

## **Pengujian Anti Protein Produksi Blastosis (Anti-PAG) melalui Metode Dot Blot** *(Evaluatin Of Anti PAG From Blastosis through Dot Blot Method)*

**Tita Damayanti Lestari**  
**Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran**

### **Abstrak**

Penelitian pengujian reaksi antiprotein dan protein produksi blastosis dilakukan dengan tujuan mengetahui apakah terjadi saling mengenali antara anti-PAG dan protein PAG yang terdapat dalam serum sapi bunting. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode Dot Blot. Uji dilakukan terhadap serum sapi bunting umur 15, 20, 25 dan 30 hari, masing-masing dari empat ekor dengan dosis pengenceran anti-PAG adalah 1/100, 1/200 dan 1/400. Hasil reaksi berupa warna ungu dikonversikan kedalam angka menggunakan metode NIH Image Version 1.62. Data dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Tersarang, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan untuk mengetahui pengaruh serum dalam dosis. Uji statistik pada hasil reaksi Dot Blot menunjukkan perbedaan yang signifikan antara serum sapi dara bunting 15,20,25 dan 30 hari dalam dosis pengenceran 1/100, 1/200 dan 1/400. PAG pada serum sapi dara bunting 15 hari mampu dikenali oleh anti-PAG pada pengenceran 1/400. Serum sapi dara bunting umur 30 hari memiliki nilai paling sensitif pada semua dosis pengenceran, disusul kemudian dengan serum sapi umur kebuntingan 25, 20 dan 15 hari.

**Kata Kunci : Anti-PAG, PAG, Dot Blot, serum sapi bunting**

### **Abstract**

Research on reaction test between anti protein and protein produced by blastocyst was conducted to find out the recognition between anti-PAG and PAG derived from pregnant cow serum. Spesificity test was done qualitatively by Dot Blot method. Test were administered on pregnant cow serum of 15, 20, 25 and 30 day of pregnancy, from four head each. Dilution doses of anti PAG were 1/100, 1/200 and 1/400. Datas collected were visualisation with blue purple color derifed from specific reaction between antigen (PAG) and antibody (anti-PAG). Expression of color were conversed to numbers by NIH Image Version 1.62. Average of numbers represent result of Dot Blot reaction. Datas collected were analysed statistically by Nested Completely Random Design, and continued further by Duncan test. Result shows Anti-PAG can recognise antigen PAG in pregnant cow serum. PAG of 15 day cow pregnancy serum is recognized by anti PAG from 1/400 dilution. The most sensitive recognition is showed in 30 day of pregnant cow serum from all anti PAG dilution, followed by 25, 20 and 15 day.

**Keywords : Anti-PAG, PAG, Dot Blot, pregnant cow serum**

### **Pendahuluan**

Metode deteksi kebuntingan pada sapi perah selama ini dilakukan secara klinik yaitu dengan dengan pemeriksaan eksplorasi rektal dan ultrasonografi (USG). Metode eksplorasi rektal, membutuhkan petugas pemeriksa kebuntingan (PKB) yang trampil dan berpengalaman guna mendapatkan diagnosa umur kebuntingan yang tepat dengan tidak melukai baik fetus maupun induknya. Dengan metode ini kebuntingan baru dapat dideteksi pada usia di atas 40 hari (Arthur, *et al*, 1989 dan Ball and Peters, 2004), sehingga hewan tersebut baru diketahui bunting atau tidak bunting sesudah lewat satu siklus berahi. Pemeriksaan dini dengan eksplorasi rektal ini didasarkan pada terjadinya perubahan dan

pembesaran bentuk cornua uteri yang belum menjamin adanya konseptus di dalamnya (Arthur, *et al*, 1989 dan Ball and Peters, 2004). Dengan alat USG, walaupun dapat dilakukan lebih dini yaitu pada 22 hari setelah inseminasi, namun harga alat ini masih cukup mahal bagi peternak-peternak rakyat. Selain itu ada resiko traumatik, yakni apabila *probe* dimasukkan ke dalam rectum dapat menyebabkan *shock* yang berakibat kematian embrio serta dibutuhkan pula operator terlatih yang trampil, yang berpengalaman dalam menginterpretasikan gambar yang muncul pada layar monitor (Jainudeen dan Hafez, 2000). Gambar yang muncul di layar monitor adalah adanya pembesaran lumen uterus yang belum

merupakan jaminan adanya konseptus didalamnya.

