

## PENGARUH INJEKSI PROTEIN MEMBRAN SPOROZOIT *Eimeria tenella* TERHADAP INDEKS REPRODUKSI OOSISTA PADA AYAM

THE EFFECT OF INJECTION OF PROTEIN MEMBRANE SPOROZOITES  
TO REPRODUCTION INDEX OF *Eimeria tenella*'s OOCYST IN CHICKEN

Muslim Akmal<sup>1</sup>, R. Wisnu Nurcahyo<sup>2</sup> dan Sumartono<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Kopelma Darussalam Banda Aceh 23111  
Telp./Fax. (0651) 54208

<sup>2</sup>Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Sekip Unit II Yogyakarta 55281  
Telp./Fax. (0274) 563083

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh injeksi protein membran sporozoit *Eimeria tenella* terhadap Indeks Reproduksi *E. tenella* pada ayam. Dalam penelitian ini, sebanyak 60 ekor DOC jantan petelur (strain *Isa Brown*) digunakan sebagai hewan percobaan. Ayam percobaan tersebut setelah berumur 4 hari dibagi acak menjadi tiga kelompok (kelompok kontrol, I dan II), masing-masing kelompok terdiri dari 20 ekor. Ayam-ayam pada kelompok I diinjeksi dengan protein membran sporozoit *E. tenella* dengan dosis 2,1 µg per ekor secara intravena. Ayam-ayam pada kelompok II diinjeksi secara intrakutan dengan protein yang sama seperti yang diinjeksikan pada kelompok I, sedang ayam pada kelompok kontrol tidak dilakukan perlakuan. Semua ayam percobaan kemudian dimasukkan ke dalam kelompoknya masing-masing dan diberi pakan non koksidiostat dan air minum secara *ad libitum*. Pada hari ke-22 setelah perlakuan, semua ayam percobaan diinfeksi dengan 1500 oosista infeksi *E. tenella* per ekor sebagai infeksi tantangan. Data jumlah oosista per gram feses dikumpulkan mulai hari ke-4 sampai dengan hari ke-11 setelah infeksi tantangan. Hasil perhitungan Indeks Reproduksi dianalisis secara deskriptif. Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa injeksi 2,1 µg protein membran sporozoit *E. tenella* baik secara intravena maupun intrakutan tidak mempengaruhi Indeks Reproduksi *E. tenella* pada ayam-ayam percobaan terhadap infeksi tantangan *E. tenella*.

**Kata kunci:** Indeks Reproduksi, protein membran sporozoit, *E. tenella*

### ABSTRACT

The purpose of the research was to study of the effect of injection of protein membrane *Eimeria tenella*'s sporozoites to Reproduction Index of oocyst in chicken. Sixty day old chicken (DOC) of the male layers (*Isa Brown* strain) were used as experimental animals. When they were 4 days old, they were divided randomly into 3 groups (group of control, group I and II), each group consisted of 20 chickens. The chickens of group I were injected intravenously with 2,1 µg/chicken of the protein membrane of *E. tenella*'s sporozoites. The chickens of group II, were injected intracutaneously with the same protein and the same dose as used in the group I, and the chickens control group, were not treated. All chickens, were kept according to their groups and they were given non coccidiostat feed and drinking water *ad libitum*. On the 22<sup>nd</sup> day after treatment, all chickens were infected orally with 1500 infective oocyst of *E. tenella* as a challenge infection. The numbers of oocyst of *E. tenella* per gram faeces were collected on the 4<sup>th</sup> day until the 11<sup>th</sup> day after the challenge. The data of Reproduction Index was analyzed descriptively. The result showed that injection of 2.1 µg protein membrane of *E. tenella*'s sporozoites/chicken neither intravenously nor intracutaneously effected Reproduction Index *E. tenella* oocyst in chicken to a challenge infection of *E. tenella*.

