

Pengembangan Teknik Serologi untuk Pemeriksaan Aspergillosis Ayam

DJAENUDIN GHOLIB

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 14 Desember 2004)

ABSTRACT

GHOLIB, D. 2005. Development of serological technique for examination of aspergillosis in chicken. *JITV* 10(2): 143-149.

Aspergillosis detection by using serological method has not been reported in Indonesia. In this case, a study was conducted, by using mycelium extract of *A. fumigatus* as the antigen. Rabbits and chickens were injected with the antigen to produce positive serum (antiserum). The antigen and antiserum were tested serologically by Immunodiffusion/Agar Gel Precipitation (AGP), ELISA and Immunoblot. Chicken serum of broiler and layer collected from field were also included in the test. All positive serum of the experimentally animals gave positive results with all methods of serological tests. No bands of precipitation reaction in AGP test with chicken serum from the field. Both chicken and rabbit positive serum with ELISA test showed high Optical Density (OD), while field chicken serum from broiler commonly gave lower OD compared to layer. Immunoblot test of chicken positive serum showed bands of reaction with the antigen in nitrocellulose membrane, approximately on 33, 38, 44, 52, 70, 77, 97, and 110 kDa, meanwhile field chicken serum with high OD in ELISA test, showed bands approximately on 16, 18, 33, 38, 44, 47, 52, 70, 77, 84, 97, and 110 kDa. It means that the field chicken serum contain immunoglobulin molecules has spesific antibody of aspergillus antigen. It is concluded that the ELISA test can be used for screening on chicken aspergillosis in serological methode.

Key Words: Antigen, *Aspergillus fumigatus*, Serology, Chicken

ABSTRAK

GHOLIB, D. 2005. Pengembangan teknik serologi untuk pemeriksaan aspergillosis ayam. *JITV* 10(2): 143-149.

Penelitian metode serologi untuk aspergillosis pada ayam belum pernah dilaporkan di Indonesia. Oleh karena itu suatu penelitian dilakukan dengan menggunakan ekstrak miselium dari *A. fumigatus* sebagai antigen. Kelinci dan ayam disuntik untuk memperoleh serum positif (antiserum). Antigen dan antiserum kemudian diuji secara serologis dengan uji Immunodiffusi Agar/Agar Gel Precipitation (AGP), ELISA dan Imunoblot. Serum lapang ayam pedaging dan petelur, disertakan dalam pengujian ini. Semua serum positif dari hewan percobaan memberikan hasil reaksi positif dengan semua uji serologis. Tidak terbentuk garis reaksi presipitasi dengan uji AGP pada serum ayam lapang yang diuji. Serum hewan percobaan dengan uji ELISA menunjukkan nilai densitas optik (OD) yang tinggi, sedangkan serum ayam pedaging dari lapang umumnya mempunyai nilai OD lebih rendah dari petelur. Uji imunoblot menggunakan serum ayam positif, menunjukkan adanya garis/pita sebagai reaksi antiserum dengan antigen pada membran nitroselulosa, di sekitar 33, 38, 44, 52, 70, 77, 97, dan 110 kDa. Sedangkan serum ayam lapang yang memiliki nilai OD tinggi dengan ELISA menunjukkan garis/pita pada 16, 18, 33, 38, 44, 47, 52, 70, 77, 84, 97, dan 110 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa serum lapang tersebut mengandung molekul imunoglobulin sebagai antibodi spesifik terhadap antigen aspergillus. Disimpulkan bahwa Uji ELISA dapat digunakan sebagai uji skreening untuk aspergillosis pada ayam secara serologis.

Kata Kunci: Antigen, *Aspergillus fumigatus*, Serologi, Ayam

PENDAHULUAN

Aspergillosis pada ayam merupakan penyakit yang perlu diperhatikan di dalam industri perunggasan. Penyakit ini menyerang alat pernapasan, terutama paru-paru dan kantung hawa, dan menyebabkan terganggunya fungsi pernapasan. Akibatnya, produktivitas telur dan daging ayam terganggu.

Indonesia sebagai negara tropis keadaannya cocok untuk pertumbuhan berbagai macam jamur termasuk aspergillus. Aspergillus adalah spesies yang tersebar luas, karena sporanya yang mudah tersebar oleh udara dan mudah tumbuh pada bahan-bahan organik dan

produk hasil pertanian. Dengan demikian aspergillus akan mudah mencemari bahan-bahan yang digunakan di dalam peternakan. Litter dan pakan yang bahannya adalah produk pertanian dapat berperan sebagai sumber infeksi aspergillus, sehingga prevalensi kejadian aspergillosis pada peternakan unggas cukup tinggi. Kondisi ini menyebabkan penyakit aspergillosis merupakan penyakit yang amat perlu diperhatikan diantara penyakit mikotik lainnya di dalam industri perunggasan.

