

Purifikasi dan Karakterisasi Immunoglobulin *Yolk* (IgY) terhadap *Jembrana* dari Telur Ayam sebagai Dasar Pengembangan Imunisasi Pasif

Purification and Characterization of Immunoglobulin yolk (IgY) Against Jembrana from Chicken Eggs as a Basis for Development of Passive Immunization

Firdaus Lingga Kusuma¹, Michael Hariyadi Wibowo², Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni^{2*}

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia
Corresponding author, Email: wahyuni_aeth@ugm.ac.id

Naskah diterima: 14 Juni 2021, direvisi: 27 Januari 2023, disetujui: 30 Juli 2024

Abstract

Jembrana disease is an infectious viral disease of Bali cattle (*Bos javanicus*) with high transmission and mortality. This disease is caused by *Jembrana Disease Virus* (JDV) from the retroviridae family. The Control of Jembrana disease in Indonesia currently through vaccination with a tissue-derived inactivated-virus vaccine, that its production is very limited. Passive immunization using antibodies is proven to be able to protect against various infections. Chicken is an excellent producer of immunoglobulin Y antibodies. This study aims to purify and characterize IgY against Jembrana for the development of passive immunization. Fifteen white leghorn chickens aged 24 weeks were divided into 3 groups. Group 1 was injected with 1 ml of the Jembrana vaccine, group 2 was injected with 1 ml of Jembrana virus *seed*, and group 3 was a control. The antigen of Jembrana was injected twice with an interval of two weeks. Eggs began to be collected after one week of the first antigen injection until three weeks of the second antigen injection. Antibody against Jembrana was detected by Agarose Gel Precipitation Test (AGPT). The egg yolk IgY against Jembrana was purified by NaCl precipitation, and the character of purified IgY was determined with SDS-PAGE. Immunoglobulin Y against Jembrana was detected in chicken serum after one week of vaccine injection, then one week after this IgY starts to be able detected in egg yolk. Immunoglobulin Y in egg yolk can be purified by the NaCl precipitation method. IgY protein characterization of Jembrana with SDS-PAGE showed protein bands with a molecular weight of 67 kDa for the heavy chain and 24 kDa for the light chain IgY

Keywords: Jembrana; Immunoglobulin Yolk; Purification; Characterization

Abstrak

Penyakit Jembrana adalah penyakit yang menyerang Sapi Bali (*Bos javanicus*) dengan angka enularan dan kematian yang tinggi. Penyakit ini disebabkan oleh *Jembrana Disease Virus* (JDV) dari famili *retroviridae*. Pengendalian penyakit Jembrana di Indonesia menggunakan vaksin inaktif yang dibuat dari jaringan limfa sapi donor, sehingga menyebabkan ketersediaan vaksin dilapangan sangat terbatas. Imunisasi pasif menggunakan antibodi terbukti mampu memberikan perlindungan terhadap berbagai infeksi penyakit. Ayam merupakan penghasil antibodi immunoglobulin Y (IgY) yang sangat baik. Tujuan penelitian ini adalah melakukan preparasi, purifikasi dan karakterisasi IgY terhadap virus Jembrana sebagai dasar pengembangan imunisasi pasif. Sebanyak 15 ekor ayam *white leghorn* umur 24 minggu dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 disuntik dengan 1 ml vaksin Jembrana, kelompok 2 disuntik dengan 1ml *seed* virus Jembrana, dan kelompok ke 3 adalah kelompok yang tidak disuntik (kontrol negatif). Penyuntikan antigen Jembrana dilakukan dua kali pada minggu pertama dan ketiga. Telur mulai dikoleksi setelah satu minggu penyuntikan antigen pertama sampai tiga minggu penyuntikan antigen kedua. Uji antibodi Jembrana dilakukan dengan *Agarose Gel Precipitaion Test* (AGPT) baik pada serum maupun telur ayam. Purifikasi IgY Jembrana dilakukan dengan pengendapan natrium