**Key words:** Index of Reproduction, protein membrane of sporozoite, *E. tenella*.

## PENDAHULUAN

Koksidiosis merupakan penya-kit yang harus diperhatikan pada industri peternakan unggas karena dapat menyebabkan perdarahan dan kematian pada infeksi yang berat (Ricketts, 1992). *Eimeria tenella* adalah salah satu spesies *Eimeria* penyebab koksidiosis bentuk sekal pada ayam yang menyebabkan diare berdarah (Groves sit. Sumartono, 2000). Protozoa parasit tersebut hidup dan berkembang di epitelium usus buntu (sekum), sehingga menyebabkan diare berdarah, penurunan berat badan, paralisis, terlambatnya produksi telur, penurunan kualitas telur dan sering mengakibatkan kematian (Shirley *et al.*, 1995).

Koksidiosis menimbulkan masalah yang serius pada peternakan ayam (Sainsbury, 1992). Di Amerika Serikat kerugian akibat koksidiosis dapat mencapai US\$ 34.854.000 pertahun (Levine, 1983). Total kerugian akibat koksidiosis di Inggris selama tahun 1995 mencapai 34.588.795 Poundsterling (Williams 1999). Kematian ternak ayam pada suatu peternakan akibat koksidiosis dapat mencapai 5 – 10% dan kerugian di seluruh dunia mencapai 50 – 100 juta Poundsterling (Gordon, 1997). Adapun untuk pengobatan koksidiosis diseluruh dunia telah menghabiskan dana US\$ 300 juta (Zakir, 1996).

Selama ini pencegahan koksidiosis dilakukan dengan cara sanitasi, baik di dalam kandang maupun lingkungannya. Cara lain yang lebih efektif adalah melalui pemberian antikoksidia (koksidostat) pada pakannya (Wallach and Waldenstedt, 1999). Hampir semua pakan komersial untuk ayam pedaging telah mengandung koksidostat (Dibner and Knight, 1999).

Pemakaian koksidostat umumnya efektif dan penggunaannya relatif mudah. Akan tetapi, pemakaian secara terus menerus dapat menyebabkan timbulnya resisten spesies koksidia terhadap koksidostat (Langhout, 1999). Selain itu, penelitian yang dilakukan untuk mencari koksidostat baru memerlukan biaya yang sangat mahal (Brake *et al.*, 1997).

Berbagai usaha pengendalian dan pemberantasan koksidiosis telah dilakukan termasuk usaha pengebalan dengan jalan vaksinasi (Shirley, 1993). Beberapa vaksin yang pernah diuji di laboratorium adalah vaksin oosista utuh (Shirley, 1996) dan vaksin bentuk sporosista (Saadi and Al-

Attar, 1993). Sporozoit adalah stadium infeksi pertama yang kontak dengan respon imun hospes (Trees *et al.*, 1989) dan dapat pula menginduksi resistensi pada hospes (Jenkins *et al.*, 1993). Manifestasi adanya respon imun terhadap infeksi koksidiosis dapat dilihat dengan adanya kekebalan atau menurunnya produksi oosista. Penurunan produksi oosista merupakan hal penting dalam pencegahan penyebaran koksidiosis (Long, 1967).

Pengembangan vaksin sporozoit *E. tenella* perlu dilakukan karena sporozoit adalah stadium infeksi pertama yang masuk ke dalam sel induk semang, sedangkan daya antigenitasnya terletak pada protein membran permukaan sporozoit (Saadi and Al-Attar, 1993). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh injeksi protein membran sporozoit *E. tenella* terhadap Indeks Reproduksi *E. tenella* pada ayam.

## MATERI DAN METODE

Hewan dan bahan utama yang digunakan adalah 60 DOC jantan petelur (strain *Isa Brown*) dan spet insulin (spet 1 ml), pakan ayam yang berupa campuran dari dedak, jagung dan kacang hijau, larutan kalium bikromat 2%, *clorox* dan *glass beads*, tripsin, dan sodium taurocholat dan CO<sub>2</sub>.

Bahan utama lainnya adalah: larutan PSG (*Phosphate Saline Glucose*), larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), *protease inhibitor*, dan nonidet P<sub>40</sub>.

Alat utama yang diperlukan terdiri dari sentrifus (J-6B, Beckman) sonikator (Labsonic U. B. Braun), spektrofotometer (DV-65, Backman), inkubator CO<sub>2</sub> (EG LLO IR, Jouan), dan saringan ukuran 100, 200, dan 325 mesh.

