

LAPORAN TEKNIS 2017

78/AIR 3/OT 02 02/02/2018

**TEKNIK NUKLIR UNTUK PENINGKATAN KESEHATAN  
DAN REPRODUKSI TERNAK**

**Boky Jeanne Tuasikal, Tri Handayani, Dadang Priyoatmojo, Afi  
Candra Trinugraha, Nuniek Lelananingtyas, Dinardi, Totti  
Tjiptosumirat**



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI  
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL  
2018**

LAPORAN TEKNIS 2017

78/AIR 3/OT 02 02/02/2018

TEKNIK NUKLIR UNTUK PENINGKATAN KESEHATAN  
DAN REPRODUKSI TERNAK

Boky Jeanne Tuasikal, Tri Handayani, Dadang Priyoatmojo, Afi  
Candra Trinugraha, Nuniek Lelanangingtyas, Dinardi, Totti  
Tjiptosumirat

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Pertanian



Dr. Irawan Sugoro, M.Si  
NIP. 19761018 200012 1 001

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Totti Tjiptosumirat  
NIP. 19630830 198803 1 002

## TEKNIK NUKLIR UNTUK PENINGKATAN KESEHATAN DAN REPRODUKSI TERNAK

B.J. Tuasikal, T. Handayani, D. Priyoatmojo, A.C. Trinugraha, N. Lelaningtyas, Dinardi, T. Tjiptosumirat

### ABSTRAK

Aplikasi teknologi nuklir dengan pemanfaatan radiasi sinar gamma diterapkan pada pembuatan vaksin iradiasi untuk pencegahan penyakit radang ambing (mastitis) dan penyakit keluron menular (brucellosis) pada ternak, serta teknik pelabelan isotop untuk radioimmunoassay (RIA) sebagai diagnosa kebuntingan dini pada ternak ruminansia. Sinar gamma digunakan untuk melemahkan bakteri penyebab penyakit ternak Mastitis subklinis dan Brucellosis untuk memperoleh strain dengan tingkat patogenesitas yang sangat berkurang, namun tetap mampu merangsang timbulnya kekebalan pada tubuh ternak terhadap penyakit. Pada uji lapang terbatas vaksin radiasi mastitis, hewan divaksinasi dengan bakteri *Streptococcus agalactiae* Group B iradiasi pada dosis LD50 dan kemudian dibooster 3 kali. Hasil pemeriksaan gambaran darah merah sapi pada uji lapang terbatas menunjukkan tidak terjadi anemia, karena masih dalam kisaran normal : Sel darah merah :  $5-10 \times 10^6$  sel/ $\mu$ l ; haemoglobin : 8-15 %; hematokrit 24-46 %. Hasil pemeriksaan total leukosit sapi perlakuan mengalami peningkatan signifikan dan berbeda nyata dengan sapi kontrol secara berturut-turut pada postvaksinasi I, II, dan III. Adanya peningkatan jumlah leukosit menunjukkan bahwa vaksin iradiasi *S. agalactiae* bersifat imunogenik sehingga berhasil meningkatkan respon pertahanan seluler maupun humoral. Pada kegiatan penelitian vaksin iradiasi Brucellosis, pengujian histopatologi menunjukkan bahwa *B. abortus* mampu memberikan perlindungan pada batas tertentu pada hewan model mencit. Pada kelompokantang dengan perlakuan infeksi *B. abortus* terlihat organ limpa lebih aktif dibandingkan dengan kontrol. Kelompok vaksin dan tantang menunjukkan 60% hewan organ limpanya aktif. Pada penelitian ini, pemberian vaksin tantang memberikan perlindungan sekitar 40% pada hewan model mencit sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk meningkatkan kadar perlindungan melalui serangkaian uji *in vivo*. Isolat PSPB, memiliki berat molekul 63-65 KDa dimanfaatkan untuk produksi antibodi menggunakan kelinci New Zealand White sebagai hewan model. Serum darah kelinci sampai dengan booster pertama dilakukan penentuan titer dengan hasil reaksi aglutinasi pada pengenceran 1:8, sehingga diketahui titer antibodi tersebut sebesar 8 HA unit. Hal ini menunjukkan terdapatnya peningkatan antibodi hasil stimulasi imunisasi utama dan booster, sehingga pada booster selanjutnya diperkirakan terjadi peningkatan titer antibodi yang lebih tinggi.

Kata Kunci: Mastitis, *B. abortus*, Vaksin Radiasi, RIA-PSPb

## PENDAHULUAN

Pengembangan sektor kesehatan dan reproduksi ternak dalam sistem peternakan di Indonesia bertujuan untuk meningkatkan kualitas serta kuantitas sistem dan produk peternakan disamping pencegahan kerugian ekonomi serta mencegah resiko penularan penyakit ke manusia. Aspek kesehatan hewan berkaitan dengan penyakit hewan menular (PHM), penyakit hewan non infeksi yang berdampak ekonomi tinggi, dan gangguan reproduksi yang berdampak pada rendahnya *service per conception*, panjangnya calving interval, rendahnya angka kelahiran dan kemajiran. Berbagai program pemerintah telah dilakukan untuk peningkatan kesehatan hewan seperti program vaksinasi, surveilan penyakit hewan, pengawasan dan pemberantasan, investigasi penyakit dan pemeriksaan hewan sebelum dipindahkan. Dengan program tersebut diharapkan terjadi peningkatan kesehatan hewan sehingga berdampak pada peningkatan kesejahteraan masyarakat melalui meningkatnya tenaga kerja peternakan, pendapatan dan kesejahteraan para peternak.

