

PENGEMBANGAN TEKNIK ELISA UNTUK MENDETEKSI TOKSIN ALFA *CLOSTRIDIUM NOVIYI*

LILY NATALIA

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 6 Januari 1997)

ABSTRACT

NATALIA, L. 1997. Development of ELISA technique for detecting *Clostridium novyi* alpha toxin. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (3): 188-193.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique was developed to detect specific *Clostridium novyi* alpha toxin in the investigation of infectious necrotic hepatitis. Modification of the indirect ELISA technique in the system used is an inhibition ELISA for antigen. The test samples were liver fluid from dead animals suspected from infectious necrotic hepatitis. To analyse for alpha toxin, microtiter plates were coated with antigen or alpha toxin. The liver fluid sample thought to contain antigen or toxin was then mixed together with reference antiserum containing specific alpha antitoxin of *Cl. novyi*. Enzyme labelled antiglobulin was then added, followed by enzyme substrate. The difference in colour change between a reference sample containing no antigen or toxin and the test sample solution indicates the amount of antigen or toxin in the test samples. This is a competitive assay; high toxin concentrations result in less colour at the end of the test. The sandwich ELISA technique was sensitive enough to detect as little as 390 ng/ml toxin in liver fluid sample. These results indicate that the ELISA technique is useful for detecting alpha toxin of *Cl. novyi* and for diagnosing infectious necrotic hepatitis.

Keywords: ELISA technique, *Clostridium novyi* alpha toxin, infectious necrotic hepatitis

ABSTRAK

NATALIA, L. 1997. Pengembangan teknik ELISA untuk mendeteksi toksin alfa *Clostridium novyi*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (3): 188-193.

Teknik enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) telah dikembangkan untuk mendeteksi dan mengukur jumlah toksin alfa yang spesifik dari *Clostridium novyi* untuk penyidikan *infectious necrotic hepatitis*. Sistem ini adalah modifikasi dari teknik ELISA tidak langsung yang merupakan teknik inhibisi ELISA untuk mendeteksi antigen. Sampel yang diuji adalah cairan hati dari hewan yang dicurigai mati karena *infectious necrotic hepatitis*. Untuk mendeteksi toksin alfa, lempeng mikrotiter dilapisi dengan antigen atau toksin alfa. Sampel cairan hati yang diperkirakan mengandung antigen atau toksin kemudian dicampur dengan antiserum referen yang mengandung antitoksin spesifik terhadap *Cl. novyi*. Antiglobulin yang telah dilabel dengan enzim kemudian ditambahkan, diikuti dengan substrat enzim. Perbedaan warna antara sampel referen yang tidak berisi antigen atau toksin dan sampel yang diuji menunjukkan jumlah antigen atau toksin di dalam sampel yang diuji. Dalam teknik kompetitif ini, konsentrasi toksin yang tinggi akan menimbulkan berkurangnya warna pada akhir uji. Teknik ELISA ini cukup sensitif untuk mendeteksi 390 ng/ml toksin dalam sampel cairan hati. Hasil ini menunjukkan bahwa teknik ELISA berguna untuk mendeteksi toksin alfa dari *Clostridium novyi* dan untuk mendiagnosis *infectious necrotic hepatitis*.

Kata kunci: Teknik ELISA, toksin alfa *Clostridium novyi*, *infectious necrotic hepatitis*

PENDAHULUAN

Clostridium novyi telah dikenal sebagai mikro-organisme patogenik bagi ternak ruminansia. Penyakitnya dikenal dengan nama *infectious necrotic hepatitis* atau *black disease*, yaitu penyakit yang bersifat akut dan toksemik pada sapi, domba, babi dan kuda akibat adanya produksi toksin alfa *Cl. novyi* tipe B pada jaringan hati yang nekrotik dan anoksik (BATTY *et al.*, 1964; BAGADI, 1974). Spora dari *Cl. novyi* yang bersifat toksigenik telah diketahui dapat ditemukan dalam hati hewan yang nampak sehat (BAGADI, 1974; WORRALL *et al.*, 1987; WORRALL, 1988). Pada ternak ruminansia, penyakit ini umumnya dimulai dengan terjadinya kerusakan hati oleh berbagai sebab. Dalam banyak kasus, penyebab kerusakan hati yang utama adalah cacing hati (JAMIESON *et al.*, 1948; JAMIESON, 1949). Parasit ini bermigrasi dalam hati dan menim-

