

Penggunaan Antigen *Mycoplasma gallisepticum* Freeze-Thawing dalam Teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

The use of Mycoplasma gallisepticum Freeze-Thawing Antigen in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Faidah Rachmawati^{1*}, I Wayan Teguh Wibawan², Ni Luh Putu Ika Mayasari²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor
Jl. RE Martadinata 30 Bogor

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,
Bagian Mikrobiologi Medik, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor 16680

*Email: fahera.08@gmail.com

Naskah diterima : 28 Juli 2017, direvisi : 15 Juni 2018, disetujui : 20 Agustus 2018

Abstract

Chronic Respiratory Disease (CRD) is a bacterial infection in chickens caused by *Mycoplasma gallisepticum*. CRD may result in economic loss in the livestock industry, decreasing of egg production and feed efficiency, increasing of medication costs, downgrading of carcass and egg qualities. The aim of this study was to develop the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit for detecting antibodies of *M. gallisepticum* using freeze-thawing antigens. The cut-off point was determined by S/N method. Chicken antiserum againsts *M. gallisepticum* was collected every week on 1st – 6th week post immunization of whole cell antigen of *M. gallisepticum*. Optimization of antigen, serum and conjugate were 10 µg/ml protein concentrations, 1:800 serum dilution and 1:10000 conjugate dilution. The validation results on developed ELISA kit (MyGELISA) analyzed by ROC curve using MedCalc statistical software revealed that developed ELISA kit (MyGELISA) had 100% sensitivity and 86.21% specificity with 95% confidence interval. The results of RSA, MyGELISA and commercial ELISA kit showed antibodies positive againsts *M. gallisepticum*. In conclusion, MyGELISA using freeze-thawing antigen can be used to detect antibodies of *M. gallisepticum*.

Key words: CRD; ELISA; freeze-thawing; *M. gallisepticum*

Abstrak

Chronic Respiratory Disease (CRD) merupakan infeksi bakterial pada ayam yang disebabkan oleh *Mycoplasma gallisepticum*. CRD dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup besar bagi industri peternakan ayam, karena dapat menurunkan produksi telur, efisiensi pakan, meningkatnya biaya pengobatan, turunnya nilai karkas dan kualitas telur. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan kit *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk mendeteksi antibodi terhadap *M. gallisepticum* dengan menggunakan antigen yang dipreparasi dengan *freeze-thawing*. Nilai *cut-off* ditentukan dengan metode S/N. Antiserum *M. gallisepticum* dikoleksi pada minggu pertama sampai minggu keenam setelah penyuntikan antigen utuh *M. gallisepticum*. Optimasi antigen, serum dan konjugat adalah konsentrasi protein 10 µg/ml, pengenceran serum 1:800 dan pengenceran konjugat 1:10000. Hasil validasi pada kit ELISA yang dikembangkan (MyGELISA) dianalisa dengan *ROC curve* menggunakan *MedCals statistical software* diperoleh hasil nilai sensitifitas 100%, spesifisitas 86,21% dengan *confidence interval* 95%. Hasil pengujian antiserum dengan RSA, MyGELISA dan Kit ELISA komersial adalah keseluruhan positif antibodi terhadap *M. gallisepticum*. Oleh karena itu, MyGELISA dengan menggunakan antigen yang dipreparasi dengan *freeze-thawing* dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap *M. gallisepticum*.

Kata kunci: CRD; ELISA; *freeze-thawing*; *M. gallisepticum*

Pendahuluan

Penyakit saluran pernapasan masih menjadi masalah bagi peternak unggas di Indonesia sampai saat ini. Salah satu agen patogen penyakit saluran pernapasan adalah bakteri *Mycoplasma gallisepticum*. Infeksi bakteri ini dikenal sebagai *Chronic Respiratory Disease* (CRD) pada ayam dan *Infectious Sinusitis* pada kalkun (Ley, 2008). Di Indonesia, secara serologis *M. gallisepticum* dilaporkan pertama kali pada tahun 1965 (Richey dan Dirdjosoebroto, 1965).