Penyebab aspergillosis yang utama adalah spesies *Aspergillus fumigatus*. Spesies lain seperti *A. flavus* dan *A. niger* dapat juga menyebabkan penyakit, tetapi

frekuensinya rendah (HASTIONO, 1984). Selain *A. fumigatus*, AL-DOORY (1980) menyatakan bahwa *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. candidus*, *A. amstelodami* dan *A. niveus* juga dapat berperan sebagai agen penyakit.

Untuk mengetahui kejadian aspergillosis pada ayam, selama ini dilakukan cara pemeriksaan patologis terhadap kelainan pada organ paru dan kantong hawa atau trakhea. Agen penyakit ditentukan dengan melakukan pemeriksaan kultural, yaitu penanaman potongan sampel organ yang mengandung sarang infeksi aspergillosis pada media agar Sabouraud yang ditambah antibiotik (THOMPSON, 1969). Koloni aspergillus yang tumbuh, lalu diidentifikasi dengan pemeriksaan secara makro dan mikroskopik. Pemeriksaan mikroskopik langsung pada organ dapat dilakukan secara natif, yaitu dengan menggunakan larutan KOH/NaOH (10 atau 20%) dan histopatologis. Adanya hifa yang bercabang dan bersepta pada pemeriksaan di bawah mikroskop menguatkan dugaan ke arah kejadian aspergillosis.

Proses pemeriksaan secara konvensional seperti diterangkan di atas, memerlukan waktu relatif lama, dan dibutuhkan ayam untuk diautopsi. Pada pemeriksaan ayam hidup dengan memeriksa berdasarkan gejala klinis, dapat dikelirukan dengan penyakit lainnya yang memperlihatkan gejala gangguan pernafasan. Untuk itu perlu dilakukan pengembangan teknik pemeriksaan secara serologis.

Teknik serologis sebagai salah satu cara untuk mendiagnosa penyakit mikotik sudah lama digunakan (AL-DOORY, 1980). Teknik serologis yang telah diketahui dan digunakan antara lain imunodifusi, imunofluoresensi, fiksasi komplemen/*Complement Fixation Test* (CFT), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan imunoblot (TIZARD, 1992).

Khusus pada aspergillosis hewan terutama ayam atau unggas lainnya, penelitian tentang penyakit ini dengan menggunakan teknik serologis amat jarang atau belum pernah dilakukan di Indonesia. Suatu laporan tentang pengujian antigen aspergillus dengan hewan percobaan kelinci dan serumnya diuji dengan cara Imunodifusi agar/AGP telah ditulis oleh SUNARTATIE dan INDRAWATI (2000). Beberapa laporan penelitian yang telah dilakukan di luar negeri antara lain adalah ASAKURA *et al.* (1962), mempelajari uji presipitasi antigen antibodi dan reaksi pada kulit dari burung. BUXTON dan SOMMER (1979) mempelajari teknik Imunodifusi agar dan *Counter Current Immuno-electrophoresis*. Penelitian tentang uji ELISA pada aspergillosis sudah dilakukan antara lain oleh BAUMGARTNER (1988) pada burung *Psittacine*, REDIG *et al.* (1990), pada kalkun dan MARTINEZ *et al.* (1993) dengan percobaan pada burung merpati. CHEN *et al.* (2000) melakukan percobaan pada ayam petelur, dan pada burung pinguin dilakukan oleh GERMAN *et al.*

(2002). Sedangkan percobaan dengan kelinci dilakukan oleh RICHARDSON *et al.* (1979), DE MAGALDI dan MACKENZIE (1984), SABETTA *et al.* (1985) dan KURUP *et al.* (1983). Hal ini mendorong penulis untuk melakukan pengembangan teknik serologi pada penelitian aspergillosis ayam, antara lain uji AGP, ELISA dan Imunoblot

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan hewan percobaan ayam dan kelinci untuk pembuatan serum kontrol negatif dan positif, ayam lapang untuk serum yang akan diuji, dan antigen berupa ekstrak miselium dari *Aspergillus fumigatus*.