bulkan nekrosis, yaitu suatu lingkungan yang sesuai dan baik untuk pertumbuhan dan proliferasi *Cl. novyi*. Toksin alfa yang dihasilkan kemudian akan diabsorpsi dengan cepat dan dalam beberapa jam hewan akan mati (BAGADI, 1974; SMITH, 1975; STERNE, 1981; WORRALL, 1988).

Penyakit ini di Indonesia sangat mungkin terjadi tanpa dapat didiagnosis karena kejadiannya begitu cepat dan hewan mati mendadak tanpa gejala klinis dan kelainan patologik yang nyata. Dalam penelitian yang telah dilakukan di Pulau Jawa, ternyata 14% hewan kambing-domba dan 20% hewan sapi-kerbau yang nampak sehat mengandung spora *Cl. novyi* tipe A dalam hatinya (WORRALL *et al.*, 1987; WORRALL, 1988). Toksin yang dihasilkan oleh galur yang telah diisolasi berkisar dari 10 sampai 10.000 *minimum lethal doses* (MLD) mencit per ml. Penelitian berikutnya menunjukkan bahwa kerbau mempunyai titer antibodi

tertinggi terhadap toksin alfa *Cl. novyi* dibandingkan dengan pada berbagai bangsa sapi yang ada di Pulau Jawa (NATALIA *et al.*, 1988).

Toksin alfa terutama dihasilkan oleh *Cl. novyi* tipe A (penyebab *big head* pada domba dan gas gangren pada manusia) dan *Cl. novyi* tipe B (penyebab *infectious necrotic hepatitis* pada hewan ruminansia) (STERNE, 1981). Toksin ini biasanya diidentifikasi dari cairan atau ekstrak dari tempat terjadinya lesio. Cara konvensional yang biasa dilakukan untuk mendeteksi toksin alfa ini adalah dengan melihat reaksi nekrotik dari toksin alfa pada penyuntikan secara intra dermal pada marmot dan reaksi penghambatan oleh antisernya (SMITH, 1975). Selain itu, karena toksin alfa ini bersifat *lethal*, maka toksinnya juga dapat membunuh mencit dan dihambat jika diberi antiserum atau antitoksin yang spesifik. Uji ini dianggap tidak praktis, karena kurang sensitif, memakan waktu yang tidak sedikit dan menggunakan banyak hewan percobaan. Oleh sebab itu, perlu diusahakan suatu uji yang lebih sederhana, cepat dan tepat seperti teknik ELISA yang dapat menggantikan uji konvensional tersebut.

ELISA merupakan teknik diagnosis yang praktis, tepat, bersifat masal dan telah dikembangkan dengan baik untuk mendiagnosis berbagai macam penyakit termasuk penyakit yang disebabkan oleh toksin *Clostridium* (VOLLER *et al.*, 1979; MARTIN *et al.*, 1988; IDRISSE dan WARD, 1992). Dalam penelitian ini, teknik ELISA yang dikembangkan diharapkan akan dapat mengatasi kesulitan dalam mendiagnosis *infectious necrotic hepatitis* atau *black disease*.