Penyakit brucellosis atau yang dikenal sebagai penyakit keluron menular menimbulkan keguguran pada umur kebuntingan tertentu. Selain itu beberapa penyakit subklinis seperti mastitis sulit diketahui oleh peternak, dan baru dapat diketahui apabila keadaannya sudah parah. Dengan diketahuinya gejala dini melalui deteksi/ identifikasi penyakit (mengggunakan reagen diagnostik), maka peternak dapat menyelamatkan ternak yang masih sehat dengan tindakan preventif misalnya dengan cara vaksinasi. Dalam upaya pengembangan vaksin, teknik nuklir khususnya radiasi sinar gamma dapat digunakan untuk menurunkan virulensi atau patogenitas agen penyakit tetapi masih mampu menstimulasi kekebalan pada ternak terhadap infeksi ganas (Smith 1992).

Pemanfaatan teknik radiasi untuk penelitian vaksin telah dilakukan pada beberapa penyakit. Kelompok Produksi Ternak PAIR menggunakan radiasi sinar gamma gamma dari sumber Cobalt-60 dalam pengembangan vaksin iradiasi untuk pencegahan penyakit radang ambing (mastitis) dan penyakit keluron menular (brucellosis) pada ternak. Teknik iradiasi memberikan keuntungan dapat memperpendek waktu pasase dalam mendapatkan bahan vaksin dibanding dengan teknik konvensional. Pemanfaatan aplikasi teknik nuklir juga digunakan untuk mendukung efisiensi reproduksi ternak melalui teknik Radio immunoassay (RIA), seperti untuk mendeteksi hormon progesteron (P4). Teknik RIA juga dikembangkan untuk deteksi kebuntingan dini pada ternak ruminansia, dengan

memanfaatkan protein spesifik kebuntingan B (*pregnancy specific protein-b: PSPB*) yang merupakan glikoprotein sintesis dari plasenta (Butler dkk 1982 dan Julie Pare dkk 2008).

Kegiatan penelitian tahun 2017 menghasilkan 2 data riset terkait Penelitian dan Pengembangan Vaksin Iradiasi Mastitis dan Brucellosis serta PSPB terhadap Kesehatan dan Reproduksi Ternak. Kegiatan aplikasi teknik nuklir ini dilakukan untuk mendukung program Landmark BATAN dalam bidang Pangan (Pertanian / Peternakan) dan diharapkan dapat mendukung upaya peningkatan produk asal ternak yang sehat serta peningkatan ketersediaan dan ketahanan pangan nasional.

## **MATERI DAN METODE**

Kegiatan meliputi 3 sub kegiatan yaitu:

### **1. Uji lapang terbatas kandidat vaksin radiasi mastitis pada ternak ruminansia**

Pada penelitian kali ini menggunakan sapi perah peranakan *friesian Holstein* (PFH) yang berlokasi di Kawasan Usaha Peternakan (KUNAK) Kabupaten Bogor. Pemilihan hewan percobaan untuk uji lapang vaksin dengan kriteria sapi sehat dengan umur kebuntingan 6-7 bulan. Status kesehatan ambing juga diperiksa dengan melakukan uji California Mastitis Test. Sapi yang akan digunakan adalah sapi dengan hasil CMT negatif. Hewan percobaan dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok vaksin (V) yang diberi SGB iradiasi secara subkutan dengan dosis  $10^8$  cfu/ ml sebanyak 4 ml/ sapi, dan kelompok kontrol (K) yaitu hewan normal yang tidak diberi vaksin SGB iradiasi. Koleksi sampel darah dari vena ekor dilakukan tiap 2 minggu sekali (Crowther 2010). Pemeriksaan darah dilakukan untuk mengetahui status hematologi hewan.

### **2. Uji in vivo *Brucella abortus* pada mencit (*Mus musculus*).**

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit (*Mus musculus*) Strain BALB/c yang diperoleh dari PT Indoanilab. Mencit memiliki usia dan berat badan yang relatif seragam. Perlakuan terhadap hewan uji, hewan uji dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu uji yaitu kelompok 1 yaitu normal tanpa perlakuan (diberikan NaCl; kontrol negatif), kelompok 2 yaitu dengan hanya *B. abortus* (kontrol positif), kelompok 3 dilakukan vaksin danantang, kelompok 4, kelompok dengan vaksin tanpaantang. Pengambilan sampel organ limpa dan testis dilakukan setelah hewan dieuthanasia dengan metode *cervical dislocation* atau dengan menginjeksikan agen euthanasia pentobarbital (100 mg/kg) secara IP. Euthanasi mencit (*Mus musculus*) dengan metode cervical dislocation didahului dengan anestesi (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013

Edition). Kegiatan pengambilan sampel organ dilakukan secara aseptik. Organ dimasukkan ke tempat steril untuk dianalisis di laboratorium. Parameter yang diamati yaitu perubahan histopatologi organ limpa dan testis. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus.