Pembuatan antigen (ekstrak miselium) *A. fumigatus*

Untuk membuat antigen digunakan metode FROUDIST (1988) yang telah dimodifikasi, yaitu: Isolat *A. fumigatus* dibiakkan di dalam media cair glukose pepton yang mengandung kloramfenikol 50 mg/ml. Biakan lalu diinkubasi pada suhu ruangan, sambil diputar dengan batang magnet selama 2-3 minggu. Koloni yang padat di permukaan media yang terdiri dari miselium lalu dipisahkan dengan cara penyaringan memakai kain *muslin* steril. Miselium yang sudah padat lalu diperas dengan kain *muslin*, dibilas dengan akuades steril dan diperas lagi sampai bersih dari medium. Miselium lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril, ditimbang, lalu disimpan pada suhu -20°C sebelum diproses lebih lanjut. Selanjutnya miselium padat ditambah dengan larutan PBS Tris dengan perbandingan (1: 2) dan dimasukkan ke dalam *blender*. Pemutaran pertama dilakukan dengan kecepatan tinggi, dan pemutaran ke dua dengan kecepatan rendah, masing-masing selama 1 menit. Miselium padat berupa suspensi kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *homogeniser* pada suhu 4°C. Setelah miselium pecah secara merata, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 jam, pada suhu 4°C. supernatan diambil dan didialisis dengan tabung dialisis dengan cara merendamnya di dalam akuades pada suhu 4°C selama semalam. Tabung dialisis yang berisi supernatan lalu diambil dan ditempatkan pada nampan, ditaburi dengan *Polyethylene Glycol* 6000, kemudian disimpan pada suhu 4°C sampai volume dialisat menjadi ¼ volume asal. Dialisat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatannya diambil sebagai ekstrak miselium, dan kadar proteinnya dianalisa dengan cara Lowry yang dimodifikasi (MARKWELL *et al.*, 1978).

Pembuatan antisera *Aspergillus fumigatus*

Tiga ekor ayam kampung dan 2 ekor kelinci diambil darahnya, masing-masing melalui pembuluh vena sayap dan melalui pembuluh vena dari daun telinga sebagai serum kontrol negatif. Dua ekor ayam tadi disuntik dengan suspensi dari ekstrak miselium *A. fumigatus* yang dicampur dengan *Freund's Complete Adjuvant* (1:1) dengan dosis 1 ml secara subkutan di bagian dada. Penyuntikan ke dua dilakukan pada 10 hari setelah suntikan pertama dengan cara yang sama. Pada hari ke-21 setelah suntikan pertama, darahnya diambil, dan serumnya digunakan sebagai kontrol positif. Untuk kelinci hanya satu ekor yang digunakan untuk pembuatan serum positif, satu ekor lagi digunakan sebagai kontrol negatif. Penyuntikan antigen dilakukan dengan dosis dan cara yang sama seperti pada ayam, tetapi bagian yang disuntik adalah pada paha belakang.

Uji serologis

Untuk uji serologis digunakan teknik Agar Gel Presipitasi (AGP) (OUCHTERLONY, 1986), ELISA dan Immunoblot (TIZARD, 1992; REDIG *et al.*, 1990; KEMENY *et al.*, 1989; PATTERSON, 1989 dan BAUMGARTNER, 1988).

Uji AGP/Imunodifusi Agar

Pertama dibuat agar dalam plat/gelas obyektif, yaitu dengan melarutkan *agarose* 1% yang mengandung 9% NaCl dalam akuades, lalu dipanaskan sampai mendidih. Setelah agak dingin, larutan dituangkan pada gelas obyektif secara merata ke seluruh permukaan. Biarkan agar membeku lalu dibuat sumur-sumur, diameter 2-3 mm, satu sumur di tengah dan 5-6 sumur di sekelilingnya dengan jarak sama (0,5 cm). Larutan antigen ditetaskan di sumur tengah dan serum yang diuji ditetaskan di sumur bagian pinggir. Gelas obyektif yang telah berisi reaktan disimpan di dalam cawan petri, alasnya diberi kertas saring basah. Keesokan harinya gelas obyektif diperiksa, bila hasilnya positif maka akan terlihat garis putih di antara sumur bagian tengah dan bagian pinggir. Kadang-kadang garis putih tidak jelas, tetapi menyerupai kabut. Garis presipitasi yang terbentuk lalu diwarnai dengan pewarna *Coomassie Blue* (0,1%).

ELISA

Serum kontrol positif dari kelinci dan ayam dideteksi dengan antigen, yaitu masing-masing serum dan antigen diencerkan secara seri 1/50, 1/100, 1/200 dan seterusnya sampai 1/1600 dengan *carbonate buffer* (pH 9,5). Dari masing-masing pengenceran antigen dituangkan sebanyak 50 µl ke dalam lubang plat mikro, mulai dari kolom pertama untuk pengenceran 1/50, dan