MATERI DAN METODE

Untuk mengembangkan teknik ELISA guna mendeteksi toksin alfa dari *Cl. novyi* dibuat tahapan pengerjaan sebagai berikut:

Pembuatan toksin

Untuk memproduksi toksin alfa *Cl. novyi*, dibuat terlebih dahulu *starter* dari biakan *Cl. novyi* tipe A (galur CN 4270, Burroughs Wellcome, UK) dalam medium *Robertson's cooked meat medium* (RCMM). Setelah *starter* tumbuh dengan baik selama 1 hari, pembuatan toksin dilakukan dalam jumlah 1 liter dalam medium yang berisi pepton 3,0%, Na₂ HPO₄ 0,5% dan glukosa 1,0% (NATALIA *et al.*, 1988). Pada awal pertumbuhan pH medium adalah 7,8 dan selama toksin diproduksi, pH biakan diusahakan selalu berada di sekitar 7,0.

Toksin selesai dibuat dalam waktu 3 hari dalam tabung anaerobik. Setelah itu, ditambah 0,01% mertiolat untuk menghentikan pertumbuhan. Toksin yang masih bercampur dengan medium ini disentrifugasi pada 7.000 x g selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung toksin kemudian diuji

kuatannya dengan menggunakan mencit. Ternyata toksin yang dihasilkan mempunyai kekuatan 10.000 MLD mencit/ml.

Pemurnian toksin

Prosedur pemurnian toksin pada umumnya mengikuti metode WORRALL (1988). Toksin mula-mula dimurnikan dengan mengendapkannya, yaitu dengan menggunakan 50% w/v *polyethylene glycol* (PEG) 6.000 sehingga konsentrasi akhirnya adalah 30%. Larutan ini disimpan di dalam lemari pendingin selama 18 jam dan disentrifugasi pada 10.000 x g selama 25 menit. Endapan yang terjadi kemudian dilarutkan kembali dalam 50 ml larutan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,5. Terhadap satu volume larutan ini ditambahkan dua volume larutan amonium sulfat jenuh, 0,001M EDTA, 0,2M TRIS HCl pH 8,0. Endapan toksin yang terjadi dipisahkan dan dilarutkan kembali dalam 70 ml larutan PBS pH 7,5.

Toksin kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan kolom kromatografi DEAE *sephacell* (Pharmacia). Selanjutnya dikonsentrasikan sebanyak 10 kali dengan menggunakan kantong dialisis yang ditaburkan PEG 20.000.

Pada tahap berikutnya, toksin dikeringbekukan, ditimbang bobotnya dan konsentrasi toksin dijadikan 20 mg/ml dengan pelarut PBS pH 7,5. Toksin ini akhirnya dikeringbekukan sehingga setiap ampul berisi 1,0 mg toksin. Pada uji ELISA, 1,0 mg toksin ini akan dilarutkan dalam 100 ml larutan penyangga karbonat (*coating buffer*) sehingga konsentrasinya 10 µg/ml.

Pembuatan antitoksin pada sapi

Hiperimunisasi pada sapi dilakukan dengan menyuntikkan toksoid dan toksin alfa *Cl. novyi* tipe A dalam dosis bertingkat pada jadwal waktu tertentu. Toksin yang telah dimurnikan seperti tersebut di atas dibuat menjadi toksoid dengan penambahan 0,6% formalin dan disimpan pada suhu 37°C selama semalam. Uji keamanan (*safety test*) terhadap toksoid ini kemudian dilakukan pada mencit. Sejumlah 0,5 ml toksoid harus tidak membunuh mencit seberat 18-20 gram.

Hiperimunisasi pada sapi dilakukan sebagai berikut:

Pada hari ke-0 dan ke-28, sapi mendapat suntikan 2 ml toksoid yang dicampur dengan *Freund's complete adjuvant* (FCA) dalam perbandingan 1:1. Suntikan dilakukan secara subkutan di daerah leher.

Pada hari ke-40, -42, -44, dan -67, hewan mendapat suntikan toksin secara subkutan, masing-masing 5,0 ml, 7,5 ml, 10,0 ml dan 10,0 ml.

Pada hari ke-73, hewan diambil darahnya dan serumnya dipisahkan. Serum ini kemudian diukur potensinya dengan uji L+ pada mencit (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1977), dengan menggunakan antitoksin standar internasional.