Deteksi kebuntingan dini pada sapi secara imunologik juga sudah dilakukan, yaitu berdasarkan pengukuran konsentrasi hormon progesteron, antara lain dengan teknik *Radio Immuno Assay* (RIA) dan *Enzym Linked Immuno Absorbend Assay* (ELISA). Namun metode ini tergolong tidak ekonomis, mengingat harga satu kit masih mahal dan ada masalah *waste* radioaktif, sehingga teknik ini tidak digunakan secara luas dan komersial. Pemeriksaan kadar progesteron dapat dilakukan pada hari ke 24 tetapi sering terjadi *false positive*, hal ini disebabkan hormon progesteron diproduksi oleh induk yang bisa saja tinggi kadarnya pada induk yang tidak bunting apabila mengalami *corpus luteum persistent* (CLP). Sementara kadar hormon estron sulfat dapat dideteksi pada hari ke 72 (Ball and Peters, 2004) sedangkan kadar eCG dapat dideteksi pada hari ke 40 umur kebuntingan pada kuda, artinya, kedua teknik ini tidak lebih unggul dibandingkan teknik eksplorasi rektal.

Dari berbagai metode deteksi kebuntingan secara klinis dan imunologis, sebagaimana yang dilaporkan Jainudeen and Hafez (2000), maka metode deteksi secara imunologis yang melibatkan kehadiran protein-protein spesifik yang diproduksi blastosis pada awal terjadinya implantasi dapat digunakan sebagai dasar mendeteksi kebuntingan dini. Dengan terdeteksinya protein spesifik dalam serum darah sapi betina setelah terjadi perkawinan maka kehadiran protein tersebut dapat dipakai sebagai indikator bahwa sapi betina tersebut bunting pada taraf implantasi embrio (Hafez and Hafez, 2000; Balls and Peters, 2004 dan Bearden, *et al*, 2004).

Beberapa protein yang dihasilkan oleh blastosis menjelang implantasi pada sapi antara lain adalah *bovine pregnancy specific protein B* (bPSPB), *bovine Trophoblastic Protein-1* (bTP-1), *pregnancy specific protein 60* (PSP60), *Early Pregnancy Factor* (EPF) dan *Pregnancy-Associated Glycoprotein* (PAG). Teknik RIA dapat mendeteksi kehadiran bPSPB pada hari ke 24 setelah inseminasi, sedangkan PSP60 dapat terdeteksi pada hari ke 28. Sementara EPF adalah produk ovum maternal sebagai respon saat penetrasi sperma (Morton, *et al*, 1992), dan bukan merupakan produk blastosis, sehingga belum dapat dijadikan acuan berlangsungnya suatu kebuntingan.

*Pregnancy-Associated Glycoprotein* (PAG), sebagai protein produksi blastosis sebagaimana disebut di atas, adalah substansi yang berupa molekul glikoprotein. PAG diproduksi oleh sel-sel trophoblast blastosis pada awal terjadinya implantasi setelah konsepsi (Xie, *et al*, 1994). Apabila PAG terdeteksi dalam sistem darah maternal, maka hal ini dapat dijadikan sebagai indikator berlangsungnya kebuntingan. Dengan teknik RIA, kehadiran PAG mulai terdeteksi pada hari ke 22 setelah inseminasi (Zoli, *et al*, 1991 dan Karen, *et al*, 2002), sedangkan protein blastosis yang lain baru dapat terdeteksi lebih dari hari ke 22.

