

ANTIBODI POLIKLONAL ANTI EKSKRETORI SEKRETORI (ES) *Schistosoma japonicum* PADA KAMBING (*Capra aegagrus*) BAHAN DETEKSI DINI PENDERITA SCHISTOSOMIASIS

Policlonal Antibody From Goat (*Capra Aegagrus*) Versus *Schistosoma Japonicum* Excretory Secretary As Early Detection Of Patients With Schistosomiasis Material

Samarang,¹Intan Tolistiawaty,¹ Malonda Maksud¹

¹ Balai Litbang P2B2 Donggala

Jl. Masitudju No. 58 Desa Labuan Panimba, Kec. Labuan, Kab. Donggala

Email: samarangp@gmail.com

Abstract. *Schistosomiasis in Indonesia is still a public health problem with a prevalence of over 1%, and to detect for patients using conventional methods. Supporting the detection of patients with polyclonal antibody production research of anti-ES *Schistosoma japonicum* in goats was conducted in June to October of 2012. This study generally aims to produce polyclonal antibodies anti-ES *S. japonicum* as an ingredient in the detection of patients with schistosomiasis by ELISA. The method used to detect the presence of anti-ES polyclonal antibodies of *S. japonicum* in goats is a test order using Gel Precipitation Test (AGPT) and to measure the concentration using the Bradford test. The results of this analysis are the polyclonal antibody anti-ES *S. japonicum* formed at week 12 post-injection, with a concentration of 0.931 mg/ml. The conclusion of this study is the time required in the formation of antibodies in response to antigens that are injected in goats for 12 weeks. The concentration of anti-ES polyclonal antibody generated *S. japonicum* is sufficient as an ingredient in ELISA testing and can recognize an antigen that stimulates the formation of antibodies that can be used in a diagnostic test worm infection caused by *S. japonicum*.*

Keywords : *Polyclonal antibodies, Schistosomiasis, Schistosoma japonicum*

Abstrak. Di Indonesia Schistosomiasis masih merupakan masalah kesehatan masyarakat dengan prevalensi di atas 1%, dan untuk mendeteksi penderita menggunakan metode konvensional. Mendukung kegiatan deteksi penderita dilakukan penelitian produksi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* pada kambing pada bulan Juni - Oktober 2012. Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memproduksi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* sebagai bahan dalam pendeteksian penderita schistosomiasis melalui uji ELISA. Metode yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* pada kambing adalah menggunakan uji *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) dan untuk mengukur konsentrasi menggunakan uji Bradford. Hasil dari penelitian ini yaitu antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* terbentuk pada minggu ke 12 pasca injeksi, dengan konsentrasi 0.931 mg/mL. Kesimpulan dari penelitian ini adalah waktu yang dibutuhkan dalam pembentukan antibodi untuk merespon antigen yang diinjeksi pada kambing yaitu selama 12 minggu. Konsentrasi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* yang dihasilkan adalah cukup sebagai bahan dalam pengujian ELISA dan dapat

mengenal antigen yang merangsang pembentukan antibodi tersebut sehingga dapat digunakan dalam uji diagnostik kecacingan yang disebabkan oleh *S. japonicum*.

Kata kunci : antibodi poliklonal, schistosomiasis, schistosoma japonicum.

Naskah masuk : 22 Juli 2014|Revisi: 1 Agustus 2014|Layak terbit: 18 Agustus 2014

PENDAHULUAN

Schistosomiasis adalah penyakit zoonotik yang disebabkan oleh sejenis parasit cacing dari kelas trematoda famili *Schistosomatidae* yang memiliki habitat pada pembuluh darah di sekitar usus atau kandung kemih dengan penyebaran sangat luas di daerah tropis maupun subtropis.¹ Di Indonesia Schistosomiasis yang disebabkan oleh *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) menginfeksi manusia juga hewan mamalia lainnya dengan perantara keong *Oncomelania hupensis linduensis*. Cacing jenis ini, hanya ditemukan endemik di tiga daerah di Sulawesi Tengah yaitu di Dataran Tinggi Lembah Lindu, Napu, dan Bada.² Dimana schistosomiasis pada manusia dan hewan masih merupakan masalah kesehatan, dengan prevalensi masih diatas 1%, dan untuk mendeteksi penderita masih menggunakan metode konvensional.^{3,4} Dilaporkan ada 13 mamalia yang dapat terinfeksi oleh *S. japonicum* antara lain sapi (*Bos sondaicus*), kerbau (*Bubalus bubalis*), kuda (*Equus caballus*), anjing (*Canis familiaris*), babi (*Sus sp*), musang (*Viverra zibetha*), rusa (*Carvus timorensis*), dan berbagai jenis tikus (*Rattus exulans*, *R. marmosurus*, *R. norvegicus*, *R. palalla*).⁵ Pada tahun 2003 dilaporkan angka prevalensi Schistosomiasis pada hewan yaitu anjing 6,0 %, babi 0,61%, dan tikus