Konjugat

Konjugat yang digunakan adalah IgG antisapi yang telah dilabel dengan *horse raddish peroxidase* (Silenus). Dalam pemakaiannya konjugat diencerkan 1/3.500 dengan larutan PBST (larutan PBS pH 7,5 yang ditambahkan 0,05% Tween-20).

Prosedur teknik ELISA

Pada dasarnya, pengerjaan teknik ELISA yang dilakukan adalah mengikuti metode VOLLER *et al.* (1979) yang dimodifikasi sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi toksin. Lempeng mikro ELISA dengan 96 lubang mula-mula dilapisi dengan antigen atau toksin alfa sebanyak 100 µl atau 1,0 µg per lubang (konsentrasi larutan antigen: 10 µg toksin/ml dalam larutan penyangga karbonat pH 9,6). Lempeng mikro ini kemudian diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah itu dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan menggunakan PBS pH 7,5 yang ditambahkan 0,05% Tween-20.

Sampel cairan hati yang diduga mengandung toksin dalam enceran 1/100 dicampur antiserum/antiktoksin berkekuatan 4,0 I.U. dalam enceran 1/100, dengan perbandingan 1:1. Campuran ini dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruangan. Selanjutnya 100 µl campuran ini kemudian dimasukkan ke dalam setiap lubang dalam lempeng mikro. Sebagai pembanding atau kontrol negatif (tidak mengandung toksin), digunakan campuran antitoksin tanpa penambahan toksin. Sebagai pelarut antitoksin digunakan larutan penyangga Tris EDTA NaCl pH 9,6 yang ditambah 0,05% Tween 20 dan 0,04% kasein (TTC). Inkubasi dilakukan selama 1 jam pada suhu ruangan. Pencucian kembali dilakukan dengan PBST sebanyak 3 kali.

Konjugat anti IgG sapi ditambahkan dalam enceran 1/3.500 dalam PBST sebanyak 100 µl per lubang. Lempeng mikro kemudian diinkubasi selama satu jam dalam suhu ruangan. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan PBST. Setelah itu dimasukkan substrat sebanyak 100 µl, yaitu 2,2-azino-bis (3ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) dalam penyangga sitrat ber-pH 4,2. Inkubasi pada suhu ruangan kembali dilakukan selama satu jam. Hasilnya dibaca dengan menggunakan *ELISA plate reader* (Titertek MCC 340, Flow Laboratories, USA) dengan panjang gelombang 415 nm. Pada setiap lempeng mikro akan terdapat kontrol negatif, yaitu sebagai pembanding bagi sampel yang diuji.

Akan terlihat perbedaan yang nyata antara sampel yang mengandung toksin/antigen dan kontrol yang tidak mengandung antigen. Besarnya perbedaan nilai densitas optikal atau warna ini menunjukkan jumlah toksin alfa atau antigen dalam sampel yang diuji (Gambar 1). Uji ini bersifat kompetitif, konsentrasi antigen yang makin tinggi dalam sampel akan meng-

akibatkan nilai densitas optikal atau warna yang makin berkurang.

Standardisasi dan evaluasi teknik ELISA

Untuk mendapatkan enceran antigen pelapis yang optimal terhadap serum positif (antitoksin referen), mula-mula dilakukan titrasi dengan sistem *checker-board*. Sampel yang digunakan berupa cairan hati yang dibuat dengan cara sebagai berikut:

Potongan hati (kira-kira 1 cm³) yang telah ditambah 2,0 ml PBS pH 7,2 dihancurkan dengan menggunakan *stomacher*. Sentrifugasi kemudian dilakukan pada 5.000 x g selama 5 menit untuk memisahkan cairan dan endapannya. Supernatan tersebut kemudian akan digunakan sebagai sampel yang diuji dengan teknik ELISA.