### **3. Produksi antibodi PSPB**

Bahan uji pada persiapan produksi antibodi PSPB yaitu imunogen PSPB yang diisolasi menggunakan HPLC preparatif dengan kolom *size exclusion chromatography*. Pengadaan hewan uji berupa kelinci *New Zealand White* (NZW) diperoleh dari PT Indoanilab dengan jenis kelamin betina dan bobot sekitar 2 Kg, pakan, pengaya lingkungan dan fasilitas penunjang. Kelinci dipelihara di Laboratorium hewan terpadu PAIR, BATAN. Hewan uji dilakukan aklimatisasi selama kurang lebih 2 minggu dilanjutkan dengan koleksi darah awal (*test bleed*). Imunisasi utama dilakukan menggunakan emulsi PSPB dalam *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) dan dua minggu berikutnya darah dikoleksi melalui vena telinga. Perlakuan *booster* dilakukan seminggu setelah koleksi darah terakhir menggunakan emulsi PSPB dalam *Freund's Incomplete Adjuvant* (FICA). Perlakuan *booster* dilakukan pengulangan sampai empat kali. Darah yang diperoleh dikoleksi serumnya. Antibodi serum darah diuji menggunakan teknik aglutinasi yang ditantang menggunakan darah sapi bunting pada tingkat pengenceran yang berbeda.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Kegiatan pengambilan sampel susu dan darah dilakukan sebagai bagian dari uji lapang lanjutan pada sapi perah bunting usia 6-7 bulan. Lokasi penelitian berada di KUNAK Kabupaten Bogor. Koleksi sampel darah dan susu untuk pengujian CMT dilakukan pada kelompok kontrol (hewan tidak diberi vaksin) dan kelompok perlakuan (hewan diberi vaksin iradiasi mastitis). Hasil pemeriksaan gambaran darah merah sapi pada uji lapang terbatas menunjukkan tidak terjadi anemia, karena masih dalam kisaran normal (Gavan *et.al* 2010) : Sel darah merah :  $5-10 \times 10^6$  sel/ $\mu$ l ; Haemoglobin : 8-15 %; Hematokrit 24-46 %. Hasil pemeriksaan Total leukosit sapi perlakuan mengalami peningkatan signifikan dan berbeda nyata dengan sapi kontrol secara berturut-turut pada postvaksinasi I, II, dan III. Adanya peningkatan jumlah leukosit menunjukkan bahwa vaksin iradiasi *S. agalactiae* bersifat imunogenik sehingga berhasil meningkatkan respon pertahanan seluler maupun humoral (Inoue, 2017).

Tabel 1. Rataan jumlah eritrosit induk sapi FH kelompok kontrol dan perlakuan sebelum dan sesudah pemberian vaksin iradiasi *Streptococcus agalactiae*

Pengambilan darah	Rataan Jumlah eritrosit ( $\times 10^6$ sel/ $\mu$ L)	
	Kontrol	Perlakuan
Sebelum vaksinasi	6.11 $\pm$ 1.05 <sup>aA</sup>	4.18 $\pm$ 0.75 <sup>aB</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi I	6.57 $\pm$ 2.23 <sup>aA</sup>	5.47 $\pm$ 0.87 <sup>aB</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi II	6.04 $\pm$ 0.96 <sup>aA</sup>	5.93 $\pm$ 0.76 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi III	5.78 $\pm$ 2.31 <sup>aA</sup>	5.78 $\pm$ 0.71 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi IV	4.96 $\pm$ 1.09 <sup>aA</sup>	5.38 $\pm$ 0.89 <sup>aB</sup>
4 minggu sesudah vaksinasi IV	4.90 $\pm$ 0.12 <sup>aA</sup>	6.00 $\pm$ 1.53 <sup>aA</sup>
6 minggu sesudah vaksinasi IV	5.05 $\pm$ 1.08 <sup>aA</sup>	6.43 $\pm$ 1.18 <sup>aA</sup>
Nilai normal	5-10 (Gavan <i>et. al</i> 2010)	

Keterangan : - Huruf superskrip kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).  
 - Huruf superskrip kapital yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).

