

# RESPONS ANTIBODI AYAM PETELUR YANG DIBERIKAN PROTEIN EKSKRETORI/SEKRETORI DAN DITANTANG DENGAN TELUR INFEKTIF *Ascaridia galli*

## *Antibody Responses of Laying Hens Treated with Excretory/Secretory Protein and Challenged with Infective Eggs of Ascaridia galli*

Darmawi<sup>1</sup>, Ummu Balqis<sup>2</sup>, Risa Tiuria<sup>3</sup>, Retno Damayanti Soejoedeno<sup>4</sup>, Fachriyan Hasymi Pasaribu<sup>5</sup>, Muhammad Hambal<sup>6</sup>, dan Razali Daud<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>3</sup>Laboratorium Helminthologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>4</sup>Laboratorium Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>5</sup>Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>6</sup>Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>7</sup>Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail:d\_darmawi@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui respons antibodi dalam serum ayam petelur terhadap ekskretori/sekretori, dan ditantang dengan telur infeksi *Ascaridia galli* (*A. galli*) Sebanyak 12 ekor ayam dibagi dalam empat kelompok. Kelompok pertama adalah ayam yang tidak diimunisasi dan tidak diinfeksi (kontrol), kelompok kedua adalah ayam yang diimunisasi dengan dosis 260 µg ekskretori/sekretori larva *A. galli*, kelompok ketiga adalah ayam yang diinfeksi dengan dosis 1000 telur infeksi *A. galli*, dan kelompok keempat adalah ayam yang diimunisasi dengan dosis 260 µg ekskretori/sekretori dan satu minggu kemudian ditantang dengan dosis 1000 telur infeksi *A. galli*. Respons antibodi pada masing-masing kelompok dianalisis dengan uji *enzymelinkedimmunosorbantassay* (ELISA) setiap satu minggu selama 10 minggu pascainfeksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa imunisasi dan atau infeksi dapat memicu peningkatan titer antibodi serum secara signifikan ( $P < 0,05$ ) selama 10 minggu pascainfeksi. Titer tertinggi adalah  $2,63 \pm 1,20$  OD (*optical density*) dicapai pada minggu ke-3 pascainfeksi dan titer terendah adalah  $1,51 \pm 0,48$  OD pada minggu ke-0. Ekskretori/sekretori dapat memicu respons antibodi serum ayam petelur terhadap *A. galli*.

Kata kunci: *Ascaridia galli*, ekskretori/sekretori, antibodi, ELISA

### ABSTRACT

The purpose of the present study to know antibody response in serum of laying hens against excretory/secretory, and challenged with infective eggs of *Ascaridia galli* (*A. galli*). Twelve head chickens were divided into four groups. First group, the chickens were not immunized and nor infected. Second group, the chickens were actively immunized with 260 µg of excretory/secretory *A. galli* larvae. Third group, the chickens were infected with dose 1000 infective eggs of *A. galli*. Fourth group, the chickens were immunized with 260 µg of excretory/secretory and challenged one week later with dose 1000 infective eggs of *A. galli*. Antibody responses of each group was analyzed by *enzymelinkedimmunosorbantassay* (ELISA) weekly with intervals along 10 weeks post infection. The result showed that immunizations and or infections were increased antibody titer significantly ( $P < 0,05$ ) for 10 weeks. The highest titer serum of immunized chickens were  $2,63 \pm 1,20$  OD (*optical density*) reached at three weeks after infections and the lowest was  $1,51 \pm 0,48$  OD appeared in the beginning of immunizations. This research was concluded that the excretory/secretory was able to trigger the serum antibody responses against worms parasitic, *A. galli*.