kolom ke dua untuk pengenceran 1/100, dan seterusnya sampai pengenceran terakhir. Plat yang sudah di *coating*, dibungkus dengan *aluminium foil* dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Lalu dilakukan pencucian 4 kali dengan larutan *Phosphate Buffered Saline-Tween* (PBST) 0,05%. Kemudian antiserum (ayam/kelinci) diencerkan dengan pengenceran seri, mulai dari 1:100. Lubang plat diisi masing-masing dengan 50 µl antiserum dimulai pada baris pertama, lalu berturut-turut pada baris ke dua, demikian selanjutnya sampai sebelum baris terakhir. Pada lubang baris terakhir diisi larutan konjugat. Plat digoyang di atas *shaker* selama 1 jam. Lalu dicuci dengan larutan PBST sebanyak 4 kali. Isikan larutan konjugat *goat anti chicken IgG-HrPo* (Sigma Chem. Co.) 1/1000 dalam larutan PBST-*casein* sebanyak 50 µl ke dalam setiap lubang, sedangkan untuk pengujian serum kelinci digunakan konjugat *goat anti rabbit* (Sigma Chem. Co.) 1/1000. Plat digoyang di atas *shaker* selama 1 jam. Lalu dicuci sebanyak 4 kali dengan PBST. Akhirnya diisikan 100 µl substrat 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzothiazolin sulphonate] (ABTS) ke setiap lubang, dan digoyang di atas *shaker* selama 30 menit. Hasilnya dibaca pada *Plate Reader* pada absorpsi 415 nm.

Pengujian serum lapang, prinsipnya sama dengan pengujian pada antiserum hewan percobaan. Sebagai pembanding, maka digunakan serum kontrol positif dan negatif. Pada uji serum lapang ini enceran serum yang digunakan adalah 1:200, enceran antigen 1:50, dan enceran konjugat 1:1000 dalam larutan PBST-*casein*.

SDS-PAGE

Untuk melakukan teknik ini, maka dibuat *Separating gel*-0,37 M Tris, pH 8,8 menggunakan 12,6% gel yang terdiri dari akuades 3,15 ml, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 2,5 ml, 10% (w/v) SDS stock 100 µl, Acrylamide/Bis (30% stock) 4,2 ml. *Degas* selama 20 menit (dengan alat penghisap vakum). Tambahkan larutan amonium persulfat (10%) 50 µl dan N,N,N',N'-tetrametilenadiazin-0,77 g/ml (TEMED) 10 µl. *Stacking gel* (4%) terdiri dari akuades 6,1 ml, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 ml, 10% (w/v) SDS 100 µl, Acrylamide/Bis (30% stock) 1,3 ml, lalu *degas* selama 20 menit. Tambah amonium persulfat (10%) 50 µl dan TEMED 10 µl. *Stacking gel* dituangkan di atas *separating gel*, biarkan selama 30 menit untuk polimerisasi. Sampel yang akan diperiksa dan *marker* (*Low Molecular Weight*) (Pharmacia Biotech.) dipanaskan selama 5 menit. 30 µl sampel dan *marker* dimasukkan. Kemudian dilakukan elektroforesis vertikal pada 200 volt selama 45 menit (Mini-vertical slab gel/ Biorad Laboratories)

