

# Purifikasi Immunoglobulin *Yolk* Pada Ayam yang Divaksin terhadap Ekskretori/Sekretori Stadium L<sub>3</sub> *Ascaridia galli*

(Purification yolk immunoglobulin of hens vaccinated against excretory/secretory *Ascaridia galli* L<sub>3</sub> larvae stage)

Darmawi<sup>1</sup>, Ummu Balqis<sup>2</sup>, Risa Tiuria<sup>3</sup>, Muhammad Hambal<sup>4</sup> dan Samadi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Staf Pengajar Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>2</sup> Staf Pengajar Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>3</sup> Staf Pengajar Helminologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

<sup>4</sup> Staf Pengajar Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>5</sup> Staf Pengajar Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala

**ABSTRACT** The main immunoglobulin fraction of poultry is called IgY, in order to distinguish it from the mammalian IgG. This article focus on purification yolk immunoglobulin of hens vaccinated against excretory/secretory *Ascaridia galli* larvae to obtained purity IgY. Active vaccinations with excretory/secretory antigen were applied intra muscularly of chickens with an initial dose of 80 µg. The vaccinations were repeated three times with dose of each 60 µg with an interval of one week. The first vaccinations were excretory/secretory antigen mixed with Freund Adjuvant Complete and subsequently mixed with Freund Adjuvant Incomplete. Antibody response in yolk was detected at weekly intervals by agar gel

precipitation test (AGPT). The chicken's eggs were collected from 49 day after vaccinations. IgY was extracted from egg yolks by means of ammonium sulphate and purified using fast performance liquid chromatography (FPLC). The purity of anti-ekskretory/secretory IgY protein was determined by Bradford method ( $\lambda = 280$  nm). The result showed that antibody in yolk was begun detect with AGPT at four weeks after vaccination. IgY concentration after purification was  $0,875 \pm 0.251$  mg/ml. This study has shown that the product released in vitro by L<sub>3</sub> stage *A. galli* is capable of stimulating humoral immunity by mean of producing antibody through *yolk* as biologic manufacturer could be a good choice.

**Key words:** *Ascaridia galli*, excretory/secretory antigen, *yolk* Immunoglobulin

2010 Agripet : Vol (10) No. 2: 9-15

## PENDAHULUAN

Kuning telur (*yolk*) dari ayam yang diimunisasi sudah sangat terkenal sebagai salah satu sumber antibodi. Produksi *immunoglobulin yolk* (IgY) dengan memanfaatkan kuning telur ayam sebagai pabrik biologis mempunyai beberapa keunggulan. Ayam memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap pemaparan antigen asing, sehingga sistem imun ayam sangat responsif dan persisten untuk produksi IgY (Hau dan Hendriksen, 2005). Keunggulan lainnya adalah IgY dapat diperoleh dari telur dengan konsisten menjaga *animal welfare*, tanpa harus menyakiti hewan, misalnya: produksi antibodi pada mencit, kelinci, kuda,

dan hewan model lainnya harus menderita stres yang lama saat-saat serumnya dipanen. Jumlah IgY yang dihasilkan oleh ayam petelur juga lebih banyak dibandingkan antibodi hewan model lainnya.

Diantara tiga kelas imunoglobulin unggas (IgA, IgM, dan IgY) yang analog dengan imunoglobulin mamalia, IgY adalah imunoglobulin yang tersedia dalam jumlah yang paling banyak ditemukan pada serum dan didepositkan ke dalam kuning telur. Riset yang membuktikan kelimpahan dan kegunaan IgY yang didepositkan ke dalam kuning telur ayam dibuktikan oleh Carlander (2002), bahwa ayam yang telah diimunisasi dengan antigen *Pseudomonas aeruginosa* dapat menghasilkan 40 – 100 mg IgY dalam setiap butir telur ayam. Tiap-tiap butir telur dari ayam *White Leghorn*

---

Corresponding author: d\_darmawi@yahoo.com

yang diimunisasi empat kali dengan 20 – 500 µg antigen secara *subcutan* mengandung 90 – 100 mg IgY, dimana 1 – 10% diantaranya adalah IgY spesifik (Haak-Frendscho, 1994).