### Produksi Oosista *Eimeria tenella*

Oosista *E. tenella* yang telah bersporulasi diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Sebanyak lebih kurang 10.000 oosista yang telah bersporulasi tersebut diinfeksi pada 25 ekor ayam jantan petelur (strain *Isa Brown*). Pada hari ke 6, 7, 8, 9, setelah infeksi, feses ayam tersebut dikumpulkan. Secara berurutan feses disaring dengan menggunakan saringan ukuran 100, 200, dan 325 mesh. Kemudian, oosista dan debris hasil saringan diberi kalium bikromat 2% dan disimpan

dalam suhu kamar selama 48 jam agar dapat bersporulasi sempurna. Oosista yang telah bersporulasi dibersihkan dan dikumpulkan dengan cara pengapungan. Proses pengapungan tersebut dilakukan dengan mencampur suspensi oosista dengan larutan gula 40% dengan perbandingan 1:1, proses ini diulangi sebanyak 2 kali. Oosista hasil pengapungan dicuci 3 kali dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah bersih oosista tersebut disuspensikan lagi ke dalam larutan kalium bikromat 2%. Selanjutnya oosista yang tersedia disimpan di dalam lemari es.

**Produksi Sporosista *Eimeria tenella***

Oosista hasil pengapungan dicuci tiga kali dengan akuades secara sentrifugasi dan cairan dibuang untuk mendapatkan pelet. Pelet oosista disuspensikan kembali dengan *clorox* 100% sebanyak 500 – 800 µl dan divortex selama 0,5 menit agar tercampur homogen. Setelah diinkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit, oosista di dalam suspensi *clorox* dicuci 3 kali dengan cara sentrifugasi, lalu cairan dibuang untuk mendapatkan pelet. Pelet disuspensikan dengan 2 ml NaCl fisiologis dan diisi dengan *glass beads* yang tingginya sama dengan tinggi larutan NaCl fisiologis; Untuk memecah dinding oosista divortex selama 23 menit sehingga dihasilkan sporosista.

Larutan NaCl fisiologis yang berisi sporosista dan *glass beads* disaring ke dalam tabung Erlenmeyer untuk memisahkan sporosista dan *glass beads* sehingga tersedia sporosista yang murni.

**Eksistasi Sporozoit *Eimeria tenella***

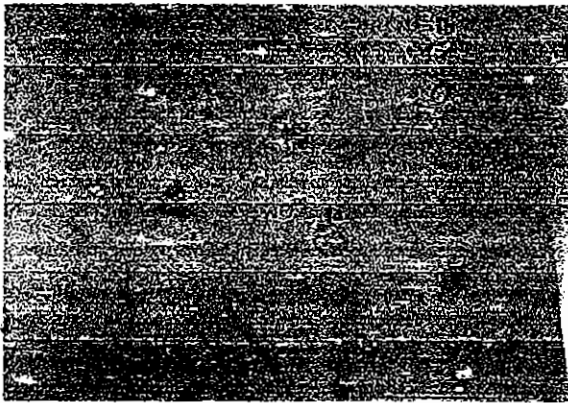
Untuk memproduksi sporozoit *E. tenella* terlebih dahulu disiapkan larutan eksistasi yang terdiri dari tripsin 0,25 g, sodium taurocholat 0,75 g dan akuades 100 ml, pH dibuat 8,00 dan dipanaskan hingga 40°C. Setelah sporosista di dalam NaCl disentrifus 1 kali, cairan dibuang dan ditambahkan larutan eksistasi sebanyak 5 ml dan divortex selama 0,5 menit. Selanjutnya sporosista dalam larutan eksistasi dipindahkan ke tabung labu Erlenmeyer 50 ml dan dimasukkan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu dalam Erlenmeyer masih 41°C selama 20 menit dengan tutup karet terbuka. Sebelum labu Erlenmeyer dikeluarkan, labu ditutup rapat dengan karet penutup. Kemudian labu diinkubasikan selama 90 menit dengan suhu 41°C dalam *waterbath* dengan rak bergoyang. Setelah dicuci 3 kali dengan NaCl fisiologis dengan sentrifugasi, cairan di atasnya dibuang dan pelet sporozoit diberi larutan PSG (*Phosphate Saline Glucose*) sebanyak 10 ml dan siap diproses lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan jumlah eliminasi oosista per gram feses mulai hari ke-4 sampai dengan hari ke-11 setelah infeksi tantangan dengan 1500 oosista *E. tenella*.