Tabel 2. Kadar hemoglobin induk sapi FH kelompok kontrol dan perlakuan sebelum dan sesudah pemberian vaksin iradiasi *S. agalactiae*

Pengambilan darah	Rataan Hb (gram %)	
	Kontrol	Perlakuan
Sebelum vaksinasi	9.13 $\pm$ 1.10 <sup>aA</sup>	10.56 $\pm$ 1.11 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi I	10.07 $\pm$ 1.03 <sup>aA</sup>	10.72 $\pm$ 2.05 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi II	10.40 $\pm$ 0.53 <sup>aA</sup>	10.48 $\pm$ 0.94 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi III	11.20 $\pm$ 0.69 <sup>aA</sup>	10.92 $\pm$ 1.11 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi IV	9.07 $\pm$ 1.70 <sup>aA</sup>	10.48 $\pm$ 1.93 <sup>aA</sup>
4 minggu sesudah vaksinasi IV	9.87 $\pm$ 1.89 <sup>aA</sup>	10.08 $\pm$ 0.87 <sup>aA</sup>
6 minggu sesudah vaksinasi IV	10.20 $\pm$ 1.22 <sup>aA</sup>	9.48 $\pm$ 0.46 <sup>aA</sup>
Nilai normal	8-15 (Gavan <i>et. al.</i> 2010)	

Keterangan : - Huruf superskrip kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).  
 - Huruf superskrip kapital yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).

Tabel 3. Nilai hematokrit induk sapi FH kelompok kontrol dan perlakuan sebelum dan sesudah pemberian vaksin iradiasi *Streptococcus agalactiae*

Pengambilan darah	Rataan Hematokrit (%)	
	Kontrol	Perlakuan
Sebelum vaksinasi	32.00 $\pm$ 1.80 <sup>aB</sup>	32.05 $\pm$ 4.52 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi I	34.58 $\pm$ 2.55 <sup>aA</sup>	34.50 $\pm$ 3.32 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi II	31.33 $\pm$ 0.76 <sup>aB</sup>	32.70 $\pm$ 1.20 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi III	34.50 $\pm$ 3.91 <sup>aA</sup>	33.00 $\pm$ 1.58 <sup>aA</sup>
2 minggu sesudah vaksinasi IV	29.00 $\pm$ 1.73 <sup>aB</sup>	32.50 $\pm$ 2.52 <sup>aA</sup>
4 minggu sesudah vaksinasi IV	31.00 $\pm$ 2.78 <sup>aB</sup>	33.25 $\pm$ 2.19 <sup>aA</sup>
6 minggu sesudah vaksinasi IV	30.50 $\pm$ 2.78 <sup>aB</sup>	32.45 $\pm$ 2.73 <sup>aA</sup>
Nilai normal	24-46 (Gavan <i>et. al</i> 2010)	

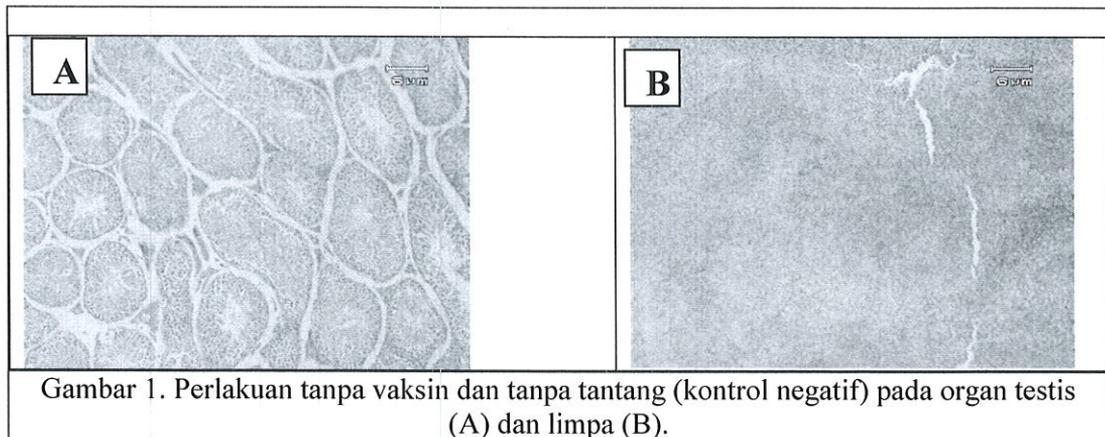
Keterangan : - Huruf superskrip kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).  
 - Huruf superskrip kapital yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).

Tabel 4. Hasil pengamatan rata-rata total leukosit sapi FH kontrol dan perlakuan vaksinasi iradiasi *S. agalactiae*

