

Variasi Respon Pembentukan IgY terhadap Toksoid Tetanus dalam Serum dan Kuning Telur pada Individu Ayam Petelur

(VARIATION OF RESPONSE ON THE PRODUCTION OF IgY TO TOXOID TETANUS IN SERUM AND EGG YOLK IN INDIVIDUAL LAYING HENS)

I Wayan Teguh Wibawan¹, Iman Bayu Prakoso Darmono¹ I Nyoman Suartha²

¹Bagian Mikrobiologi, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Email. wibawan@yahoo.com. Telp. 0251-8629474. Fax. 0251-8629459. ² Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner, Universitas Udayana, Denpasar.

ABSTRACT

The variation of response on the production of specific IgY to tetanus toxoid among chicken in serum and egg yolk was observed in this study. Chicken showed relatively late response in producing specific IgY in serum, around 59 days were needed to have a positive precipitation reaction of complex IgY-tetanus toxoid in the immunodiffusion test (agar gel precipitation test/ AGPT). The presence of IgY in egg yolk could be detected one week after positive reactions in serum was observed. The positive reaction in AGPT mostly related with the positive reaction in ELISA, eventhough the variation of titer values were observed among chicken sera and egg yolk. This response variation might be related with the different of physiological status of the chicken.

Key words: Variation of response, IgY, serum, egg yolk, toxoid tetanus

PENDAHULUAN

Variasi respon pembentukan antibodi secara individu pada mahluk hidup secara empiris telah banyak dirasakan oleh para pelaku peternakan di lapangan. Secara teoritis, hal tersebut dikaitkan dengan adanya variasi biologis yang dimiliki oleh individu-individu dalam suatu kelompok. Semakin variatif individu-individu dalam satu kelompok spesies, semakin variatif pula respon kekebalan yang muncul apabila individu-individu tersebut terpapar oleh suatu jenis antigen tertentu. Sebaliknya, semakin seragam individu-individu yang ada dalam kelompok itu, semakin seragam pula respon imun yang dihasilkan, maka dari itu dalam suatu proses produksi suatu bahan biologis tertentu (misalnya antibodi, hormon, enzim atau yang lainnya) digunakan individu-individu yang relatif seragam. Ayam, baik itu ayam petelur (*laying hens*) mau pun ayam pedaging (*broiler*) didisain sedemikian seragam melalui proses seleksi genetik, yang diharapkan memiliki keseragaman pertumbuhan dan keseragaman produksi telur. Keseragaman

genetik tersebut diharapkan pula menimbulkan keseragaman respon dalam pembentukan antibodi jika individu ayam tersebut terpapar toksoid tetanus. Jika hal ini benar, maka akan mudah membuat prediksi dan rencana produksi suatu bahan biologis di dalam kuning telur. Pada tulisan sebelumnya, telah dikemukakan bahwa telur dapat dimanfaatkan sebagai pabrik biologis (van Regenmortel, 1993), antibodi (IgY) spesifik terhadap berbagai jenis penyakit dapat diproduksi dalam telur (Bogoyavlensky *et al.*, 1999; Kermani-Arab *et al.*, 2001; Amaral *et al.*, 2002; Yokohama *et al.*, 1998; Makoto *et al.*, 1998; 2002) dan bahan biologis untuk kit-diagnostik (Schmidt *et al.*, 1993, Wibawan *et al.*, 2003). Dalam tulisan ini akan dibahas tentang adanya variasi respon pembentukan IgY spesifik pada individu-individu ayam yang digunakan, baik IgY yang ada di dalam serum mau pun yang ada dalam kuning telur.

Sebagai objek bahasan dalam tulisan ini diamati respon pembentukan IgY spesifik terhadap toksoid tetanus di dalam serum dan kuning telur ayam petelur. Antitetanus serum sampai saat ini secara komersial masih

diproduksi pada kuda dengan menyuntikkan toksoid tetanus berulang kali secara berkala dalam kurun waktu yang sangat lama. Penyuntikan toksoid dengan cara tersebut menyebabkan penderitaan pada kuda, yaitu terjadinya kasus amiloidosis. Gencarnya dunia menyuarkan tentang kesejahteraan hewan (*animal welfare*) membuat cara produksi anti tetanus serum (ATS) tersebut kurang disukai. Disamping itu, penyuntikan toksoid secara terus menerus menyebabkan penurunan respon pembentukan antibodi secara signifikan. Sudah saatnya kita memikirkan alternatif lain untuk memproduksi ATS ini, maka penggunaan telur ayam sebagai pabrik biologis menjadi pilihan yang mungkin lebih tepat dan selaras dengan *issue animal welfare*.

