

Identifikasi Protein dan Seleksi Isolat *Trypanosoma evansi* Bersifat Imunogenik untuk Kandidat Pengembangan Imunoasai (Identification of Immunogenic Protein and Selection of *Trypanosoma evansi* Isolates as Candidate for Immunoassay Development)

Didik T. Subekti^{1*} & Ichwan Yuniarto²

¹ Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, ² Balai Veteriner Banjarbaru
Email: subekti@litbang.pertanian.go.id ; subektididik96@yahoo.com

Memasukkan: Januari 2018, Diterima: Juni 2018

ABSTRACT

Surra is a parasitic disease caused by *T. evansi* and causing high economic losses in Indonesia. Some isolates have been isolated from several areas experiencing outbreaks of Surra in Indonesia. The isolates have been reported to have a diversity of protein profiles based on SDS PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*). The research aims to identify immunogenic protein from each isolate and make the selection of *T. evansi* isolates which is potential as a source of antigens for immunoassay development. Each isolates were obtained to be purified from blood and then the protein was isolated. The proteins were run onto polyacrilamide gel electrophoresis and visualized by Coomassie blue. Another electrophoresis results were transferred onto a nitrocellulose membrane for immunoblotting. The results showed that the immunogenic proteins that consistently detected among nine *T. evansi* isolates of Indonesia are 100, 90, 85, 76-80, 70, 65, 55, 49-52, 44-46, 40, 34-36, 31-33 kDa. Among the nine *T. evansi* isolates, N372 isolate was selected as a candidate for immunoassay development, especially ELISA. Immunogenic proteins were specifically found on the N372 isolate are 85, 70, 65, 49-52, 44-46, 34-36, 31-33, 24-28, 15-20 kDa.

Keywords : *Trypanosoma evansi*, immunoblotting, protein profiles, immunogenic protein

ABSTRAK

Surra merupakan penyakit parasitik yang disebabkan *T. evansi* dan menyebabkan kerugian ekonomi yang besar di Indonesia. Beberapa isolat telah berhasil diisolasi dari daerah wabah Surra di Indonesia. Isolat-isolat tersebut telah dilaporkan memiliki keragaman profil protein berdasarkan SDS PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*). Penelitian bertujuan mengidentifikasi protein imunogenik dari masing-masing isolat *T. evansi* yang terseleksi berpotensi sebagai sumber antigen untuk pengembangan imunoasai. Setiap isolat yang diperoleh dimurnikan dari darah dan diisolasi proteinnya. Protein kemudian dielektroforesis pada gel poliakrilamida dan divisualisasikan dengan *coomassie blue*. Sebagian hasil elektroforesis dipindahkan pada membran nitroselulosa untuk imunoblotting. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein imunogenik yang konsisten terdeteksi pada kesembilan isolat *T. evansi* dari Indonesia yaitu 100, 90, 85, 76-80, 70, 65, 55, 49-52, 44-46, 40, 34-36 dan 31-33 kDa. Diantara kesembilan isolat *T. evansi* tersebut, isolat N372 berpotensi sebagai kandidat untuk pengembangan imunoasai terutama ELISA. Protein imunogenik yang khusus ditemukan pada isolat N372 adalah protein berukuran 85, 70, 65, 49-52, 44-46, 34-36, 31-33, 24-28, 15-20 kDa.

Kata Kunci : *Trypanosoma evansi*, imunoblotting, profil protein, protein imunogenik

PENDAHULUAN

Penyakit Surra disebabkan oleh *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*). Pada tahun 2010–2012 di Sumba telah terjadi wabah yang menyebabkan kematian sebanyak 1159 ekor kuda, 600 ekor kerbau dan seekor sapi (Dirkeswan 2012). Oleh karena kerugian yang ditimbulkan secara ekonomis cukup tinggi, maka pengembangan diagnosa dini untuk pengendalian penyakit Surra sangat diperlukan. Salah satu perangkat dalam pengendalian penyakit Surra adalah diagnosis dini dengan teknik seperti MHCT (*microhaematocrit*

technique), Serologi dengan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) dan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebagaimana direkomendasikan oleh OIE, *Office International des Epizooties* (OIE 2012). Adapun pernyataan bebas dari Surra untuk hewan ekspor maupun deklarasi status daerah bebas diharuskan melakukan diagnosa selama 40 hari dengan ELISA (OIE 2012).

Pada saat ini, beberapa *T. evansi* telah diisolasi dari hewan yang menderita Surra di berbagai provinsi di Indonesia. Isolat-isolat tersebut juga telah dikarakterisasi profil proteinnya. Subekti *et al.* (2017) telah melaporkan adanya

perbedaan profil protein berdasarkan SDS PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*) terhadap 11 isolat *T.evansi* yang telah diisolasi dari daerah wabah dan hewan terinfeksi dari Indonesia. Uche *et al.* (1992) telah melakukan penelitian untuk membandingkan profil protein dari *T.evansi* isolat dari Indonesia, Mesir dan Yaman. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa isolat Indonesia memiliki sedikit perbedaan dengan isolat Mesir tetapi keduanya memiliki perbedaan yang besar dibandingkan isolat dari Yaman. Singh *et al.* (1995) juga telah melaporkan adanya keragaman profil protein pada membran sel dari 7 isolat *T.evansi* dari India bagian utara. Bukti-bukti tersebut secara umum menunjukkan adanya keanekaragaman hayati pada populasi *T.evansi* termasuk di Indonesia.

Keragaman hayati dari isolat *T.evansi* yang dimanifestasikan dengan keragaman profil protein berkonsekuensi adanya kemungkinan keragaman protein imunogenik pada masing-masing isolat. Protein imunogenik merupakan protein yang mampu menggertak respon imun dari inang yaitu hewan yang terinfeksi *T.evansi*. Perbedaan tersebut akan menyebabkan timbulnya perbedaan hasil imunoblotting yang menggambarkan perbedaan respon pengenalan antibodi dari inang terhadap setiap protein *T.evansi*. Kondisi tersebut dapat menyebabkan keragaman respon imun yang mengenali berbagai protein dari masing-masing isolat.

Oleh karena itu pada penelitian ini hendak dipelajari kemungkinan adanya variasi protein imunogenik dari setiap isolat tersebut. Identifikasi protein imunogenik dari masing-masing isolat *T.evansi* akan membantu untuk menetapkan jenis protein imunogenik yang spesifik untuk *T.evansi*. Hal demikian juga sangat membantu dalam mengidentifikasi isolat *T.evansi* yang potensial dan bermanfaat untuk dijadikan kandidat sebagai sumber antigen untuk bahan uji diagnostik, khususnya imunoasai dengan teknik ELISA.