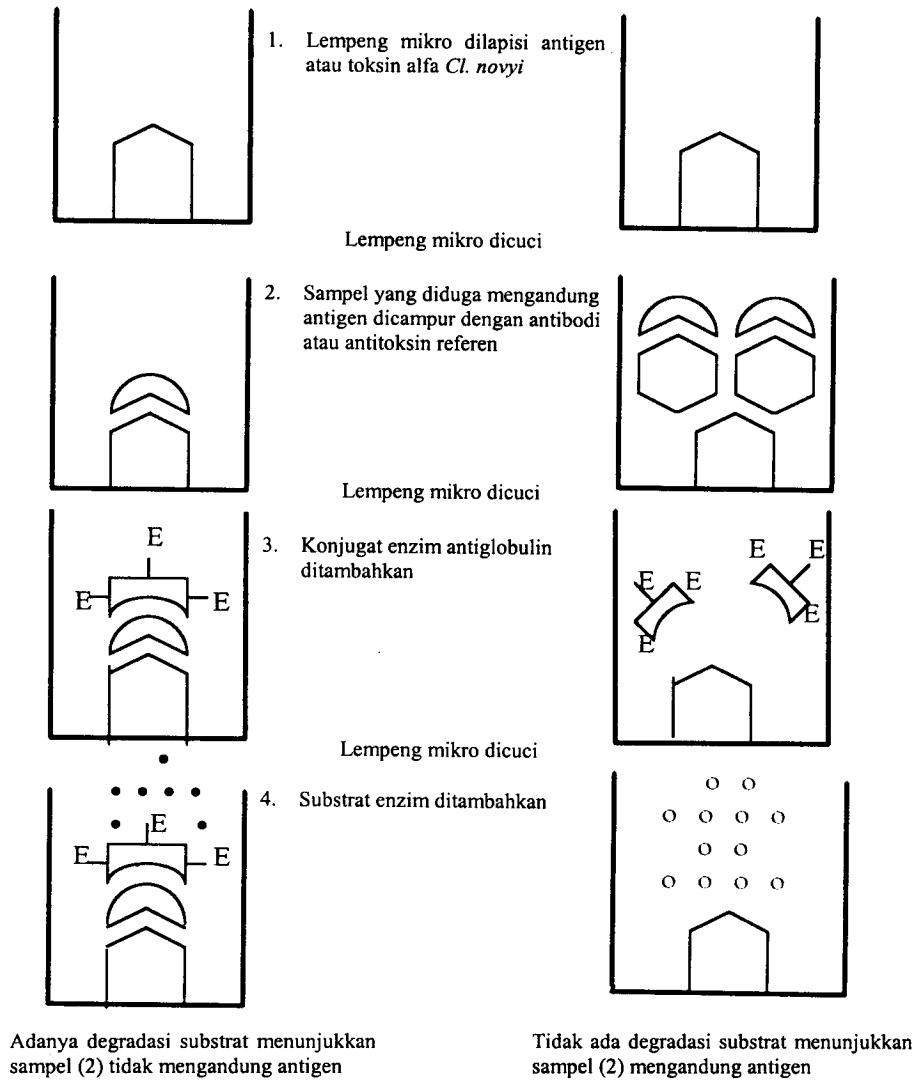
Dari rumah potong hewan, sebanyak 44 sampel hati dari 44 ekor hewan sapi dan kerbau yang nampak sehat akan diuji kadar kandungan toksinnya. Hasil uji ini kemudian akan digunakan sebagai batas nilai ELISA yang negatif.