Ada beberapa hal penting yang membedakan IgG dengan IgY, yaitu IgY lebih resisten terhadap suhu, pH dan kekuatan ion daripada IgG. Antibodi yang mirip IgG dengan rantai berat  $\gamma$  seberat 50.000 Da tidak ditemukan pada ayam. IgY ayam tidak berikatan dengan reseptor Fc manusia dan juga tidak bereaksi dengan anti-mamalia antibodi manusia, seperti faktor *rheumatoid* dan anti-IgG manusia (Schade *et al.*, 1999).

Penelitian ini akan fokus pada evaluasi sifat imunogenik ekskretori/sekretori *L<sub>3</sub> A. galli* sebagai pemicu respons imunitas ayam petelur, khususnya respons humoral yang berimplikasi kepada terbentuknya IgY di dalam kuning telur. Antibodi anti-ekskretori/sekretori *L<sub>3</sub> A. galli* di dalam kuning telur dideteksi dengan uji *agar gel precipitation test* (AGPT). IgY dipurifikasi melalui kromatografi *fast performance liquid chromatography* (FPLC). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan IgY murni pada kuning telur dari ayam yang divaksinasi dengan antigen ekskretori/sekretori stadium *L<sub>3</sub> A. galli*. Diharapkan IgY murni yang diperoleh dari penelitian ini berpeluang dimanfaatkan pada kepentingan imunodiagnostik untuk mendeteksi antigen *A. galli*.

## BAHAN DAN METODE

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan enam ekor ayam petelur jenis *Hysex Brown* yang dibagi atas dua kelompok. Kelompok pertama terdiri dari tiga ekor ayam yang tidak divaksin. Kelompok kedua terdiri dari tiga ekor ayam yang divaksin dengan 260 µg ekskretori/sekretori *L<sub>3</sub> A. galli* secara intramuskular. Semua ayam dipastikan bebas dari infeksi cacing melalui pemeriksaan telur tiap gram tinja. Ayam dipelihara secara individual dalam kandang baterai yang diberi pakan komersial dan air minum secara *ad libitum*. Sampel *yolk* diperiksa setiap minggu mulai dari satu minggu pertama praimunisasi sampai minggu keenam pascaimunisasi. IgY yang terbentuk diuji secara kualitatif dengan *Agar Gel Precipitation Test*

(AGPT). Apabila uji AGPT sudah menunjukkan hasil positif, maka telur ayam dikoleksi untuk dilakukan purifikasi IgY melalui *Fast Performan Liquid Chromatography* (FPLC). Kuantitas protein IgY pada tiap-tiap tahap purifikasi dihitung mengikuti metode Bradford.

### Teknik Imunisasi Menggunakan Ekskretori/Sekretori *L<sub>3</sub> A. galli*

Untuk mendapatkan ekskretori/sekretori *L<sub>3</sub> A. galli*, *A. galli* dipelihara secara *in vivo* dan *in vitro*. Antigen ekskretori/sekretori dipreparasi mengikuti metode Hintz *et al.* (1998) seperti dijelaskan oleh Darmawi *et al.* (2008). Konsentrasi protein antigen ekskretori/sekretori *L<sub>3</sub> A. galli* dosis 260 µg ditentukan berdasarkan uji Bradford seperti dijelaskan oleh Darmawi *et al.* (2009) digunakan pada penelitian ini. Vaksinasi dilakukan empat kali dalam interval waktu satu minggu setiap vaksinasi. Teknik yang digunakan adalah suntikan pertama 80 µg ekskretori/sekretori larva *A. galli* dalam emulsi *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) yang diikuti dengan tiga kali suntikan *booster* (60 µg/imunisasi) dalam emulsi *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) (Lanyi dan Bergan 2003 dan Camenisch *et al.* 1999). Satu minggu pertama praimunisasi sampai minggu keenam pascaimunisasi sampel kuning telur diuji dengan AGPT. Purifikasi IgY dari kuning telur dilakukan apabila hasil AGPT sudah positif.