Chronic Respiratory Disease merupakan penyakit endemik pada ayam dan sangat merugikan bagi industri perunggasan, karena dapat menurunkan produksi telur, efisiensi pakan, meningkatnya biaya pengobatan, dan turunnya nilai karkas (BPPH, 2007; Ley, 2008). Penyebaran CRD dapat terjadi secara horisontal dan vertikal. Secara horisontal dapat terjadi karena kontak langsung atau tidak langsung dengan ayam yang terinfeksi. Penyebaran secara vertikal dapat terjadi melalui telur dan hal ini dapat mempengaruhi kualitas telur serta menyebabkan penurunan kualitas *Day Old Chick* (DOC) yang dihasilkan di peternakan pembibitan (*breeding farm*). Kualitas ayam yang baik sangat penting untuk mengoptimalkan produktivitas ayam. CRD dapat berperan sebagai predisposisi munculnya penyakit pernapasan lainnya. Penyakit pernafasan lain yang cukup sering dijumpai di peternakan adalah *Collibacillosis*, *Infectious Bronchitis* dan *Newcastle Disease* (Ley, 2008).

Ayam yang terinfeksi *M. gallisepticum* akan menjadi karier, sehingga penyakit ini sulit dihilangkan dari peternakan. Oleh karena itu perlu dilakukan tindakan pengendalian dan pencegahan CRD. Pengendalian dan pencegahan dapat dilakukan dengan penguatan program *biosecurity*, sanitasi dan monitoring status kesehatan serta vaksinasi (Kleven, 2005).

Program monitoring pada peternakan yang

umum dilakukan adalah dengan uji serologi *Rapid Serum Agglutination* (RSA) dengan antigen berwarna. Uji ini cukup cepat, praktis, murah, dan efisien (Ley, 2008; OIE, 2008), tetapi uji ini dapat memberikan reaksi non spesifik dan reaksi silang dengan *Mycoplasma* lain. Hasil pembacaannya bersifat subyektif dan tidak ada standar internasional untuk interpretasi uji ini. Pengujian dengan metode lain yang lebih spesifik dan sensitif perlu dilakukan untuk konfirmasi uji RSA yaitu dengan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). ELISA telah banyak digunakan di peternakan unggas untuk uji *screening* terhadap *Mycoplasma* baik karena infeksi atau vaksinasi (OIE, 2008).

ELISA merupakan uji serologi yang digunakan sebagai konfirmasi uji RSA dan bersifat kualitatif maupun kuantitatif. Teknik ELISA yang digunakan untuk mendeteksi antibodi memerlukan antigen untuk *coating*. Jenis antigen *M. gallisepticum* yang digunakan untuk teknik ELISA dipreparasi dengan berbagai cara dan menggunakan bahan kimia yang berbeda. Antigen tersebut diantaranya menggunakan antigen rekombinan (Noormohammadi et al., 2002; Mardassi et al., 2008), yang dipreparasi dengan bahan kimia seperti *sodium dodecyl sulfate* (SDS), *Tween 20*, *Triton*, *carbonat bicarbonat*, dan *boric acid*. Preparasi antigen memerlukan teknik yang cukup sulit dan biaya yang cukup mahal. Oleh karena itu dalam penelitian ini dikembangkan teknik ELISA dengan menggunakan *soluble antigen* sebagai *coating antigen* yang dipreparasi dengan metode yang lebih sederhana yaitu dengan *freeze-thawing*. Metode *freeze-thawing* adalah salah satu cara melisiskan sel untuk pemurnian protein. Cara *freeze-thawing* ini dapat dilakukan dengan menggunakan nitrogen cair (Ekawasti et al., 2015; Mojsin et al., 2005). Tujuan dalam penelitian ini adalah mengembangkan kit ELISA untuk deteksi antibodi terhadap *M. gallisepticum* menggunakan antigen yang

dipreparasi dengan *freeze-thawing*.

Materi dan Metode

Antigen untuk *coating* dan produksi antiserum *Mycoplasma gallisepticum*

Bakteri yang digunakan adalah *M. gallisepticum* strain S6 dan R (koleksi BBLITVET). Bakteri ditumbuhkan pada media *mycoplasma broth* (*Mycoplasma broth base* dan *culture media supplements*, OXOID) dengan perbandingan 1 bagian kultur dan 10 bagian media. Bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 – 2 hari. Kultur diinaktivasi dengan 0,1% formaldehid, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 – 24 jam. Bakteri dikoleksi dengan disentrifugasi pada 20000×g selama 30 menit pada suhu 4°C. Setelah supernatan dibuang, bakteri dicuci dengan PBS steril pH 7,2 sebanyak 3 kali.