Untuk mengetahui kepekaan teknik ELISA, dilakukan uji terhadap sampel berupa cairan hati yang mengandung berbagai konsentrasi toksin. Untuk itu, sampel hati sapi dari hewan sehat di rumah potong hewan yang telah diketahui negatif atau tidak mengandung toksin alfa diberi perlakuan dengan penambahan berbagai konsentrasi toksin. Untuk penambahan toksin dalam cairan hati, toksin diencerkan secara seri dengan kelipatan dua, yaitu dari 100.000 ng/ml sampai 48,75 ng/ml. Dari hasil yang didapat akan terlihat kepekaan uji ELISA untuk mendeteksi toksin yang terkandung dalam sampel cairan hati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik ELISA telah digunakan untuk mendeteksi toksin *Cl. novyi* tipe B dengan menggunakan 3 antiserum poliklonal (SCHRANER *et al.*, 1992). Teknik ELISA untuk mendeteksi berbagai toksin dari *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum* pada umumnya juga telah dikembangkan dengan menggunakan antibodi yang murni dan spesifik (WIMSATT *et al.*, 1986; SOYKA *et al.*, 1989; LYERLY dan WILKINS, 1991; THOMAS, 1991; IDRISI dan WARD, 1992; GREGORY *et al.*, 1996). Metode pengembangan teknik ELISA tersebut pada umumnya menggunakan antiserum yang telah dimurnikan untuk dapat digunakan sebagai antigen pelapis atau pembuatan konjugat yang spesifik.

Teknik ELISA yang dikembangkan dalam penelitian ini adalah modifikasi dari metode VOLLER *et al.* (1979), yaitu metode tidak langsung dan kompetitif. Cara ini dapat digunakan dengan pemakaian antigen atau toksin yang telah dimurnikan tanpa harus menggunakan antibodi yang murni dan spesifik. Dalam uji ini dinilai besarnya selisih nilai densitas optikal antara



Gambar 1. Modifikasi metode VOLLER *et al.* (1979): teknik ELISA tidak langsung untuk mendeteksi antigen

sampel yang mengandung toksin alfa *Cl. novyi* dan kontrol yang tidak mengandung toksin. Konsentrasi antigen atau toksin yang makin tinggi dalam sampel akan mengakibatkan nilai densitas optikal atau warna yang makin berkurang.

Pada uji ELISA ini, sampel yang dijadikan bahan pemeriksaan adalah cairan hati hewan yang diduga mati karena *infectious necrotic hepatitis*. Dalam kasus penyakit ini, organ hati merupakan tempat utama bagi *Cl. novyi* untuk tumbuh, berproliferasi dan menghasilkan toksin (SMITH, 1975).

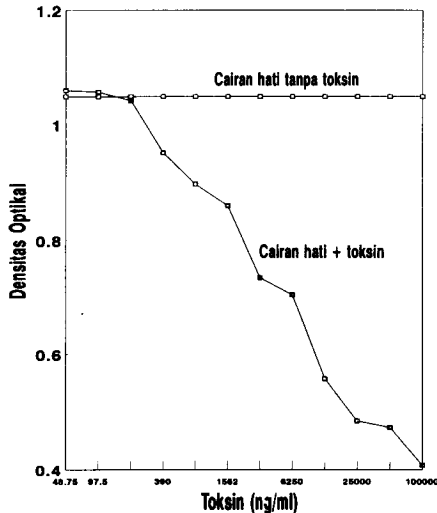
Dari hasil titrasi pendahuluan didapatkan bahwa antigen pelapis yang diperlukan adalah 1 µg/lubang atau dalam konsentrasi 10 µg/ml, sedangkan antiserum standar yang digunakan adalah 4 I.U./ml, yang dalam pemakaiannya diencerkan 1/100 dalam larutan TTC.

Dalam penilaian hasil ELISA yang bersifat kompetitif ini, dinilai besarnya penghambatan toksin alfa *Cl.*

novyi terhadap serum referen atau dihitung besarnya selisih nilai densitas optikal antara sampel yang diuji dan kontrol negatif yang tidak mengandung toksin. Makin besar selisih densitas optikal akan makin besar pula kandungan toksin di dalam sampel.