Key words: *Ascaridia galli*, excretory/secretory, antibody, ELISA

### PENDAHULUAN

*Ascaridia galli* (*A. galli*) adalah cacing gelang bertubuh besar dan tergolong cacing nematoda. Investigasi epidemiologi ascaridiosis yang disebabkan oleh infestasi *A. galli* pada unggas tersebar hampir di seluruh dunia. Kasus ascaridiosis tergolong tinggi, terutama pada negara-negara beriklim tropis seperti di Afrika (Siamba *et al.*, 2007), dan di Asia (Lalchandama *et al.*, 2009) sehingga dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat berarti. Masalah lain yang diakibatkan oleh ascaridiosis pada ayam petelur dapat menimbulkan efek immunosupresi yang rentan terhadap infeksi bakteri patogen seperti *Salmonella enterica* (Chadfield *et al.*, 2001) dan *Escherichia coli* (Permin *et al.*, 2002). Efek immunosupresi dilaporkan oleh Hørning *et al.* (2004),

bahwa ayam yang telah terinfeksi cacing secara alami dan ayam yang telah diinfeksi oleh *A. galli* apabila divaksinasi dengan vaksin *Newcastle disease De Soto* dapat mengurangi titer antibodi terhadap virus tersebut.

Selama menetap pada inang, cacing melepaskan substansi bioaktif melalui ekskretori/sekretori. Ekskretori/sekretori memainkan peran penting pada interaksi antara cacing dan inangnya karena ekskretori/sekretori bersifat antigenik. Substansi yang terdapat pada ekskretori/sekretori dapat mengenal dan bereaksi dengan antibodi sehingga dapat diaplikasikan pada uji serodiagnostik. Penelitian Choi *et al.* (2003) menjelaskan bahwa antigen ekskretori/sekretori lebih antigenik dibandingkan dengan *crude* antigen untuk serodiagnostik. Rokni dan Kia (2005) telah menggunakan uji *enzymelinkedimmunosorbantassay*

(ELISA) menunjukkan bahwa diagnosis dengan antigen ekskretori/sekretori lebih baik dibandingkan dengan antigen *somatic* dari *Strongyloides stercoralis* pada infeksi nematoda intestinal manusia. Karimi *et al.* (2008) melaporkan bahwa melalui uji difusi antigen ekskretori/sekretori dan antigen somatik dari cacing *Ornithobilharzia turkestanicum* menunjukkan reaksi silang yang kuat terhadap satu dengan lainnya. Prasad *et al.* (2008) menjelaskan pula bahwa fraksi antigen yang dipurifikasi dari ekskretori/sekretori boleh digunakan untuk diagnosis infeksi dini *Haemonchus contortus* pada domba. Fenomena yang sama diobservasi oleh Hassan dan Aziz (2010), antigen ekskretori/sekretori larva infeksi dari *Toxocara vitulorum* bersifat sangat reaktif untuk diagnostik dan telah berhasil dalam mendeteksi toxocarosis dalam level persentase infeksi yang tinggi pada kerbau.

Selain untuk bahan imunodiagnostik, penggunaan ekskretori/sekretori cacing ditujukan untuk merangsang mekanisme imunitas penyakit parasitik. Respons antibodi dalam serum hewan terhadap cacing parasitik dapat terbentuk dengan teknik imunisasi hewan dengan ekskretori/sekretori yang dilepaskan oleh cacing. Sifat imunogenik ekskretori/sekretori *Onchocerca gibsoni* jantan dewasa diekspresikan melalui pembentukan antibodi spesifik pada tikus (Harnett *et al.*, 1997). Yokoi *et al.* (2002) berhasil memproduksi antibodi monoklonal terhadap antigen ekskretori/sekretori larva *Toxocara canis* (*T. canis*), IgG bereaksi spesifik dengan protein ekskretori/sekretori dan tidak bereaksi silang dengan antigen *T. canis* dewasa. Penggunaan ekskretori/sekretori *L3 Haemonchus contortus* sebagai antigen dapat meningkatkan respons imunoglobulin G (IgG) anak domba (Vervelde *et al.*, 2003).

Indikasi terbentuknya tanggap kebal humoral pada inang adalah meningkatnya sirkulasi antibodi yang spesifik di dalam serum terhadap antigen cacing. Karimi *et al.* (2008) menjelaskan bahwa kelinci yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori atau produk somatik cacing *Ornithobilharzia turkestanicum* dewasa dapat memicu pembentukan antibodi serum kelinci. Analisis produk ekskretori/sekretori yang diidentifikasi pada *secretome* larva *Teladorsagia circumcincta* dilaporkan oleh Smith *et al.* (2009) berpotensi terlibat dalam mekanisme imunitas yaitu sebagai target respons imunoglobulin A (IgA) yang terlokalisasi di dalam mukus domba. Penelitian ini bertujuan mendeteksi respons antibodi serum ayam petelur yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori, dan ditantang dengan telur infeksi *A. galli* melalui uji ELISA. Penelitian ini bermanfaat untuk memberi informasi tentang kemampuan ekskretori/sekretori *A. galli* dalam merangsang respons antibodi ayam petelur.