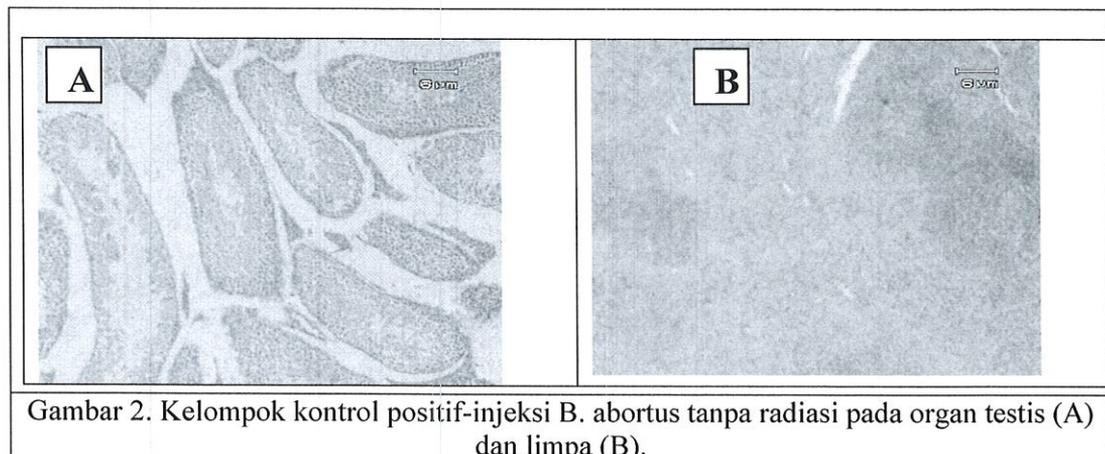
Pengambilan darah	Rataan total leukosit (sel/ $\mu$ l)	
	Kontrol	Perlakuan
Sebelum vaksinasi	6583 $\pm$ 1613 <sup>aA</sup>	5100 $\pm$ 627 <sup>cA</sup>
2 minggu setelah vaksinasi I	5517 $\pm$ 702 <sup>aA</sup>	8370 $\pm$ 1627 <sup>bB</sup>
2 minggu setelah vaksinasi II	6483 $\pm$ 425 <sup>aA</sup>	10020 $\pm$ 630 <sup>abB</sup>
2 minggu setelah vaksinasi III	8333 $\pm$ 702 <sup>aA</sup>	11175 $\pm$ 1839 <sup>abB</sup>
2 minggu setelah vaksinasi IV	7750 $\pm$ 2125 <sup>aA</sup>	7913 $\pm$ 1862 <sup>bA</sup>
4 minggu setelah vaksinasi IV	5933 $\pm$ 732 <sup>aA</sup>	7590 $\pm$ 2815 <sup>bA</sup>
6 minggu setelah vaksinasi IV	6983 $\pm$ 2446 <sup>aA</sup>	8510 $\pm$ 1811 <sup>bA</sup>

Keterangan : - Huruf superskrip kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).  
 - Huruf superskrip kapital yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ).

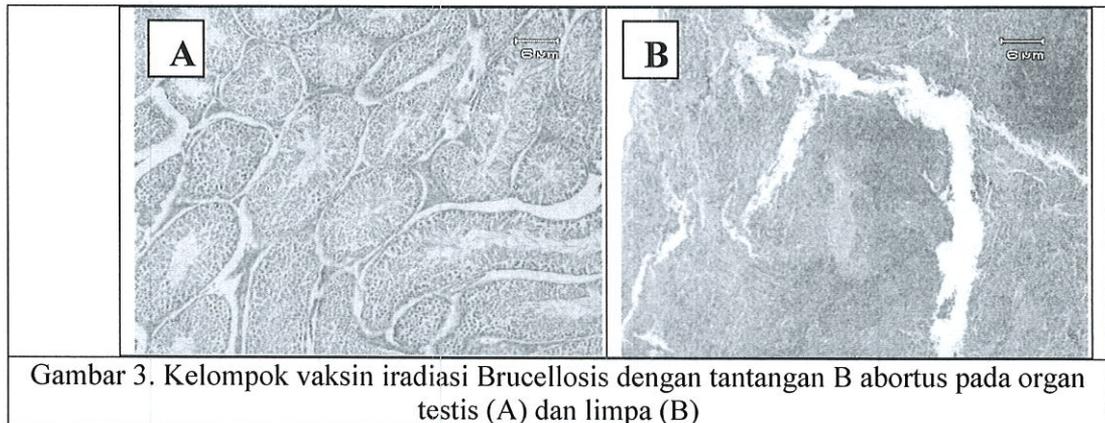
Pada kegiatan penelitian uji in vivo vaksin iradiasi brucellosis pada mencit dilakukan pengamatan hitopatologi pada organ testis dan limpa seperti terlihat pada Gambar 1, 2, 3 dan 4.