klorida (NaCl), dan untuk melihat karakter IgY Jembrana digunakan *sodium dodecyl sulfat-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil uji antibodi terhadap Jembrana IgY pada serum terdeteksi setelah satu minggu penyuntikan vaksin dan pada telur dua minggu setelah penyuntikan vaksin. Immunoglobulin Y pada telur dapat dimurnikan dengan pengendapan NaCl. Pita protein SDS-PAGE IgY Jembrana menunjukkan berat molekul 67 Kda yang merupakan rantai berat heavy-chain (HC), dan 24 kDa yang merupakan rantai right-chain (LC). Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa telur ayam dapat digunakan sebagai penghasil IgY terhadap Jembrana dengan penyuntikan vaksin Jembrana pada induk ayam. Immunoglobulin Y terhadap Jembrana terdeteksi pada kuning telur setelah dua minggu penyuntikan vaksin dan dapat dimurnikan. Karakterisasi IgY terhadap Jembrana menunjukkan berat molekul rantai berat (HC) sekitar 67 kDa, dan berat molekul rantai ringan (LC) sekitar 24 kDa.

Kata kunci: Jembrana; Immunoglobulin *yolk*; karakterisasi; preparasi; purifikasi

Pendahuluan

Virus Jembrana termasuk dalam famili *retroviridae* (Wilcox *et al.*, 1992) dari genus *lentivirus* (Kertayadnya *et al.*, 1993) yang menyebabkan penyakit Jembrana pada sapi Bali. Penyakit Jembrana pertama kali muncul pada tahun 1964 di desa Sangkaragung, daerah Jembrana, Pulau Bali (Soeharsono *et al.*, 1990; Wilcox *et al.*, 1995). *Jembrana Disease Virus* (JDV) merupakan virus beramplop, dengan RNA untai tunggal, memiliki kisaran diameter 96 sampai 124 nm (Kertayadnya *et al.*, 1993; Wilcox *et al.*, 1995). Virus ini memiliki protein utama dengan berat molekul 100Kd, 45Kd, 42Kd, 33Kd, 26Kd, 16Kd, dan 14Kd. Protein 26Kd JDV bereaksi silang dengan protein 26Kd dari *bovine immunodeficiency virus* (BIV) pada uji *Western blot* mengindikasikan bahwa penyebab JDV memiliki hubungan antigenik dengan BIV (Kertayadnya *et al.*, 1993).

Pengendalian penyakit Jembrana saat ini dilakukan dengan cara vaksinasi hewan rentan terhadap penyakit Jembrana di sekitar wilayah *outbreak* (Desport dan Lewis 2010). Vaksin Jembrana merupakan vaksin yang dibuat dari jaringan limfa sapi terinfeksi JDV, kemudian diinaktivasi dengan Triton X-100 dan ditambah dengan *mineral oil adjuvant* (Hartaningsih *et al.*, 2001). Adjuvan pada vaksin ini diharapkan mampu meningkatkan respon imun terutama pada populasi yang memiliki respon imun yang kurang baik, sehingga mampu meningkatkan antibodi yang terbentuk (Coffman *et al.*, 2010). Vaksin ini dapat mengurangi keparahan dan durasi penyakit Jembrana, meskipun tidak secara menyeluruh mencegah perkembangan penyakit pada hewan yang ditantang dengan infeksi virus

(Hartaningsih *et al.*, 2001). Vaksin Jembrana mampu menurunkan hingga 96% *viral load* jika dibandingkan dengan hewan kontrol yang tidak divaksin, dan juga mengurangi kemungkinan penularan virus (Ditcham *et al.*, 2009).