Bakteri yang digunakan sebagai antigen *coating* adalah *M. gallisepticum* strain S. Bakteri diresuspensi dengan PBS steril dan dibuat konsentrasi protein 1 mg/ml. Antigen *coating* sebagai *soluble antigen* diperoleh dengan cara *freeze-thawing*. *Freeze-thawing* dilakukan secara berulang sebanyak 5 kali, dengan menggunakan nitrogen cair. Suspensi bakteri dibekukan dalam nitrogen cair selama 1 menit dan dicairkan pada suhu 30°C selama ±2 menit. Suspensi bakteri kemudian disentrifugasi pada 20000×g selama 30 menit pada 4°C, supernatan diambil, dibuat *aliquot* dan disimpan pada suhu –20°C (Afiff, 2010; David *et al.*, 2010; Ekawasti *et al.*, 2015). *Soluble antigen* dievaluasi dengan SDS-PAGE menurut Sambrook dan Russel (2001).

Bakteri yang digunakan sebagai antigen utuh (*whole cell*) untuk produksi antiserum adalah *M. gallisepticum* strain S6 dan R. Bakteri diresuspensi dengan PBS steril hingga konsentrasi bakteri setara dengan McFarland 3, disimpan pada suhu 4°C dan dapat digunakan selama 2 minggu (Afiff, 2010; David

et al., 2010).

Produksi antiserum *Mycoplasma gallisepticum* menggunakan antigen utuh

Lima ayam *layer* umur 8 minggu digunakan untuk memproduksi antiserum *M. gallisepticum*. Sebelum penyuntikan antigen, ayam diambil darahnya kemudian serum diuji dengan RSA. Penyuntikan antigen dilakukan bila RSA menunjukkan hasil negatif. Ayam disuntik dengan antigen utuh tanpa *adjuvant* sebanyak 0,5 ml dan diberikan secara intravena. Satu minggu kemudian ayam disuntik dengan antigen utuh dan *adjuvant* sebanyak 0,5 ml secara intramuskuler (CCAC, 2002; Rawendra, 2005; Suartha, 2006). *Adjuvant* yang digunakan adalah *Montanide ISA70*.

Ayam yang digunakan dalam produksi antiserum adalah 4 ekor ayam disuntik antigen utuh *M. gallisepticum* strain R dan 1 ekor ayam disuntik antigen utuh *M. gallisepticum* strain S6. Serum ayam yang dikoleksi pada minggu ketiga setelah disuntik antigen utuh *M. gallisepticum* strain S6 digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian kit ELISA yang dikembangkan. Serum yang dikoleksi dari ayam yang disuntik dengan antigen utuh *M. gallisepticum* strain R digunakan sebagai sampel untuk pengujian kit ELISA yang dikembangkan dalam penelitian ini. Serum dikoleksi pada minggu 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 setelah penyuntikan antigen pertama.

Optimasi antigen, serum dan konjugat

Prosedur ELISA dilakukan menurut Subekti dan Yuniarto (2017). *Coating antigen* dengan konsentrasi protein 0,5; 2; 5; 10 µg/ml dilarutkan dalam *coating buffer* (0,005M *Carbonat bicarbonat* pH 9,8) dan dimasukkan ke dalam sumuran mikroplat (*flat bottomed 96 well Maxisorb microplate*, Nunc-Denmark) sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu

4°C selama 18–24 jam. Mikroplat dicuci 3 kali dengan 0,01M PBS *Tween 20* (0,05%) sebanyak 300 µl tiap sumuran, kemudian mikroplat dibloking dengan PBS *Tween 20* BSA (*Bovine Serum Albumin*) 0,5% sebanyak 300 µl tiap sumuran selama 18–24 jam pada suhu 4°C. Mikroplat dicuci kembali dengan PBS *Tween 20* sebanyak 3 kali, selanjutnya ditambahkan serum kontrol positif dan negatif yang diencerkan 1:200, 1:400, 1:800 dengan PBS *Tween 20* BSA sebanyak 100 µl tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Mikroplat dicuci dengan PBS *Tween 20* sebanyak 4 kali, berikutnya ditambahkan 100 µl konjugat *anti chicken IgG-HRP* (Sigma, USA) tiap sumuran yang telah diencerkan dalam PBS *Tween 20* BSA dengan pengenceran 1:5000 dan 1:10000 dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Mikroplat kembali dicuci dengan PBS *Tween 20* sebanyak 6 kali, kemudian ditambahkan substrat TMB/3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine* (Sigma) sebanyak 100 µl tiap sumuran, dibiarkan kurang lebih 1 menit dan reaksi dihentikan dengan menambahkan 2N H₂SO₄ dengan volume yang sama dengan substrat. Perubahan warna kemudian dibaca dengan *ELISA reader* (*Multiskan EX Colorimeter Reader*, Thermo Scientific, Finlandia) dengan panjang gelombang 450 nm.