Perlakuan	Pemeriksaan hari ke-n								
	NO.	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Kontrol</b>									
Total		768850	1333400	1882000	802200	664200	339400	631300	227350
Mean		76885	133340	188200	80220	66420	33940	63130	22735
SD		64097	103514	113151	9854,59	37007,2	48133,7	116292	31450,4
<b>KI</b>									
Total		33500	1344000	1737600	1967600	1797600	2351700	1305700	512400
Mean		3350	134400	173760	196760	179760	235170	130570	51240
SD		4712,7	101612	124909	155313	222528	227528	204144	59135,7
<b>KII</b>									
Total		2000	27500	1131100	1650600	1200300	3656300	9688300	4981900
Mean		200	2750	113110	165060	120030	365630	968830	498190
SD		181,05	1838,2	73311,6	72080,8	107905	112003	526186	514680

### Isolasi Protein Membran Sporozoit *Eimeria tenella*

Sporozoit dalam larutan PSG (*Phosphat Saline Glucose*) dicuci 2 – 3 kali dengan NaCl fisiologis kemudian diendapkan. Setelah sporozoit dicuci 3 kali dengan larutan PBS, sporozoit dalam endapan diisolasi protein membrannya dengan meresuspensikan dalam 10 mM PBS serta ditambah *Protease inhibitor* (untuk 100 ml PBS ditambah 100 µl mM PMSF, dan 7 mg TPCK). Suspensi tersebut disonikasi dengan amplitudo 14 nm selama 30 detik sebanyak 5 kali dalam *ice bath*. Selanjutnya suspensi disentrifus pada kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Supernatan merupakan protein sitoplasma dan pelet mengandung protein membran



Gambar 1. a) Oosista *E. tenella* yang dikembangkan secara *in vivo* dan b) sporosista *E. tenella* yang diproduksi secara mekanik (pembesaran 400x).

protein membran tersebut diliofilisasi lalu disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan.

Sebanyak 60 ekor DOC jantan petelur (strain Isa Brown) dipelihara dalam satu kandang selama empat hari. Selama pemeliharaan, ayam-ayam tersebut diberi pemanasan dengan lampu listrik secukupnya serta diberi pakan non koksidiostat dan air minum secara *ad libitum*. Ayam percobaan tersebut setelah berumur 4 hari dibagi secara acak menjadi tiga kelompok (kelompok kontrol, I, dan II), masing-masing kelompok terdiri dari 20 ekor. Ayam-ayam pada kelompok I diinjeksi dengan protein membran sporozoit *E. tenella* dengan dosis 2,1 µg per ekor secara intravena. Ayam-ayam pada kelompok II diinjeksi secara



Gambar 2. Sporozoit *E. tenella* yang diproduksi secara *in vitro* (pembesaran 1000 x).

yang dicari. Pelet direzuspensikan dengan 0,5% nonidet P<sub>40</sub> dalam larutan *protease inhibitor* (komposisi sama seperti tersebut diatas). Suspensi disonikasi dengan amplitudo 14 nm selama 30 detik sebanyak 5 kali. Selanjutnya larutan diinkubasi semalam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  sambil diaduk dengan *stirer* pada kecepatan sedang. Tahap berikutnya suspensi disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian supernatan diambil. Konsentrasi protein dihitung dengan menggunakan metode Bradford. Reaksi warna diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya protein dialiquot dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Untuk menjaga antigenitasnya, larutan

intrakutan dengan protein yang sama seperti yang diinjeksikan pada kelompok I, sedangkan ayam pada kelompok kontrol tidak dilakukan perlakuan. Semua ayam percobaan kemudian dimasukkan dalam kandang kelompoknya masing-masing dan dipelihara dengan diberi pakan non koksidiostat dan air minum secara *ad libitum*. Pada hari ke-22 setelah perlakuan, semua ayam percobaan diinfeksi dengan 1500 oosista infeksi *E. tenella* per ekor sebagai infeksi tantangan.