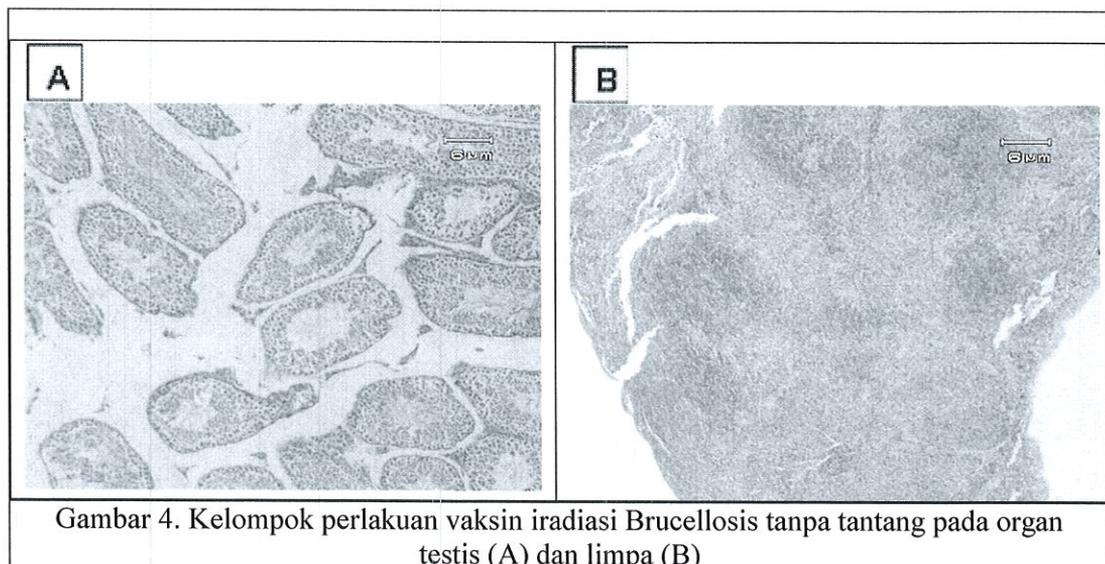
Gambar 1. Perlakuan tanpa vaksin dan tanpa tantang (kontrol negatif) pada organ testis (A) dan limpa (B).



Gambar 2. Kelompok kontrol positif-injeksi B. abortus tanpa radiasi pada organ testis (A) dan limpa (B).



Gambar 3. Kelompok vaksin iradiasi Brucellosis dengan tantangan B abortus pada organ testis (A) dan limpa (B)

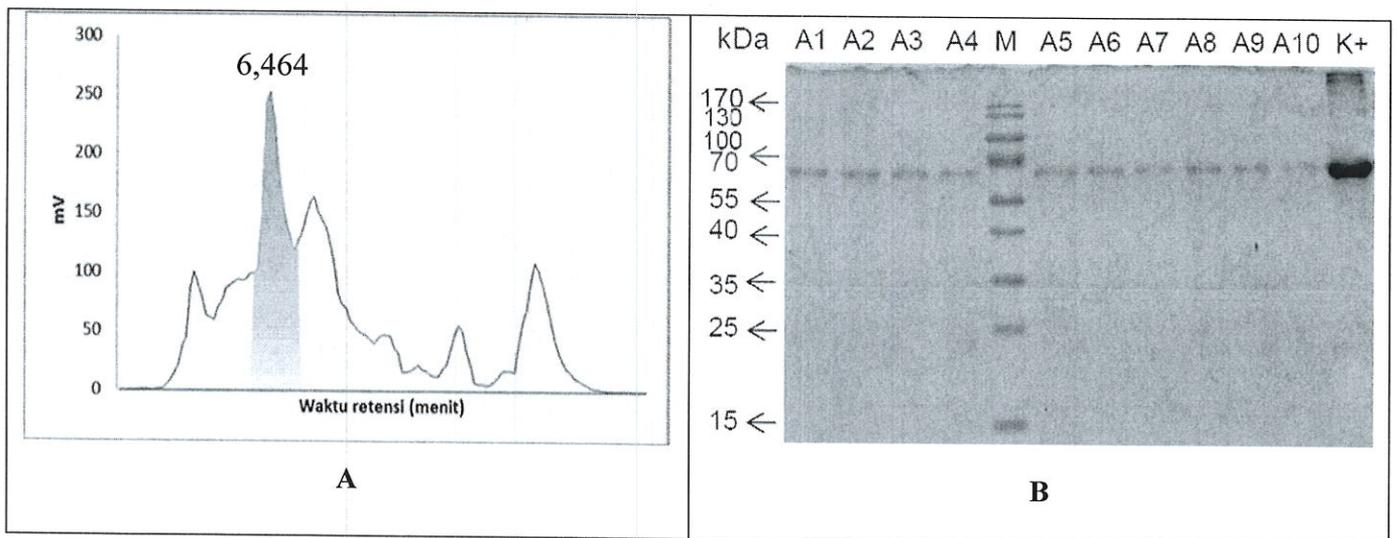


Gambar 4. Kelompok perlakuan vaksin iradiasi Brucellosis tanpa tantang pada organ testis (A) dan limpa (B)