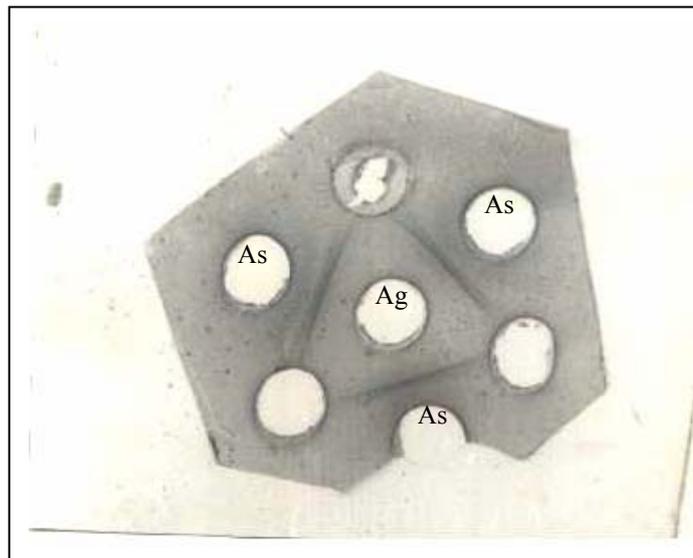
Imunoblot

Untuk melakukan teknik Imunoblot, gel yang sudah diproses dengan elektroforesis, nitroselulose, kertas saring dan *pad* (bantalan) dibasahi dengan *Tris Buffer Saline* (TBS) selama 30 menit. Kertas saring diletakkan di atas *pad*, dan diletakkan di atas fiksasi serta panel di bagian dasar. Lalu direndam di dalam cairan TB, gel diletakkan di atas kertas saring, dan nitroselulose di atas gel, di atas nitroselulose diletakkan kertas saring lalu diletakkan *pad* di atas kertas saring, dan fiksasi. Tanki elektroforesis diisi dengan larutan *Tris Buffer* (TB) (0,3%) dingin sebanyak 500 ml. Elektrotransfer dilakukan pada 50 volt selama 1 jam. Nitroselulose yang sudah diproses, direndam di dalam larutan PBS/Tween mengandung kasein 2% sebanyak 2 kali masing-masing 15 menit sambil digoyang pada *shaker*. Serum uji dengan pengenceran 1/100 dalam larutan PBST kasein direaksikan dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian dicuci dengan larutan PBS/Tween/kasein selama 15 menit. Antibodi dalam serum yang bereaksi dengan antigen (protein) pada nitroselulose dideteksi dengan anti IgG ayam yang dilabel dengan enzim *horse radish peroksidase* (HrPo) dengan pengenceran 1/500 dalam larutan PBS/Tween/Kasein dan diinkubasi pada suhu kamar. Lalu dilakukan pencucian seperti di atas, direaksikan dengan substrat (4-chloro-1-naphtol 0,02%) (Sigma Chem. Co.), selama 1-5 menit sampai pita terlihat, lalu dicuci dengan akuades.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran kadar protein menunjukkan bahwa ekstrak miselium dari *A. fumigatus* sebagai antigen adalah 1,5 mg/ml. Reaksi antigen dengan serum kontrol positif dari hewan percobaan ayam dan kelinci dengan uji AGP, menunjukkan garis presipitasi yang menandakan terjadinya ikatan kompleks antigen dan antibodi (Gambar 1). Pengujian antigen dengan serum ayam dari lapang hasilnya tidak menunjukkan garis presipitasi. Hal ini menunjukkan kemungkinan tidak ada antibodi yang spesifik, karena tidak adanya infeksi, atau bila ada antibodi, kemungkinannya kadarnya rendah, sehingga tidak terjadi reaksi presipitasi. Disamping itu memang uji AGP kurang sensitif. Walaupun demikian THURSTON *et al.* (1975) menerangkan bahwa teknik AGP digunakan secara umum untuk mendeteksi aspergillosis. Adanya reaksi presipitasi disimpulkan adanya infeksi spora dengan jumlah banyak sehingga terjadi aspergillosis.

Pengujian serum ayam dengan teknik imunodifusi ini menggunakan agarose 1% dan NaCl dengan konsentrasi tinggi, dalam hal ini 9%, menunjukkan hasil yang memuaskan, hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh CROWLE (1973). Selanjutnya CROWLE (1973), mengemukakan adanya 3 jenis antibodi presipitin di dalam serum ayam, antara lain adalah 7 S globulin yang dihasilkan segera setelah imunisasi dosis tinggi, dan tetap terdapat dalam serum setelah diikuti oleh imunisasi dosis rendah. Reaksi dengan antigen untuk membentuk presipitasi adalah optimal dengan konsentrasi NaCl tinggi.



Gambar 1. Uji Imunodifusi Agar/Agar Gel Precipitation (AGP) dari antiserum kelinci (lubang pinggir) dan antigen (lubang tengah). Pewarnaan dengan *Coomassie Blue*

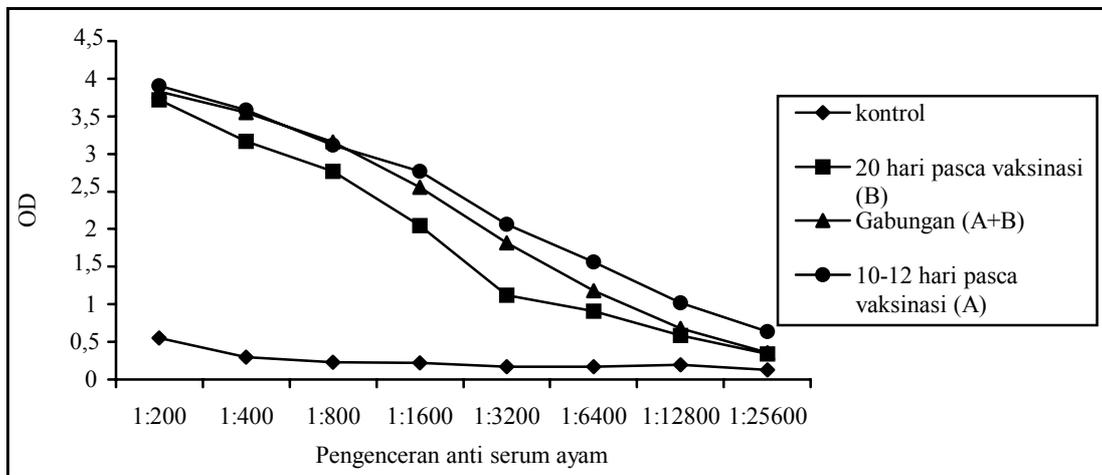
Hasil pengujian antiserum hewan percobaan terhadap antigen dengan pengenceran pada ELISA, dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 tersebut dapat ditentukan bahwa untuk mendeteksi antibodi spesifik dalam serum uji ELISA yang efektif dan efisien dilakukan dengan menggunakan enceran serum ayam 1:200 dan serum kelinci 1:100, antigen 1:50; serta enceran konjugat 1:1000 dalam bahan pengencer.