Validasi ELISA

Validasi tahap pertama dilakukan menggunakan 116 sampel lapang yang dikoleksi dari beberapa wilayah di Jawa Barat (29 sampel positif dan 87 sampel negatif berdasarkan uji RSA) untuk diuji dengan kit ELISA yang dikembangkan. Hasil pengujian ini kemudian dianalisis dengan *ROC curve* (*Receiver Operating Characteristic Curve*) menggunakan *MedCalc statistical software*. Analisis dengan *ROC Curve* akan menentukan sensitivitas, spesifisitas dan nilai *cut off* dari uji kit ELISA yang

dikembangkan.

Validasi kedua, sampel standar negatif yang akan digunakan sebagai standar untuk *cut-off* dipilih berdasarkan nilai OD yang ditetapkan pada validasi pertama. Artinya, sampel yang memiliki nilai OD mendekati nilai *cut-off* yang ditetapkan dengan *ROC curve* pada validasi pertama akan digunakan sebagai sampel untuk standar *cut-off*. Analisis hasil kit ELISA yang dikembangkan pada validasi kedua untuk menentukan spesifisitas, sensitivitas dan akurasi dilakukan dengan WinEpi menggunakan tabel 2×2.

Penentuan nilai *cut-off*

Nilai *cut-off* ditentukan berdasarkan Paré et al. (1995) dengan beberapa metode yaitu nilai OD sampel dibagi nilai OD kontrol negatif (S/N), nilai rata-rata OD sampel negatif + 2SD (standar deviasi) sampel negatif serta nilai rata-rata OD sampel negatif + 3SD (standar deviasi) sampel negatif. Metode penentuan *cut-off* yang memberikan nilai sensitivitas, spesifisitas dan akurasi terbaik akan digunakan untuk pengujian ELISA selanjutnya.

Pengujian antiserum yang diproduksi menggunakan antigen utuh

Respon antibodi dalam serum ayam yang diproduksi dari penyuntikan antigen utuh *M. gallisepticum* strain R diuji dengan kit ELISA yang dikembangkan dan kit ELISA komersial.

Analisis Data

Data hasil ELISA yang diperoleh dianalisa dengan *Cohen's Kappa estimator* untuk mengetahui kesesuaian hasil uji (*agreement*) antara kit ELISA yang dikembangkan dan RSA.

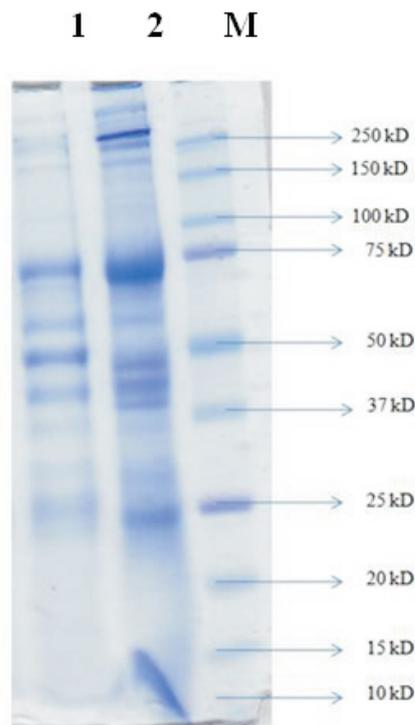
Hasil dan Pembahasan

Evaluasi *soluble antigen freeze-thawing* dengan

SDS-PAGE

Profil protein dari *soluble antigen* hasil preparasi suspensi bakteri *M. gallisepticum* dengan *freeze-thawing* yang diekspresikan pada SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan gambar tersebut pita protein dari *soluble antigen* yang dipreparasi dengan *freeze-thawing* diekspresikan pada SDS-PAGE berada pada kisaran berat molekul besar hingga

kecil, yaitu pada ukuran 520, 300, 256, 190, 105, 73, 55, 47, 41, 35, 30, 27, 19, dan 18 kilo Dalton. Hal ini menunjukkan bahwa protein dalam *soluble antigen* hasil preparasi dengan *freeze-thawing* tidak rusak atau hilang, sehingga antigen yang diperoleh digunakan sebagai antigen *coating* pada kit ELISA yang dikembangkan (MyGELISA).