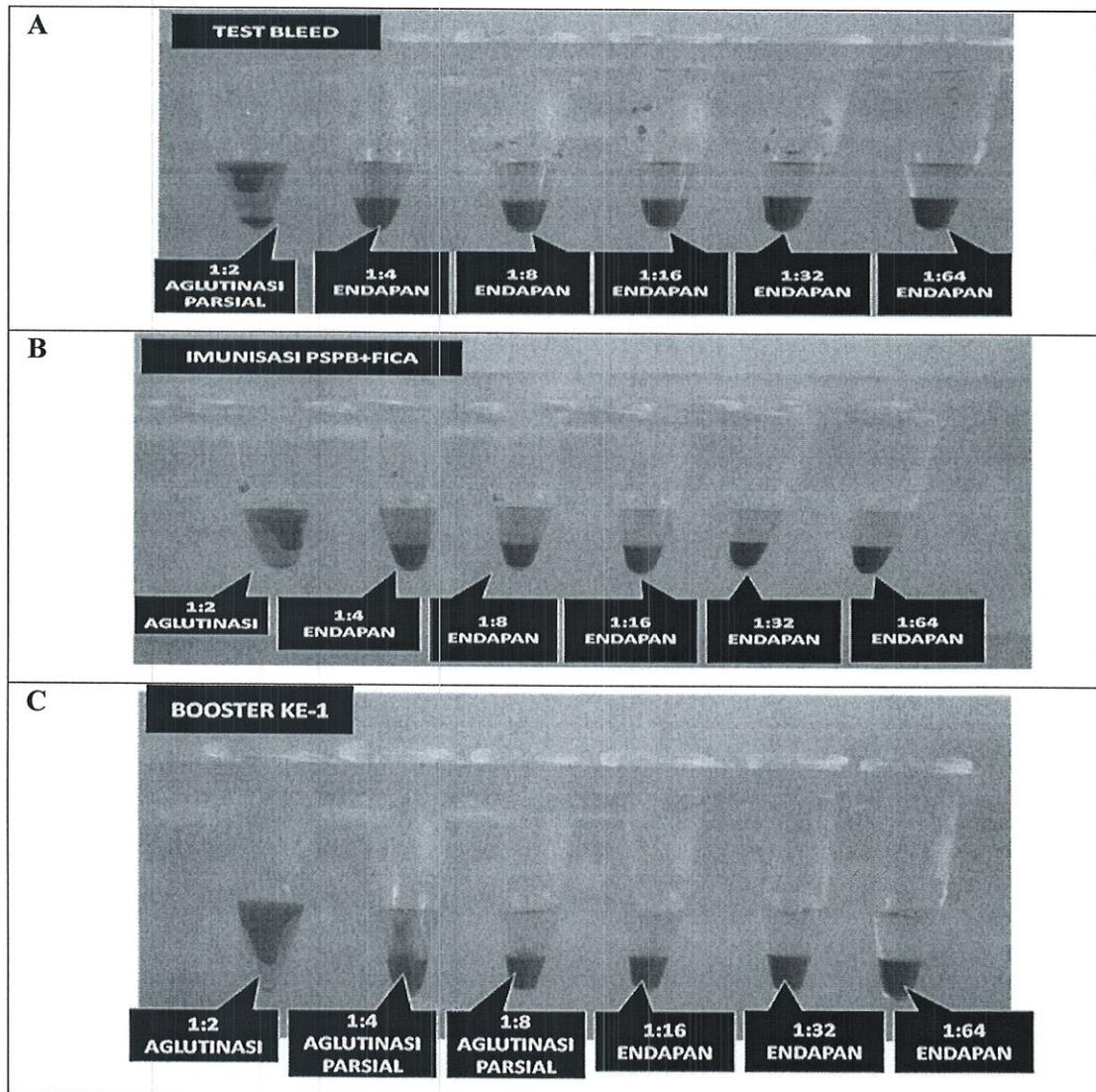
Berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi testis mencit kelompok kontrol menunjukkan tidak terdapat kelainan spesifik, sedangkan pada mencit kelompok tantang dengan perlakuan infeksi *B. abortus* (Gambar 2) terlihat bahwa organ limpa lebih aktif dibandingkan dengan kontrol. Pada kelompok vaksin dan tantang (Gambar 3) menunjukkan 60% hewan organ limpanya aktif. Pada penelitian ini, pemberian vaksin tantang memberikan perlindungan sekitar 40% pada hewan model mencit sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk meningkatkan kadar perlindungan melalui serangkaian uji *in vivo*.

Kegiatan penelitian produksi antibodi PSPB pada kelinci dilakukan dengan menginjeksikan imunogen PSPB. Imunogen PSPB merupakan glikoprotein yang diproduksi oleh plasenta dari sapi peranakan ongole (PO). Dari hasil isolasi menggunakan

HPLC dengan kolom SEC dan karakterisasinya diketahui PSPB tersebut memiliki berat molekul 63-65 KDa (Gambar 5). Isolat tersebut kemudian dipergunakan sebagai imunogen untuk produksi antibodi PSPB melalui hewan uji kelinci NZW. Serum darah kelinci sampai dengan *booster* terakhir dilakukan penentuan titer dengan hasil terjadinya reaksi aglutinasi pada pengenceran 1:8, sehingga dapat diketahui titer antibodi tersebut sebesar 8 HA unit (Gambar 6). Hal ini menunjukkan kecenderungan peningkatan antibodi hasil stimulasi dari imunisasi utama dan *booster*, sehingga pada *booster* selanjutnya diperkirakan terjadi peningkatan titer antibodi yang lebih tinggi.



Gambar 5. Kromatogram puncak PSPB pada waktu retensi 6.464 menit (A) dan isolat hasil separasi HPLC (A1-A10) (B).



Gambar 6. Penentuan titer antibodi (A) pra imunisasi (*test bleed*), (B) imunisasi utama dan *booster* pertama (C).