2,85 %³. Pada tahun 2012 dilaporkan prevalensi penyakit schistosomiasis pada manusia sebanyak 0,76 % di Dataran Tinggi Lindu dan 1,44 % di Napu⁶. Manusia yang terinfeksi *S. japonicum* akan memperlihatkan gejala umum seperti disentri, penurunan berat badan, kurang nafsu makan, kurus yang berlebihan, dan lambatnya pertumbuhan badan bila penderita masih tergolong anak-anak. Sedangkan pada penderita yang sudah kronis, akan mengakibatkan pembengkakan hati yang akan berujung pada kematian.⁷

Program pengendalian yang dilakukan hingga saat ini belum dapat menekan angka kejadian penyakit, karena adanya reinfeksi dari berbagai reservoir termasuk hewan liar diantaranya tikus, ternak masyarakat bahkan masyarakat sendiri sebagai pembawa, sehingga schistosomiasis sulit untuk dikendalikan.⁸ Deteksi dini pada masa pre paten untuk penderita schistosomiasis di Sulawesi Tengah hingga kini belum dilakukan, sehingga penderita hanya dapat terdeteksi bila cacing dalam tubuh penderita telah berproduksi (bertelur) melalui pemeriksaan tinja secara konvensional.³ Deteksi dini infeksi cacing sebelum menimbulkan perubahan patofisiologis dalam tubuh inang dapat dilakukan dengan teknik imunologis dan molekuler yang menawarkan alternatif baru dalam diagnosa dini terhadap

berbagai patogen.⁹ Deteksi dengan teknik imunologis yang didasarkan pada penggunaan antibodi dengan target antigen parasit yang dicari merupakan metode sensitive dan spesifik.⁹ Antibodi dapat berupa monoklonal antibodi atau poliklonal antibodi yang diproduksi dengan memanfaatkan protein Ekskretori/Sekretori (ES) yang merupakan hasil metabolisme cacing parasit yang diinfeksi kedalam tubuh hewan coba.¹⁰ Produksi antibodi anti ES *S. japonicum* yang terbentuk diharapkan memiliki kemampuan untuk mendeteksi *circulating antigen* penderita schistosomiasis.

Produksi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* pada kambing (*Capra aegagrus*), dilakukan dengan menginjeksi antigen ES *S. japonicum* secara intra-vena dan sub-cutan dengan bantuan *freud adjuvant complete* dan *incomplete*. Benda asing atau antigen yang masuk ke dalam tubuh inang akan memicu sistem imunitas atau terjadi respon imun dari sel pembentuk imun (*antibody forming cells*), kemudian diikuti dengan pembentukan antibodi.¹¹ Penggunaan ekskretori/sekretori cacing ditujukan untuk merangsang mekanisme imunitas penyakit parasit.¹² Hewan yang diimunisasi pertama kali akan memicu respon imun primer yaitu dengan membentuk immunoglobulin M (IgM) dengan kadar tinggi lalu diikuti dengan IgG yang rendah, dan imunisasi berikutnya (booster) akan terjadi respon imun sekunder dimana IgM kadarnya akan turun digantikan dengan meningkatnya kadar IgG¹³. Produksi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* pada kambing (*Capra aegagrus*)

dilakukan dengan harapan dapat dimanfaatkan untuk kegiatan diagnosis penderita schistosomiasis secara dini. Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memproduksi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* sebagai bahan dalam pendeteksian penderita schistosomiasis melalui uji ELISA. Secara khusus mengidentifikasi waktu yang dibutuhkan terbentuknya antibodi dan mengidentifikasi konsentrasi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum* yang dihasilkan.