### Uji Spesifisitas IgY Secara Kualitatif: *Agar Gel Precipitation Test*

Agar dibuat dengan melarutkan 0,4 g agarose (Serva, Germany) dan 1,2 g polietilin glikol (PEG 6000, Merck, Germany) ke dalam 20 ml aquadest dan 20 ml PBS 0,5 M dengan pH 7,2 (Merck). Campuran tersebut ditangas pada air mendidih sampai jernih. Agar cair tersebut dituang dengan menggunakan pipet 10 ml di atas gelas objek dan dibiarkan sampai mengeras. Lubang-lubang dibuat di atas agar dengan menggunakan alat gel *puncher*. Lubang tengah diisi dengan ekskretori/sekretori *L<sub>3</sub> A. galli* sedangkan lubang di sekitarnya diisi dengan kuning telur yang telah diencerkan dengan PBS pada perbandingan 1 : 3. Gelas objek diletakkan di atas kertas saring basah

supaya terjaga kelembabannya. Reaksi dibaca setelah 18 – 48 jam untuk melihat adanya garis presipitasi yang menunjukkan antara antibodi di dalam kuning telur dan antigen ekskretori/sekretori L<sub>3</sub> *A. galli* tersebut terjadi reaksi homolog (Lanyi dan Bergan, 2003).

### Purifikasi Imunoglobulin Y (IgY) dari Kuning Telur

Purifikasi IgY dilakukan melalui *Fast Performan Liquid Chromatography* (FPLC) dengan alat AKTA™ explorer 10S, kolom HiTrap™ IgY Purification (Amersham pharmacia biotech). Ligan (matriks) kolom mempunyai afinitas spesifik terhadap IgY yang dikemas dengan medium absorpsi *thiophilic, 2-mercaptopyridine* yang terikat pada *spharose high performance*. Semua selang pada FPLC dicuci dengan etanol 20% dan air bebas ion (mili Q) untuk menghilangkan sisa-sisa protein dan zat lainnya, menghindari kontaminan bahan yang akan dipurifikasi. Matriks dalam kolom dibilas dengan buffer K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M dalam larutan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pada pH 7,5 (Soejoedono *et al.*, 2005).

Kuning telur dari ayam yang telah divaksinasi dengan antigen asal L<sub>3</sub> *A. galli* diencerkan dengan 9 bagian aquadest pH 5,0 – 5,2 dan diinkubasikan selama 6 jam pada suhu 4°C. Larutan disentrifus pada 10.000 g selama 25 menit pada suhu 4°C. Supernatan ditambahkan dengan amonium sulfat 60% dan disentrifus pada 10.000 g selama 25 menit pada suhu 4°C. Endapan diresuspensi menjadi ½ volume kuning telur dan didialisis selama satu malam dengan PBS pH 8,0 (Akita dan Nakai, 1992). Dialisis dilarutkan dalam buffer K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M dan dimasukkan ke dalam kolom *HiTrap IgY Purification Hp 5 ml* yang telah terpasang pada alat. Larutan *binding* (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M dalam larutan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pada pH 7,5) dialirkan ke dalam kolom untuk memberikan kesempatan matriks dalam kolom mengikat IgY sedangkan protein lain akan lolos dan dibuang. IgY yang terikat pada matriks dielusi dengan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pada pH 7,5. Eluat terdeteksi oleh monitor absorban ditandai dengan naiknya garis sampai terbentuk garis puncak. Setiap fraksi eluat ditampung ke dalam tabung pada alat fraksimeter. Fraksi eluat konsentrasi puncak diambil, dipisahkan pada volume semula dan

didialisis selama 24 jam dalam larutan PBS pH 8. Matriks dicuci dengan *cleaning buffer* propanol 30% dalam larutan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pada pH 7,5 (Soejoedono *et al.*, 2005).