BAHAN DAN CARA KERJA

Antigen *T.evansi* yang digunakan dalam penelitian ini adalah TSA (*Trypanosome Soluble Antigen*) dari isolat P06, B87, S13, S18,

N374 dan N372 (BBLITVET), isolat A14 dan SPT (BVET V) dan isolat PLS (BVET III). TSA dikuantifikasi dengan metode Bradford menggunakan *BioRad Protein Assay* (BioRad, Perancis) yang menggunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma, USA), masing-masing pada konsentrasi 0; 0,5; 0,75; 1; 1,25 mg/mL. Masing-masing 10 uL TSA maupun protein standar dilarutkan dalam 190 uL larutan *Bradford* dihomogenisasi. Sampel (TSA maupun sampel baku) yang telah homogen diambil sebanyak 80 uL dan dimasukkan ke mikroplat (*flat bottomed 96well microplate*, Nunc - Denmark) kemudian dibaca pada *Multiskan EX Colorimeter Reader* (Thermo Scientific, Finlandia) pada 600 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh akan dikonversi menjadi kadar protein.

Empat jenis protein TSA secara acak dipilih untuk pengecekan pengenceran serum yang optimal. Keempat protein tersebut berasal dari isolat PLS, N372, N370 dan N374. Masing-masing TSA dari keempat isolat tersebut dilapiskan (*coating*) pada mikroplat *flat bottomed Nunc Maxisorp* dengan konsentrasi 5 ug/mL. Mikroplat diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 – 24 jam yang selanjutnya diikuti dengan pencucian menggunakan PBS-Tween 20 (0,05%) sebanyak 4 kali. Tahapan selanjutnya adalah *blocking* menggunakan PBS-Tween 20-BSA (0,5%) dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 – 24 jam. Mikroplat dicuci dengan PBS-Tween20 sebanyak 4 kali dan siap untuk digunakan.

Tiga serum standar yaitu FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma Chem), serum kontrol negatif dan serum kontrol positif untuk Surra yang akan diuji pada tiga pengenceran (1:100, 1:400 dan 1:800). Masing-masing serum pada pengenceran yang berbeda dimasukkan dalam sumuran mikroplat (100 uL/sumuran) dilakukan secara duplo. Mikroplat tersebut diinkubasi pada suhu 27°C selama satu jam dan selanjutnya mikroplat dicuci dengan PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali. Sebanyak 100 uL konjugat anti Bovine IgG – HRP (1:10.000) ditambahkan pada setiap sumuran dan kembali diinkubasi selama satu jam pada suhu 27°C. Mikroplat kembali dicuci dengan PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali, diikuti penambahan substrat TMB (*tetra methyl benzidine*) sebanyak 100 uL dan diinkubasi

pada suhu 27°C selama 10 – 20 menit. Setelah terjadi perubahan warna, reaksi dihentikan dengan 100 uL 2N H₂SO₄, kemudian mikroplat dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

Protein trypanosoma (TSA) dari masing-masing isolat dielektroforesis pada SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) 12% untuk membandingkan profil protein setiap isolat *T.evansi*. Sekitar 10 ug TSA dari masing-masing isolat dicampur (1:1) dengan *buffer sampel* (BioRad, Prancis). Setiap sampel dimasukkan kedalam lajur dari gel (*TGX™ pre cast gel 12%*, BioRad, Prancis) pada konsentrasi 10 ug / lajur bersama dengan marka protein (*Broad Range Spectra Multicolor*, Thermo Scientific). Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *Mini Protean* (BioRad) pada 150 volt sekitar 45-50 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue*.

Hasil elektroforesis sebagian ditransfer pada membran nitroselulosa menggunakan *Transblot Turbo* (BioRad, Prancis). Hasil transfer pada membran dicuci dengan air suling steril. Setelah membran nitroselulosa tersebut dicuci, membran kemudian di blok (*blocking*) dengan PBS-Tween 20-BSA selama satu jam. Membran nitroselulosa kembali dicuci dengan PBS-Tween 20, kemudian masing-masing direaksikan dengan 2 jenis serum negatif dan 4 serum positif Surra serta diinkubasi selama 1 jam. Membran nitroselulosa kembali dicuci dengan PBS-Tween 20 dan kemudian direaksikan dengan konjugat anti Bovine IgG – HRP (1:10.000) selama satu jam. Terakhir, membran dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 dan direaksikan dengan substrat ODN (*o dianisidine*) sekitar 15 – 30 menit. Setelah hasil reaksi tervisualisasikan, maka membran nitroselulosa dicuci dengan air suling steril.

HASIL

Pengenceran serum positif dan serum negatif

Serum negatif yang digunakan adalah serum sapi impor dari Australia yang bebas dari infeksi *T.evansi* (N1) dan serum komersial (N2) dari fetus sapi (*fetal bovine serum, FBS*). Adapun serum positif yang digunakan adalah P1

dan P2 yang berasal dari sapi yang terinfeksi *T.evansi* serta P3 dan P4 yang berasal dari kerbau yang terinfeksi *T.evansi*. Pada imunobloting terdapat beberapa faktor utama yang perlu diperhatikan, diantaranya adalah pengenceran serum positif dan serum negatif, pengenceran konjugat yang digunakan serta profil protein dari *T.evansi* pada SDS PAGE.

Penetapan pengenceran serum positif (seropositif) dan serum negatif (seronegatif) terhadap beberapa isolat *T.evansi* yaitu PLS, N372, N370 dan N374 telah ditampilkan pada Gambar 1. Pengenceran serum dengan nilai rasio P/N (perbandingan nilai absorbansi serum positif/P dengan absorbansi serum negatif/N) tertinggi menunjukkan pengenceran serum yang optimal. Adapun pengenceran konjugat 1:10.000 mengikuti pedoman yang diberikan oleh produsennya.

Hasil ELISA terhadap keempat isolat *T.evansi* (PLS, N372, N370 dan N374) menunjukkan adanya keragaman nilai absorbansi dan rasio P/N (Gambar 1). Nilai absorbansi dari sampel seronegatif umumnya berkisar antara 0,2 – 0,43 sedangkan nilai absorbansi sampel seropositif berkisar antara 0,49 – 1,09. Semakin rendah pengenceran serumnya, nilai absorbansi sampel seronegatif semakin meningkat. Sebaliknya nilai absorbansi sampel seropositif cenderung menurun. Hal ini menyebabkan nilai rasio P/N semakin kecil pada pengenceran serum yang rendah.