Secara *in vitro*, apabila serum darah sapi bunting yang mengandung protein blastosis yang dikenali oleh anti-protein tersebut pada konsentrasi yang sangat kecil, maka artinya sapi betina tersebut bunting. Hal ini karena adanya reaksi antigen - antibodi yang sangat spesifik, sehingga apabila terjadi reaksi antara PAG dari serum sapi yang diduga bunting dengan anti-PAG maka artinya sapi betina tersebut positif bunting.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji adanya reaksi antara anti-PAG sebagai anti dari protein produksi blastosis PAG dengan antigen PAG sendiri. Pengujian dilakukan menggunakan metode Dot Blot. Apabila terjadi reaksi yang akan dimanifestasikan dengan warna biru keunguan artinya anti-PAG dapat mengenali PAG. Lebih jauh anti PAG dapat digunakan sebagai penciri pada terjadinya kebuntingan pada sapi secara dini.

## Metode

Penelitian ini adalah uji reaksi antara anti protein produksi blastosis yaitu PAG (anti-PAG) dengan antigen standar (bovine PAG MDBiomed Cat. 101-7963-13-3) dan serum sapi dara bunting umur 15, 20, 25 dan 30 hari kebuntingan yang sudah dikonfirmasi terlebih dulu kebuntingannya. Metode pengujian yang dilakukan adalah metode Dot Blot. Metode ini menggunakan alat Dot blotter (BioRad) untuk mendeteksi reaksi antara anti-PAG dengan PAG standar yang ditetaskan pada membran nitroselulose selanjutnya ditambahkan Anti Rabbit IgG Alkaline Phosphatase (AP) *Conjugated* serta substrat Western blue. Hasilnya divisualisasikan dengan adanya noda biru keunguan. Protein yang akan diuji langsung ditotolkan pada membran. Analisis keberadaan PAG secara semi kuantitatif, dinilai melalui pengukuran intensitas warna dengan program NIH Image Version 1.62. Sampel yang diukur adalah serum sapi dara

bunting mulai umur kebuntingan 15, 20, 25 dan 30 hari setelah inseminasi buatan (IB), masing-masing dari empat ekor sapi..

Uji dot blot diawali dengan merangkai membran pada alat Dot Blotter (BioRad) selanjutnya membran ditetesi dengan sampel dengan konsentrasi @ 50 µl. .setelah inkubasi 30 menit, dilakukan bloking dengan PBS Skim 1% selama 1 jam dan dicuci dengan PBS Tween selama 3x3 menit. Setelah itu direaksikan selama 2 jam dengan antibodi primer dengan pengenceran (1/100; 1/200 dan 1/400), sambil digoyang. Kemudian membran dicuci dengan PBS Tween 3x3 menit dan diinkubasi dengan antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG Alkaline Phospatase* dengan pengenceran 1:2500 selama 1 jam. Membran dicuci dengan PBS Tween-20 0,05% selama 3x3 menit lalu diinkubasi dengan substrat Western Blue Substrat Solution selama 30 menit. Dilakukan stop reaksi dengan aquades, lalu membran dikeringkan dan dilihat ada tidaknya noda berwarna .

Metode penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan percobaan yang digunakan yaitu Pola Tersarang dengan dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dicobakan adalah dosis atau konsentrasi anti-PAG sebanyak tiga dosis yaitu D1 : 1/100 ; D2 : 1/200 dan D3 : 1/400. Hari pengamatan adalah umur kebuntingan sapi dara yaitu 15, 20, 25 dan 30 hari setelah IB yang telah dikonfirmasi kebuntingannya. Sampel adalah serum sapi dara bunting dengan umur kebuntingan yang disebutkan di atas, masing-masing dari empat ekor sapi. Setiap ekor sapi diambil serum sebanyak enam sampel dan berfungsi sebagai ulangan.

### Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa anti-PAG mampu mengenali PAG dari serum sapi dara berbagai umur kebuntingan dini melalui metode Dot Blot. Apabila anti-PAG dapat mengenali antigen PAG yang berasal dari serum sapi bunting dini, maka anti-PAG tersebut dapat dijadikan indikator atau deteksi kebuntingan pada sapi mulai umur kebuntingan yang dini. Data yang dihasilkan berupa visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen (PAG) dengan antibodi (Anti-PAG) yang terlihat sebagai noda biru keunguan.