Data yang dikumpulkan adalah jumlah oosista per gram feses. Data jumlah oosista per gram feses dilakukan dengan metode McMaster yang dimodifikasi menurut Georgi (1980) dari feses ayam percobaan yang dikumpulkan mulai hari ke-4 sampai dengan hari ke-11 setelah infeksi tantangan.

Indeks Reproduksi (IR) oosista dihitung menurut Kennedy (1975).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi Oosista, Sporosista dan Eksistasi Sporozoit *Eimeria tenella*

Bentuk oosista *Eimeria tenella* yang diproduksi secara *in vivo* pada 25 ekor ayam jantan petelur (strain Isa Brown) umur 2 minggu dari 10.000 oosista *E. tenella* per ekor dan bentuk sporosista *E. tenella* yang diproduksi dengan cara mekanik dengan menggunakan *glassbeads* terlihat pada Gambar 1, sedangkan bentuk sporozoit *E. tenella* yang diproduksi secara *in vitro* dengan

setelah infeksi tantangan pada kelompok kontrol lebih rendah daripada kelompok ayam yang divaksin dengan protein membran sporozoit *E. tenella* baik secara intravena (4432,43 vs 7366,72) maupun secara intrakutan (4432,43 vs 14891,97), sedangkan total Indeks Reproduksi *E. tenella* kelompok ayam yang divaksin dengan protein membran sporozoit *E. tenella* secara intravena lebih rendah daripada kelompok ayam yang divaksin dengan protein hari ke-6, kelompok I terdapat pada hari ke-9, sedangkan kelompok II terdapat pada hari ke-10.

Pada Tabel 2 dan Gambar 2 terlihat bahwa total Indeks Reproduksi *E. tenella* kelompok kontrol lebih rendah daripada Kelompok ayam yang

Tabel 2. Indeks Reproduksi oosista tiap-tiap perlakuan mulai hari ke-4 s.d. hari ke-11 setelah infeksi tantangan dengan 1500 oosista *E. tenella*.

Kelompok	Indeks Reproduksi <i>E. tenella</i>								
	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
Kontrol	512,56	888,93	1254,66	534,8	442,8	226,26	420,86	151,56	4432,43
KI	22,33	896	1158,4	1311,73	1198,4	1567,8	870,46	341,6	7366,72
KII	1,33	18,33	754,06	1100,4	800,2	2437,53	6458,86	3321,26	14891,97

menggunakan larutan eksistasi (tripsin dan sodium taurocholat) dan inkubator CO<sub>2</sub> dapat dilihat pada Gambar 2.

### Isolasi Protein Membran Sporozoit *Eimeria tenella*

Hasil isolasi protein membran sporozoit *E. tenella* yang dilakukan dengan menggunakan bahan *protein inhibitor* (PMSF dan TPCK) dengan jumlah sporozoit  $18 \times 10^4$  didapatkan konsentrasi protein membran sporozoit *E. tenella* sebanyak 2,1 µg/µl. Konsentrasi protein tersebut diukur dengan menggunakan metode Bradford, sedangkan reaksi warna diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

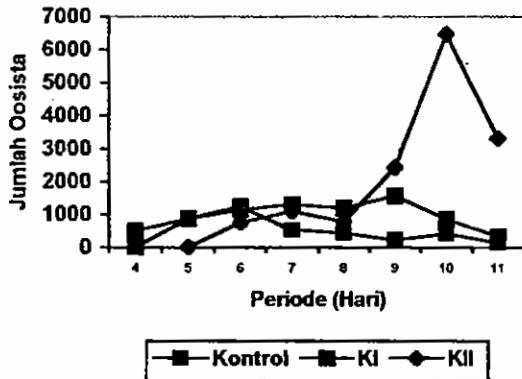
### Indeks Reproduksi *E. tenella*

Hasil perhitungan terhadap Indeks Reproduksi *E. tenella* mulai hari ke-4 sampai dengan hari ke-11 setelah infeksi tantangan 1500 oosista *E. tenella* dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa total Indeks Reproduksi *E. tenella* mulai hari ke-4 s.d hari ke-11