Profil protein imunogenik dan seleksi isolat *T.evansi* dari Indonesia

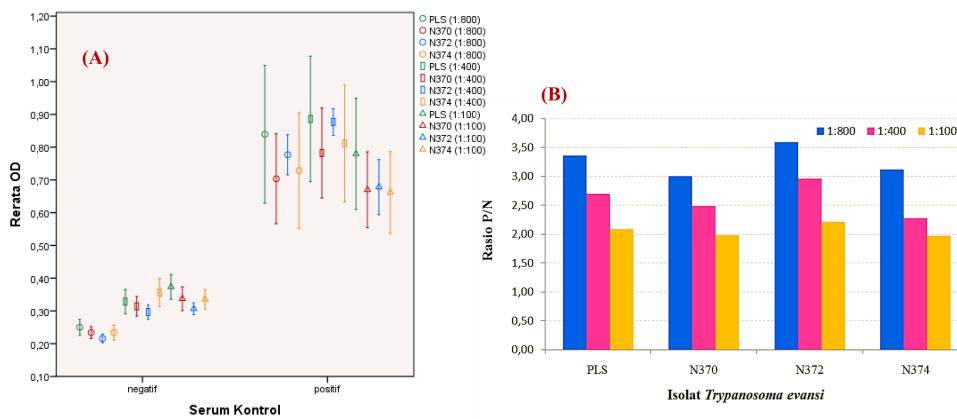
Profil protein dari sembilan isolat *T.evansi* (P06, B87, S13, S18, A14, PLS, N372, N374, dan SPT) pada gel poliakrilamid 12% diperlihatkan pada Gambar 2 sampai Gambar 6. Gambar 2 adalah profil protein hasil imunobloting dengan serum negatif dan serum positif terhadap *T.evansi* isolat P06 dan B87. Pada isolat P06, nampak terlihat adanya reaksi non spesifik pada beberapa pita protein yang direaksikan dengan serum negatif (Gambar 2.A). Sebaliknya pita protein spesifik dari isolat P06 yang dikenali oleh serum positif dari kerbau juga sangat sedikit, terutama pada ukuran >70 kDa. Adapun reaksi non spesifik pada pita protein dari isolat B87 jauh lebih

banyak dibanding isolat P06 (Gambar 2.B). Demikian pula halnya pita protein spesifik dari isolat B87 yang dikenali oleh serum positif juga sangat sedikit. Umumnya reaksi hanya terjadi dengan serum positif dari kerbau yang mengenali pita protein berukuran >70 kDa (Gambar 2.B).

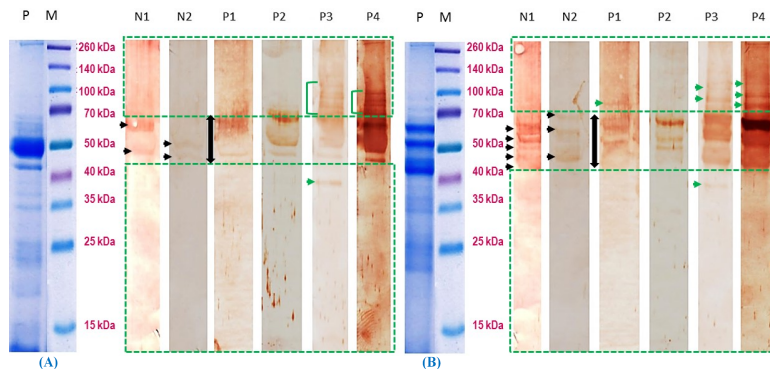
Gambar 3 merupakan profil protein hasil imunobloting dengan serum negatif dan positif terhadap *T.evansi* isolat S18 dan S13. Reaksi non spesifik yang terjadi pada pita protein dari isolat S18 merupakan yang terbanyak (Gambar 3.A), sementara reaksi spesifik terutama terdeteksi pada serum positif dari kerbau. Banyaknya pita non spesifik yang terdeteksi

pada isolat S18 menyebabkan isolat tersebut sangat tidak memadai sebagai sumber antigen untuk uji serologis. Adapun pada isolat S13, reaksi non spesifik yang terjadi juga cukup banyak (Gambar 3.B) sebagaimana yang telah terjadi pada isolat B87. Reaksi oleh antibodi yang spesifik mengenali pita protein isolat S13 juga terbatas sehingga serupa dengan tiga isolat lainnya (P06, B87 dan S18).

Pada Gambar 4, memperlihatkan profil protein hasil imunobloting dengan serum negatif dan positif terhadap *T.evansi* isolat SPT dan A14. Reaksi non spesifik terdeteksi pada beberapa pita protein dari isolat SPT, namun beberapa pita protein imunogenik yang spesifik



Gambar 1. Hasil ELISA terhadap serum seronegatif dan seropositif Surra pada berbagai tingkat pengenceran serum (1:100, 1:400 dan 1:800). OD = nilai absorbansi hasil ELISA. Rasio P/N = nilai absorbansi serum seropositif / nilai absorbansi serum seronegatif. (A). Perbandingan nilai absorbansi antara serum seronegatif dengan seropositif menggunakan empat antigen yang berbeda. (B). Rasio P/N pada berbagai pengenceran serum dari masing-masing antigen yang berbeda (empat isolat *T.evansi* yang berbeda)

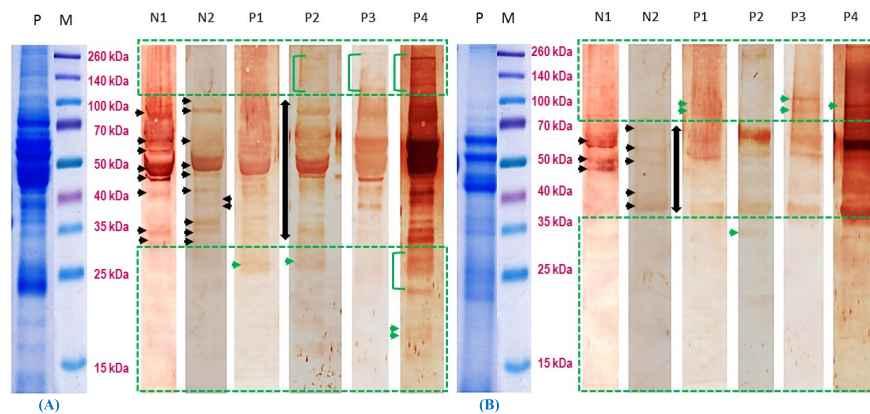


Gambar 2. Profil protein hasil imunobloting terhadap antigen *T.evansi* isolat P06 (A) dan B87 (B) dengan serum negatif dan serum positif. (P). Profil protein SDS PAGE 12% ; (M). Protein penanda ; (N1). Serum negatif dari Sapi Australia ; (N2). Serum negatif dari FBS komersial ; (P1 - P2). Serum positif dari sapi terinfeksi alamiah ; (P3 - P4). Serum positif dari kerbau terinfeksi secara alamiah. Panah hitam = area dan pita protein yang menunjukkan reaksi silang / reaksi non spesifik. Kotak hijau = area identifikasi pita protein imunogenik yang spesifik. Panah hijau / tanda kurung hijau = pita protein imunogenik yang spesifik penanda infeksi *T.evansi*.