## MATERI DAN METODE

### Rancangan Penelitian

Dua belas ekor ayam *HySex Brown* berumur 24 minggu digunakan sebagai ayam percobaan. Masing-masing ayam dipastikan bebas dari infeksi cacing

melalui pemeriksaan telur tiap gram tinja (TTGT). Ayam dipelihara secara individual dalam kandang batere yang diberi pakan komersial dan air minum secara *ad libitum*. Ayam dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari tiga ekor ayam. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol, ayam tidak diimunisasi dan tidak diinfeksi. Kelompok kedua adalah ayam yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori *A. galli*. Kelompok ketiga adalah ayam yang diinfeksi dengan dosis 1000 *L2 A. galli*. Kelompok keempat adalah ayam yang diimunisasi, dan ditantang dengan dosis 1000 *L2 A. galli*. Serum pada semua kelompok ayam dipanen dan diuji dengan ELISA setiap minggu yang dimulai sesaat prainfeksi dosis 1000 *L2 A. galli* sampai minggu ke-10 pascainfeksi.

### Preparasi Ekskretori/Sekretori *L3 A. galli*

Larva stadium *L3 A. galli* diperoleh dari isi lumen dan mukosa usus halus ayam petelur yang telah diinfeksi dengan dosis 6000 telur infeksi *A. galli* (Darmawi *et al.*, 2007). Larva diinkubasi dalam sumur *cell culture plate*, masing-masing sumur diisi 25-50 larva dalam 5 ml medium *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Sigma-Aldrich), pH 6,8, tanpa merah fenol yang ditambahkan 100 unit  $\text{ml}^{-1}$  penisilin G, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  streptomisin, 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  gentamisin, dan 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamisin dalam inkubator  $\text{CO}_2$  selama 3 hari. Campuran medium dengan ekskretori/sekretori *L3 A. galli* disentrifus pada 1000 g dengan temperatur 4°C selama 10 menit. Supernatan disaring dengan membran filter 0,45  $\mu\text{m}$  Minisart® (Sartorius), ditampung ke dalam tabung vivaspin 30.000 MWCO dan disentrifus pada 1000 g dengan temperatur 4°C selama 10 menit. Filtrat dicuci dengan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) dan disentrifus kembali 3 menit. Filtrat diambil dan dijadikan sebagai bahan antigen ekskretori/sekretori *L3 A. galli*. Formulasi dosis antigen ekskretori/sekretori stadium *L3 A. galli* ditentukan mengikuti metode Bradford (Darmawi *et al.*, 2009).

### Teknik Imunisasi dan Teknik Infeksi pada Ayam Percobaan

Imunisasi dilakukan empat kali dalam interval waktu satu minggu setiap kali imunisasi. Teknik yang digunakan adalah suntikan pertama 80  $\mu\text{g}$  dengan emulsi antigen plus *freund's complete adjuvant* (FCA) yang diikuti dengan tiga kali suntikan *booster* (60  $\mu\text{g}$ /imunisasi) dengan emulsi antigen plus *incomplete freund's adjuvant* (IFA) (Camenisch *et al.*, 1999; Yokoi *et al.*, 2002). Infeksi dengan dosis 1000 *L2 A. galli* dilakukan langsung ke dalam esofagus pada minggu pertama pascaimunisasi terakhir.

### Uji ELISA

Uji ELISA dilakukan terhadap serum dari semua kelompok ayam percobaan yang dipanen setiap minggu, dimulai sesaat prainfeksi dengan dosis 1000 *L2 A. galli* sampai minggu ke-10 pascainfeksi. Sumur *plate* ELISA dilapisi dengan 100  $\mu\text{l}$  antigen *L3 A. galli*.