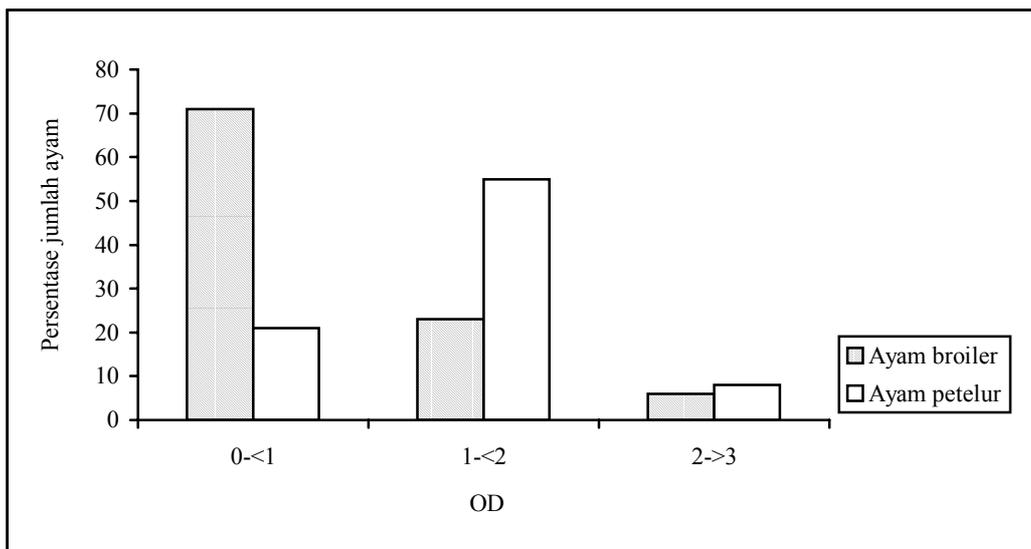
Serum ayam lapang, yang diambil dari peternakan di sekitar Bogor yang diuji dengan cara ELISA, hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2. Serum kontrol positif menunjukkan reaksi yang kuat, yaitu dengan nilai *Optical Density* (OD) > 2,0-3,0. Yang menarik adalah sebagian besar ayam petelur menunjukkan titer

antibodi lebih tinggi dibandingkan dengan ayam pedaging. Hal ini kemungkinan dikarenakan periode pemeliharaan ayam petelur lebih lama dibandingkan dengan pada ayam pedaging yang hanya dalam waktu 2-3 bulan. Sehingga ayam petelur akan terpapar dengan spora *aspergillus* lebih lama dalam hidupnya dibandingkan dengan ayam pedaging. Akibatnya titer antibodi terhadap aspergillosis juga lebih tinggi.