Toksoid adalah toksin yang telah diolah sedemikian rupa dengan formalin sehingga tidak toksik lagi, akan tetapi masih mempunyai sifat antigenik seperti semula. Untuk mempertinggi pembentukan zat anti spesifik, toksoid ini kemudian dipresipitaskan dengan aluminium fosfat yang berfungsi sebagai *adjuvant* (Sososepuro, 1987). Dalam pembuatan toksoid tetanus digunakan bibit kuman *Clostridium tetani* dari strain Massachuset ditanamkan pada medium Pitmann untuk dapat diperoleh toksin dengan dosis yang cukup tinggi. Detoksifikasi dilakukan dengan penambahan formalin sedemikian sehingga konsentrasinya menjadi 0,5%, dieramkan pada suhu 37°C untuk selama 4 minggu. Pemurnian dilakukan dengan fraksionisasi pengendapan menggunakan amonium sulfat (Sutaryo *et al.*, 1986)

METODE PENELITIAN

Aplikasi Toksoid Tetanus

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu FKH IPB Bogor dan PT. Bio Farma Bandung. Produksi IgY pada ayam dilakukan dengan menyuntikkan toksoid tetanus secara intramuskular pada 5 ekor ayam petelur umur 20 minggu. Pada minggu pertama masing-masing ayam disuntik toksoid tetanus (PT. Biofarma), dengan dosis 100 Lf (*limit flocculation*), pada minggu ke dua dengan 200 Lf dan 300 Lf pada minggu ke tiga. Selanjutnya dilakukan penyuntikan ulang setiap 4 minggu dengan dosis 300 Lf.

Variasi Pembentukan Ig Y dalam Serum

Untuk melihat adanya variasi respon pembentukan IgY maka 2 ml darah diambil dari masing-masing ayam yang digunakan dalam penelitian ini melalui *v.clavicularis* (daerah sayap) tanpa menggunakan antikoagulan. Darah diinkubasi 1 jam pada inkubator (37°C, 1jam), kemudian disentrifuse (3000 rpm, 10 menit) untuk mendapat serum. Serum dialiquote dan disimpan pada suhu 4°C. Keberadaan IgY spesifik dimonitor pada setiap waktu yang ditentukan. Keberadaan dan titer IgY spesifik dilakukan dengan teknik imunodifusi dan ELISA.

Variasi Pembentukan Ig Y dalam Kuning Telur

Variasi respon pembentukan IgY spesifik dalam telur ditentukan menggunakan teknik yang sama dengan pada serum. Sebanyak 10 ml kuning telur yang sebelumnya telah dilarutkan dalam PBS (1:1) dicampurkan dengan 100 ml aquades. Presipitasi lemak telur dilakukan dengan dekstran Sulphate (10%) yang berisi 1 M CaCl₂, dipusing dengan kecepatan 3500 rpm, 15 menit. Presipitasi protein dilakukan dengan menggunakan sodium sulfat atau amonium sulfat, dipusing, endapan diresuspensi ke dalam 10 ml PBS, di dialisis terhadap 11 PBS selama 48 jam, pada suhu 4°C. Ekstraksi Ig Y juga dilakukan pada darah ayam yang telah dipusing untuk mendapatkan serumnya. Keberadaan IgY spesifik dilakukan dengan teknik imunodifusi dan titernya ditentukan dengan ELISA.

Identifikasi Ig Y dengan Metode Agar Gel *Presipitation Test* (AGPT)

Identifikasi Ig Y ditentukan dengan metode AGPT, dengan mencampurkan 0,502 g Agarose, 1,2 g PEG 6000 dalam 20ml PBS (pH 7,2) dan 20ml Aquades ke dalam tabung erlenmeyer, serta dengan menambahkan Na-azide untuk mencegah kontaminasi oleh jamur. Campuran tersebut dipanaskan di dalam penangas air sampai terbentuk larutan yang jernih. Setelah itu campuran dituangkan ke dalam gelas objek sebanyak 4 ml dan ditunggu sampai beku menjadi agar. Setelah menjadi agar dibuat lubang dengan *puncher*. Lalu dimasukan antigen ke dalam lubang tengah dan serum antibodi yang diuji ke dalam lubang sisi dengan mikropipet. Kemudian agar tersebut disimpan

pada nampan yang di bawahnya diisi tisyu basah untuk kelembaban selama semalam. Hasil uji tersebut positif dengan munculnya garis presipitasi di antara lubang yang diisi antigen dengan lubang yang diisi oleh serum antibodi yang diuji.