Immunoglobulin *yolk* (IgY) telah digunakan dalam penelitian, baik untuk terapi dan diagnostik (Pereira *et al.*, 2019). Ayam dapat digunakan untuk memproduksi antibodi IgY selama masa produksi telurnya (Warr *et al.*, 1995; Carlander 2002). Ayam mampu menghasilkan antibodi dengan aviditas yang tinggi segera setelah dilakukan satu kali vaksinasi (Warr *et al.*, 1995). Titer IgY naik secara bertingkat setelah satu minggu vaksinasi (Wibawan *et al.*, 2018). Antibody IgY dari telur perlu dimurnikan karena adanya lemak pada kuning telur yang menghalangi aktivitas antibodi (Larsson *et al.*, 1993). Potensi penggunaan IgY untuk pencegahan dan pengobatan terhadap bakteri dan virus telah banyak diteliti. Beberapa penggunaan IgY sebagai imunitasi pasif yaitu: IgY terhadap *Bovine rotavirus* (BRV) mampu memberikan perlindungan pasif pada pedet yang terinfeksi BRV (Kuroki *et al.*, 1994), IgY terhadap *enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) mampu mengendalikan diare yang diinduksi ETEC pada anak babi (Marquardt *et al.*, 1999), IgY terhadap ETEC melindungi pedet dari *Enteric colibacillosis* (Ikemori *et al.*, 1992). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempersiapkan, melakukan pemurnian/purifikasi dan mengetahui karakter dari IgY terhadap virus Jembrana sebagai langkah awal untuk memberikan alternatif pengendalian penyakit Jembrana melalui imunitasi pasif.

Materi dan Metode

Vaksin Jembrana yang digunakan merupakan vaksin dari jaringan limpa sapi yang terinfeksi Jembrana pada hari kedua fase demam akut dengan estimasi titer virus pada plasma sekitar 10^8 ID₅₀ per ml yang diinaktivasi dengan Triton X-100 (Hartaningsih *et al.*, 2001). *Seed* Jembrana adalah suspensi 10% stok limpa sapi terinfeksi yang dikorbankan pada hari ke dua fase demam akut dengan estimasi titer virus yang menginfeksi pada plasma sekitar 10^8 ID₅₀ per ml (Soeharsono *et al.*, 1990).

Produksi IgY terhadap virus jembrana dilakukan dengan melakukan penyuntikan 1 ml vaksin Jembrana dan 1 ml *seed* virus jembrana pada masing-masing 5 ekor ayam *white leg horn* yang berumur 24 minggu pada otot dada. Vaksin jembrana merupakan vaksin inaktif menggunakan ajuvant berupa *mineral oil*. *Seed* virus Jembrana berasal dari gerusan limpa sapi yang diencerkan dengan media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) dengan konsentrasi 20%, dan disentrifus pada 3500 rpm selama 15 menit, kemudian diambil supernatan dan dilakukan filtrasi 0,2 µm. Ayam *white leg horn* disuntik pada hari pertama dan diulang 2 minggu berikutnya. Lima ekor ayam *white leg horn* digunakan sebagai kontrol negatif yang tidak diberi suntikan antigen Jembrana. Telur dari masing masing kelompok dikoleksi setiap hari mulai satu minggu setelah penyuntikan pertama sampai minggu ke empat.

Ekstraksi IgY dilakukan dengan metode pengendapan NaCl (Hodek *et al.*, 2013). Pengendapan menggunakan NaCl dilakukan dengan memisahkan kuning telur dari putih telur. Kuning telur yang telah dipisahkan diencerkan dengan *aquadest* sampai dengan perbandingan 1 : 7, kemudian pH disesuaikan menjadi 5,0 dengan penambahan 0,5 M HCLl. Kuning telur yang telah diencerkan dibekukan pada suhu minus 20 °C selama 24 jam. Kuning telur beku kemudian dicairkan dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan sampel atau *water soluble fraction* (WSF) ditambahkan NaCl sebanyak 8,8%, dan tingkat keasaman disesuaikan menjadi pH 4 sambil diaduk menggunakan *mag-netic stirrer* selama 2 jam pada suhu ruangan. Larutan tersebut kemudian di sentrifus pada kecepatan

3700 g selama 20 menit. *Pellet* yang didapat diambil dan tambahkan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 3 ml.