Konsentrasi larutan yang digunakan adalah 2-10 µl/ml dalam 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5. *Plate* diinkubasikan selama 24 jam pada temperatur 4° C. *Plate* dicuci sebanyak 3 kali dengan 0,15 M NaCl, 0,02 M NaHPO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, pH 7,2 (PBS-T) yang khusus digunakan sebagai larutan pencuci dalam ELISA. Sebanyak 100 µl sampel antibodi dari serum ayam yang diencerkan 200 kali yang telah dilarutkan dalam PBS-T ditambahkan ke setiap lubang dari *plate* yang dibuat duplo. *Plate* diinkubasikan selama satu sampai dua jam pada temperatur ruangan di atas *shaker*. *Plate* dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak 100 µl antibodi yang telah dilabel (*IgY conjugate HRP, rabbit anti-chicken, Promega*<sup>(R)</sup>) dimasukkan ke dalam lubang *plate* dan diinkubasikan selama satu jam pada temperatur ruangan di atas *shaker* dan ditambahkan substrat peroksidase, ABTS, dan sitrat bufer. Prinsip yang digunakan adalah antigen ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* diikatkan pada matriks padat (*microplate*) yang berguna untuk menangkap antibodi yang larut dalam serum ayam yang telah diimunisasi dengan antigen tersebut. Kompleks antigen-antibodi yang terbentuk dideteksi dengan bantuan antibodi yang telah dilabel dengan enzim (*IgY conjugate HRP, rabbit anti-chicken*). Besarnya *optical density* (OD) adalah proporsional dengan konsentrasi ikatan kompleks tersebut. Konsentrasi ikatan yang terbentuk pada *plate* dibaca melalui *ELISA reader* dengan panjang gelombang 415 nm dengan bantuan substrat enzim (Yokoi *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2005).

#### Analisis Data

Data diuji dengan analisis sidik ragam, dan dilanjutkan dengan uji wilayah berganda Duncan.

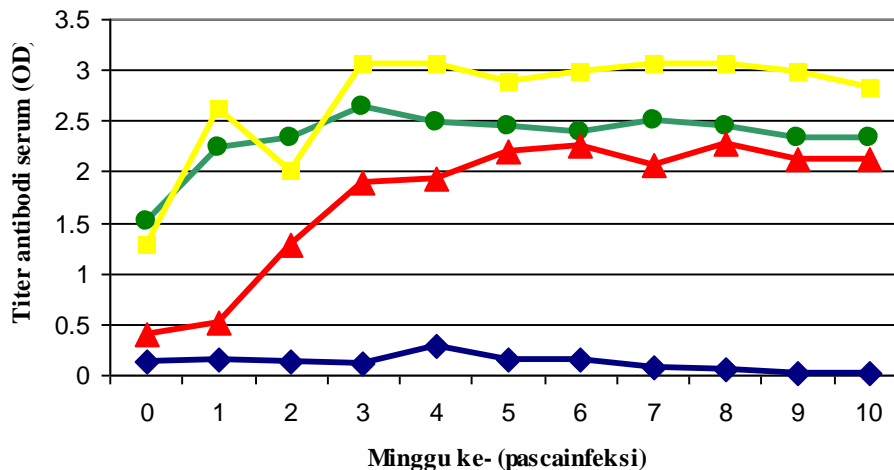
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambar 1 menunjukkan *optical density* (OD) antibodi dalam serum ayam percobaan. *Optical density* antibodi semua kelompok ayam percobaan tidak berbeda signifikan ( $P>0,05$ ) pada sesaat prainfeksi. Selain pada kelompok ayam kontrol, peningkatan OD

antibodi terjadi pada semua kelompok ayam percobaan mulai minggu ke-1 sampai minggu ke-10 pascainfeksi. *Optical density* antibodi semua kelompok ayam percobaan meningkat signifikan ( $P<0,05$ ), kecuali pada kelompok kontrol, pada minggu ke-1, 2, 5, dan 10 pascainfeksi seperti yang disajikan pada Gambar 1.