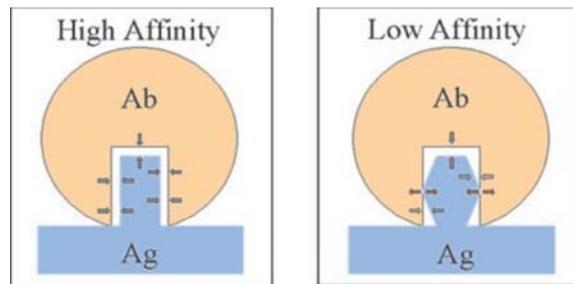
Identifikasi IgY dengan ELISA

Identifikasi kemurnian IgY dilakukan juga dengan metode *Double Antigen ELISA* di Lab Surveillance PT. Bio Farma untuk mendapatkan berapa tingkat titer antibodi yang didapat secara kuantitatif dengan tingkat ketelitian sampai 0,00002 IU/ml (Kristiansen *et al.*, 1997). Metode ini diawali dengan melakukan coating plate Polisorp Nunc dengan 100 µl/well toksoid tetanus dalam buffer karbonat pH 9,6 yang kemudian di inkubasi selama semalam pada suhu 4°C. Setelah itu *plate* tersebut dicuci dengan larutan *tapwater* (0,05% tween 80) sebanyak satu kali, lalu dilakukan *blocking* dengan PBS yang mengandung 0.5% BSA sebanyak 125 µl/well kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam. Kemudian dicuci dengan larutan *tapwater* (0,05% tween 80) dua kali lalu dibuat larutan *blocking buffer* ditambah dengan 10% tween 80 yang diberikan sebanyak 100 µl/well. Kemudian dibuat anti tetanus serum yang akan diuji dengan pengenceran tertentu yang diberikan sebanyak 100µl/well, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama dua jam. *Plate* tersebut dicuci dengan larutan *tapwater* (0,05% tween 80) sebanyak dua kali. Kemudian larutan Biotin (TAM 138 Biotinilated) dibuat dengan 1/1200 µl Biotin yang diencerkan dengan *diluent* yang kemudian ditambahkan sebanyak 100µl/well, kemudian diinkubasi selama dua jam pada suhu ruang. Lalu *plate* tersebut dicuci dengan larutan *tapwater* (0,05% tween 80) sebanyak dua kali. Setelah itu dibuat konjugat HRP-Streptavidine 1/25.000 yang ditambahkan sebanyak 100µl/well, lalu diinkubasi selama satu jam. Lalu *plate* tersebut di cuci dengan larutan *tapwater* (0,05% tween 80) sebanyak enam kali. Kemudian ditambahkan sebanyak 100µl/well larutan TMB dengan perbandingan Buffer asetat: TMB : H₂O₂ sebanyak 10ml : 167ml : 2µl. Setelah sepuluh menit reaksi dihentikan dengan *stopping solution* dengan menambahkan H₂SO₄ 100µl/well. Kemudian dibaca *Optical Density* dengan *ELISA reader* yang menggunakan *kinetical calculation* dengan *adsorbance reference* 0,5 IU yang dibandingkan dengan *adsorbance sampel*. Hasil dari pembacaan pengujian ini dibahas dengan analisa secara