divaksin dengan protein membran sporozoit *E. tenella* baik secara intravena maupun intrakutan. Hal ini disebabkan karena penggunaan 2,1 µg protein membran sporozoit *E. tenella* baik secara intravena maupun intrakutan belum mampu merangsang timbulnya respon imun pada ayam-ayam percobaan. Ketidakmampuan protein membran sporozoit *E. tenella* merangsang respon imun ayam-ayam percobaan tersebut, kemungkinan besar disebabkan karena pada penelitian ini tidak dilakukan *booster* setelah vaksinasi pertama diberikan, sehingga titer antibodi yang muncul tidak begitu tinggi. Akibat titer antibodi yang tidak begitu tinggi menyebabkan ayam-ayam percobaan pada kelompok ini tidak tahan terhadap infeksi tantangan.

Hasil penelitian Prastowo *et al.* (1998) menunjukkan bahwa penyuntikan 2,0 µg protein membran sporozoit *E. tenella* secara intraperitoneal pada tikus telah mampu merangsang adanya respon imun pada tikus dengan titer antibodi yang tinggi. Hal ini disebabkan karena peneliti ini melakukan *booster* setelah imunisasi pertama diberikan. *Booster* dilakukan 3 kali berturut-turut dengan cara

menginjeksikan secara intravena sebanyak 1µg protein membran sporozoit *E. tenella* dalam PBS tanpa *adjuvant*. Lebih lanjut penelitian yang dilakukan oleh Danford *et al.* (1993) yang menggunakan antigen sporozoit *E. tenella* dengan



Gambar 2. Grafik hasil perhitungan terhadap Indeks Reproduksi oosista *E. tenella* mulai hari ke-4 s.d. hari ke 11 setelah infeksi tantangan 1500 oosista *E. tenella*.

dosis 1 sampai 10 µg pada ayam Broiler umur 2-4 hari, juga belum mampu melindungi ayam-ayam percobaan terhadap infeksi tantangan. Hal ini disebabkan karena peneliti ini juga tidak melakukan *booster* setelah vaksinasi pertama diberikan.

Menurut Pote *et al.* (1991) antigenisitas protein pada stadium seksual dan aseksual spesies *Eimeria* telah dipelajari dan dibuktikan. Akan tetapi penentuan bagian dari protein tersebut yang dapat merangsang respon imunitas protektif yang lengkap relatif masih sukar karena kompleksnya siklus hidup dan banyaknya stadium perkembangan parasit. Saadi and Al-Attar (1993) menyatakan bahwa sporozoit merupakan stadium infeksi pertama yang masuk ke dalam sel induk semang, sedangkan daya antigenitasnya terletak pada protein membran permukaan sporozoit.

Injeksi 2,1 µg protein membran sporozoit *E. tenella* baik secara intravena maupun intrakutan tidak mempengaruhi Indeks Reproduksi terhadap infeksi tantangan *E. tenella*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brake, D.A., C.H. Fedor., B.W. Werner., T.J. Miller., R.L. Taylor and R.A. Clare., 1997. Characterization of immune response to *Eimeria tenella* antigens in a natural immunity. Model with host which differ serological at the B Locus the major histocompatibility complex. *Infection and Immunity*. p. 1204-1210.
- Danford, H.D., P.C. Augustine, and M.C. Jenkins., 1993. A Review of Progress in Coccidial Vaccine Development. *Proceedings. VI<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference*. pp. 49-60.
- Dibner, F.J and C.D. Knight., 1999. Direct Delivery of Live Coccidiosis Vaccine into the Hatling Yolk Sac. *World Poultry ed. Special. Published By Elsever International Businesss Informa-tion, Part of Reed-Elsevier the Netherlands*. 3: 28-29.
- Gordon, R.F., 1997. *Poultry Diseases*. Bailiere Tindall, London. pp. 77-82, 126-133, 166-169.
- Jenkins, M.C., P.G. Seferian., P.C. Augustine and H.D. Danford., 1993. Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation-attenuated *Eimeria maxima* sporozoites that are incapable of aseksual development. *Avian Diseases*. 37: 74-82.
- Langhout, D.J., 1999. The Role of Nutrition on Coccidial Infection. *World Poultry ed. Special. Published By Elsever International Businesss Information, Part of Reed-Elsevier the Netherlands*. 3: 33-34.
- Levine, N.D., 1983. *Veterinary Parasitology*. Burgess Publishing Company. Minniefotta. pp. 73-78.
- Pote, L.M., A.J., Ainsworth, J.E. Brown, and J.A. Haney., 1991. Characterization of proteins in sporulated and unsporulated *Eimeria*