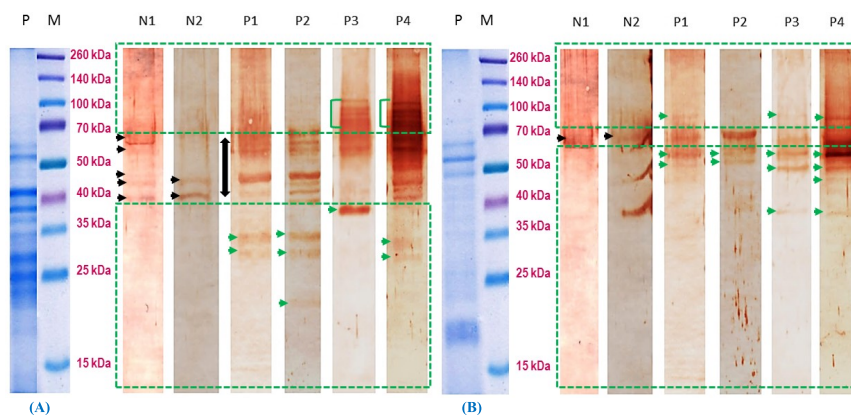
juga terdeteksi baik pada pita berukuran >70 kDa maupun < 40 kDa (Gambar 4.A). Adapun isolat A14 memperlihatkan reaksi non spesifik yang rendah dan memperlihatkan beberapa pita protein munogenik yang spesifik terutama pada ukuran 35 – 65 kDa (Gambar 4.B). Secara umum, isolat yang menunjukkan reaksi non spesifik paling besar sampai yang terkecil adalah S18 > S13 > B87 > P06 > SPT > A14.

Tiga isolat *T.evansi* yaitu PLS, N374 dan N372 memperlihatkan reaksi non spesifik yang rendah dibanding isolat lainnya. Isolat PLS menunjukkan reaksi non spesifik paling rendah

dan memiliki beberapa pita protein imunogenik yang berintensitas kuat baik pada berat molekul <60 kDa maupun >70 kDa (Gambar 5.A). Intensitas warna yang kuat mengindikasikan adanya ikatan dengan antibodi dalam serum positif secara kuat dalam jumlah cukup banyak. Meskipun jumlah pita protein imunogenik yang dikenali tidak terlalu banyak, namun memiliki intensitas warna yang kuat. Sebaliknya, isolat N374 menunjukkan beberapa pita protein imunogenik terutama pada berat molekul <60 kDa (Gambar 5.B). Reaksi non spesifik juga tergolong rendah sebagaimana isolat PLS,



Gambar 3. Profil protein hasil imunoblotting terhadap antigen *T.evansi* isolat S18 (A) dan S13 (B) dengan serum negatif dan serum positif. (P). Profil protein SDS PAGE 12% ; (M). Protein penanda ; (N1). Serum negatif dari Sapi Australia ; (N2). Serum negatif dari FBS komersial ; (P1 - P2). Serum positif dari sapi terinfeksi alamiah ; (P3 – P4). Serum positif dari kerbau terinfeksi secara alamiah. Panah hitam = area dan pita protein yang menunjukkan reaksi silang / reaksi non spesifik. Kotak hijau = area identifikasi pita protein imunogenik yang spesifik. Panah hijau / tanda kurung hijau = pita protein imunogenik yang spesifik penanda infeksi *T.evansi*.



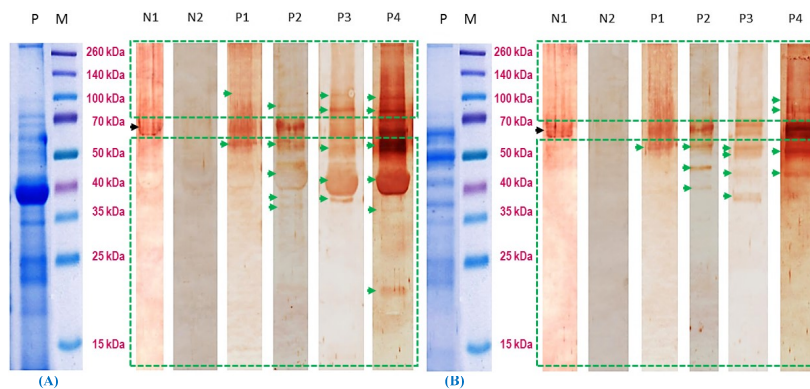
Gambar 4. Profil protein hasil imunoblotting terhadap antigen *T.evansi* isolat SPT (A) dan A14 (B) dengan serum negatif dan serum positif. (P). Profil protein SDS PAGE 12% ; (M). Protein penanda ; (N1). Serum negatif dari Sapi Australia ; (N2). Serum negatif dari FBS komersial ; (P1 - P2). Serum positif dari sapi terinfeksi alamiah ; (P3 – P4). Serum positif dari kerbau terinfeksi secara alamiah. Panah hitam = area dan pita protein yang menunjukkan reaksi silang / reaksi non spesifik. Kotak hijau = area identifikasi pita protein imunogenik yang spesifik. Panah hijau / tanda kurung hijau = pita protein imunogenik yang spesifik penanda infeksi *T.evansi*.

namun jumlah pita protein imunogenik yang terdeteksi lebih sedikit dibanding isolat PLS.

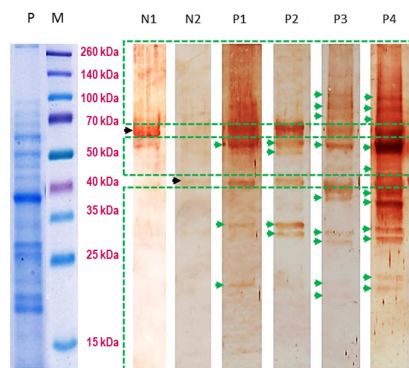
Adapun *T.evansi* isolat N372, memperlihatkan reaksi non spesifik yang rendah dengan jumlah pita protein imunogenik yang paling banyak (Gambar 6) dibanding semua isolat yang diuji. Intensitas warna yang tervisualisasi juga cukup kuat, hal tersebut mengindikasikan kuatnya ikatan antigen (dari pita protein isolat N372) dengan antibodi didalam serum positif. Pita imunogenik yang spesifik pada isolat N372 terdistribusi merata, baik yang direaksikan dengan serum positif dari sapi maupun kerbau. Pita protein tersebut diperkirakan berkisar antara 15 – 40 kDa dan 45 – 60 kDa (Gambar

6). Adapun pita protein imunogenik yang spesifik diatas 70 kDa hanya terdeteksi pada serum kerbau. Secara umum, profil pita protein imunogenik yang bereaksi dengan serum positif dan negatif pada sembilan isolat *T.evansi* diringkaskan distribusinya pada Tabel 1.