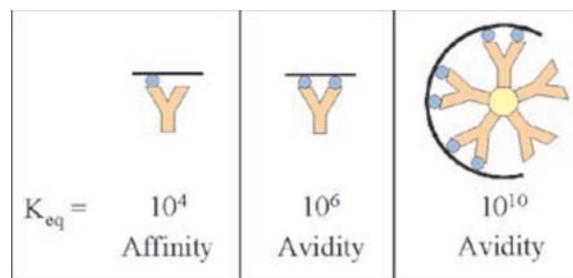
deskriptif untuk membuktikan ada tidaknya titer antibodi terhadap toksin tetanus di dalam serum darah dan telur ayam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah vaksinasi terakhir, dilakukan pemantauan antibodi (IgY) terhadap toksoid tetanus di dalam serum dan kuning telur pada umumnya setiap 7 hari atau kelipatannya secara periodik menggunakan teknik imundifusi dan ELISA. Pengamatan hingga hari ke 52 pasca vaksinasi belum terdeteksi adanya IgY pada serum mau pun pada kuning telur dalam uji AGPT. Respon pembentukan IgY terhadap toksoid tetanus relatif lambat bila dibandingkan dengan respon pembentukan IgY spesifik terhadap antigen lain (misalnya antigen virus). Keterlambatan ini mungkin disebabkan oleh rendahnya afinitas IgY terhadap toksoid dan lemahnya aviditas toksoid tetanus mengikat IgY (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Ilustrasi afinitas antibodi yang kuat (kiri) dan yang lemah (kanan) (Sumber: Mayer, G. 2009. Immunoglobulins-Antigen-Antibody Reactions. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm>).



Gambar 2. Ilustrasi aviditas antigen terhadap antibodi yang lemah (tengah) dan yang kuat (kanan)(Sumber: Mayer, G. 2009. Immunoglobulins-Antigen-Antibody Reactions. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm>)

Tabel 1. Keberadaan IgY pada serum diuji dengan AGPT dan ELISA

Hari ke (pasca vaksinasi)	Reaksi IgY pada AGPT					Reaksi IgY pada ELISA (IU)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10	-	-	-	-	-					
17	-	-	-	-	-					
24	-	-	-	-	-					
31	-	-	-	-	-					
38	-	-	-	-	-					
45	-	-	-	-	-					
52	-	-	-	-	-					
59	+	+	+	+	+	2,914	12,93	19,739	9,000	4,309
66	+	+	+	+	+	0,191	3,975	45,120	36,535	83,82
73	+	+	+	+	+	0,878	5,270	20,135	16,834	10,279
80	-	+	-	+	+	0,289	4,329	2,086	21,011	1,167
87**	-	-	-	+	+	0,180	1,726	2,210	7,819	1,456
110	+	+	+	+	+	0,662	1,757	38,32	9,181	11,081
120	+	+	+	+	+	0,641	1,415	7,946	19,44	4,300

Keterangan

* Hari setelah imunisasi terakhir

** Vaksinasi Ulang

+ Terdapat garis Presipitasi pada AGPT

- Tidak Terdapat Garis Presipitasi pada AGP

Pada hari ke 59 pascapenyuntikan, keberadaan IgY baru terdeteksi pada kelima serum ayam yang digunakan, tetapi IgY belum terdeteksi pada kuning telur. Yang menarik adalah, meskipun reaksi presipitasi (+) dapat diamati pada uji AGPT pada serum dari lima ayam yang digunakan, tetapi memiliki titer antibodi (IgY) yang bervariasi antara 2.914 - 19,739 IU.

Pengamatan pada hari ke 66 pasca vaksinasi, menunjukkan kenaikan titer IgY yang cukup tajam pada ayam 3, 4 dan 5 dan sebaliknya titer IgY terlihat stagnan untuk ayam 1 dan 2 dan tidak menunjukkan kenaikan yang berarti pada pengamatan di hari-hari selanjutnya. Ayam 5 berespon lebih lambat terhadap toksoid tetanus yang disuntikkan dibandingkan dengan ayam 3 dan 4, meskipun ayam 5 mampu mencapai titer IgY yang paling tinggi dalam kurun waktu selang pengujian (83,82 IU).

Pada hari 80 pasca vaksinasi, titer IgY di dalam serum telah menurun tajam untuk semua ayam dan hanya 3 serum ayam yang masih menunjukkan reaksi + pada AGPT. Kenaikan titer IgY terjadi kembali setelah dilakukan vaksinasi ulang (revaksinasi) pada hari ke 87. Hal tersebut menunjukkan bahwa titer IgY di dalam serum hanya mampu

bertahan cukup tinggi selama kurang lebih 10-14 hari dan untuk mempertahankan kejajegan titer dibutuhkan tindakan revaksinasi (Tabel 1).