Keberadaan antibodi terhadap protein JDV diuji dengan AGPT menggunakan antigen rekombinan virus yang diekspresikan dalam strain *E. coli* JM109 (Desport *et al.*, 2005). Pembuatan agar gel dibuat dengan melarutkan 0,5 g *agarose* dan 1,2 g *Poly Ethylene Glycol* (PEG) 6.000, dalam 20 ml *Phospat* PBS pH 7,2 dan 20 ml *aquadest*. Larutan ini dipanaskan dalam penangas air sampai larut dan warna larutan menjadi bening. Kemudian larutan dipipet sebanyak 4 ml, di cetak pada gelas objek dan ditunggu sampai mengeras, kemudian dibuat sumur-sumur dengan *gel puncher*. Pada sumuran bagian ditengah dimasukkan 25 µl antigen dan 25 µl antibodi dari serum atau IgY pada sumur sekelilingnya. Gelas obyek diletakkan diatas kertas saring basah agar terjaga kelembabannya. Reaksi dibaca setelah 18 sampai 48 jam.

Berat molekul protein IgY dianalisis dengan metode *Sodium Deodecil Sulphate-Poly Acrilamide Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE) (Righetti, 2016). SDS-PAGE ini menggunakan gel pemisah dengan konsentrasi 12 % *poliakrilamide*, gel pengumpul 4% *poliakrilamide*. Perangkat elektroforesis dijalankan dengan arus 100 mA dengan voltase 200 V selama 90 menit. Elektroforesis berakhir apabila pewarna sampel mencapai batas bawah gel. Setelah elektroforesis berakhir, gel diangkat dari lempeng kaca dan direndam di dalam pewarnaan *Commase Brilliant Blue* 0.25% yang dilarutkan dalam 55 ml methanol dan 7.5% asam cuka dalam 1 liter aquades selama 3 jam suhu ruang. Pewarna yang tidak terikat pada protein dihilangkan dengan merendam gel pada larutan metanol dan asam asetat sehingga gel berwarna bening atau pita-pita protein yang telah terbentuk terlihat jelas.

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji AGPT serum ayam menunjukkan adanya garis presipitasi pada kelompok ayam yang disuntik dengan vaksin Jembrana. Kelompok ayam yang disuntik dengan *seed* Jembrana tidak menunjukkan adanya garis presipitasi. Garis presipitasi menunjukkan adanya reaksi ikatan antigen-antibodi Jembrana.

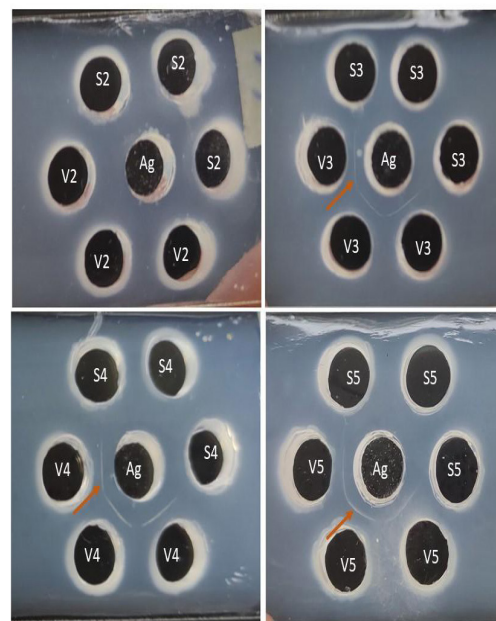
Hal ini menunjukkan bahwa imunoglobulin Y spesifik Jembrana mulai muncul pada serum ayam *white leghorn* pada minggu ke dua. Vaksin Jembrana yang digunakan pada penelitian ini merupakan vaksin yang berbentuk emulsi dengan ajuvan “*mineral oil*”. Ajuvan pada vaksin diharapkan mampu meningkatkan respon imun terutama pada populasi yang memiliki respon imun yang kurang baik, sehingga mampu meningkatkan antibodi yang terbentuk (Coffman *et al.*, 2010). Berdasarkan hasil riset terhadap tiga jenis ajuvan yang digunakan dalam produksi IgY, dapat disimpulkan bahwa emulsi air dalam minyak (MONTANIDE™ ISA 71R VG) sebagai bahan ajuvan akan membantu meningkatkan produksi IgY pada serum dan telur kuning telur dalam waktu yang relatif lebih cepat dibandingkan tanpa penggunaan ajuvan dua jenis lainnya (Rifky *et al.*, 2020)