METODE

Penelitian dilakukan di Balai Litbang P2B2 Donggala, Kecamatan Labuan, Kabupaten Donggala, selama 4 bulan dari Juni – Oktober 2012. Antibodi poliklonal dihasilkan dengan menginjeksi antigen ES *S. japonicum* pada kambing. Data yang dihasilkan diolah secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan persamaan linear.

Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini yaitu dua ekor kambing jantan, satu ekor sebagai control dan satu ekor sebagai perlakuan keduanya berumur 1 tahun. Kambing perlakuan digunakan untuk memproduksi poliklonal antibodi, yaitu memperoleh immunoglobulin g (IgG) dari serum. Kedua ekor kambing dipelihara dalam kandang yang tidak kontak dengan tanah. Sebulan sebelum perlakuan kambing dirawat dengan pemberian obat cacing, obat scabies serta vitamin B Kompleks agar kambing terbebas dari penyakit cacing dan kulit

selama penelitian. Sebelum perlakuan dilakukan pemeriksaan feses pada kambing untuk memastikan kambing terbebas dari penyakit kecacingan. Pakan yang diberikan pada kambing yaitu berupa rumput hijau yang telah dilayukan terlebih dahulu, tujuannya agar metascaris yang ada pada rumput tersebut dapat dihindari.

Produksi Antibodi Poliklonal

Kambing perlakuan diimunisasi pada bulan Juli 2012, dengan menggunakan antigen ES *S. japonicum* yang telah dimurnikan dengan dosis 150 µg/ekor, sebelum penyuntikan kambing dipelihara dikandang dan diberi obat cacing agar bebas dari penyakit cacing dan selalu dijaga agar tidak terkena infeksi penyakit lain. Penyuntikan pertama dengan menggunakan antigen ES tanpa ditambahkan *adjuvant* dengan rute intra- vena (I.V). Rute penyuntikan kedua yaitu di bawah kulit (S.C) menggunakan antigen ES tambah *adjuvant* komplit perbandingan 1:1. Setelah selang dua minggu dilakukan penyuntikan ketiga dengan pemberian antigen ES ditambahkan *adjuvant* inkomplit masing-masing perbandingan 1:1. Pada minggu ketiga darah diambil melalui vena untuk pemeriksaan secara kualitatif dengan metode *AgarGel Precipitation Test* (AGPT).¹⁴ Pemeriksaan ini bertujuan untuk membuktikan antibodi anti ES *S. japonicum* telah terbentuk dalam tubuh kambing. Selanjutnya bila pada perlakuan pertama antibodi belum terbentuk, maka dilakukan 2 kali penyuntikan booster antigen yang diemulsikan dalam *Frued Adjuvant*

incomplete (1:1) secara SC dengan interval tiga minggu. Pemeriksaan AGPT diulang kembali untuk pemeriksaan antibodi. Antibodi yang telah terbentuk selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan *purification antibodi kit* (Montage®). Konsentrasi antibodi diukur dengan menggunakan metode Bradford.¹⁵

Teknik Agar Gel Precipitation Test (AGPT)¹⁴

Agar Gel Precipitation Test (AGPT) merupakan uji presipitasi antigen yang terlarut. Bahan untuk AGPT terdiri atas *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7.4, aquabides, *agarose* 1%, dan *Na citrate* 0.001%. Campuran tersebut dipanaskan dalam *microwave* atau dengan penangas air sampai agar larut dan mendidih. Sebanyak 4 ml larutan agar dituang di atas gelas objek hingga seluruh permukaan gelas objek tertutup dengan agar dan dibiarkan hingga mengeras. Agar yang telah mengeras, dilubangi menggunakan *puncher* agar. Lubang pada bagian tengah diisi dengan antigen yang telah disonikasi dan enam lubang di sekelilingnya diisi dengan serum antibodi yang akan diuji. Agar disimpan di dalam wadah tertutup yang telah dialasi dengan kertas atau tissue basah untuk menjaga kelembaban dan didiamkan selama 24 hingga 48 jam pada suhu ruang. Setelah 24 hingga 48 jam pengamatan dilakukan untuk mengetahui keberhasilan uji AGPT ini dengan melihat ada-tidaknya garis presipitasi yang terbentuk. Garis presipitasi terbentuk dalam media agar yaitu antara lubang tengah yang berisi

AgES *S. japonicum* dengan 6 lubang yang mengelilingi berisi serum darah yang diuji. Garis presipitasi terlihat seperti garis putih yang merupakan garis agregasi antara antigen dan antibodi yang terkandung dalam serum darah yang diuji. Hal ini menandakan bahwa serum darah yang diuji mengandung antibodi α ES *S. japonicum* dengan kata lain produksi

antibodi yang dilakukan berhasil terbentuk.