### Kuantitas Protein IgY

Kuantitas protein IgY pada tahap purifikasi pengendapan dengan ammonium sulfat, dialisis, pemekatan dengan PEG 6000, dan hasil FPLC dihitung mengikuti metode Bradford menggunakan spektrofotometer ultraviolet (UV). Sebanyak satu ml reagen Bradford dicampurkan dalam 100 µl antibodi dan diinkubasi selama lima menit. Absorban sampel ditentukan dengan pembacaan panjang gelombang 280 nm (Paryati, 2006).

## HASIL DAN PENELITIAN

### Uji Spesifisitas IgY Secara Kualitatif: Agar Gel Precipitation Test

Antibodi tidak terdeteksi pada semua ayam yang tidak diimunisasi. Pada ayam yang diimunisasi, antibodi juga tidak terdeteksi sampai minggu ketiga pascaimunisasi. Antibodi terdeteksi pada minggu keempat, kelima, dan keenam pascaimunisasi berturut-turut pada satu, dua, dan tiga ekor ayam yang diimunisasi (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji AGPT terhadap IgY pada telur ayam

Minggu (pasca-imunisasi pertama)	Perlakuan					
	Ayam tidak di vaksin			Ayam divaksin		
	1	2	3	1	2	3
-1	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-

Keterangan: - = reaksi negatif, + = reaksi positif, terlihat garis presipitasi

Antigen ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* yang digunakan pada penelitian merupakan imunogen yang baik karena terbukti dapat menggertak sistem imunitas ayam petelur yang berimplikasi pada terbentuknya IgY di dalam kuning telur pada satu, dua, dan tiga ekor ayam berturut-turut pada minggu ke-4, ke-5, dan ke-6 pascavaksinasi (Tabel 1). Seperti yang

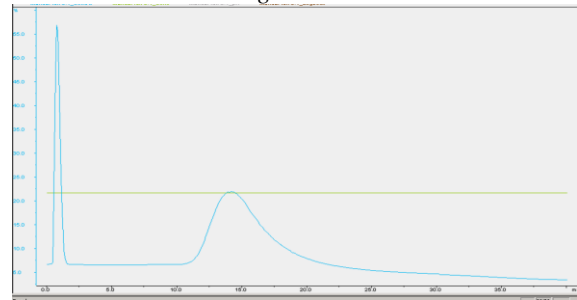
dilaporkan Darmawi *et al.* (2008) bahwa Harnett *et al.* (1997) telah membuktikan bahwa aplikasi 300 µg ekskretori/sekretori *Ochocerca gibsoni* jantan dewasa yang diimunisasikan 50 µg setiap hari selama 6 hari berturut-turut dapat memicu respons humoral hewan percobaan. Vaksinasi pertama dan kedua antigen diemulsikan FCA dan IFA berturut-turut. Sedangkan pada 4 kali *booster* selanjutnya digunakan PBS. Menurut Yoshihara *et al.* (1993) cairan tubuh cacing *A. suum* betina dewasa dapat digunakan sebagai antigen untuk mendiagnosa ascariosis pada babi melalui uji ELISA. Terbukti bahwa reaksi spesifik terjadi antara cairan tubuh cacing dengan antibodi di dalam serum babi yang diinfeksi. Fraksi protein 105 kDa dari cairan tubuh cacing dewasa bereaksi sangat spesifik dengan IgG di dalam serum babi yang diinfeksi dengan *A. suum*.

Pada penelitian ini, IgY yang dipicu oleh pemaparan antigen ekskretori/sekretori larva *A. galli* sudah terdeteksi melalui uji AGPT mulai minggu keempat pascaimunisasi (Tabel 1). Sebenarnya, antibodi anti-ekskretori/sekretori L<sub>3</sub> *A. galli* mulai didepositkan ke dalam *yolk* mulai pada minggu kedua, dan mencapai puncaknya pada minggu kedelapan dan kesembilan pascaimunisasi yang dapat dibuktikan melalui uji *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA) (Darmawi *et al.*, 2008). Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada minggu kedua titer antibodi yang didepositkan ke dalam *yolk* masih rendah sehingga tidak dapat dideteksi dengan uji AGPT. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan laporan Soejoedono *et al.* (2005) bahwa pemaparan antigen ke dalam tubuh induk ayam akan menghasilkan antibodi spesifik terhadap antigen yang disuntikkan. Ayam petelur yang diimunisasi dengan *Streptococcus mutans*, *Salmonella enteritidis*, dan *Escherichia coli* menunjukkan serum dan ekstraksi kuning telur positif mengandung IgY terhadap bakteri tersebut dua minggu pascaimunisasi.