Berdasarkan pola pengenalan pita protein oleh serum negatif, maka 9 isolat *T.evansi* yang diteliti terbagi dalam dua kelompok. Kelompok pertama terdiri dari isolat yang menunjukkan banyaknya pita protein (>2 pita protein) yang dikenali oleh serum negatif. Kelompok ini terdiri dari isolat S13, S18, B87, P06 dan SPT (Gambar 2 sampai Gambar 4.A dan Tabel 1). Kelompok kedua yaitu isolat yang memiliki pita



Gambar 5. Profil protein hasil imunoblotting terhadap antigen *T.evansi* isolat PLS (A) dan N374 (B) dengan serum negatif dan serum positif. (P). Profil protein SDS PAGE 12% ; (M). Protein penanda ; (N1). Serum negatif dari Sapi Australia ; (N2). Serum negatif dari FBS komersial ; (P1 - P2). Serum positif dari sapi terinfeksi alamiah ; (P3 – P4). Serum positif dari kerbau terinfeksi secara alamiah. Panah hitam = pita protein yang menunjukkan reaksi silang / reaksi non spesifik. Kotak hijau = area identifikasi pita protein imunogenik yang spesifik. Panah hijau / tanda kurung hijau = pita protein imunogenik yang spesifik penanda infeksi *T.evansi*.



Gambar 6. Profil Protein dan hasil imunoblotting terhadap antigen *T.evansi* isolat N372 dengan serum negatif dan serum positif. (P). Profil protein SDS PAGE 12% ; (M). Protein penanda ; (N1). Serum negatif dari Sapi Australia ; (N2). Serum negatif dari FBS komersial ; (P1 - P2). Serum positif dari sapi terinfeksi alamiah ; (P3 – P4). Serum positif dari kerbau terinfeksi secara alamiah. Panah hitam = pita protein yang menunjukkan reaksi silang / reaksi non spesifik. Kotak hijau = area identifikasi pita protein imunogenik yang spesifik. Panah hijau / tanda kurung hijau = pita protein imunogenik yang spesifik penanda infeksi *T.evansi*.

protein paling sedikit (≤ 2 pita protein) dikenali oleh serum negatif, yaitu isolat N374, PLS, N372 dan A14 (Gambar 4.B sampai Gambar 6 dan Tabel 1).

Serum negatif merupakan serum dari individu yang tidak terinfeksi oleh *T.evansi* tetapi belum tentu bebas dari infeksi mikroorganisme lainnya. Oleh sebab itu secara alamiah, adanya pita protein dari isolat *T.evansi* yang dikenali oleh antibodi dalam serum negatif menunjukkan adanya reaksi silang sehingga terdeteksi reaksi non spesifik. Semakin banyak pita protein yang dikenali oleh antibodi dalam serum negatif menunjukkan banyaknya reaksi silang pada protein dari isolat *T.evansi* tersebut. Sebaliknya, semakin sedikit

pita protein dari isolat *T.evansi* yang dikenali maka reaksi silangnya semakin rendah.

Isolat *T.evansi* yang menunjukkan reaksi silang rendah sangat potensial sebagai kandidat antigen untuk pengembangan uji serologi. Berdasarkan profil protein imunogenik (pola pengenalan pita protein oleh antibodi) dari hasil imunoblotting dapat diseleksi dan ditetapkan bahwa empat isolat (N374, PLS, N372 dan A14) berpotensi untuk digunakan sebagai sumber antigen dalam pengembangan uji serologis. Adapun identifikasi pita protein imunogenik yang spesifik dan konsisten terdeteksi pada imunoblotting terhadap isolat *T.evansi* yang terseleksi (N374, PLS, N372 dan A14) disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Ringkasan Distribusi Kelompok Pita Protein masing-masing Isolat *T.evansi* Dikenali oleh Serum Negatif dan Serum Positif.

Protein	Reaksi Serologis																	
	N374						N372						PLS					
	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2
> 70 kDa	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
50 - 70 kDa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
35 - 49 kDa	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
25 - 34 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15 - 24 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
< 15 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A14						SPT						P06					
	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2
> 70 kDa	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
50 - 70 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 - 49 kDa	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 - 34 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15 - 24 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
< 15 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B87						S13						S18					
	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2	Aus	FBS	S1	S2	K1	K2
> 70 kDa	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
50 - 70 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 - 49 kDa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 - 34 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 - 24 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
< 15 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : Aus, yaitu serum negatif dari sapi impor Australia (N1) ; FBS, yaitu serum negatif *fetal bovine serum* komersial (N2) ; P1 = S1 ; P2 = S2 ; P3 = K1 dan P4 = K2. Notasi "S" = yaitu serum positif dari sapi terinfeksi *T.evansi* dan "K" = yaitu serum positif dari kerbau terinfeksi *T.evansi*. Adapun notasi "P" secara umum menunjukkan serum positif, baik dari sapi maupun kerbau.

PEMBAHASAN

Pengenceran serum yang optimal

Berdasarkan pada Gambar 1, diketahui bahwa pengenceran serum yang optimal adalah 1:800. Hal demikian disebabkan karena dua pertimbangan. Pertimbangan pertama adalah nilai absorbansi dari serum negatif pada pengenceran 1:800 dibawah nilai 0,3 (Gambar 1.A). Nilai tersebut cukup ideal mengingat nilai absorbansi untuk *blank control* sekitar 0,1. Nilai absorbansi serum negatif diharapkan dibawah 0,3 (Botuş & Oncescu 2006) atau dibawah 0,25 (Desquesnes *et al.* 2009). Adapun serum akan dianggap positif (seropositif) apabila nilai absorbansinya melebihi 0,5 (Desquesnes *et al.* 2009). Kedua syarat tersebut terpenuhi pada pengenceran serum 1:800 (Gambar 1.A).

Pertimbangan kedua adalah nilai rasio P/N pada pengenceran serum 1:800 diperoleh hasil > 3 sedangkan pada pengenceran serum 1:400 berkisar antara 2,25–3 (Gambar 1.B). Besarnya rasio P/N mengindikasikan kemampuan diskriminasi yang lebar sehingga memudahkan dalam pembedaan antara serum yang dinyatakan positif dengan negatif. Sebaliknya, semakin kecil rasio P/N akan menyebabkan kemampuan diskriminasi yang sempit sehingga menyulitkan pembedaan

serum positif dengan negatif. Penelitian Yadav *et al.* (2014) memperlihatkan bahwa nilai rasio P/N pada ELISA *T.evansi* adalah 2,33. Demikian pula dengan Paré *et al.* (1995) yang menggunakan rasio P/N tertinggi sebagai acuan untuk menetapkan pengenceran serum paling optimal. Dengan demikian pengenceran serum 1:800 dari hasil studi ini merupakan yang paling optimal sekaligus menunjukkan variasi sampel serum negatif yang baik dan seragam berdasarkan kecilnya nilai baku galatnya. Adapun nilai baku galat sampel serum positif sangat bervariasi disebabkan variasi respon imun dari setiap individu, periode dan derajat infeksi yang berbeda.