Ajuvan adalah agen yang dapat merangsang sistem imun dan meningkatkan respons terhadap vaksin, tanpa memiliki efek antigenik spesifik. Ajuvan sebagian besar berasal dari patogen dan sering kali mewakili pola molekuler terkait patogen (PAMP) seperti LPS, MPL, DNA CpG, antigen polisakarida bakteri (PS), konjugat polisakarida kapsul bakteri (CPS), saponin-QS-21, sitokin, toksin kolera, oligonukleotida sintesis, tawas, enterotoksin labil panas *E. coli*, IL-2, IL-12, GM-CSF, lipopeptida, hormon, monofosforil lipid A, muramyldipeptida (MDP), epitop sel T, dan sistem penghantaran vaksin seperti emulsi, iskom, liposom, dan mikropartikel. Ajuvan mengaktifkan sel-sel sistem imun bawaan. Setelah diaktifkan, sel-sel imunitas bawaan mendorong dan memfokuskan respons imun yang didapat. Dalam beberapa penelitian, sistem penghantaran dan agen imunostimulasi telah digabungkan untuk penghantaran ajuvan imunostimulasi yang lebih efektif ke dalam sel penyaji *antigen presenting cell* (APC).

Penggunaan ajuvan sangat penting dalam membuat vaksin mampu menginduksi respons imun. Penggunaan ajuvan biasanya diperlukan untuk menginduksi respons imunologi yang kuat terhadap antigen protein. Namun, efek samping yang serius menghalangi penggunaannya dalam vaksin manusia.

Menurut Hay dan Westwood (2002) antigen lebih bersifat *immunogen* saat bersama dengan ajuvan. Secara umum ajuvan dapat menyebabkan cedera pada jaringan, sehingga menyebabkan perekrutan sel imun dan pengenalan oleh sel imun yang menghasilkan stimulasi dan aktivasi imunitas *inate* dan adaptif. Secara umum ajuvan menginduksi respon imun *pro-inflammatory* lokal yang menghasilkan perekrutan dan aktivasi sel imun di tempat injeksi yang ditandai dengan perekrutan sel imun seperti makrofag, neutrophil, dan sel dendritik (Gerdt 2015).

Uji AGPT sampel IgY terhadap Jembrana yang sudah dimurnikan (Gambar 1) menunjukkan hasil bahwa tidak ada garis presipitasi pada sampel minggu ke 2. Garis presipitasi muncul pada sampel telur minggu ke 3, 4, dan 5. Garis presipitasi pada sampel minggu ke 3 tampak lebih tipis dibandingkan dengan minggu ke 4 dan ke 5. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi IgY terhadap Jembrana pada telur di minggu ke tiga lebih sedikit daripada minggu ke 4 dan ke 5. Imunoglobulin Y terhadap Jembrana muncul di kuning telur pada minggu ke 3, sedangkan pada

