

PENGEMBANGAN *INDIRECT* ELISA UNTUK MENGUJI KEBERADAAN ANTIBODI *Gallibacterium anatis* PADA AYAM PETELUR

RAUDATUL JANNAH



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIS HEWAN
PEMINATAN MIKROBIOLOGI MEDIK
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Pengembangan *Indirect ELISA* untuk Menguji Keberadaan Antibodi *Gallibacterium anatis* Pada Ayam Petelur” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Januari 2026
Raudatul Jannah
B3501232045

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

RAUDATUL JANNAH. Pengembangan *Indirect* ELISA untuk Menguji Keberadaan Antibodi *Gallibacterium anatis* Pada Ayam Petelur. Dibimbing oleh AGUSTIN INDRAWATI, SRI MURTINI, dan RYAN SEPTA KURNIA.

Gallibacterium anatis merupakan bakteri patogen yang menyebabkan gallibacteriosis pada unggas. Infeksi oleh *G. anatis* menyebabkan penurunan produksi telur hingga 30% dan epididimitis pada ayam jantan. Kejadian infeksi *G. anatis* dilaporkan meningkat dalam beberapa tahun terakhir dan digolongkan sebagai *Emerging disease*. Variabilitas genomik dan fenotipik antar isolat lapang, menjadi tantangan dalam pengembangan diagnostik dan vaksin yang efektif. Metode deteksi berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) selama ini lebih berfokus pada identifikasi agen penyakit, sementara data serologis *G. anatis*, khususnya di Indonesia masih terbatas. Berdasarkan permasalahan tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan dan menyeleksi antigen *G. anatis* isolat lokal sebagai protein deteksi pada uji *indirect Enzyme Link Immunosorbant Assay* (ELISA) serta untuk memperoleh gambaran seroprevalensi *G. anatis*.

Penelitian diawali dengan karakterisasi isolat arsip secara biologis dan molekular. Isolat selanjutnya digunakan untuk pembuatan vaksin oil adjuvant untuk imunisasi serta produksi sel bakteri untuk ekstraksi antigen. Sampel antigen hasil perlakuan diukur konsentrasinya dengan UV-Spektrofotometer, kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE dan *Western blotting*. Serum kontrol positif digunakan dalam proses optimasi *in-house* ELISA, yang selanjutnya diterapkan menggunakan serum sampel lapang.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengembangan *indirect* ELISA untuk menguji keberadaan antibodi *G. anatis* berhasil dilakukan. Berdasarkan hasil optimasi, antigen dengan perlakuan sonikasi pada konsentrasi 7,1 µg/mL terpilih sebagai kandidat optimal sebagai *coating*. Antigen sonikasi juga menunjukkan risiko reaksi silang yang lebih rendah dibanding perlakuan lain. Pengujian konjugat antibodi sekunder diperoleh optimal pada pengenceran 1:8000 dan menghasilkan rasio P/N tertinggi (4,07) dengan *background noise* minimal.

Berdasarkan pengamatan uji patogenisitas, gejala klinis berupa pembengkakan pada infraorbital dan *nassal discharge* mulai muncul pada hari ke-2 pasca infeksi, dengan peningkatan gejala dominan pada kelompok infeksi antara hari ke-6 hingga ke-14. Sementara itu, pada kelompok transmisi gejala klinis terjadi pada hari ke-8 hingga ke-10 sebelum menurun pada hari ke-12 dan ke-14. Uji patogenisitas menunjukkan nilai S/P kelompok infeksi berada pada rentang 0,047–0,204, dengan nilai *cut-off* masing-masing 0,156 (±2SD) dan 0,189 (±3SD). Hasil sensitivitas dan spesifisitas yang diperoleh masing-masing 85% dan 94%. Pada pengujian *in-house* ELISA dari 56 serum lapang diperoleh nilai seroprevalensi *G. anatis* 64%.

Kata Kunci: Antigen, *Gallibacterium anatis*, *Indirect* ELISA, Sonikasi



SUMMARY

RAUDATUL JANNAH. Development on Indirect ELISA to Test the Presence of *Gallibacterium anatis* Antibodies in Laying Hens. Supervised by AGUSTIN INDRAWATI, SRI MURTINI, and RYAN SEPTA KURNIA.