Pengenceran serum 1:800 tersebut merupakan pengenceran serum maupun sampel yang akan menjadi acuan untuk imunoblotting maupun pengembangan ELISA untuk diagnosa penyakit Surra. Meskipun umumnya pengenceran serum berkisar 1:50 – 1:200 namun pengenceran 1:800 merupakan hal yang wajar pada uji serologi penyakit parasitik. Cabán-Hernández *et al.* (2014) telah menggunakan pengenceran serum 1:800 pada pengembangan ELISA untuk deteksi serologis terhadap *fasciolosis* pada manusia. Sensitivitas dan spesifisitas uji serologis yang dikembangkannya tersebut adalah 96,6% dan

Tabel 2. Pita Protein Immunogenik secara Konsisten Dikenali Serum Positif Bovis (Sapi dan Kerbau) pada Imunoblotting terhadap 4 isolat *T.evansi* berpotensi dari Indonesia

BM (kDa)	Serum Bovis (<i>bovinae</i>)							
	N374		PLS		N372		A14	
	Sapi	Kerbau	Sapi	Kerbau	Sapi	Kerbau	Sapi	Kerbau
100	–	+	–	+	–	+	–	–
90	–	+	–	+	+	+	–	–
85	–	+	+	+	+	+	–	–
78	–	+	–	+	–	+	–	–
70	–	+	+	+	–	+	–	+
65	+	–	+	–	+	+	+	+
55	–	–	+	–	+	+	+	+
49-52	+	+	+	+	+	+	+	+
44-46	+	+	+	+	+	+	+	+
34-36	–	–	+	+	–	+	–	–
31-33	–	–	+	+	+	+	+	+
29-30	–	–	–	–	–	–	–	–
24-28	–	–	–	–	+	+	–	–
15-20	–	–	–	–	+	+	–	–

Keterangan : Penetapan berat molekul (BM) berdasarkan prediksi menggunakan nilai Rf (*retention factor*).

95,7% (Cabán-Hernández *et al.* 2014).

Profil protein yang imunogenik

Protein imunogenik merupakan pita protein yang dikenali oleh antibodi yang terdapat pada serum dari individu yang terinfeksi *T.evansi*. Berdasarkan Gambar 2 sampai Gambar 6 tentang profil protein hasil imunoblotting menggunakan serum positif dan negatif, dapat diketahui bahwa tidak semua pita protein dapat dikenali dan berikatan dengan antibodi anti *T.evansi*. Beberapa pita protein bahkan dikenali dan berikatan dengan antibodi dari serum negatif (serum dari individu yang tidak terinfeksi *T.evansi*). Serum negatif yang digunakan adalah serum sapi impor dari Australia dan serum komersial dari fetus sapi (*fetal bovine serum, FBS*) yang bebas dari infeksi *T.evansi*. Australia merupakan negara yang dinyatakan masih bebas dari infeksi *T.evansi* (Reid 2002 ; Desquesnes *et al.* 2013 ; Thompson *et al.* 2014). Adapun FBS merupakan serum komersial yang secara umum diambil dari fetus sapi yang masih belum terinfeksi *T.evansi* dan terbukti memiliki nilai absorbansi yang rendah.

Pita protein dari 9 isolat *T.evansi* yang konsisten dikenali oleh serum negatif dari sapi Australia (N1) adalah pita protein dengan berat molekul 60-62 kDa (Gambar 2 sampai 6 serta Tabel 1 dan 2). Pita protein tersebut diduga bereaksi silang dengan antibodi yang terstimulasi oleh infeksi parasit darah lainnya. Dengan demikian, pita protein 60-62 kDa yang terdeteksi tersebut bukanlah protein spesifik untuk penanda infeksi *Trypanosoma*. Infeksi parasit darah yang umum ditemukan pada sapi impor dari Australia adalah *Anaplasma*, *Babesia* dan *Theileria*. Australia merupakan negara yang endemik untuk infeksi *Anaplasma sp.*, *Babesia sp.*, *Theileria sp.* dan *Trypanosoma theileri* (Reid & Copeman, 2003). Adapun pita protein yang dikenali oleh serum negatif N2 (yaitu FBS) hanya protein dengan berat molekul 39 kDa pada isolat N372 dan protein dengan BM 65 kDa pada isolat A14.

Hasil imunoblotting pada isolat P06, B87, S13, S18 dan SPT menunjukkan sejumlah pita protein yang dikenali oleh serum negatif N1 dan N2. Pita protein tersebut terdistribusi sangat beragam mulai dari 30 kDa sampai 120 kDa.

Hal ini menunjukkan bahwa keempat isolat *T.evansi* tersebut tidak dapat digunakan sebagai sumber antigen untuk pengembangan uji serologi. Apabila suatu antigen memiliki banyak pita protein yang berikatan dengan antibodi didalam serum negatif, maka hal tersebut mengindikasikan adanya reaksi non spesifik akibat reaksi silang yang terjadi pada antigen tersebut. Kemungkinan pada antigen isolat *T.evansi* tersebut (P06, B87, S13, S18 dan SPT) terdapat sejumlah protein yang memiliki kemiripan struktur atau konformasi molekul dengan antigen dari mikroorganisme lainnya yang memicu reaksi silang tersebut.

Adapun serum positif dari individu terinfeksi *T.evansi* yang digunakan pada penelitian ini adalah P1, P2, P3 dan P4. P1 dan P2 berasal dari serum sapi serta P3 dan P4 dari serum kerbau yang dinyatakan terinfeksi *T.evansi* pada pemeriksaan mikroskopis. Pita protein yang umum dan konsisten dikenali oleh serum bovis positif adalah protein 100, 90, 85, 76-80, 70, 65, 55, 49-52, 44-46, 40, 34-36, 31-33 kDa. Keduabelas pita protein tersebut merupakan protein imunogenik yang umum dan konsisten ditemukan pada kesembilan isolat *T.evansi* yang diuji. Namun demikian, pengenalan antibodi dari serum positif terhadap pita protein 24-28 dan 15-20 kDa secara khusus hanya ditemukan pada isolat N372, PLS dan SPT (Tabel 2). Protein imunogenik tersebut bersesuaian dengan penelitian lain sebagaimana telah dilaporkan Uche *et al.* (1993), Uzcanga *et al.* (2002) dan Aquino *et al.* (2010).

Beberapa protein dengan berat molekul tinggi seperti protein 250, 220, 130 dan 120 kDa secara eksklusif juga imunogenik. Protein imunogenik dengan ukuran 120 sampai 250 kDa hanya ditemukan pada *T.evansi* isolat S18 yang direaksikan dengan serum positif dari kerbau terinfeksi *T.evansi*. Adapun protein 24-28 kDa merupakan protein imunogenik yang spesifik pada isolat N372, baik yang direaksikan dengan serum positif sapi maupun kerbau. Sebaliknya protein 34-36 kDa merupakan protein imunogenik yang spesifik pada isolat N372 dan PLS yang direaksikan dengan serum positif dari sapi maupun kerbau. Pada isolat N374 juga ditemukan protein imunogenik spesifik yaitu protein 49-52 kDa yang bereaksi

dengan serum positif dari sapi maupun kerbau. Protein-protein tersebut kemungkinan merupakan protein imunogenik dan spesifik yang secara khusus terdapat pada keempat isolat *T.evansi* tersebut.