HASIL

Berdasarkan pemeriksaan AGPT, kambing yang diimunisasi dengan antigen ES *S. japonicum* menunjukkan adanya pembentukan antibodi terhadap ES *S. japonicum* pada minggu ke – 12 jelasnya dapat dilihat pada tabel berikut.

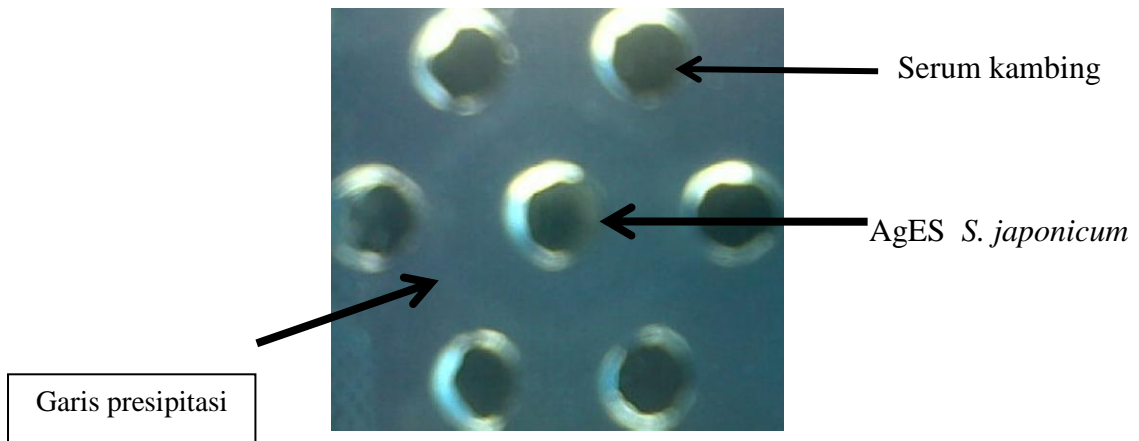
Tabel 1. Pembentukan Antibodi Poliklonal Pada Kambing Berdasarkan Hasil Uji AGPT tahun 2012

Antigen	Pembentukan Antibodi Dalam Minggu														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ES <i>S. japonicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Tabel 1 terlihat bahwa minggu 1-11 dalam pengamatan belum terbentuk antibodi pada kambing. Hal ini dinyatakan setelah dilakukan pengujian AGPT yaitu minggu ke 4 dan ke 8 dan menunjukkan hasil negatif. Minggu 1 setelah dilakukan penyuntikan antigen yang diemulsikan dalam *Frued Adjuvant incomplete* (1:1) secara SC, selang 3 minggu dilakukan pemeriksaan AGPT karena hasil negatif maka dilakukan pengulangan penyuntikan (booster 1) pada minggu ke 4 dan pemeriksaan AGPT dilakukan kembali setelah selang 3 minggu berikutnya yaitu minggu ke 8. Berdasarkan hasil pemeriksaan AGPT minggu ke 8 yang menunjukkan hasil negatif maka dilakukan booster 2 dan selang 3

minggu berikutnya yaitu minggu ke 12 kembali dilakukan pengecekan pembentukan antibodi dengan uji AGPT dan menunjukkan hasil positif.

Konsentrasi antibodi yang dihasilkan setelah dilakukan uji konsentrasi yaitu 0.931 mg/mL, diukur menggunakan metode Bradford setelah dilakukan pemurnian. Pembentukan antibodi pada kambing perlakuan ditandai dengan adanya garis presipitasi pada media agar semi solid dalam uji AGPT. Pengujian kualitas dilakukan dengan uji AGPT antara AgES dengan serum kambing perlakuan. Garis presipitasi yang terbentuk dari uji AGPT ini seperti yang terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Uji AGPT AgES Dengan Serum Kambing