Gambar 1. Profil protein pada SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan *Commassie Brilliant Blue R250* (1) *Soluble antigen freeze-thawing*, (2) antigen utuh, (M) marker protein.

Optimasi antigen, serum dan konjugat

Serum positif yang digunakan dalam optimasi kit ELISA yang dikembangkan adalah serum kontrol positif, sedangkan serum negatif yang digunakan adalah serum ayam SPF. Hasil optimasi antigen, serum dan konjugat dapat dilihat pada Tabel 1.

Antigen yang dipreparasi dengan *freeze-thawing* dapat memberikan hasil reaksi yang jelas antara serum positif dan negatif. Nilai optimum untuk ELISA ini dapat ditentukan dengan memilih nilai rasio P/N (OD positif/OD negatif) paling tinggi. Dalam

penelitian ini nilai rasio P/N tertinggi adalah 4. Nilai tersebut berada pada antigen dengan konsentrasi protein 10 µg/ml, pengenceran serum 1:800 dan pengenceran konjugat 1:10000. Oleh karena itu hasil ini yang digunakan dalam prosedur pengujian kit ELISA yang dikembangkan yang selanjutnya disebut dengan MyGELISA. Nilai rasio P/N yang semakin tinggi akan memperjelas dan mempermudah dalam menetapkan dan membedakan serum positif atau negatif (Priadi dan Natalia, 2006; Subekti dan Yunanto, 2017).

Tabel 1. Hasil optimasi antigen, serum dan konjugat

Antigen (konsentrasi protein µg/ml)	Enceran konjugat		Pengenceran serum		
			1:200	1:400	1:800
0,5 2 5 10	1:5000	Rasio P/N	2,4	2,1	1,5
		Rasio P/N	2,5	2,6	2,4
		Rasio P/N	3,1	3,2	2,9
		Rasio P/N	3,7	3,5	2,7
05 2 5 10	1:10000	Rasio P/N	2,3	2,1	2,5
		Rasio P/N	2,9	3,2	2,8
		Rasio P/N	2,9	3,3	3,6
		Rasio P/N	3,5	3,2	4

Validasi hasil optimasi ELISA

Hasil validasi pengujian MyGELISA yang

dianalisa dengan *ROC curve* menggunakan *MedCalc statistical software* (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil validasi tahap pertama dengan *ROC curve*

Jumlah sampel	116
Jumlah seropositif	29
Jumlah seronegatif	87
<i>Confidence interval</i>	95%
Sensitifitas	100%
Spesifisitas	86,21%
<i>Cut-off</i>	0,264

Sampel negatif yang digunakan sebagai standar *cut-off* untuk pengujian MyGELISA ditentukan dengan mengambil 3 sampel yang memiliki nilai OD sampel mendekati nilai *cut-off* hasil *ROC curve* pada

validasi pertama. Validasi kedua berdasarkan analisa *ROC curve*, menggunakan WinEpi dengan tabel 2 × 2 dapat ditentukan nilai spesifisitas, sensitivitas, nilai Kappa dan akurasi (Tabel 3 dan 4).

Tabel 3. Tabel 2 × 2 hasil analisa *ROC curve* dari pengujian MyGELISA dan RSA

MyGELISA		RSA		Jumlah
		Positif	Negatif	
	Positif	29	12	41
	Negatif	0	75	75
	Jumlah	29	87	116

Berdasarkan Tabel 3 dan 4, maka nilai sensitifitas dan spesifisitas cukup tinggi, dengan nilai akurasi sangat baik, sesuai dengan status sampel serum yang diuji. Nilai Kappa sebesar 0,758 sesuai kategori

Altman (Thrusfield 2005) menunjukkan kategori kesesuaian antara uji RSA dan MyGELISA tergolong baik (*good agreement*).