Ekspresi warna keunguan hasil uji Dot Blot kemudian di konversi ke dalam angka melalui program NIH Image version 1.62. Hasil analisis

serum dalam dosis secara simultan menunjukkan perbedaan yang signifikan. Untuk mengetahui lebih lanjut secara parsial, maka dilakukan uji ganda menurut metode Duncan. Hasil uji Duncan pengaruh serum pada dosis D 1 adalah sebagaimana tertera pada Tabel 1.

Tabel 3. Hasil Uji Duncan pada D1

Perlakuan	Rataan	Signifikansi
S1	33,28	a
S2	44,68	b
S3	87,77	c
S4	152,48	d

Ket.: Huruf yang tidak sama ke arah kolom menunjukkan perbedaan yang nyata

Hasil uji ganda dengan metode Duncan menunjukkan antara S1 (serum dari 15 hari) dibandingkan dengan S2 (20 hari), S3 (25 hari) dan S4 (30 hari) berbeda nyata satu sama lain pada dosis D1(dosis pengenceran 1/100). Hasil uji Duncan pengaruh serum pada dosis D 2 adalah pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Duncan pada D2

Perlakuan	Rataan	Signifikansi
S1	25,32	a
S2	37,98	b
S3	58,66	c
S4	120,29	d

Ket.: Huruf yang tidak sama ke arah kolom menunjukkan perbedaan yang nyata

Hasil uji ganda dengan metode Duncan menunjukkan antara S1 dibandingkan dengan S2, S3 dan S4 berbeda nyata satu sama lain pada dosis D2 (dosis pengenceran 1/200). Hasil uji Duncan pengaruh serum pada dosis D 3 adalah sebagai berikut pada Tabel 3

Tabel 3. Hasil Uji Duncan pada D3

Perlakuan	Rataan	Signifikansi
S1	21,38	a
S2	31,09	b
S3	50,19	c
S4	116,77	d

Ket.: Huruf yang tidak sama ke arah kolom menunjukkan perbedaan yang nyata

Hasil uji ganda dengan metode Duncan menunjukkan antara S1 dibandingkan dengan S2, S3 dan S4 berbeda nyata satu sama lain pada dosis D3 (dosis pengenceran 1/400).

Untuk membuktikan bahwa anti-PAG hasil isolasi dari penelitian terdahulu yang diproduksi pada hewan coba kelinci dapat mengenali PAG

dalam serum sapi bunting maka dilakukan pengujian spesifisitas secara kualitatif dengan metode Dot Blot. Pengujian spesifisitas anti-PAG dengan PAG standar melalui metode dot blot menunjukkan homologi nukleotida dan asam amino yang tinggi karena terjadi ikatan kovalen diantara keduanya (Tizard, 2004).

Metode dot blot juga dilakukan untuk pengujian secara kualitatif antara anti-PAG hasil isolasi hewan coba kelinci dengan PAG yang terkandung dalam serum sapi dara bunting umur 15, 20, 25 dan 30 hari. Hasil reaksi uji Dot Blot terhadap serum sapi dara bunting menggunakan anti-PAG hasil isolasi dari kelinci, ternyata menghasilkan warna, hal ini membuktikan bahwa terjadi reaksi pada semua sample. Artinya, sample serum sapi dara mulai umur kebuntingan 15 hari mengandung antigen PAG yang berhasil dikenali oleh anti-PAG. Warna ungu yang timbul sebagai hasil reaksi uji dot blot selanjutnya dikonversikan ke dalam angka menggunakan metode NIH Image Version sehingga muncul nilai yang dapat di analisis.

Dikenalnya PAG pada kebuntingan umur 15 hari dapat dijelaskan karena setelah fertilisasi, menjelang hari ke tujuh, zona pellucida di sekeliling blastosis mulai tanggal, sehingga sel-sel trophoblas berkontak langsung dengan epitel uterus. Sel-sel trophoblas berkembang dengan pesat dan membentuk pelipatan dinding trophoblas (Arthur, *et al*, 1989). Implantasi terjadi bila embryo telah bertaut pada endometrium. Proses embryo mamalia menempel pada uterus melibatkan proliferasi, diferensiasi dan migrasi dari sel embryo maupun uterus (Gordon, 2004). Masih menurut Gordon, 2004, menjelang penempelan pada endometrium, embryo ruminan dan babi melayang-layang bebas selama beberapa hari dalam lumen uterus bersamaan dengan trophoblasterm yang tumbuh membesar. Pada babi pertautan berlangsung pada hari ke 12 sampai 24 sesudah fertilisasi, sedang pada sapi pada hari ke 11 sampai 40 (Gordon, 2004). Sementara menurut Arthur, *et al*, 1989, penempelan embryo sapi pada uterus terjadi pada hari ke 12.