*Optical density* antibodi kelompok ayam yang diimunisasi dan diinfeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> meningkat signifikan ( $P<0,05$ ) terhadap OD antibodi kelompok ayam kontrol dan kelompok ayam imunisasi pada minggu ke-3, 4, 6, 7, 8, dan 9 pascainfeksi. *Optical density* antibodi kelompok ayam infeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> tidak berbeda signifikan ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok ayam imunisasi dan kelompok ayam yang diimunisasi dan diinfeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> pada minggu ke-3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 pascainfeksi. *Optical density* antibodi pada kelompok ayam yang diimunisasi dan kelompok ayam yang diimunisasi dan diinfeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> *A. galli* selalu menunjukkan nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan OD antibodi kelompok ayam yang tidak diimunisasi dan tidak diinfeksi, demikian juga dengan OD antibodi ayam yang hanya diinfeksi. Hal ini berarti bahwa pemaparan ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* bersifat merangsang mekanisme imunitas ayam petelur yang berimplikasi antibodi di dalam serum.

Pada minggu ke-2 pascainfeksi terjadi penurunan titer antibodi pada kelompok ayam yang diimunisasi dan diinfeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> *A. galli*. Fluktuasi antibodi yang telah terbentuk dalam serum ayam petelur kemungkinan terjadi karena sebagian antibodi telah terikat pada larva cacing *A. galli*. Peningkatan titer antibodi kembali terjadi pada minggu ke-3 pascainfeksi, dan titer antibodi yang tinggi tetap dipertahankan sampai minggu ke-10 pascainfeksi pada kelompok ayam yang diimunisasi dan diinfeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> *A. galli*. Fenomena fluktuasi titer antibodi merupakan manifestasi infeksi cacing. Menurut Nambi *et al.* (2005), respons humoral dan seluler kerbau (*Bubalus bubalis*) meningkat signifikan dua minggu setelah diimunisasi dengan 400 µg ekskretori/sekretori *Fasciola gigantica* (*F. gigantica*).



Gambar 1. Titer antibodi dalam serum ayam pada tiap-tiap kelompok ayam percobaan

Sifat antigenik ekskretori/sekretori cacing telah dibuktikan oleh peneliti terdahulu (Vervelde *et al.*, 2003; Paz-Silva *et al.*, 2003; Paz-Silva *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; dan Yadav *et al.*, 2005). Aktivitas antigenik ekskretori/sekretori *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) dan *F. gigantica* dibuktikan pula oleh dan Paz-Silva *et al.* (2004) dan Zhang *et al.* (2005). Aktivitas tersebut dapat menimbulkan efek imunomodulator dan memicu proliferasi limfosit domba, tikus, dan kerbau. Cathepsin-L (28-kDa) dari ekskretori/sekretori *F. gigantica* dapat digunakan sebagai antigen dalam uji ELISA untuk mendeteksi fasciolosis selama 4 minggu pasca infeksi pada kerbau dan domba (Paz-Silva *et al.*, 2003 dan Yadav *et al.*, 2005). Demikian juga pada anak domba yang memiliki titer IgG yang meningkat signifikan berimplikasi kepada penurunan nilai TTGT (Vervelde *et al.*, 2003). Percobaan Rokni dan Kia (2005) membuktikan bahwa antibodi serum dari pasien yang terinfeksi oleh cacing nematoda *Strongyloides stercoralis* lebih reaktif mengenal antigen ekskretori/sekretori dibandingkan dengan antigen somatik. Prasad *et al.* (2008) membuktikan pula bahwa pada infeksi awal (masa prepaten), antibodi serum domba yang diinfeksi dengan dosis 10000 telur infektif dapat mengenal antigen ekskretori/sekretori cacing nematoda *Haemonchus contortus*.