Tabel 4. Hasil validasi tahap kedua dengan analisa WinEpi

Jumlah sampel	116
<i>Confidence interval</i>	95%
Sensitifitas	100%
Spesifisitas	86,2%
Nilai Kappa	0,758
Akurasi	89,6%

Penentuan Nilai *cut-off* Kappa dan akurasi penentuan nilai *cut-off* yang Hasil perbandingan nilai sensitivitas, spesifitas, menggunakan hasil validasi MyGELISA (Tabel 5).

Tabel 5. Perbandingan nilai sensitivitas, spesifitas, Kappa dan akurasi dalam penentuan nilai *cut-off*

Metode	Sensitivitas	Spesifisitas	Akurasi	Nilai Kappa	Kesesuaian uji
S/N	86,2%	95,4%	93,1%	0,816	<i>very good</i>
Mean OD+2SD	100%	67,8%	75,8%	0,513	<i>moderate</i>
Mean OD+ 3SD	100%	47,1%	60,3%	0,308	<i>fair</i>

Berdasarkan Tabel 5, nilai *cut-off* yang digunakan untuk prosedur MyGELISA adalah metode S/N, karena nilai spesifisitas, akurasi dan Kappa paling tinggi, meskipun nilai sensitivitas lebih rendah dari kedua metode lain. Nilai spesifisitas lebih diutamakan

dengan harapan MyGELISA lebih spesifik untuk mendeteksi antibodi terhadap *M. gallisepticum*. Ketentuan nilai *cut-off* adalah apabila $S/N > 2$ maka serum dikatakan positif dan apabila $S/N < 2$ serum dikatakan negatif.

Pengujian antiserum *Mycoplasma gallisepticum* yang diproduksi menggunakan antigen utuh

Hasil pengujian antiserum *M. gallisepticum* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil pengujian RSA, MyGELISA dan kit ELISA komersial pada antiserum yang diproduksi menggunakan antigen utuh *M. gallisepticum* R

Minggu (ke-) setelah penyuntikan	RSA ^a	MyGELISA ^b	Kit ELISA ^c komersial
1	4/4	4/4	2/4
2	4/4	4/4	4/4
3	4/4	4/4	4/4
4	4/4	4/4	4/4
5	4/4	4/4	4/4
6	4/4	4/4	4/4

^aJumlah sampel yang positif/jumlah sampel yang diuji dengan RSA.

^bJumlah sampel yang positif/jumlah sampel yang diuji dengan MyGELISA.

^cJumlah sampel yang positif/jumlah sampel yang diuji dengan kit ELISA komersial.

Berdasarkan Tabel 6, hasil RSA adalah positif yaitu adanya reaksi aglutinasi antara (++) dan (+++). Reaksi aglutinasi (+) hanya pada minggu ke 1 dan 2 (data tidak ditampilkan) setelah penyuntikan antigen utuh. Hasil pengujian serum dengan MyGELISA dan

kit ELISA komersial adalah positif, hanya pada minggu pertama setelah penyuntikan antigen utuh, pengujian dengan kit ELISA komersial diperoleh hasil negatif pada dua sampel.

Antiserum yang diproduksi dengan antigen utuh

M. gallisepticum R diuji dengan RSA, MyGELISA dan kit ELISA komersial diperoleh hasil semua positif terhadap *M. gallisepticum*, meskipun antigen berwarna untuk RSA, *antigen coating* yang digunakan dalam MyGELISA, antigen pada kit ELISA komersial dan antigen untuk produksi antiserum berbeda strain. Hal ini terjadi dimungkinkan karena protein yang menimbulkan respon antibodi mempunyai kesamaan diantara strain tersebut. Berdasarkan hasil ini kit ELISA yang dikembangkan dalam penelitian ini atau MyGELISA dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap *M. gallisepticum*

Kesimpulan

Teknik preparasi antigen dengan *freeze-thawing* dapat digunakan sebagai *antigen coating* pada kit ELISA yang dikembangkan untuk deteksi antibodi terhadap *M. gallisepticum*.