### Purifikasi Immunoglobulin Y (IgY) dari Kuning Telur

Kromatogram hasil pengujian IgY anti *A. galli* menunjukkan *peak* terbentuk pada fraksi keempat (Gambar 1).

Gambar 1. Kromatogram FPLC IgY anti-ekskretori/sekretori *A. galli*



Hasil FPLC pada penelitian ini menunjukkan bahwa IgY dapat dideteksi oleh monitor absorbansi. Garis grafik mulai naik pada fraksi ketiga sampai terbentuk puncak (*peak*) pada fraksi keempat dan grafik menurun kembali pada fraksi kelima (Gambar 1). Prinsip purifikasi IgY melalui FPLC adalah interaksi IgY dengan ligan dapat berlangsung akibat adanya pertukaran elektron donor dan penerimaan aksi pada ligan. Absorpsi thiofilik dikembangkan oleh struktur garam-air yang memberikan interaksi IgY dan hasil ligan dari aksi kombinasi pemberian dan penerimaan elektron dari ligan atau campuran model interaksi hidrofilik-hidrofobik antara ligan dan IgY. Teknik yang digunakan adalah FPLC dengan alat AKTA™ explorer 10S, kolom HiTrap™ IgY Purification (Amersham pharmacia biotech). Ligan (matriks) kolom mempunyai afinitas spesifik terhadap IgY yang dikemas dengan medium absorpsi *thiophilic*, 2-mercaptopyridine yang terikat pada *spharose high performance*. Ikatan IgY pada matriks dapat dielusi oleh larutan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 7,5. Eluat IgY dapat dideteksi oleh monitor absorbansi yang menyebabkan naiknya garis sehingga terbentuk puncak (*peak*). Kolom HiTrap™ IgY Purification memiliki kelebihan antara lain: didapatkan kemurnian IgY yang lebih baik, purifikasi IgY cepat dan mudah dari kuning telur, dan masing-masing column mengikat IgY dari 1-4 kuning telur. Untuk kapasitas yang lebih besar, kolom dapat dihubungkan dalam rangkaian (Amersham, 2003).

### Kuantitas Protein IgY

Untuk mengetahui kuantitas protein dilakukan pemeriksaan kandungan protein IgY

dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm. Sampel diambil pada tiap-tiap tahap dari empat tahapan purifikasi. Kuantitas protein IgY pada tiap-tiap tahap purifikasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kuantitas protein kuning telur pada tiap-tiap tahapan purifikasi IgY

Tahap purifikasi	Kuantitas protein (mg/ml)
Pengendapan ammonium sulfat	6.936
Dialisis	4.685
Pengendapan PEG 6000	6.74
FPLC	0.875

Kuantitas protein IgY yang ditemukan pada purifikasi FPLC adalah 0,875 mg/ml (Tabel 2). Nilai tersebut diperoleh pada rata-rata volume kuning telur *HySex Brown* adalah 10,1 – 14,9 ml/yolk, setara dengan kuantitas protein IgY adalah 18 – 26 mg dalam setiap butir telur *HySex Brown*. Sebagai perbandingan, Haak-Frendscho (1994) melaporkan bahwa ayam petelur *White Leghorn* yang diinjeksi pada beberapa lokasi *subcutan* dengan 20 – 500 µg antigen yang dicampur dengan FCA dan diikuti 2-3 kali *booster* dapat menghasilkan 90 – 100 mg IgY, 1 -10% (1 -10 mg) diantaranya adalah IgY spesifik dalam setiap butir telur. Rollier *et al.* (2000) membuktikan bahwa dalam setiap butir telur yang dihasilkan oleh ayam yang diimunisasi dengan antigen *Hepadnavirus* ditemukan 60 – 100 mg IgY spesifik terhadap antigen virus tersebut. Hal ini membuktikan bahwa IgY yang didepositkan ke dalam kuning telur bervariasi kuantitasnya, tergantung pada jenis antigen dan jenis ayam yang digunakan. Selain itu, respons imun terhadap antigen yang berasal dari cacing biasanya lemah bila dibandingkan dengan respons imun yang dirangsang oleh antigen yang berasal dari bakteri atau virus.