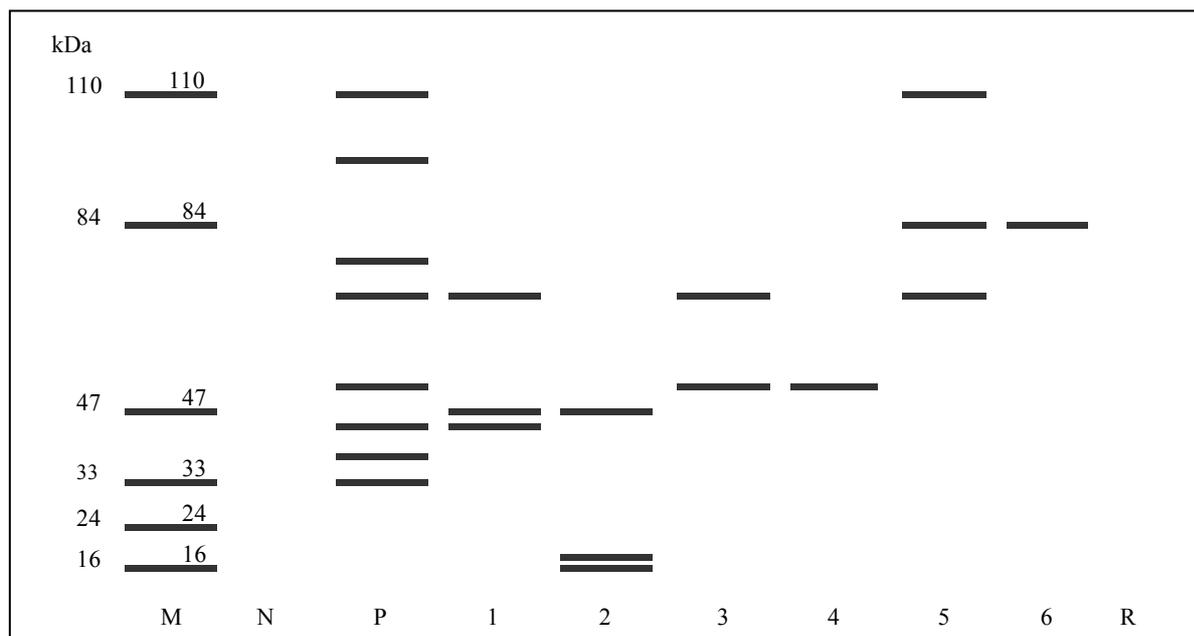
Adanya reaksi silang di antara spesies *A. fumigatus* dengan spesies *Aspergillus* lainnya telah dilaporkan oleh KIM dan CHAPARAS (1979) dan SELA (1977). Maka itu metoda ELISA digunakan untuk skrining aspergillosis ayam, sebagai pelengkap diagnosa secara kultural dan klinis.



Gambar 1. Uji kontrol positif dan negatif dari serum ayam dengan pengenceran antigen 1:50



Gambar 2. Uji serum ayam lapang dengan antigen



Gambar 2. Representasi hasil imunoblot reaksi serum positif ayam dan sampel serum ayam lapang. M (*marker*), N (serum negatif), P (serum positif), 1 s/d 6 (sampel lapangan) dan R (*reagen*)

Hasil imunoblot menunjukkan pita dari protein antigen yang ditransfer ke lapis nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi dari serum positif dengan berat molekul 33, 38, 44, 52, 70, 77, 97 dan 110 kDa. Sementara itu, dengan serum kontrol negatif dan reagen tanpa serum, hasilnya tidak menunjukkan adanya pita tersebut. BURNIE (1991) dalam penelitian *aspergilloma* dan *allergic bronchopulmonary aspergillosis* dengan cara imunoblot melaporkan hasilnya dengan berat molekul 33, 40, 47,50, 67, dan 84 Kda, sedangkan PIECHURA *et al.* (1987) dalam penelitiannya tentang antigen sitoplasma dari *A. fumigatus* menunjukkan ada 6 pita dengan berat molekul 14 sampai dengan 94 kDa. Dari 19 serum lapang yang menunjukkan titer tinggi dengan uji ELISA, lalu diuji dengan teknik imunoblot, 6 sampel dapat dideteksi adanya antibodi dan pita yang timbul dengan berat molekul pada 16, 18, 33, 38, 44, 47, 52, 70, 77, 84, 97 dan 110 kDa (Gambar 2). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa 6 sampel serum lapangan mengandung antibodi spesifik terhadap sejumlah *epitop* protein antigen dengan berat molekul yang disebutkan di atas.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa ELISA dengan menggunakan antigen *A. fumigatus* dapat mendeteksi adanya antibodi terhadap aspergillosis dari serum lapang, dan lebih sensitif dibandingkan dengan uji AGP.

ELISA yang dikembangkan ini bermanfaat sebagai uji skrining kasus aspergillosis pada ayam. Hasil pengujian serum lapang dengan ELISA, menunjukkan bahwa prevalensi aspergillosis pada ayam petelur lebih tinggi daripada ayam pedaging.

Hasil imunoblot dengan serum ayam kontrol positif hasilnya menunjukkan adanya pita dengan ukuran berat molekul 33, 38, 44, 52, 70, 77, 97 dan 110 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Mr. Edward Lawler, BSc, teknisi di bidang Bakteriologi dari Australia, yang telah membantu dan mendorong penulis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AL-DOORY, Y. 1980. Laboratory Medical Mycology, Lea & Febiger Philadelphia. pp. 133-142.
- ASAKURA, S., S. NAKAGAWA and M. MASUI. 1962. Immunological studies of aspergillosis in birds. *Mycopathol. Myco. Appli.* 18: 249-256.
- BAUMGARTNER, R. 1988. Clinical diagnosis of aspergillosis in psittacine birds with the aid of serology, especially the elisa. *Proc. Association of Avian Veterinarians.* pp. 61-67.
- BURNIE, J.P. 1991. Development in the serological diagnosis of opportunistic fungal Infection. *J. Antimicrobial Chemo.* 28 Suppl. A. pp. 23-33.