Daftar Pustaka

- Afiff, U. (2010). A Comparison of Serological and Bacteriological Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Experimentally-Infected Chickens. *Microbiol Indones.* 4 (3): 119-126.
- BPPH. Balai Penyelidikan Penyakit Hewan. (2007). Data Diagnosa Penyakit pada Unggas. Informasi Laboratorium Balai Penyelidikan Penyakit Hewan dan Balai Besar Veteriner seluruh Indonesia.
- CCAC. Canadian Council on Animal Care. (2002). Guidelines on: Antibody Production [Internet]. [Diunduh 2015 Januari 19]. Tersedia pada: <https://www.medicin.uni-tuebingen.de/tierschutz/antibody.pdf>.
- David, S.A.W., Volokhov, D.V., Ye, Z. and Chizhikov, V. (2010). Evaluation of *Mycoplasma* Inactivation during Production of Biologics: Egg-Based Viral Vaccines as a Model. *Appl Environ Microbiol.* 76 (9): 2718-2728.
- Ekawasti, F., Yuniarto, I. dan Subekti, D.T. (2015). Profil Protein *Trypanosoma evansi* Isolat S371 pada Elektroforesis dengan Reduksi dan Non-reduksi Ikatan Disulfida. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* [Internet]. [Diunduh 2016 Desember 25]. Tersedia pada: .
- Kleven, S.H. (2005). Prevention and Control of Avian Mycoplasmas. *Avian Insight A Lohmann Animal Health News Brief* [Internet]. [Diunduh 2012 Oktober 12]; Volume 2:1-2. Tersedia pada: .
- Ley, D.H. (2008). *Mycoplasma gallisepticum* Infection. In: Diseases of Poultry. 12th ed. Saif, Y.M. Blackwell Publishing. USA. 807-834.
- Mardassi, B.B.A., Béjaoui, A., Oussaeif, L., Mlik, B. and Amouna, F. (2008). A Recombinant Antigen-Based Elisa For The Simultaneous Differential Serodiagnosis Of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and *Mycoplasma meleagridis* Infections. *Avian Dis.* 52 (2): 214-221.
- Mojsin, M., Nikčević, G., Grujičić N.K., Savić T., Petrović, I. and Stevanović, M. 2005. Purification and functional analysis of the recombinant protein isolated from E. coli by employing three different methods of bacterial lysis. *Serb. Chem. Soc.* 70 (7): 943-950.
- Noormohammadi, A.H., Jones, J.F., Underwood, G. and Whithear, K.G. (2002). Poor Systemic Antibody Response After Vaccination of Commercial Broiler Breeders with *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine ts-11 Not Associated with h Susceptibility to Challenge. *Avian Dis.* 46 (3): 623-628.
- OIE. Office International des Epizooties. (2008). Avian Mycoplasmosis. World Organisation For Animal Health. OIE Terrestrial Manual [Internet]. [Diunduh 2010 April 19]:482-496. Tersedia pada: .
- OIE. Office International des Epizooties. (2013). World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) – Version 1. Copyright 2013 [Internet]. [Diunduh 2017 Juli 06]. Tersedia pada: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countrytimelines.
- Paré, J., Hietala, S.K. and Thurmond, M.C. (1995). An

- enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7: 352-359.
- Priadi, A. dan Natalia, L. (2006). Pengembangan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay untuk Mendeteksi Infeksi *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) pada Ayam. *JITV.* 11 (3): 241-247.
- Rawendra, R. (2005). Prospek Pengembangan Immunoglobulin Y (IgY) Kering Beku Sebagai *Nutraceutical Food* anti *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC). Disertasi. Program Studi Sains Veteriner. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Richey, D.J. and Dirdjosoebroto, S. (1965). Chronic Respiratory Disease of Chicken in West Java, Indonesia I. Preliminary Serological Studies. *Com Vet.* 9 (1): 1-5.
- Sambrook, J. and Russel, D. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Subekti, D.T. dan Yuniarto, I. (2017). Perbandingan Penggunaan Konjugat Antibovine IgG-HRP dan protein A/G-HRP Dengan Beberapa Larutan Pengencer Serum Pada ELISA Untuk Deteksi Surra pada Sapi dan Kerbau. *J Biologi Indones.* 13: 43-52.
- Suartha, I.N. (2006). Karakteristik Immunoglobulin Y Antitetanus Diisolasi dari Telur Ayam sebagai Pengganti Antitetanus Serum Kuda. Disertasi. Program Studi Sains Veteriner. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary Epidemiology* 3rd ed. Blackwell Publishing. Iowa. USA: 305-330.