## KESIMPULAN

Dari 3 subkegiatan tersebut dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil pemeriksaan gambaran darah merah sapi pada uji lapang terbatas menunjukkan tidak terjadi anemia, karena masih dalam kisaran normal : Sel darah merah :  $5-10 \times 10^6$  sel/ $\mu$ l ; Haemoglobin : 8-15 %; Hematokrit 24-46 %. Dari pemeriksaan sel darah putih/ Leukosit menunjukkan bahwa vaksin iradiasi Mastitis bersifat imunogenik sehingga berhasil meningkatkan respon kekebalan sapi.

2. Hasil pemeriksaan testis mencit kelompok kontrol tidak menunjukkan kelainan spesifik, sedangkan pada kelompok vaksin danantang menunjukkan 60% hewan organ limpanya aktif.
3. Diperolehnya reaksi aglutinasi pada pengenceran 1:8, sehingga dapat diketahui titer antibodi tersebut sebesar 8 HA unit. Uji Antigen PSPb pada kelinci menunjukkan kecenderungan peningkatan antibodi hasil stimulasi dari imunisasi utama dan booster.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Samik. Identifikasi Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) Dari Air Susu Sapi Perah Bunting. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan* Vol. 4, No. 1, Februari 2011.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Vengr JM. 1988. *Techniques for The Brucellosis Laboratory*. Paris: Institute National De La Recherche Agronomique
- Arifin, M., E. Pudjiastuti, B.J. Tuasikal, E. Yulia, "Pengaruh irradiasi terhadap Immunogenitas *Brucella abortus*", Risalah Seminar Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi untuk Litbang bidang Pertanian, Peternakan, Industri dan Lingkungan dalam Pembangunan Nasional, P3TIR-BATAN, Jakarta 17-18 Februari 2004.
- AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition
- Butler JE, amilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, William RJ. Detection and Partial Characterization of Two Bovine Pregnancy-Specific Protein. *Boil Reprod* 1982; 26:975-933.
- Diano, M., Le Bivic, A. and Hirn, M. A Method for Production of Highly Specific Polyclonal Antibodies. *Analytical Biochemistry*; 166: 224-229, 1987.
- Frankantony PB, Ravichandra U, Ramya V, Pradeep XD. 2015. Animal Lab Environment for Better Research: A Short Communication. *International Journal of Advanced Health Sciences*, Vol 2 (7): 10-14.
- Găvan C, Retea C, Motorga V. 2010. Changes in the hematological profile of holstein primiparous in periparturient period and in early to mid lactation. *Animal Science and Biotechnologies*. 43 (2) : 244-246.
- Ghaffar A. 2010. Bacteriology. Zoonoses *Listeria*, *Franciella*, *Brucella*, *Bacillus* and *Yersina*. Chapter seven. Microbiology and immunology on line. Microbiology and immunology on line. The University of South Carolina.
- Idriss SHE, Foltys V, Tančín V, Kirchnerová K, Tančinová D, Zaujec K. 2014. Mastitis pathogens and their resistance against Antimicrobial agents in dairy cows in Nitra, Slovakia. *Slovak J. Anim. Sci.*, 47, 2014 (1): 33-38.

- Inoue S. 2017. Leukocytosis [internet].[diakses pada 2017 Mei 7]. Tersedia pada : <http://emedicine.medscape.com/article/956278-overview#a6>
- OIE World Organization for Animal Health. 2009. OIE Terrestrial Manual Chapter 2. 4. 3. Bovine brucellosis. [www.oie.int](http://www.oie.int).
- Permentan PERATURAN MENTERI PERTANIAN. 2010. Permentan Nomor 16/Permentan/OT.140/1/2010. Pedoman Identifikasi dan Pengawasan Ternak Ruminansia Besar
- Sadeq E, Jafar M, Leili AM, Jalal A, Mehdi Y, Majid A, Somayeh D, Zahra M, Elmira Z. 2015. Production and Purification of a Polyclonal Antibody Against Purified Mouse IgG2b in Rabbits Towards Designing Mouse Monoclonal Isotyping Kits. *Adv Pharm Bull.* Vol 5 (1):109-113.
- Setiatin, E.T. Purifikasi Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein (ovPAG) dalam Kotiledon Plasenta dan Pengukuran Konsentrasinya dalam Urine domba Garut. Ringkasan Disertasi. Sekolah Pascasarjana. IPB, Bogor. 2010
- Shearer JK and Harris B Jr. 2003. Mastitis in dairy goats. University of Florida, Ifas extention. <http://edis.ifas.ufl.edu>. [28 Juli 2010].
- Tjiptosumirat, T., I. Sugoro dan N. Lelaningtyas. Identifikasi Senyawa Protein Spesifik Kebuntingan Tipe B (Pspb) Hasil Filtrasi Dengan Sephadex-Gel 75 Sebagai Bahan Senyawa Deteksi Kebuntingan Dini. *Prosiding Seminar ilmiah Hasil Penelitian Aplikasi isotop dan Radiasi.* (2008). 393-399.
- WHO World Health Organization. 1997. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting. Geneva, Switzerland