IgY mengemban fungsi yang setara dengan IgG mamalia. IgY berevolusi dan diduga menjadi cikal bakal IgG dan IgE mamalia. Namun, berdasarkan struktur fundamennya ada perbedaan antara IgG mamalia dan IgY unggas. Molekul IgY terdiri dari dua rantai berat dan dua rantai ringan. Rantai berat tidak memiliki engsel dan tersusun atas empat domain variabel yaitu Cv1, Cv2,

Cv3, dan Cv4. IgY memiliki berat molekul ~180 kDa yang masing-masing rantai beratnya ~65-68 kDa, koefisien sedimentasi 7,8 S, dan titik isoelektrik 5,7-7,6 (Chio, 2002 dan Davalos-Patoja *et al.*, 2000).

Penggunaan IgY yang terbentuk oleh rangsangan antigen tertentu telah diaplikasikan untuk kepentingan imunodiagnostik dan imunoterapi. Schmidt *et al.* (1989) telah memproduksi IgY anti-virus distemper terhadap anjing untuk kepentingan imunokimia. IgY dapat berperan lebih baik dibanding antibodi mamalia dalam imunodiagnostik, pencegahan dan pengobatan terhadap patogen pada infeksi gastrointestinal (Szabo *et al.*, 1998). Penyakit infeksius enterik yang disebabkan oleh mikroba pada manusia dan hewan dapat diobati melalui pemberian IgY spesifik secara oral sebagai imunisasi pasif (Mine dan Kovacs-Nolan, 2002).