Pola titer IgY yang serupa diamati pula dalam kuning telur. Keberadaan IgY di dalam kuning telur baru dapat dideteksi 1 minggu setelah IgY dalam serum terdeteksi positif (Tabel 2). Hasil serupa dilaporkan pula oleh peneliti sebelumnya bahwa pasase transovarial IgY ini berlangsung kurang lebih 3-6 hari, tergantung dari jumlah sel telur yang ada di dalam tubuh ayam (Patterson *et al.*, 1962; Wooley *et al.*, 1995) Ig Y secara selektif ditransfer dari serum melewati *oolemma* ke dalam oosit yang telah matang dalam folikel ovarium (Rose dan Orland, 1981). Transfer tersebut terjadi melalui reseptor spesifik di permukaan membran kantung kuning telur (Tressler *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 2001).

Titer IgY di dalam darah tidak selalu setara dengan titer IgY yang ada di dalam kuning telur, artinya tingginya titer IgY di dalam darah dalam satu masa, tidak selalu berbarengan dengan tingginya titer IgY di dalam kuning telur. Hal tersebut sesuai dengan pengamatan dalam penelitian ini, bahwa dibutuhkan waktu 1 minggu untuk dapat mendeteksi IgY di dalam kuning telur setelah IgY terdeteksi positif pada serum. Fenomena ini belum sepenuhnya dapat

Tabel 2. Keberadaan IgY pada kuning telur diuji dengan AGPT dan ELISA

Hari ke (pasca vaksinasi)	Reaksi IgY pada AGPT					Reaksi IgY pada ELISA (IU)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10	-	-	-	-	-					
17	-	-	-	-	-					
24	-	-	-	-	-					
31	-	-	-	-	-					
38	-	-	-	-	-					
45	-	-	-	-	-					
52	-	-	-	-	-					
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	+	+	+	+	+	5,38	16,43	38,6334	15,42	42,042
73	+	+	+	+	+	16,12	153,54	165,65	57,51	7,986
80	+	+	+	+	+	1,28	61,08	33,27	96,26	2,406
87**	-	+	-	+	+	1,168	31,048	18,715	48,638	1,575
110	-	+	-	-	-	1,057	1,015	4,16	1,015	0,744
120	+	+	+	+	+	1,48	12,512	4,635	23,08	13,02

Keterangan

* Hari setelah imunisasi terakhir

** Vaksinasi Ulang

+ Terdapat garis Presipitasi pada AGPT

- Tidak Terdapat Garis Presipitasi pada AGP

dijelaskan, meskipun diketahui bahwa transfer IgY ke dalam kuning telur melalui 2 tahapan yang tampaknya membutuhkan waktu tertentu untuk proses transfer ini, yang mungkin waktu transfernya bervariasi untuk setiap individu ayam. Pertama, IgY ditransfer dari serum menuju kuning telur dengan proses yang analog dengan proses transfer antibodi (IgY) pada fetus melalui plasenta pada mamalia. Kedua, transfer antibodi (IgY) dari kantung embrio kepada embrio yang sedang berkembang. Konsentrasi IgY dalam kuning telur pada dasarnya konstan selama pematangan oosit pada telur. Pada telur yang telah matang konsentrasi IgY sekitar 10 – 20 mg/ml (Rose *et al.*, 1974).

Variasi respon pembentukan antibodi dalam individu dapat pula disebabkan karena perbedaan kebugaran fisiologis antar individu ayam. Hal tersebut menyebabkan adanya perbedaan kinerja makrofag, yang memiliki peran penting dalam penyajian antigen (*antigen presenting cells*) mengoptimalkan kerja sel limfosit Th dalam menghasilkan sitokin dan kemudian menginduksi sel B menjadi sel plasma yang secara spesifik menghasilkan IgY. Perbedaan kebugaran antar individu ayam secara kuantitatif tidak mudah diukur, karena paparan toksin, logam berat, atau zat berbahaya

lainnya sering terjadi secara subklinis (Grassman dan Scarlon, 2004). Di samping itu, perbedaan derajat *inbreeding* individu dapat pula menyebabkan perbedaan respon kekebalan dan perbedaan respon kepekaan terhadap penyakit tertentu (Reid *et al.*, 2006).