Ekskretori/sekretori yang dilepaskan oleh *A. galli* bersifat merangsang terbentuknya respons imun humoral melalui pembentukan antibodi IgY. Antibodi IgY adalah antibodi utama yang dihasilkan oleh ayam petelur. Antibodi IgY disintesis, disekresikan ke dalam darah dan ditranfer ke dalam kuning telur. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa titer antibodi ayam petelur yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori larva *A. galli* mulai meningkat di dalam kuning telur (*yolk*) pada minggu ke-2, dan mencapai puncaknya pada minggu ke-8 dan 9 pascaimunisasi (Darmawi *et al.*, 2008). Peningkatan titer antibodi di dalam kuning telur membuktikan pula bahwa pada ayam petelur yang diimunisasi, sebagian antibodi yang terbentuk didepositkan di dalam *yolk* yang berfungsi sebagai proteksi bagi *day old chicken* terhadap serangan agen infeksi (Darmawi *et al.*, 2010). Peneliti lain menjelaskan bahwa pembentukan antibodi IgY spesifik dalam kuning telur dapat dirangsang oleh bakteri *Helicobacter pylori* (Kazmierczuk *et al.*, 2005), bakteri *enteric* (Chalghoumi *et al.*, 2009; Diraviyam *et al.*, 2011), dan terhadap *Eimeria acervulina* (Lee *et al.*, 2009).

Antibodi IgY yang terbentuk oleh rangsangan antigen dialirkan melalui sistem sirkulasi sehingga berakumulasi di dalam *yolk*. Darmawi *et al.* (2010) berhasil memurnikan IgY pada *yolk* dari ayam yang dipaparkan dengan ekskretori/sekretori *A. galli*. Antibodi IgY tersebut sangat reaktif mengenal antigen yang tersebar pada tubuh cacing *A. galli* (Darmawi *et al.*, 2012). Beberapa peneliti sebelumnya menjelaskan bahwa IgY lebih efektif dan efisien digunakan pada berbagai imunoasai karena IgY memiliki sensitivitas, stabilitas, dan spesifisitas yang lebih tinggi pada

*binding IgY-specific surface antigens* atau epitop dibandingkan dengan antibodi dari mamalia (Shin *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012). Shin *et al.* (2009) menjelaskan bahwa spesifisitas antibodi poliklonal IgY yang dihasilkan dalam kuning telur ayam sangat potensial dikembangkan sebagai antibodi pada uji imunodiagnostik dalam berbagai sampel klinis untuk *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. IgY juga telah diaplikasikan pada uji ELISA untuk mendeteksi sirkulasi antigen dalam serum tikus yang diinfeksi oleh trematoda *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) (Lei *et al.*, 2009). Lei *et al.* (2011) menjelaskan bahwa sampel serum pasien yang menderita schistosomiasis sensitif dan spesifik melalui uji ELISA. Lu *et al.* (2012) berhasil mengembangkan metode imunoasai dengan memanfaatkan IgY yang efektif membedakan infeksi oleh *S. japonicum* kronis dan akut melalui identifikasi profil sirkulasi antigen *S. japonicum* di dalam serum.

## KESIMPULAN

Ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* bersifat antigenik yang dapat merangsang respons pembentukan antibodi di dalam serum ayam petelur. *Optical density* antibodi serum meningkat pada ayam yang dipaparkan dengan ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* dan ditantang dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> *A. galli*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas pendanaan penelitian ini melalui dana Hibah Bersaing. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Sulaeman dan Bapak Kosasih dari Laboratorium Helminthologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, dan Bapak Yono dari Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor atas bantuan teknik pada penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Camenisch, G., T. Mauro, C. Dmitri, K. Ivica, S. Vickram, C. Jaime, S. Patrick, H.W. Roland, and G. Max. 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.
- Chadfield, M., A. Permin, P. Nansen, and M. Bisgaard. 2001. Investigation of the parasitic nematode *Ascaridia galli* (Shrank 1788) as a potential vector for *Salmonella enterica* dissemination in poultry. **Parasitol. Res.** 87:317-325.
- Chalghoumi, R., Y. Beckers, D. Portetelle, and A. Théwis. 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 13(2):295-308.
- Choi, M.H., I.C. Park, S. Li, and S.T. Hong. 2003. Excretory-secretory antigen is better than crude antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis by ELISA. **The Korean J. Parasitol.** 41(1):35-39.
- Darmawi, R. Tiuria, R.D. Soejoedono, F.H. Pasaribu, dan U. Balqis. 2007. Populasi L<sub>3</sub> pada ayam petelur yang diinfeksi dengan dosis 6000 L<sub>2</sub> *Ascaridia galli*. **Jurnal Kedokteran Hewan** 1(2):71-76.