Berdasarkan profil pita protein yang dikenali oleh antibodi dalam serum positif maupun negatif tersebut dapat digunakan sebagai sarana untuk melakukan seleksi terhadap isolat *T.evansi* yang berpotensi sebagai sumber antigen untuk pengembangan uji serologi. Isolat yang terpilih didasarkan pada jumlah pita protein yang paling sedikit dikenali oleh antibodi dalam serum negatif. Seleksi juga didasarkan pada jumlah pita protein yang paling banyak dikenali oleh antibodi didalam serum positif.

Seleksi isolat *T.evansi* sebagai sumber antigen untuk imunoasai

Diantara kesembilan isolat *T.evansi* dari Indonesia tersebut, empat isolat diantaranya berpotensi digunakan sebagai kandidat sumber antigen untuk pengembangan uji serologi, terutama adalah teknik ELISA. Keempat isolat *T.evansi* tersebut adalah N374, N372, PLS dan A14 karena memiliki reaksi silang (*cross reaction*) paling rendah. Rendahnya reaksi silang yang ditunjukkan oleh keempat isolat tersebut terindikasi dari sedikitnya jumlah pita protein (\leq pita protein) yang dapat dikenali dan berikatan dengan antibodi didalam serum negatif sebagaimana dipaparkan pada Tabel 1. Reaksi silang yang rendah antara ikatan antigen (protein dari isolat *T.evansi*) dengan antibodi pada serum negatif diperlukan untuk mengeliminasi atau meminimalkan kemungkinan terjadinya reaksi serologis non spesifik. Reaksi silang akan mempengaruhi spesifisitas uji serologis suatu perangkat diagnostik sehingga akurasi pengujiannya terganggu (Crowther 2009). Tingginya reaksi silang yang terjadi akan menyebabkan spesifisitas uji menjadi rendah sehingga akurasi uji perangkat diagnostik tersebut akan menurun. Rendahnya spesifistas suatu uji akan menyebabkan kegagalan dalam mendiagnosa atau menetapkan individu yang sehat (seronegatif) sehingga dinyatakan positif (positif palsu / *false pasitive*).

Diantara keempat isolat *T.evansi* (N374, N372, PLS dan A14), hanya isolat N372 yang memiliki pita protein imunogenik terbanyak

dibanding isolat lainnya (Gambar 6, Tabel 1 dan Tabel 2). Berdasarkan Tabel 1, lima kelompok pita protein dari isolat N372 bereaksi dengan semua serum positif (100%) dan satu kelompok pita protein (>70 kDa) bereaksi dengan tiga serum positif (75%). Pada Tabel 2, dipaparkan perincian berat molekul pita protein yang dapat dikenali oleh serum positif terhadap keempat isolat terpilih yaitu N374, N372, PLS dan A14. Antigen berupa protein dari isolat N372 yang dikenali oleh serum positif merupakan yang terbanyak dan merata dibanding tiga isolat *T.evansi* lainnya yang potensial (N374, PLS dan A14).

Banyaknya pita protein yang dapat dikenali oleh antibodi didalam serum positif, berkonsekuensi pada banyaknya reaksi ikatan antigen-antibodi yang terjadi. Banyaknya ikatan antigen-antibodi dalam uji serologis akan diamplifikasi oleh konjugat (antibodi berlabel enzim) yang akan ditambahkan. Pada kondisi demikian, maka reaksi imunoenzim yang terjadi akan tervisualisasi berupa sinyal warna yang diukur berdasarkan nilai absorbansinya pada panjang gelombang tertentu. Apabila pita protein imunogenik yang dikenali sedikit, maka sinyal dari reaksi imunoenzim akan rendah, sebaliknya apabila yang dikenali semakin banyak maka sinyal dari reaksi imunoenzim akan tinggi.

Pada saat antigen berupa protein yang dikenali oleh serum negatif jumlahnya sedikit maka nilai absorbansinya akan rendah. Disisi lainnya, pada saat antigen berupa pita protein yang dikenali oleh serum positif jumlahnya banyak akan menyebabkan nilai absorbansi yang tinggi. Konsekuensinya, nilai absorbansi antara serum negatif dan positif akan memiliki perbedaan yang mencolok. Dengan demikian, diskriminasi antara sampel seronegatif dengan seropositif diharapkan mudah ditetapkan.

Isolat *T. evansi* N372 sebagai kandidat sumber antigen untuk imunoasai.

Perbandingan total pita protein yang dikenali oleh serum positif dan negatif pada keempat isolat terpilih (PLS, N372, N374 dan A14) menunjukkan bahwa isolat N372 merupakan kandidat paling potensial. Hal demikian juga bersesuaian dengan hasil evaluasi

pada pengujian ELISA sebagaimana diperoleh pada Gambar 1.B. Hasil pengujian dengan ELISA menunjukkan bahwa rasio P/N dari nilai absorbansi (OD) terhadap serum positif dan serum negatif pada pengenceran 1 : 800 juga menunjukkan hasil yang tertinggi (Gambar 1.B). Dengan demikian, isolat N372 lebih diunggulkan sebagai sumber antigen untuk pengembangan immunoasai dibanding isolat lainnya.

Analisis lebih lanjut terhadap keragaman pita protein imunogenik dari isolat N372 yang dikenali oleh antibodi dalam serum positif diperlukan untuk memperkirakan kemungkinan adanya kemiripan pola dengan berbagai laporan peneliti lain. Aquino *et al.* (2010) melaporkan bahwa pita protein imunogenik 160, 88, 74, 66, 50-52, 46-48, 38, 30-32, 27 dan 20 kDa dari isolat Brazil dikenali oleh serum positif dari bovis yang diinfeksi secara eksperimental. Hasil tersebut nampak bersesuaian dengan penelitian ini yang mengenali pita protein 85, 70 atau 78, 65, 49-52, 44-46, 34-36, 31-33, 24-28 dan 15-20 kDa dari isolat N372. Aquino *et al.* (2010) menyatakan bahwa protein imunogenik berukuran 88, 66, 32 dan 27 kDa dari *T.evansi* isolat Brazil serupa dengan protein imunogenik 85, 67, 32,4 dan 28 kDa dari *T.evansi* isolat Indonesia yang dilaporkan Uche *et al.* (1993). Protein yang dilaporkan oleh Aquino *et al.* (2008) maupun Uche *et al.* (1993) kemungkinan juga serupa dengan protein imunogenik 85, 65, 31-33 dan 24-28 kDa dari *T.evansi* isolat N372 pada penelitian ini.