Pada uterus ruminansia dimana allanto-chorion melakukan kontak dengan karunkula uterus, vili-vili yang mengandung kapiler, tumbuh keluar dari allanto-chorion menjulur memasuki kripta-kripta karunkula induk yang juga dikelilingi oleh plexus kapiler. Hal ini membentuk karakteristik kotiledon ruminansia atau placentom, tempat terjadi pertukaran nutrisi dan gas antara induk dan fetus (Arthur, *et al*, 1989).

Pertautan pada endometrium ini dilaporkan secepat-cepatnya pada hari ke 10, walaupun sampai hari ke 17 ternyata masih bisa didapat dengan cara membilas uterus. Trophoblas berkembang terus sehingga memenuhi seluruh ruang uterus. Sel-sel trophoblas masuk ke dalam celah vili yang terdapat pada karunkula, dan terjadilah pertautan yang erat karena terjadi pelepasan sel vili. Seluruh lumen uterus terisi pertautan trophoblas dengan karunkula dan proses plasentasipun telah dimulai (Senger, 2003).

Pada penelitian terkini, dengan menggunakan analisis cDNA microarray, Ushizawa, *et al*, 2004 dapat menunjukkan bahwa beberapa molekul PAG diekspresi tujuh hari sampai 14 hari setelah konsepsi dan bahkan sebelum tujuh hari (Ushizawa, *et al*, 2004). Namun demikian karena sebagian besar protein ini belum dapat dipurifikasi, maka tidak dapat dilakukan pengukuran konsentrasinya menggunakan teknik RIA dan ELISA.

Dari referensi di atas dapat dikatakan bahwa pada hari ke 15 umur kebuntingan telah terjadi kontak antara embryo dan uterus induk, sehingga PAG yang dihasilkan oleh sel-sel binukleat trophoblas sudah dapat terdeteksi pada sirkulasi darah maternal. Walaupun konsentrasinya mungkin sangat kecil, namun PAG sudah terekspresi kehadirannya. Kehadiran PAG inilah yang dikenali oleh Anti-PAG sehingga menimbulkan warna ungu pada hasil reaksi. Warna yang dihasilkan dari reaksi pada umur kebuntingan 15 hari berbeda dengan warna yang dihasilkan pada umur kebuntingan yang lebih lama.

Pada umur kebuntingan 20 hari, embryo sudah menetap di lumen cornua uteri, implantasi sudah dimulai. Sedang pada umur kebuntingan 25 hari embryo sudah stabil pada satu lokasi dalam salah satu cornua uteri (Bearden, *et al*, 2004) maka interaksi antara embryo dan endometrium induk menjadi lebih intens. Pada sapi, embryo tidak seperti pada domba yang sering mengalami perpindahan dari satu cornua ke cornua uteri yang lain (Bearden, *et al*, 2004). Pada umur kebuntingan 30 hari proses plasentasi mendekati lengkap. Sel-sel binukleat dalam plasenta ruminansia merupakan diferensiasi dari sel-sel trophoblas mononukleat fetus dan diketahui mensekresi glikoprotein. Selagi penempelan terjadi, sel-sel binukleat trophoblas bermigrasi dari trophoblas untuk fusi dengan sel-sel epitel endometrial maternal. Pada tahap ini granula-granula yang terkandung dalam sel-sel binukleat

disekresikan langsung ke dalam jaringan maternal, dan diantara produk sekresi ini, terbanyak adalah pregnancy-associated glycoprotein atau PAG (Gordon, 2004).

Pada umur kebuntingan 20, 25 dan 30 hari sesuai pendapat Zoli, *et al*, 1992 dimana konsentrasi PAG mulai dapat dideteksi dalam sirkulasi darah maternal pada hari ke 22 yaitu 0,38ng/ml, dan meningkat secara gradual sesuai dengan bertambahnya umur kebuntingan, maka hal inilah yang menyebabkan warna yang timbul pada reaksi uji dot blot lebih jelas dibandingkan dengan pada 15 hari.