Gallibacterium anatis is a pathogenic bacteria that cause gallibacteriosis in poultry. Infection by *G. anatis* can lead to decreased egg production up to 30% and also cause epididymitis in roosters. Reports indicate that the incidence of *G. anatis* infection has increased in recent years, and the pathogen is now classified as an emerging disease. Genomic and phenotypic variability among field isolates, as well as frequent co-infections with other bacteria such as APEC, present significant challenges in developing effective diagnostic tools and vaccines. Current PCR-based detection methods primarily focus on identifying the pathogen, whereas data on the seroprevalence of *G. anatis*, particularly in Indonesia, remain limited. Based on these gaps, the present study aimed to develop and select optimal antigens from local *G. anatis* isolates for use as detection proteins in an indirect ELISA, and to generate preliminary data on the seroprevalence of *G. anatis* in layer commercial farms in West Java. This study offers valuable benefits by providing more accurate diagnostic antigen candidates and initial insights into the field-level distribution of *G. anatis* infection.

The study began with biological and molecular characterization of the archived isolate. The isolate was subsequently used for the preparation of an oil-adjuvanted vaccine for immunization, as well as for bacterial cell production for antigen extraction. Antigen samples from each treatment were quantified using a UV spectrophotometer and further analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Positive control serum was used during the optimization of the in-house ELISA, which was later applied to field serum samples.

The results demonstrated successful development of indirect ELISA to test the presence of antibodies. Optimization identified the sonicated antigen, at a concentration of 7.1 µg/mL, as the most suitable coating antigen, with a lower risk of cross-reactivity compared to other treatments. The optimal dilution for the secondary antibody conjugate was determined to be 1:8000, yielding the highest P/N ratio (4.07) with minimal background noise.

Pathogenicity assessment showed that clinical signs first appeared at 2 days post-infection (dpi), with the most pronounced symptoms in the infection group occurring between 6 and 14 dpi. In the transmission group, clinical signs increased from 8 to 10 dpi before declining at 12 and 14 dpi. The pathogenicity test produced OD values ranging from 0.047 to 0.204 in the infection group, with cut-off values of 0.156 (±2SD) and 0.189 (±3SD), with sensitivity and specificity values of 85% and 94% respectively. ELISA testing of 56 field serum samples collected from six layer farms (8–48 weeks of age) revealed that 8-week-old chickens had the lowest mean S/P ratio (0.088), which increased at 14 weeks of age (0.179) and peaked at 36 weeks of age (0.530). The relatively lower and more uniform S/P values observed in the 14-week groups likely reflect the more stable immune status of younger adult chickens, resulting in milder exposure and lower antibody production.

Keywords: Antigen, *Gallibacterium anatis*, Indirect ELISA, Sonication



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2026
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB



PENGEMBANGAN *INDIRECT* ELISA UNTUK MENGUJI KEBERADAAN ANTIBODI *Gallibacterium anatis* PADA AYAM PETELUR

RAUDATUL JANNAH

Tesis
sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Magister Ilmu Biomedis Hewan

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIS HEWAN
PEMINATAN MIKROBIOLOGI MEDIK
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Tesis

1. Prof. Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS



Judul Tesis : Pengembangan *Indirect* ELISA Untuk Menguji Keberadaan
Antibodi *Gallibacterium anatis* Pada Ayam Petelur
Nama : Raudatul Jannah
NIM : B3501232045

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui Oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. drh. Agustin Indrawati, M.Biomed

Pembimbing 2:
Dr. drh. Sri Murtini, M.Si

Pembimbing 3:
Dr. drh. Ryan Septa Kurnia, M.Si

Diketahui Oleh

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis Hewan:
Prof. drh. Bambang Pontjo Priosoeryanto, M.S, Ph.D,
APVet, DACCM
NIP 196002281986011001

Dekan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis:
Prof. drh. Amrozi, Ph.D
NIP 197007211995121001

Tanggal Ujian: 6 Januari 2026

Tanggal Lulus:

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanaahu wa Ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Penelitian ini telah dilaksanakan sejak bulan Maret 2025 sampai bulan September 2025 dengan judul “Pengembangan *Indirect* ELISA Untuk Menguji Keberadaan Antibodi *Gallibacterium anatis* Pada Ayam Petelur”. Dalam prosesnya, penulis telah melibatkan berbagai pihak, baik perorangan maupun lembaga yang telah memberikan kontribusi dalam penyelesaian tesis ini. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan kontribusi dalam membantu penyelesaian tesis ini:

1. Prof. Dr. drh. Agustin Indrawati, M. Biomed, Dr. drh. Sri Murtini, M. Si, dan Dr. drh. Ryan Septa Kurnia, M. Si yang telah membimbing, memberikan arahan, saran, dan nasihat selama proses penelitian dan penulisan tesis.
2. Prof. Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS yang telah bersedia menjadi dosen penguji luar komisi dalam ujian tesis penulis.
3. Dr. drh. Christian Marco Hadi Nugroho dan PT. Medika Satwa Laboratoris yang telah memberikan dukungan dan izin selama penelitian ini berlangsung.
4. Kedua orang tua penulis yaitu Bapak Syafrizal Syah (Alm) dan Ibu Habibah serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, do'a, dan kasih sayangnya. Doa dan semangat dari Ibu dan Bapak menjadi kekuatan utama bagi penulis menyelesaikan studi ini.
5. Rekan-rekan seperjuangan dalam program Magister atas kebersamaan, serta dukungan emosional yang telah membantu Penulis melewati berbagai tantangan akademik:
 - a. Mahasiswa Pascasarjana Peminatan Mikrobiologi Medik tahun akademik 2023/2024.
 - b. Genapkocak dan Trio Kreatif.
6. Seluruh staf dan tenaga pendidik Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor.
7. Pihak-pihak lain yang telah banyak berjasa dan membantu penyelesaian tulisan ini yang tidak bisa di sebutkan satu persatu.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Januari 2026

Raudatul Jannah



DAFTAR ISI

RINGKASAN	iii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xi
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Bakteri <i>Gallibacterium anatis</i>	3
2.2 Infeksi <i>Gallibacterium anatis</i> Pada Unggas	4
2.3 Antigen dan Antibodi	6
2.4 Metode Deteksi <i>Gallibacterium anatis</i>	7
III METODE	9
3.1 Persetujuan Komisi Etik Hewan	9
3.2 Waktu dan Tempat	9
3.3 Bahan dan Alat	9
3.4 Desain Penelitian	9
3.5 Prosedur Kerja	11
3.5.1 Kultur Bakteri <i>G. anatis</i>	11
3.4.2 Preparasi Antigen <i>Gallibacterium anatis</i>	12
3.4.3 Imunisasi Antigen <i>G. anatis</i> Pada Ayam Layer	12
3.4.4 Pengukuran Konsentrasi Protein Dengan UV-Spektrofotometri	13
3.4.5 Pengukuran Berat Molekul Protein Dengan SDS-PAGE	13
3.4.6 Konfirmasi Antigen-Antibodi dengan <i>Western Blotting</i>	14
3.4.7 Optimasi <i>Indirect</i> ELISA	14
3.4.8 Uji Patogenisitas	15
3.4.9 Pengujian indirect ELISA dengan Sampel Lapang	16
3.6 Analisis Data	16
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Sub-kultur dan Karakterisasi <i>Gallibacterium anatis</i>	17
4.2 Preparasi Antigen (Pengukuran Konsentrasi, SDS-PAGE, dan <i>Western-Blotting</i>)	19
4.3 Imunisasi pada Ayam Layer	22



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

4.4	Optimasi ELISA	24
4.5	Uji Patogenisitas	30
4.6	Pengujian ELISA dengan Sampel Serum dari Lapangan	34
V	SIMPULAN DAN SARAN	36
5.1	Simpulan	36
5.2	Saran	36
	DAFTAR PUSTAKA	37
	LAMPIRAN	42
	RIWAYAT HIDUP	44

DAFTAR TABEL

1.	Primer real-time PCR Gen Virulensi	12
1.	Tabel Kontingensi Diagnostik 2 x 2	16
2.	Optimasi Kandidat Antigen Pelapis	25
3.	Hasil Nilai P/N Pada Variasi Pengenceran Antigen dan Serum	28
4.	Skor Gejala Klinis Harian	31
5.	Kontingensi Diagnostik 2 x 2	32
6.	Validasi Diagnostik in-house ELISA	34

DAFTAR GAMBAR

1.	Morfologi koloni <i>Gallibacterium anatis</i>	3
2.	Koloni <i>G. anatis</i> biovar anatis dan <i>G. anatis</i> biovar hemolytica	4
3.	Gejala Klinis Infeksi <i>G. anatis</i>	5
4.	Tahapan Pengujian Indirect ELISA	7
5.	Diagram Penelitian	10
6.	Koloni bakteri <i>G. anatis</i> pada media agar darah.	17
7.	Hasil deteksi dengan qPCR.	19
8.	Konsentrasi antigen <i>G. anatis</i> dengan UV spektrofotometer	20
9.	Karakterisasi Protein	22
10.	Nilai S/P rasio pada serum hasil imunisasi	24
11.	Uji Spesifisitas Kandidat Antigen	27
12.	Optimasi Pengenceran Serum	28
13.	Optimasi Antibodi sekunder	30
14.	Skor Gejala Klinis Harian Uji Patogenisitas <i>G. anatis</i>	27
15.	Titer Antibodi Uji Patogenisitas	28
16.	Titer antibodi serum sampel lapang	30

DAFTAR LAMPIRAN

1.	Komposisi reagen SDS-PAGE	43
----	---------------------------	----