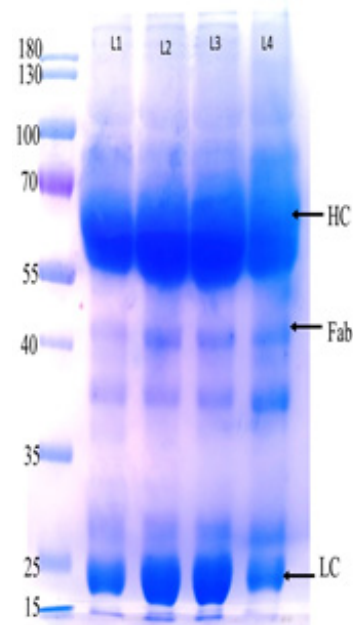


Gambar 1. Hasil Uji AGPT sampel IgY hasil purifikasi. Garis presipitasi ditunjukkan oleh anak panah. (V2) IgY telur minggu ke 2 penyuntikan vaksin ; (V3) IgY telur minggu ke 3 penyuntikan vaksin ; (V4) IgY telur minggu ke 4 penyuntikan vaksin; (V5) IgY telur minggu ke 5 penyuntikan vaksin; (S2) IgY telur minggu ke 2 penyuntikan *Seed JD*; (S3) IgY telur minggu ke 3 penyuntikan *Seed JD*; (S4) IgY telur minggu ke 4 penyuntikan *Seed JD*; (S5) IgY telur minggu ke 5 penyuntikan *Seed JD*; (Ag) Protein rekombinan Jgag

serum pada minggu ke 2. Menurut Wibawan *et al.*, (2010), titer IgY dalam kuning telur tidak selalu sama dengan antibodi di dalam darah, dibutuhkan waktu untuk mentransfer antibodi dari darah ke kuning telur dan waktu transfer ini mungkin berbeda untuk setiap individu ayam. Proses transfer antibodi spesifik dari serum ke kuning telur mengalami penundaan sekitar 5-6 hari atau 3-4 hari tergantung pada jumlah telur saat proses akhir, dimana IgY ditransfer bersama protein lain.

Pemurnian IgY dengan menggunakan NaCl sesuai dengan metode yang dikembangkan oleh (Hodek *et al.*, 2013) mampu menghasilkan IgY dengan kemurnian tinggi. Metode ini mudah dikerjakan dan memakan biaya yang murah jika dibandingkan dengan metode yang lain. Hodek *et al.*, 2013 juga menyatakan bahwa pemurnian Ig Y dengan presipitasi NaCl terdiri dari dua tahap utama, yaitu pemisahan lemak dari kuning telur dan presipitasi IgY. Presipitasi NaCl pada pH yang rendah merupakan metode yang cepat dan memakan biaya yang rendah (Wibawan *et al.*, 2018). Penambahan NaCl bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi bahan yang bersaing dengan protein untuk mengikat air sehingga afinitas antara molekul protein meningkat. Hal ini menyebabkan daya larutnya menurun dan mengendap ketika dilakukan sentrifus, sementara komponen lain akan tetap larut di air. Proses pengendapan ini dipengaruhi perubahan muatan elektrostatik larutan yang sangat dipengaruhi oleh titik isoelektrik bahan dan pH (Chard 1990). Proses pemurnian IgY menggunakan NaCl mampu mendapatkan IgY dengan kemurnian tinggi sekitar 97% (Hodek *et al.*, 2013).

Pengujian SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui berat molekul protein. Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa ukuran berat molekul dari rantai berat IgY adalah sekitar 65-70 kDa, sedangkan untuk rantai ringan 20-30 kDa (Hatta *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993; Bhanushali *et al.*, 1994; Schade *et al.*, 1996; Schade *et al.*, 2005). Hasil uji SDS PAGE IgY Jembrana yang dimurnikan seperti (Gambar 2), menunjukkan pita protein yaitu 67 kDa, 46 kDa, dan 24 kDa. Pita protein dengan berat molekul 67 kDa diduga merupakan rantai berat (HC) dari IgY dan pita protein dengan



Gambar 2. Profil pita protein IgY spesifik virus Jembrana yang diisolasi dengan teknik pengendapan menggunakan NaCl. (HC) menunjukkan rantai berat IgY sekitar 67 kDa, (LC) menunjukkan rantai ringan IgY yaitu sekitar 24 kDa, (Fab) *fragmen antigen binding* dengan berat molekul sekitar 46 kDa. (L1) sampel telur ayam minggu ke 2; (L2) sampel telur ayam minggu ke 3; (L3) sampel telur ayam minggu ke 4; (L4) sampel telur ayam minggu ke 5; (M) marker