PEMBAHASAN

Antibodi adalah protein pelindung yang dihasilkan oleh limfosit vertebrata dan dapat mengenali serta menetralkan molekul asing yang dihasilkan oleh invasi organisme virus, bakteri, parasit atau sesuatu agen menular lainnya.¹⁰ Antibodi memiliki kemampuan untuk menolak atau mengabaikan bagian intrinsik molekul dari organisme inangnya.¹¹ Antibodi memiliki kemampuan berikatan khusus dengan antigen serta mempercepat penghancuran dan penyingkiran antigen tersebut.¹⁶ Penyuntikan AgES *S. japonicum* yang diberikan pada kambing secara intra-vena pada awal dan secara SC untuk booster. Antibodi poliklonal asal kambing terbentuk setelah minggu ke 12, imunisasi dengan AgES *S. japonicum* (Tabel 1). Pada awal infeksi atau injeksi antigen masuk ke dalam tubuh respon yang terjadi berupa fagositosis antigen oleh sel fagosit polimorfonuklear atau makrofag. Jika pada proses fagositosis tersebut masih ada antigen yang belum terfagosit, maka antigen akan merangsang respon imun spesifik untuk

membentuk antibody sehingga terbentuk respon imun primer. Respon imun primer terdiri dari periode induktif dimana selama waktu tersebut antigen dikenal sebagai benda asing dan diproses dan signal dikirim pada sel-sel yang ditugaskan untuk membuat antibody. Hal ini akan merangsang aktivasi sel T untuk mengidentifikasi antigen dan menimbulkan respon humoral untuk pembentukan antibody antiprotein oleh sel B.¹⁷

Pada pengujian menggunakan teknik AGPT didapatkan garis presipitasi yang belum tampak pada pengujian serum kambing pada minggu pertama hingga minggu kesebelas, disebabkan oleh konsentrasi antibody dalam serum darah kambing belum dapat dideteksi. Respon imun yang terlihat setelah minggu ke 12 terjadi kemungkinan karena pada awal penyuntikan diharapkan akan terjadi peningkatan imunogenitas dengan cara menyusup ke dalam sel limfosit sedangkan booster kedua dan ketiga yang diinjeksikan secara SC agar antigen yang diinjeksikan tidak langsung lepas ke dalam peredaran

darah dan adanya penambahan adjuvant menyebabkan antigen akan dilepas secara perlahan ke dalam peredaran darah. Antigen yang terlepas secara perlahan ke peredaran darah karena antigen terperangkap ke dalam emulsi adjuvant sehingga respon imun terjadi lama.¹⁸ Pembentukan antibodi dapat bervariasi dan tergantung pada imunogenitas, bentuk, stabilitas stimulant, spesies hewan, rute injeksi, serta sensitivitas uji yang digunakan untuk mendeteksi antibodi.¹⁹ Pada penelitian ini didapatkan antibodi terbentuk pada minggu ke 12 pasca-imunisasi, sedangkan pada beberapa hewan penggunaan ekskretori/sekretori *L3 Haemonchus contortus* sebagai antigen dapat meningkatkan respon immunoglobulin G anak domba,²⁰ dan kerbau (*Bubalus bubalis*) respon humoral dan selulernya meningkat signifikan dua minggu setelah imunisasi dengan 400µg ekskretori/sekretori *Fasciola gigantica*. Pada ayam petelur yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori larva *Ascaridia galli* mengalami peningkatan dari minggu ke dua hingga puncaknya pada minggu ke 9 pascaimunisasi.²¹

Konsentrasi antibodi terendah mampu dideteksi menggunakan uji AGPT adalah 30 µg/ml,¹⁰ sedangkan menurut Kuby antibodi minimal dalam serum yang dapat dideteksi oleh uji AGPT sebesar 20 µg/ml.¹¹ Antibodi yang diproduksi secara visual dilakukan melalui uji kualitas metode AGPT (Gambar 1). Presipitasi yang terbentuk mulai hitungan menit hingga jam terlihat sebagai suatu garis opaq dalam suatu media agar semisolid. Garis opaq