Hasil reaksi uji dot blot menunjukkan bahwa pada pengenceran 1/400 masih mampu mengenali antigen PAG dalam serum sapi bunting bahkan pada umur kebuntingan 15 hari, artinya reaksi berjalan sangat spesifik. Dengan demikian maka hasil reaksi dari serum sapi umur kebuntingan 20, 25 dan 30 hari akan lebih jelas pada semua pengenceran. Hal ini dimanifestasikan oleh nilai yang tertera pada hasil konversi dengan metode NIH Image Version 1.62.

Dikenalnya antigen PAG dalam serum sapi bunting umur 15 hari pada pengenceran terkecil 1/400 selain karena reaksi berjalan sangat spesifik, juga disebabkan oleh terjadinya kontak antara uterus ruminansia melalui allanto-chorion dan karunkula uterus serta vili-vili yang mengandung kapiler, tumbuh keluar menjulur memasuki kripta-kripta karunkula induk kemudian membentuk karakteristik kotiledon ruminansia atau placentom (Athur, *et al*, 1989). Pertautan pada endometrium ini dilaporkan secepat-cepatnya pada hari ke 10. Trophoblas berkembang terus sehingga memenuhi seluruh ruang uterus. Sel-sel trophoblas blastosis masuk ke dalam celah vili yang terdapat pada karunkula, dan terjadilah pertautan yang erat karena terjadi peleburan sel vili. Seluruh lumen uterus terisi pertautan trophoblas dengan karunkula dan proses plasentasipun telah dimulai (Senger, 2003 ; Bearden, *et al*, 2004 dan Gordon, 2004).

### Kesimpulan

Anti-PAG mampu mengenali antigen PAG yang merupakan protein produksi blastosis. Anti-PAG dalam pengenceran 1/400 masih mampu mengenali PAG dalam serum sapi dara bunting

umur 15 hari. Kemampuan Anti-PAG mengenali PAG dalam serum sapi dara bunting umur 30 hari dengan pengenceran 100 kali adalah paling baik.

### Daftar Pustaka

- Abbas, K.A.; A.H. Liccthman and J.S. Pober. 2000. *Antibodies and Antigen. Cellular and Molecular Immunology*. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia. WB Saunders Co.p. 41-62.
- Abbas, K.A.and A.H. Liccthman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition. Elsevier Saunders. The Curtis Center. Philadelphia.
- Arthur, G. F.; D.E. Noakes and H. Pearson. 1989. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Sixth Edition. ELBS. Bailliere Tindall. London. p : 60 – 86.
- Aulanni'Am. 2003. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Edisi 1. FPUB Press bekerja sama dengan Usaha Nasional Surabaya.
- Aulanni'Am. 2004. *Dasar-dasar Biomolekul*. Edisi 1. FPUB Press bekerja sama dengan Usaha Nasional Surabaya.
- Aulanni'Am. 2005. *Protein & Analisisnya*. Penerbit Citra Mentari Grup. Malang.
- Ball, P.J.H. and A.R. Peters. 2004. *Reproduction in Cattle*. Third Edition. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. UK.
- Bearden, H. J. and J.W. Fuquay. 2000. *Applied Animal Reproduction*, Fifth Edition Prentice Hall-Upper Saddle River. New Jersey.
- Bearden, H.J. ; J.W. Fuquay and S.T. Willard. 2004. *Applied Animal Reproduction*, Sixth Edition. Prentice Hall-Upper Saddle River. New Jersey.
- Gordon, I. 2004. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI Publishing. Cambridge. USA
- Hafez, E.S.E and B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>ed</sup>. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Jainudeen, M.R. and E.S.E. Hafez. 2000. *Pregnancy Diagnosis*, dalam Hafez, E.S.E and B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>ed</sup>. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Kresno, S.B. 2004. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur laboratorium*. Edisi Keempat. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi*. Edisi 1. Airlangga University Press.Surabaya