- BUXTON, I and C.V. SOMMER. 1979. Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* antibody in migratory ducks. *Avian Dis.* 34: 446-454.
- CHEN, F. S., J.W. CHEN, S. ZHAO, Z.B. GAN, X.C. LOU and Q. ZHOU. 2000. Characterization of chicken antisera raised against *Aspergillus* spp. by enzyme linked immunosorbent assay. *Nahrung* 44: 323-327.
- CROWLE, J. 1973. Immunodiffusion. Academic Press. Inc. N.Y.
- DE MAGALDI, S.W. and D.W.R. MACKENZIE. 1984. Specificity of antigens from pathogenic *Aspergillus* sp. I. Studies with ELISA and immunofluorescence. *Sabouraudia J. Medical Vet. Myco.* 22: 381-394.
- FROUDIST, J. 1988. (Personal Communication) Medical Mycology Lab. State Health Lab., Perth, Australia.
- GERMAN, A.C., G.S. SHANKLAND, J. EDWARDS and E.J. FLACH. 2002. Development of an indirect ELISA for detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. *Vet. Rec.* 150: 513-518.
- HASTIONO, S. 1984. Tinjauan epidemiologik aspergillosis unggas. *Wartazoa* 1: 45-49.
- KEMENY, D.M. and S.J. CHALLOMBE. 1989. Elisa and Other Solid Phase Immunoassay. Theoretical and Practical Aspects. John Wiley & Sons.
- KIM, S.J. and S.D. CHAPARAS. 1979. Characterization of Antigens from *Aspergillus fumigatus*. III. Comparison of antigenic relationships of clinically important aspergilli. *Am. Rev. Respiratory Dis.* 120: 1297-1303.
- KURUP, V.P., E. YITING and J.N. FINK. 1983. Immunochemical characterization of *Aspergillus fumigatus* antigens. *Infection and Immunity* (Aug. 1983). pp. 698-701.
- MARKWELL, M.A.K., S.M. HAAS, L.L. BIEBER and N.E. TOLBERT. 1978. A modification of the lowry procedure to simplify protein determinations in membrane lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- MARTINEZ, Q., A.N. CADENAZZI and T. RODRIGUEZ. 1993. Humoral Immunoresponse of Pigeons to *Aspergillus fumigatus* antigens. *Mycopathologia* 124: 134-137.
- OUCHTERLONY, O. and L.A. NILSSON. 1986. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimental Immunology. WEIR D.M. (Ed.), vol. I, 4th. Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- PATTERSON, R.M. 1989. Establishing Applied Immunology. A Consultancy Report in Indonesian Research Institute for Veterinary Science. Bogor, Indonesia.
- PIECHURA, J.E., R.S. RIETEL and L.J. DAFT. 1987. Electrophoretic and serological analyses of cytoplasmic antigens from *A. fumigatus* during growth of conidia to mature mycelia. *J. Medic. Vet Mycol.* 25: 243-254.
- REDIG, P.T., S.P. GERALD and M.C. TIMOTHY. 1990. Development of an Elisa Assay for the Detection of Aspergillosis in Avian Species. Department of Veterinary Biology. College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul MN 5508.
- RICHARDSON, M.D., L.O. WHITE and R.C. WARREN. 1979. Detection of circulating antigen of *A. fumigatus* in sera of mice and rabbits by enzyme linked immunosorbent assay. *Mycopathologia* 67: 83-88.
- SABETTA, J.R., P. MINITER and V.T. ANDRIOLE. 1985. The diagnosis of Invasive aspergillosis by an enzyme linked immunosorbent assay for circulating antigen. *J. Infect. Dis.* 152: 946-953.
- SELA, M. 1977. The Antigenic of Pathogenic Fungi, Vol. IV. Academic Press, New York, San Fransisco, London. pp. 286-288.
- SUNARTATIE, T. dan A. INDRAWATI. 2000. Mempelajari pembuatan antigen *Aspergillus fumigatus*. *J. Mikol Ked. Indones.* (I)1: 25-28.
- THOMPSON, J.C. 1969. Techniques for the isolation of the common pathogenic fungi. II. Air sampling, dilution plating and the ringworm fungi. *Medium* 2: 110-120.
- TIZARD, I. 1992. Veterinary Immunology. An Introduction. 4rd. ed. W.B. Saunders Company. pp. 214-236.
- THURSTON, J.R., J.L. RICHARD, S.J. CYSEWSKI and R.E. FICHTNER. 1975. Antibody formation in rabbits exposed to aerosols containing spores of *Aspergillus fumigatus*. *Am. J. Vet. Res.* 36: 899-901.