yang terbentuk disebut sebagai garis presipitasi.²² AGPT dapat digunakan untuk mendeteksi antigen yang berbeda dengan satu jenis antibodi ataupun antibodi yang berbeda dengan satu jenis antigen yang terdapat pada sampel serum.²³ Garis presipitasi yang terbentuk merupakan bukti bahwa dalam serum darah kambing telah terbentuk antibody. Antibodi poliklonal adalah antibodi yang diproduksi dari hasil hiperimunisasi. Antibodi poliklonal memiliki campuran kompleks antibodi dengan spesifitas, afinitas, dan isotipe yang berbeda. Antibodi poliklonal memiliki reaktivitas multipel yaitu bereaksi dengan sejumlah epitop (antigen determinan) yang berbeda pada antigen, dapat terjadi karena epitop yang sama dimiliki oleh antigen yang berbeda atau epitop yang secara struktur mirip atau memiliki keserupaan dengan epitop pembuat peka (*priming epitop*) yang dikenali oleh antibodi.²⁴ Penelitian yang sama pernah dilakukan oleh Satrija dkk yaitu produksi antibodi pada ayam (IgY) dalam pengembangan kit diagnostik koproantigen untuk mendeteksi infeksi cacing hati pada ternak ruminansia.²⁵ Penelitian lain yaitu antibodi dalam kuning telur pada ayam (IgY) yang dapat dipergunakan sebagai bahan pengujian ELISA yang merupakan antibodi alternatif pada mamalia juga diteliti oleh Michael *et all*.²⁶

Teknik ELISA umum digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam sampel dan relatif sederhana.²⁷ ELISA telah dikembangkan sejak tahun 1970, sebagai quality control dalam berbagai

industri. Pengujian ELISA paling sedikit melibatkan satu antibodi dengan spesifisitas untuk sebuah antigen. ELISA adalah teknik biochemical yang umum digunakan dalam imunologi untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam sampel, melalui adsorpsi permukaan atau penangkapan antibodi spesifik untuk antigen yang sama yang dihubungkan dengan enzim dengan reaksi visual untuk menandakan keberadaan antigen atau antibodi dalam sampel.²¹ Berdasarkan konsentrasi antibodi poliklonal anti *S. japonicum* yang dihasilkan asal kambing yaitu 0.931 adalah cukup sebagai bahan dasar dalam pengujian ELISA karena berdasarkan teori konsentrasi antigen yang dapat terdeteksi dengan baik dalam uji ELISA yaitu 0,5-5 µg/ml, sehingga bila akan digunakan sebagai bahan dalam Uji ELISA diperlukan pengenceran terlebih dahulu.²⁸

KESIMPULAN

Antibodi poliklonal pada kambing terbentuk setelah minggu ke 12 setelah penyuntikan antigen ekskretori/sekretori *Schistosoma japonicum*. Terbentuknya antibodi menunjukkan kambing memiliki kekebalan tubuh dan riwayat infeksi terhadap Schistosomiasis

Konsentrasi poliklonal antibodi yang dihasilkan 0.93 mg/mL merupakan konsentrasi cukup sebagai antibodi capture dalam uji ELISA untuk mendeteksi AgES *Schistosoma japonicum* pada penderita

schistosomiasis, yang dapat bermanfaat untuk diagnosa dini pada penderita schistosomiasis.

SARAN

Perlu dilakukan produksi antibodi pada spesies berbeda untuk dapat membandingkan waktu yang dibutuhkan hingga terbentuknya antibodi anti *Schistosoma japonicum*, serta kualitas yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala, atas izin dan alokasi dana untuk melaksanakan penelitian ini. Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Poso, yang telah memberikan izin melaksanakan penelitian di wilayah kerjanya. Seluruh tim yang terlibat dalam penelitian dan penyusunan artikel ini. Semoga artikel ini dapat bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya dan kemajuan ilmu pengetahuan pada khususnya

DAFTAR PUSTAKA

1. Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostik parasitologi kedokteran*. Penerbit buku kedokteran. EGC. Editor , Dr. Lesmana Padmasutra. Hal. 244-252. 1996.
2. Jastal, Mujiyanto, Garjito, TA., Anastasia, H., Chadijah, S., Nurjana, M.A., Nurwidayati, A., et al. Analisis Spasial Epidemiologi Schistosomiasis dengan