Untuk mengetahui batasan nilai ELISA negatif, juga telah dilakukan uji ELISA terhadap cairan atau ekstrak hati sapi dan kerbau yang sehat. Ternyata dari 44 sampel cairan hati yang diuji mempunyai nilai densitas optikal sebesar $1,050 \pm 0,052$. Dalam evaluasi uji ELISA yang dikembangkan, telah dicoba mendeteksi berbagai konsentrasi toksin yang dilarutkan dalam cairan hati dari sapi yang sehat. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2. Pada gambar ini dapat dilihat adanya perpotongan antara garis cairan hati tanpa toksin dan garis cairan hati yang mengandung toksin. Jadi, di sekitar titik potong ini ada atau tidak adanya toksin dalam sampel cairan hati tidak dapat dibedakan.

Sesudah titik potong ini, makin besar kadar toksin dalam sampel akan menunjukkan nilai densitas optikal yang semakin rendah, atau akan makin besar selisih nilai densitas optikal antara sampel yang mengandung toksin dan sampel tanpa toksin.



Gambar 2. Tingkat densitas optikal teknik ELISA dari sampel cairan hati dengan dan tanpa tambahan toksin *Cl. novyi*

Hasil ELISA untuk mendeteksi alfa toksin dapat dicoba untuk dibandingkan dengan uji konvensional, yaitu uji toksisitas pada mencit. Hasil yang positif pada uji toksisitas toksin alfa pada mencit ditunjukkan dengan adanya kematian. Jadi, dalam penelitian ini, toksin yang digunakan dalam teknik ELISA diukur kemampuannya untuk membunuh mencit. Dalam uji ini, 1 mg toksin yang kering beku mempunyai 150 MLD mencit atau toksin ini dapat membunuh mencit dalam jumlah 6,66 µg, sedangkan sampel yang mengandung toksin dalam jumlah lebih kecil dari 6,66 µg memberi hasil negatif atau tidak dapat membunuh mencit.

Batasan kepekaan ELISA dapat ditentukan berdasarkan *mean* sampel negatif ditambah 2 standar deviasi (TJUSSEN, 1985). Karena teknik ELISA yang dikembangkan ini bersifat kompetitif dan makin tinggi jumlah toksin dalam sampel akan makin rendah nilai densitas optikalnya, maka batasan toksin yang dapat dideteksi adalah *mean* sampel negatif dikurangi 2 standar deviasi. Jadi, batas pembedaan antara ELISA positif dan negatif adalah nilai densitas optikal 0,946 atau sampel dengan kandungan toksin mendekati 390 ng/ml atau 0,39 µg/ml (Gambar 2). Dengan demikian, teknik ELISA dapat mendeteksi toksin dalam jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan uji konvensional dengan menggunakan mencit.

Dibandingkan dengan metode lain untuk mendeteksi toksin klostroidia seperti *reversed passive latex agglutination* (RPLA) dan *verocell assays* (mengukur efek sitotoksitas dari toksin), meskipun teknik ELISA

menggunakan waktu yang lebih lama, namun hasil ELISA lebih spesifik dan lebih konsisten pada uji ulangan. RPLA lebih sensitif daripada ELISA, tetapi memperlihatkan beberapa reaksi nonspesifik. Dari ketiga uji ini, *verocell assay* yang terendah sensitivitasnya dan tidak selalu konsisten pada uji ulangan karena adanya reaksi sitotoksik nonspesifik dan reaksi sitototik (BERRY *et al.*, 1988). Metode lain yang sederhana dan yang selama ini masih digunakan adalah uji biologis menggunakan mencit, uji hemolisis dan uji hemaglutinasi (LYERLY dan WILKINS, 1991). Uji ini dipandang kurang sensitif dibandingkan dengan teknik ELISA.

Sebagai kesimpulan dapat dinyatakan bahwa teknik ELISA kompetitif yang dikembangkan ini dapat digunakan sebagai pengganti uji biologis yang menggunakan mencit, karena lebih praktis, sederhana dan lebih sensitif.