Laha dan Sasmal (2008) juga telah melaporkan protein imunogenik 81-83, 64-65, 44-46, 34-35 dan 25-26 kDa dari *T.evansi* isolat India yang direaksikan dengan serum sapi. Protein-protein tersebut serupa dengan protein 85, 65, 44-46, 34-36 dan 24-28 kDa dari *T.evansi* isolat N372 pada penelitian ini. Adapun protein 86, 68, 46, 32 dan 17 kDa dari *T.evansi* isolat Venezuela yang dilaporkan Uzcanga *et al.* (2002) kemungkinan serupa dengan protein 85, 65, 44-46, 31-33 dan 15-20 kDa yang terdeteksi pada protein dari *T.evansi* isolat N372. Protein imunogenik 49-52, 34-36, 24-28, 15-20 kDa pada isolat N372 kemungkinan juga serupa dengan protein 52-

53, 34-35, 26-27, 23-24 dan 16-18 kDa dari *T.evansi* isolat India yang direaksikan dengan serum kuda (Laha & Sasmal 2008), dengan demikian, sebagian besar berat molekul protein imunogenik yang telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dari berbagai negara tersebut juga dikenali dan terwakili pada protein imunogenik dari isolat N372. Namun demikian, terdapat sedikit perbedaan antara penelitian ini dengan hasil Aquino *et al.* (2010) yang melaporkan adanya protein imunogenik pada pita protein dengan berat molekul 160 kDa sementara pada penelitian ini tidak terdeteksi. Queiroz *et al.* (2001) melaporkan mengenali pita protein imunogenik pada berat molekul 17 sampai 57 kDa. Adapun pada penelitian ini maupun penelitian Aquino *et al.* (2010) juga mengenali pita protein imunogenik diatas 57 kDa.

Laha dan Sasmal (2008) juga melaporkan protein imunogenik yang kuat yaitu protein 61-62 kDa. Pada penelitian ini protein tersebut kemungkinan serupa dengan protein 60-62 kDa yang ditemukan pada kesembilan isolat *T.evansi* dari Indonesia. Protein tersebut merupakan protein non spesifik karena bereaksi dengan serum negatif secara kuat. Diduga protein tersebut bereaksi silang dengan infeksi parasit darah lainnya. Velásques *et al.* (2014) melaporkan bahwa protein 53, 31 dan 27 kDa dari *T.evansi* bereaksi silang dengan protein dari *T.vivax*. Protein tersebut kemungkinan serupa dengan protein 49-52, 31-33 dan 24-28 kDa pada isolat N372. Hal demikian mengindikasikan kemungkinan adanya reaksi silang antar genus *Trypanosoma* yang memiliki siklus biologi sangat dekat atau serupa.

KESIMPULAN DAN SARAN

Protein imunogenik yang terdeteksi pada sembilan isolat *T.evansi* dari Indonesia berukuran 100, 90, 85, 76-80, 70, 65, 55, 49-52, 44-46, 40, 34-36, 31-33 kDa. *T.evansi* isolat N372 memiliki pita protein imunogenik yang sesuai untuk kandidat pengembangan immunoasai terutama ELISA. Protein imunogenik isolat N372 tersebut berukuran 85, 70, 65, 49-52, 44-46, 34-36, 31-33, 24-28, 15-

20 kDa. Disarankan untuk melakukan pengujian lanjutan terhadap potensi isolat N372 sebagai sumber antigen untuk pengembangan uji serologis terutama dengan metode ELISA.

DAFTAR PUSTAKA

- Aquino, LPCT., RZ. Machado, KR. Lemos, LC. Marques, MV. Garcia & GP. Borges. 2010. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. *The Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 19(2) : 112-118.
- Botuş, D., & T. Oncescu. 2006. Optimizing immunoenzymatic reactions (ELISA) for the detection of antibody against NDV virus. *Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie, Anul XV (serie nouă) II* : 33-41.
- Cabán-Hernández, K., JF. Gaudier, C. Ruiz-& AM Espino. 2014. Development of Two Antibody Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Serodiagnosis of Human Chronic Fascioliasis. *Journal of Clinical Microbiology* 52(3) : 766-772.
- Crowther, JR. 2009. *Validation of diagnostic test for infectious diseases* Dalam *The ELISA Guidebook*. Humana Press, New York. p: 315.
- Desquesnes, M., P. Holzmuller, D-H Lai, A. Dargantes, ZR. Lun & S Jittaplaong. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra : A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 194176, 22 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/194176>.
- Desquesnes, M., K. Kamyngkird, M. Pruvot, C. Kengradomkij, G. Bossard, N. Sarataphan & S. Jittapalpong. 2009. Antibody-ELISA for *Trypanosoma evansi*: Application in a serological survey of dairy cattle, Thailand, and validation of a locally produced antigen. *Preventive Veterinary Medicine* 90 : 233-241.
- Dirkeswan (Direktorat Kesehatan Hewan). 2012. *Pedoman pengendalian dan pemberantasan penyakit Trypanosomiasis (Surra)*. Jakarta (Indonesia): Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementrian Pertanian.
- Laha, R., & NK. Sasmal. 2008. Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. *Research in Veterinary Science* 85 : 534-539.
- OIE (Office International des Epizooties). 2012. *Trypanosoma evansi Infection (Surra)*. OIE Terrestrial Manual 2012, Chapter 2.1.17. Paris (France): Office International des Epizooties. p. 1-15.
- Paré, J., SK. Hietala & MC. Thurmond. 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7: 352-359.
- Queiroz, AO., AP Legey, SCC Xavier & AM Jensen. 2001. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96(7) : 965-972.
- Reid, SA. 2002. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *TRENDS in Parasitology* 18(5): 214-224.
- Reid, SA., & DB. Copeman. 2003. The development and validation of an antibody-ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Preventive Veterinary Medicine* 61 : 195-208.
- Subekti, DT., I. Yuniarto & Sulinawati. 2017. Perbandingan metode *hierarchical cluster analysis* untuk analisis keragaman hayati berdasarkan profil protein *Trypanosoma evansi* dari Indonesia. *Jurnal Veteriner* 18(4) : 516-525.
- Singh, V., A. Singh & MB. Chabra. 1995. Polypeptide profiles and antigenic characterization of cell membrane and flagellar preparations of different stocks of *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 56 : 269-279.
- Thompson, CK., SS. Godfrey & RCA.

- Thompson. 2014. Trypanosomes of Australian mammals: A review. *International Journal for Parasitology : Parasites and Wildlife* 3: 57-66.
- Uche UE., TW. Jones & R. Boid. 1992. Antibody patters in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. *Acta Tropica* 52 : 139-147.
- Uche UE., TW. Jones & R. Boid. 1993. Class-specific antibody response in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Tropical Medicine and Parasitology* 44 : 27-31.
- Uzcanga, G., M. Mendoza, PM. Aso & J. Bubis. 2002. Purification of a 64 kDaa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology* 124 : 287-299.
- Velásquez, NP., RE. Camargo, GL. Uzcanga & J. Bubis. 2014. Partial purification of integral membrane antigenic proteins from *Trypanosoma evansi* that display immunological cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Journal of Parasitology Research*. Volume 2014, Article ID 965815, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/965815>.
- Yadav, SC., R. Kumar, A. Manuja, L. Goyal & AK. Gupta. 2014. Early detection of *Trypanosoma evansi* infection and monitoring of antibody levels by ELISA following treatment. *Journal of Parasitic Disease* 38(1) : 124-127.