IgY yang didapatkan dari hasil penelitian ini diharapkan berpeluang digunakan sebagai imunodiagnostik untuk mendeteksi antigen *A. galli*, khususnya untuk pemeriksaan antigen yang dilepaskan ke dalam tinja (kopro antigen). Biasanya, deteksi kecacingan menggunakan sampel tinja untuk menemukan telur cacing. Metode tersebut tidak akurat manakala cacing muda belum bertelur sehingga tidak ditemukan telur di dalam tinja. IgY anti-ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* berpotensi digunakan untuk mendeteksi secara dini keberadaan kopro antigen yang dilepaskan oleh cacing muda (larva) ke dalam tinja selama establish di dalam saluran pencernaan inang.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Ayam yang divaksinasi dengan ekskretori/sekretori L<sub>3</sub> *A. galli* dapat membentuk antibodi muali pada minggu ke-4 pascavaksinasi.
2. Antibodi yang terbentuk adalah IgY anti-ekskretori/sekretori yang dapat dipurifikasi melalui kromatografi FPLC, dan mempunyai konsentrasi protein 0,875 mg/ml.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akita, E.M., Nakai, S., 1992. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *J. of Food Sci.* **57**: 629 – 634.
- Amersham. 2003. Amersham Biosciences, BioDirectory. *Amersham Biosciences Ltd.*
- Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R.H., Gassmann, M., 1999. General Applicability of Chicken Egg Yolk Antibodies: the Performance of IgY Immunoglobulins Raised Against the Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$ . *J. FASEB.* **13**: 81-88.
- Carlander, D., 2002. Avian IgY Antibody: *in vitro* and *in vivo*. *Dissertation*, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Chio, V., 2002. Ducks Antibodies for IVD Applications. IVD Technology. <http://www.decifelink.com/ivdt/archive/02/04/003.html>. (20-02-2003).
- Darmawi, Balqis, U., Tiuria, R., Hambal, M. dan Samadi. 2008. Kajian Titer Antibodi Pada Yolk Dari Ayam Yang Diimunisasi Dengan Antigen Ekskretori/Sekretori Stadium L3 *Ascaridia galli*. *Jurnal Agripet* **8**(2): 21–26, Tahun 2008
- Darmawi, Balqis, U., Tiuria, R., Soejoedono R.D., Pasaribu, F.H., Hambal. 2009. Konsentrasi Protein dan Penentuan Berat Molekul Ekskretori/Sekretori L3 *Ascaridia galli*. *J. Ked. Hewan* **3**(1): 197 – 202.
- Davalos-Patoja, L., Ortego-Vinuesa, J.L., Bastos-Gonzales, D., Hidalgo-Alvarez, R., 2000. Colloidal Stability of IgG and IgY-coated Latex Microspheres, Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces.* **20**(2): 165-175.
- Haak-Frendscho, M., 1994. Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, an Appealing Alternative. *Promega Notes Magazine* (46): 11.
- Hau, J. and Hendriksen, C.F.M., 2005. Refinement of Polyclonal Antibody Production by Combining Oral Immunization of Chickens with Harvest of Antibodies from the Egg Yolk. *J. ILAR.* **46**(3) (online issues).
- Hintz, M., Schares, G., Taubert, A., Geyer, R., Zahner, H., Stirm, S., Conraths, F.J., 1998. Juvenile Female *Listomosoides sigmodontis* Produce an Excretory-Secretory Antigen (Juv-p120) Highly Modified with Dimethylaminoethanol. *J. of Parasitol.* **171**: 265-271.
- Lanyi, B. and Bergan, T., 2003. Bacterial Agglutination. *Method in Microbiology*, **10**: 93 – 168.
- Mine, Y., Kovacs-Nolan, J., 2002. Chicken Egg Yolk Antibodies as Therapeutics in Enteric Infectious Disease: *A Review.* *J. Med. Food* **5**: 159 – 169.
- Paryati, S.P.Y., 2006. Antibodi Anti-idiotipe Sebagai Kandidat Vaksin Rabies. *Disertasi.* Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Rollier, C., Charollois, C., Jamrd, C., Trepo, C., and Cova, L., 2000. Maternally Transferred Antibodies from DNA-Immunized Avians Protect Offspring Against Hepadnavirus Infection. *J. of Virol.* **74**(10): 4908 – 4911.
- Schade, R., Henklein, P. and Hlinak, A., 1999. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. *The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21<sup>1,2</sup>*. Reprinted with Minor Amendments from ATLA **24**: 925 - 934.
- Schmidt, P., Wiedemann, V., Kühlmann, R., Wanke, R., Linckh, E. and Lösck, U., 1989. Production of Antibodies to Canine Distemper Virus in Chicken Eggs for Immunochemistry. *J. of Vet. Med.* **B 36**: 661 – 668.
- Soejoedono, R.D., Wibawan, I.W.T, dan Hayati, Z., 2005. Pemanfaatan Telur Ayam Sebagai Pabrik Biologis: Produksi "Yolk Immunoglobulin" (IgY) Anti Plaque dan Diare dengan Titik Berat pada Anti *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis*. *Laporan Riset Unggulan*

- Terpadu*, Kementrian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia.
- Szabo, C.S., Bardos, L., Losonczy, S. and Kachesz, K., 1998. Isolation of Antibodies from Chicken and Quail Eggs. *Presented at INABIS '98 – 5<sup>th</sup> Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, December 7 – 16<sup>th</sup>. <http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/-szabo0509/index.html> (20-11-06)*
- Yoshihara, S., Oya, T., Furuya, T., Goto, N.. 1993. Use of Body Fluid of Adult Female *Ascaris suum* as an Antigen in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Diagnosis of Swine Ascariasis. *J. of Helminthol.* 67: 279 – 286.