DAFTAR PUSTAKA

- BAGADI, H.O. 1974. Infectious necrotic hepatitis (black disease) of sheep. *Vet. Bull.* 44:385-388.
- BATTY, I., D. BUNTAIN, and P.W. WALKER. 1964. *Clostridium oedematiens*: a cause of sudden death in sheep, cattle and pigs. *Vet. Rec.* 76: 1115-1116.
- BERRY, P. R., J.C. RODHOUSE, S. HUGHES, B.A. BARTHOLOMEW, and R.J. GILBERT. 1988. Laboratory techniques. Evaluation of ELISA, RPLA and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 41: 458-461.
- BRITISH PHARMACOPOEIA 1977. Appendix XIV b. *British Pharmacopoeia (Veterinary)*. Published on the recommendation of the Medicines Commission. Her Majesty's Stationery Office. London.
- GREGORY, A. R., T. M. ELLIS, T. F. JUBB, R. J. NICKELS, and D. V. COUSINS. 1996. Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulisms in cattle. *Aust. Vet. J.* 73 (2):55-61.
- IDRISSI, A.H.E. and G.E. WARD. 1992. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. *Vet. Microbiol.* 31 :89-99.
- JAMIESON, S., J. J. THOMPSON, and J.G. BROTHURSTON. 1948. Studies in black disease. The occurrence of the disease in sheep in north of Scotland. *Vet. Rec.* 60:11-14.
- JAMIESON, S. 1949. The identification of *Clostridium oedematiens* and an experimental investigation of its role in the pathogenesis of infection necrotic hepatitis (black disease) of sheep. *J. Path. Bact.* 61:389-402.
- LYERLY, D. M. and T. D. WILKINS. 1991. Toxins of anaerobes. In: *Anaerobic Microbiology*. The Practical Approach Series. IRL Press. Oxford University Press, Oxford:163 - 181.
- MARTIN, P. K., R. D. NAYLOR, and R. T. SHARPE. 1988. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by

- enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 44:270-271.
- NATALIA, L., E. E. WORRALL, and M. SYAFARUDIN. 1988. Antibodies to *Clostridium novyi* alpha toxin in imported cattle and buffalo in Java. Proceedings of the 6th Congress of FAVA, Oct. 16-19, 1988. Denpasar, Bali, Indonesia: 429-434.
- SCHRANER, I., M. H. KALTNER, and H. LOSCH. 1992. Isolation of immunogenic and lethal peptides of alpha-toxin from *Clostridium novyi* type B. *Toxicon-Oxford*. 30 (5/6): 653-668.
- SMITH, L. D. S. 1975. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. 2nd Ed. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, U.S.A.
- SOYKA, M. G., V. J. WHITE, C. J. THORNS, and P. L. ROEDER. 1989. The detection of *Clostridium perfringens* epsilon antitoxin in rabbit serum by monoclonal antibody based competition ELISA. *J. Biol. Standardization* 17: 117-124.
- STERNE, M. 1981. Clostridial infections. *Brit. Vet. J.* 137:434-454.
- THOMAS, R.J. 1991. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. *Am. Vet. J.* 68 (3): 111-113.
- TJUSSEN, P. 1985. *Practice and Theory of Enzyme Immuno Assays*. Elsevier, Amsterdam. pp. 385-421.
- VOLLER, A., D. E. BIDWELL, and A. BARTLETT. 1979. *The Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Dynatech Lab. Inc. 900 Slaters Lane, Alexandria, Virginia 22314.
- WIMSATT, J. C., S. M. HARMON, and D. B. SHAH. 1986. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in stool specimens and culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 4:307-313.
- WORRALL, E.E., G. MOEKTI, and D.A. LUBIS. 1987. *Clostridium novyi* isolated from the livers of healthy sheep and goats in Java. *Penyakit Hewan* 19(13):14-16.
- WORRALL, E.E. 1988. *Assignment Termination Report*. British Indonesian Technical Cooperation Project. ATA 244. Phase 3. RIVS, Bogor, West Java, Indonesia.