SIMPULAN

Respon pembentukan IgY terhadap toksoid tetanus pada ayam berlangsung lambat, dibutuhkan waktu sekitar 50 hari setelah 3 kali vaksinasi untuk dapat mendeteksi keberadaan IgY di dalam serum. IgY di dalam kuning telur dapat dideteksi 7 hari setelah IgY terdeteksi di dalam serum. Terdapat variasi respon pembentukan IgY terhadap toksoid tetanus (kecepatan pembentukan dan titer IgY) pada masing-masing individu ayam petelur, meskipun ayam tersebut secara genetik dinyatakan seragam. Titer IgY di dalam serum suatu individu ayam tidak selalu mencerminkan titer IgY di dalam telurnya, sehingga penentuan titer IgY yang ada di dalam kuning telur dapat diprediksi melalui penentuan rata-rata titer IgY serum dalam kelompok.

SARAN

Perlu dilakukan suatu penelitian yang lebih rinci untuk mengoptimalkan respon ayam terhadap toksoid tetanus melalui preparasi toksoid yang bersifat lebih antigenik dengan melibatkan peran imunostimulan dalam adjuvan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaral JA, Tino De Franco M, Carneiro-Sampaio, Carbonare. 2002. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. *Res Vet Sci* 72 : 229 – 34
- Bogoyavlensky AP, Bersin VE, Tolmachva VP. 1999. Immunogenicity of Influenza Glycoprotein with Different Forms of Supramolecular Organization in Hens *Balt J Lab Anim Sci* 4 : 99 – 105.
- Grasman KA, Scanlon PF. 2004. Effects of acute lead ingestion and diet on antibody and T-cell-mediated immunity in Japanese quail. *Arch.*
- Kermani-Arab V, Moll T, Cho BR, Davis WC, Lu YS. 2001. Effects of Ig Y Antibody on The Development of Marek's Disease. *Avian Dis* 20 : 32 – 41.
- Kristiansen M, Aggerbeck H, Heron I. 1997. Improved ELISA for Determination of Anti-Diphtheria and/or Anti-Tetanus Antitoxin Antibodies in Sera. *APMIS* 105 : 843 – 853.
- Makoto, SCF. Robert, N. Shuryo. 1998. Anti *E.coli* Immunoglobulin in Y isolated from Egg Yolk of Immunized Chicken as A Potential Food Ingredient. *J Food Sci* 53: 1361 – 1365
- Morrison S.L. et al., 2001. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol Immunol* 38 : 619-625.
- Patterson R, Youngner JS, Weigle WO, Dixon FJ. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol* 89 : 272-278.
- Reid JM, Arkese P, Keller LF, Elliott KH, L. Sampson L, Hasselquist D. Inbreeding effects on immune response in free-living song sparrows (*Melospiza melodia*). <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/274/1610/697.abstract>
- Rose ME, Orlans E. 1981. Immunoglobulins in the egg, embryo, and young chick. *Dev Comp Immunol* 5 : 15-20.
- Rose ME, Orlans E, Buttress N. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol* 4 : 521-523.
- Schmidt P, Erhard MH, Schams D, Hafner A, Folger S, Losch U. 1993. *Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth-hormone and prolactin in bovine pituitary gland.* *J Histochem & Cytochem* 41: 1441 – 1446
- Sosroseputro, H. 1987. *Hal Ihwal Imunisasi dan Aplikasinya.* Bandung. PT. Gardawastu. Pp: 69 – 77.
- Sutaryo J. 1986. Vaksin Tetanus. *Disampaikan dalam symposium Peranan Vaksinasi dalam Penanggulangan Penyakit Infeksi di Indonesia.* Pp 20 – 29.
- Tressler RL, Roth TF. 1987. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J Biol Chem* 262 : 15406-15412.
- van Regenmortel, M.H. V. 1993. Eggs as Protein and Antibody Factory. *In Proceedings of The European Symposium on the Quality of Poultry Meat.* Pp 257 -263. Tours , France INRA.
- Woolley JA, Landon J. 1995. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J Immunol Methods* 178 : 53-265.
- Wibawan IWT, Djannatun T, Halimah LS. 2003. Pengujian Teknik Koaglutinasi tidak Langsung untuk Deteksi Penyakit Unggas. *Hibah Bersaing XI 2003 – 2004.* Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Yokohama H, Peralta RC, Umeda K, Hashi T, Icalto FC, Kuroki M. 1998. Prevention of Fatal Salmonellosis in Neonatal Calves, Using Orally Administrated Chicken Egg Yolk Salmonella-specific Antibodies. *Am J Vet Res* 59(4) 416 – 420.