- Darmawi, U. Balqis, R. Tiuria, M. Hambal, dan Samadi. 2008. Kajian titer antibodi pada *yolk* dari ayam yang diimunisasi dengan antigen ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *Ascaridia galli*. **J. Agripet.** 8(2):21-26.
- Darmawi, U. Balqis, R. Tiuria, R.D. Soejoedono, and F.H. Pasaribu. 2009. Penentuan konsentrasi dan berat molekul protein ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *Ascaridia galli*. **Jurnal Kedokteran Hewan** 3(1):197-202.
- Darmawi, U. Balqis, R. Tiuria, M. Hambal, dan Samadi. 2010. Purifikasi immunoglobulin *yolk* dari ayam yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *Ascaridia galli*. **J. Agripet.** 10(2):9-15.
- Darmawi, U. Balqis, M. Hambal, R. Tiuria, B.P. Priosoeryanto, and E. Handharyani. 2012. The ability of immunoglobulin *yolk* recognized the antigen in the tissue of *Ascaridia galli*. **J. Med. Pet.** 35(3):190-195
- Diraviyam, T., T. Jeevitha., P. Saravanan, A. Michael, and S. Meenatchisundaram. 2011. Preparation of chicken (IgY) antibodies consortium for the prevention of enteric infections in poultry. **J. Microbiol. Biotech. Res.** 1(4):95-103.
- Harnett, W., M. MacDonald, G. Preece, M. Patterson, and M.E. Parkhouse. 1997. Production of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of adult male *Onchocerca gibsoni*. **J. Parasitol.** 83(2):316-319.
- Hassan, S.E. and M.M.A. Aziz. 2010. Detection of antibody to excretory/secretory antigen of *Toxocara vitulorum* infective larvae in buffalo calves by ELISA. **Glob. Vet.** 4(1):97-102.
- Hørning, G., S. Rasmussen, A. Permin, and M. Bisgaard. 2004. Investigations on the influence of helminth parasites on vaccination of chickens against newcastle disease virus under village conditions. **Vet. Parasitol.** 7(121):115-124.
- Karimi, G.R., M. Abdigoudarzi, M. Valizadeh, and H. Miranzadeh. 2008. Comparison of excretory-secretory and somatic antigens of *Ornithobilharzia turkestanicum* in agar gel diffusion test. **Iranian J. Parasitol.** 3(4):19-22.
- Kazimierczuk, K., L. Cova, B. Ndeboko, U. Szczyrk, A. Targosz, T. Brzozowski, and A. Sirko. 2005. Genetic immunization of ducks for production of antibodies specific to *Helicobacter pylori* UreB in egg yolks. **Acta Biochim. Polon.** 52(1):261-266.
- Lalchandama, K., B. Roy, and B.K. Dutta. 2009. Anthelmintic activity of *Acacia oxyphylla* stem bark against *Ascaridia galli*. **Pharm. Biol.** 47(7):578-583.
- Lee, S.H., H.S. Lillehoj, D.W. Park, S.I. Jang, A. Morales, D. Garcia, E. Lucio, R. Larios, G. Victoria, D. Marrufo, and E.P. Lillehoj. 2009. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 13(2):295-308.
- Lei, J.H., W.Q. Liu, C.S. Sun, C.L. Tang, M.J. Li, Y.L. Chen, and Y.L. Li. 2009. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with *Schistosoma japonicum* by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. **Acta Trop.** 111:39-43.
- Lei, J.H., B.T. Su, H. Xu, J.L. Shen, X.H. Guan, Z.Q. Feng, Y.L. Li, M.X. Xu, and W.Q. Liu. 2011. Evaluation of an IgY-based immunomagnetic enzyme-linked immunosorbent assay system for detection of circulating *Schistosoma japonicum* antigen in serum samples from patients in China. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 85:1054-1059.
- Lu, Y., B. Xu, C. Ju, X. Mo, S. Chen, Z. Feng, X. Wang, and W. Hu. 2012. Identification and profiling of circulating antigens by screening with the sera from *Shistosomiasis japonica* patients. **Parasites & Vectors.** 5:115.
