. *Testing Departure from Hardy–Weinberg Proportions*. In: *Statistical Human Genetics: Methods and Protocols*. (R.C. Elston, J.M. Satagopan and S. Sun, eds). Humana Press. New York. P. 850.
- Wibawan, I. W. T.**, & R. D. Soejoedono. 2013. *The Essence of Medical Immunology*. IPB Pr. Bogor.
- Zhang, L.**, P. Li, R. Liu, M. Zheng, Y. Sun, Wu, Y. Hu, J. Wen, & G. Zhao. 2015. The identification of loci for immunity traits in chicken using a genome-wide association study. *J Plos One*. 10: 1-16.
- Zuben E.**, Chave K. 2011. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *J. Nature Reviews Genetics*. 12: 683–691.