*maxima* oocyst. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 52  
No.1: 257-266.

Prastowo, J., W.T. Artama, dan Sumartono., 1998.  
Produksi Antibodi Monoklonal Terhadap  
Membran Protein Koksidia Isolat  
Yogyakarta. Program Pasca-sarjana,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Ricketts, A.P., 1992. *Eimeria tenella*: Growth and  
Drug Sensitivity in Tissue Culture Under  
reduced Oxygen. *J. Experimental  
Parasitology*, Academic Press, Inc, Boston,  
Massachusetts.

Saadi, L. and M.A. Al-Attar, 1993. Immunization of  
Chickens Against *Eimeria tenella* by  
Intramuscular Injection of Live Sporozoit.  
*Proceeding: VI<sup>th</sup> International Coccidiosis  
Confrence* (June, 1983). Canada. 166.

Sainsburry, D., 1992. Poultry Health and  
Management Chickens, Turkeys, Ducks,  
Geese, Quail, 3<sup>th</sup> ed. Blackwell Scientific  
Publication, London-Edinburg, Boston.

Schetters, P.M., H.A.J.M. Janssen and A.N.  
Vermuelen., 1999. A new Vaccination  
Concept Against Coccidiosis in Poultry.  
*World Poultry* ed. Special. Published By  
Elsever International Businesss Informa-  
tion, Part of Reed-Elsevier the Netherlands.  
3: 26-27.

Shirley, M.W., 1993. Live vaccines for the Control  
of Coccidiosis. *Proceedings. VI<sup>th</sup>  
International Coccidiosis Conference.* pp.  
61-79.

Shirley, M.W., 1996. Biological principle of live  
attenuated vaccines. *Magyar Allatoyvasak  
Lapja* 51 (1): 23-29.

Shirley, M.W., A.C. Bushell., W. McDonald, and  
B. Roberts., 1995. A live attenuated vaccine  
for the control of avian coccidiosis: Trial in  
broiler breeder and replacement layer flocks  
in The United Kingdom. *Vet. Tec.* 137 (18):  
453-457.

Sumartono, 2000. Produksi dan Uji Infektivitas  
Sporosista Dari Berbagai Isolat *Eimeria  
tenella* Terhadap Ayam Ras. Laporan  
penelitian. Lembaga Penelitian, Universitas  
Gadjah Mada Yogyakarta.

Trees, A.J., M.J. Karim., S.B. McKellor and S.D.  
Carter., 1989. *Eimeria tenella*: Local  
antibodies and interactions with the  
sporozoites surface. *J. Protozool.*, 36(4). pp.  
326-333.

Wallach, M. and M. Waldenstedt., 1999. Immunity  
and the Effect of Removing Coccidiostats  
from Poultry Feed. *World Poultry* ed.  
Special. Published By Elsever International  
Businesss Information, Part of Reed-  
Elsevier the Netherlands. 3: 12-15.

Williams, R.B., 1999. Anticoccidial Vaccines: the  
Story so Far. *World Poultry* ed. Special.  
Published By Elsever International  
Businesss Information, Part of Reed-  
Elsevier the Netherlands. 3: 30-31.

Zakir, Z., 1996. Tendensi pengobatan koksidiosis di  
masa datang. *Poultry Indonesia*. No. 191:  
hal; 34-36.