- Nambi, P.A., S.C. Yadav, O.K. Raina, D. Sriveny, and M. Saini. 2005. Vaccination of Buffaloes with *Fasciola gigantica* Recombinant Fatty Acid Binding Protein. [http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j\\_436\\_005-1397-4.html.html](http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_436_005-1397-4.html.html).
- Paz-Silva, A., R. Sánchez-Andrade, J.L. Suárez, J. Pedreira, M. Arias, C. López, R. Panadero, P. Díaz, P. Díez-Baños, and P. Morrondo. 2003. Prevalence of Natural Ovine Fasciolosis Shown by Demonstrating the Presence of Serum Circulating Antigens. [http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j\\_436\\_003-0961-z.html.html](http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_436_003-0961-z.html.html)
- Paz-Silva, A., G.V. Hillyer, R. Sánchez-Andrade, J.R. Rodríguez-Medina, M. Arias, P. Morrondo, and P. Díez-Baños. 2004. Isolation, Identification and Expression of a *Fasciola hepatica* cDNA Encoding a 2.9-kDa Recombinant Protein for the Diagnosis of Ovine Fasciolosis. [http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j\\_436\\_004-1202-9.html.html](http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_436_004-1202-9.html.html)
- Permin, A., J.P. Christensen, and M. Bisgaard. 2002. Consequences of Concurrent *Ascaridia galli* and *Escherichia coli* Infection in Chickens. <http://lib.bioinfo.pl>
- Prasad, A., A. Nasir, and N. Singh. 2008. Detection of anti-*Haemonchus contortus* antibodies in sheep by dot-ELISA with immunoaffinity purified fraction of ES antigen during prepatency. **Indian J. Exp. Biol.** 46:94-99.
- Rokni, M.B., and E.B. Kia. 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, using somatic and excretory-secretory antigens of *Strongyloides stercoralis* for the serodiagnosis of Strongyloidosis. **Iranian J. Publ. Health.** 34(1):8-12.
- Shin, S.J., S.S. Lee, E.J.B. Manning, and M.T. Collins. 2009. Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **J. Microbiol.** 47(5):1-10.
- Siamba, D.N., L.O. Okitoi, M.K. Watai, A.M. Wachira, F.B. Lukibisi, and E.A. Mukisira. 2007. Efficacy of *Tephrosia vogelli* and *Vernonia amygdalina* as anthelmintics against *Ascaridia galli* in indigenous chicken. **Livestock Res. Rural Develop.** 19(12):1-6.
- Smith, S.K., A.J. Nisbet, L.I. Meikle, N.F. Inglis, J. Sales, R.J. Beynon, and J.B. Matthews. 2009. Proteomic analysis of excretory/secretory products released by *Teladorsagia circumcincta* larvae early post-infection. **J. Parasite Immunol.** 31:10-19.
- Vervelde, L., N. Bakker, F.N.J. Kooyman, A.W.C.A. Cornelissen, C.M.C. Bank, A.K. Nyame, R.D. Cummings, and I.V. Die. 2003. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. **Glycobiol.** 13(11):795-804.
- Yadav S.C. M. Saini, O.K. Raina, P.A. Nambi, K. Jadav, and D. Sriveny. 2005. *Fasciola gigantica* Cathepsin-L Cysteine Proteinase in the Detection of Early Experimental Fasciolosis in Ruminants. [http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j\\_436\\_005-1466-8.html.html](http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_436_005-1466-8.html.html)
- Yokoi, K., F. Kobayashi, J. Sakai, M. Usui, and M. Tsuji. 2002. Sandwich ELISA detection of excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae using a specific monoclonal antibody. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health** 33(1):33-37.
- Zhang, W., E. Moreau, F. Peigné, W. Huang, and A. Chauvin. 2005. Comparison of Modulation of Sheep, Mouse and Buffalo Lymphocyte Responses by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Excretory-Secretory Products. [http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j\\_436\\_005-1306-x.html.html](http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_436_005-1306-x.html.html)