- Menggunakan Penginderaan Jauh dan Sistem Informasi Geografis Di Sulawesi Tengah. 2008
3. Ridwan, Y. Potensi Hewan Reservoir Dalam Penularaan Schistosomiasis Pada Manusia Di Sulawesi Tengah. Makalah Pribadi Falsafah Sains. Program Pasca Sarjana. IPB. 2004
 4. Subdin PP&PL. Situasi Schistosomiasis Di Sulawesi Tengah Tahun 2010. Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah. 2010.
 5. Hadidjaja, P. Schistosomiasis di Sulawesi Tengah Indonesia. Balai Penerbitan FKUI, Jakarta. 1985.
 6. [DINKES] Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah. Laporan Tahunan Schistosomiasis Sulawesi Tengah. 2012.
 7. Soedarto. *Zoonosisi Kedokteran*, Airlangga press, Surabaya, 2003
 8. Sudomo M. Schistosomiasis control in Indonesia. *Majalah Parasitologi Indonesia* 13 (1-2): 1-10. 2000.
 9. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. A highly sensitive diagnostic kit for evaluating therapeutic effect in schistosomiasis cases, *Journal PubMed* 72(11): 686-8,704. 1992.
 10. Tizzard. *An Introduction to Veterinary Immunology 7th Ed.* Elsevier : Philadelphia. 2004.
 11. Kuby. *Immunology 6th Ed.* New York: W.H Freeman Company. 2007
 12. Darmawi, Balqis, U., Tiuria, R., Damayanti, R., Pasaribu, FH., et al. Respons Antibodi Ayam Petelur Yang Diberikan Protein Ekskretori/Sekretori dan Ditantang Dengan Telur Infektif *Ascaridia galli*. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 7, No. 2. 2013.
 13. Bratawidjaja, K.E. *Imunologi Dasar*. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Jakarta. 1988.
 14. Eisen HN. *Immunology*. Di dalam: Davis, Bernard D, editor. *Microbiology 2nd Ed.* Maryland: Harper & Row, Inc. hlm 349-597. 1973.
 15. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for The Quatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem.* 72 : 248-254. 1976.
 16. Guyton AC, and Hall JE. *Fisiologi Kedokteran Edisi ke-11*. Irawati et al, penerjemah; Rachman LY, editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: Textbook of Medical Physiology 11th Edition. 2007.
 17. Austyn, J.N dan Wood, K.J. *Principle of cellular and molecular Immunology*. Oxford : Oxford University Press. 1994.
 18. Handoyo T, Bambang S, Purnama O. Produksi Protein Rekombinan Sucrose Transporter Melalui Overekspresi cDNA-SoSUTI Pada Sel Bakteri E.coli Untuk Pembuatan Antibodi. Universitas Jember. 2012.
 19. Black JG. *Microbiology : Principles and Explorations 6thEd.* Virginia: John Wiley & Sons, Inc. 470-492. 2005.
 20. Nambi, P.A, S.C. Yadav, O.K. Raina, D. Sriveny, dan M. Saini. Vaccination of Buffaloes with

- Fasciola gigantic Recombinant Fatty Acid Binding Protein.
21. Darmawi, U, Balqis, R. Tiuria, M. Hambal, dan Samadi. Kajian Titer Antibodi pada yolk dari Ayam yang Diimunisasi dengan antigen ekskretori/sekretori stadium L₃ Ascaridia galli. Jurnal Agripet. 2008.
 22. Garret RH, Grisham CM. Principle of Biochemistry. Saunders College Publishing. 2001.
 23. Zola H. Monoclonal antibodies. A manual Of Techniques. CRC Press, Boca Raton, California : 214. 1987.
 24. Smith JR. Produksi serum hiperimun. Burgess GW, Editor. Yogyakarta; Gajah mada University Press. 1995.
 25. Satrija F, Murtini S, Retnani EB, Ridwan Y. Pengembangan kit diagnostika koproantigen untuk mendeteksi infeksi cacing hati pada ternak ruminansia. Laporan pelaksanaan Hibah Kompetensi. 2009.
 26. Michael A, Meenatchisundaram S, Parameswari G, Subbraj T, Selvakumaran R, Ramalingam S. Chicken egg yolk (IgY) as an alternative to mamalian antibodies. Indian Journal of Science and Tecnology 3: 468-474. 2010.
 27. Turner P, Lalloo K, Bligh J, Armstrong M, Whitty CJM, Daenhoff MJ, and Chiodini PL. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. Journal Clin Pathol. 57(11): 1193-1196. 2004.
 28. Kemediy D M. *A Practical Guide To ELISA*, Pergamon Press plc : page 21-28, 1991.