berat molekul 24 kDa adalah pita rantai ringan (LC). Sun *et al.*, (2001) dan Schade *et al.*, (2005) menyatakan bahwa degradasi IgY menghasilkan fragmen Fc dan Fab, dimana Fab memiliki berat molekul sekitar 45 kDa. Pita protein 45 kDa diduga merupakan fragmen Fab.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa telur ayam dapat digunakan sebagai penghasil IgY terhadap Jembrana dengan penyuntikan vaksin Jembrana pada induk ayam. Imunoglobulin Y terhadap Jembrana terdeteksi pada kuning telur setelah dua minggu penyuntikan vaksin dan dapat dimurnikan. Karakterisasi IgY terhadap Jembrana menunjukkan berat molekul rantai berat (HC) sekitar 67 kDa, dan berat molekul rantai ringan (LC) sekitar 24 kDa.

Daftar Pustaka

Bhanushali JK, Gilbert JM, McDougald LR. (1994). Simple method to purify chicken immunoglobulin G. *Poultry science*. 73(7):1158–1161.

- . (1993). Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review. *Poultry science*. 72(10):1807–1812.
- Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*. 73:293–303.
- Rifky Rizkiantino, I Wayan Teguh Wibawan, Fachriyan Hasmi Pasaribu, Retno Damajanti Soejoedono, Okti Nadia Poetri, Wyanda Arnafia, Kris Damar Sasi, Dinda Reisinta. (2020). The Potential of Adjuvant Against Production of Antistreptococcal Immunoglobulin Y (IgY) in Aquaculture. *Jurnal Veteriner*. Vol. 14, No.3. September
- Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*. 33(2):129–154. doi:10.1177/026119290503300208.
- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, van Regenmortel M, Rijke E, *et al.* (1996). The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. *Alternatives to Laboratory Animals*. 24(6):925–934.
- Soeharsono S, Hartaningsih N, Soetrisno M, Kertayadnya G, Wilcox GE. (1990). Studies of Experimental Jembrana Disease in Bali Cattle. I. Transmission and Persistence of the Infectious Agent in Ruminants and Pigs, and Resistance of Recovered cattle to Re-infection. *Journal of Comparative Pathology*. 103(1):49–59.
- Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (Igy) against rabies virus. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 15(9):708–712.
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*. 16(8):392–398.
- Wibawan IWT, Darmono IBP, Suartha IN. (2010). Variasi Respon Pembentukan IgY terhadap Toxoid Tetanus dalam Serum dan Kuning Telur pada Individu Ayam Petelur. *Jurnal Veteriner*. 11(3):152–157.
- Wibawan IWT, Kristanti ND, Zulfa A, Sasi KD, Permatasari DA, Cahyono MI, Julianto, Sibit G, Arnafia W. (2018). Production of IgY Against Infectious Bursal Disease Virus and Purification of IgY from Egg by Using Biocompatible Technique. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 16(3):175–179.
- Wilcox GE, Chadwick BJ, Kertayadnya G. (1995). Recent advances in the understanding of Jembrana Disease. *Veterinary Microbiology*. 46:249–255.
- Wilcox GE, Kertayadnya G, Hartaningsih N, Dharma DMM, Soeharsono S, Robertson T. (1992). Evidence for a viral aetiology of Jembrana disease in Bali cattle. *Veterinary Microbiology*. 33(1–4):367–374.
- Wood GW, Muskett JC, Hebert CN, Thornton DH. (1979). Standardization of the quantitative agar gel precipitin test for antibodies to infectious bursal disease. *Journal of biological standardization*. 7(2):89–96.
- Yokoyama H, Peralta RC, Horikoshi T, Hiraoka J, Ikemori Y, Kuroki M, Kodama Y. (1993). A Two-Step Procedure for Purification of Hen Egg Yolk Immunoglobulin G: Utilization of Hydroxypropylmethylcellulose Phthalate and Synthetic Affinity Ligand Gel (Avid AL®). *Poultry Science*. 72(2):275–281.