

Perbandingan Penggunaan Konjugat Antibovine IgG-HRP dan Protein A/G-HRP Dengan Beberapa Larutan Pengencer Serum Pada ELISA Untuk Deteksi Surra pada Sapi dan Kerbau

(Comparison of Anti Bovine IgG-HRP and Protein A/G-HRP Conjugates Using Different Dilution Buffer in ELISA for Diagnosis of Surra in Cattle and Buffalo)

Didik T Subekti^{1*} & Ichwan Yuniarto²

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

Memasukkan: Mei 2016, Diterima: Juni 2016

ABSTRACT

Surra was reported in various types of animals both livestock, pets and wildlife. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) is a sensitive and specific diagnosis technique for Surra detection. The use of species specific conjugate (*anti bovine IgG-HRP*) has limited while protein A/G can be used for a wide variety of animal species. This study aimed to evaluate the initial application of the protein A/G-HRP compared with *anti bovine IgG-HRP* using standard samples using four (4) types of diluent buffer. The standard serum samples (23 serum) consist of positive and negative sera from bovine (cattle and buffalo) were reacted with Surra antigen on microplate. Positive and negative serum was diluted with different diluent buffer, namely PBS-Tween20 (PBST), RBA (RedBuff A), RBB (RedBuff B) and LC (Low Cross). Results of ELISA using protein A/G-HRP showed absorbance values reduced 36.16% - 69.30% compared to the anti-bovine IgG-HRP. The percentage reduction of PBST, RBA, RBB and LC, were 51.76%; 56.64%; 36.16% and 69.30% respectively. The use of protein A/G-HRP and fourth diluent buffer can reduce antigen - antibody bonding with a weak affinity which lowers the absorbance value of ELISA Surra.

Keywords : Protein A, Protein G, Surra, ELISA, *Trypanosoma evansi*

ABSTRAK

Surra dilaporkan pada berbagai jenis hewan baik ternak, piaraan maupun satwa liar. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) merupakan teknik diagnosis yang sensitif dan spesifik untuk Surra. Penggunaan konjugat spesifik pada spesies (*anti bovine IgG-HRP*) memiliki keterbatasan sedangkan protein A/G dapat dimanfaatkan untuk berbagai macam spesies hewan. Penelitian ini bertujuan untuk evaluasi awal penggunaan konjugat protein A/G-HRP dibandingkan dengan antibovine IgG-HRP menggunakan sampel standar dengan empat (4) macam larutan dapar pengencer. Sampel serum standar (23 serum) dari bovis (sapi dan kerbau) yang telah diketahui positif dan negatif direaksikan dengan antigen Surra pada mikroplat. Serum positif dan negatif tersebut diencerkan dengan beberapa larutan yaitu PBS-Tween20 (PBST), RBA (RedBuff A), RBB (RedBuff B) dan LC (Low Cross). Hasil ELISA menggunakan protein A/G-HRP menunjukkan nilai absorbansi tereduksi 36,16% - 69,30% dibanding anti bovine IgG-HRP. Persentase reduksi dari PBST, RBA, RBB dan LC, masing-masing 51,76% ; 56,64% ; 36,16% dan 69,30%. Penggunaan protein A/G-HRP dan keempat larutan dapar pengencer mampu mereduksi ikatan antigen - antibodi dengan afinitas lemah yang menurunkan nilai absorbansi hasil ELISA Surra.

Kata kunci : Protein A, Protein G, Surra, ELISA, *Trypanosoma evansi*

PENDAHULUAN

Surra merupakan penyakit parasitik yang disebabkan *Trypanosoma evansi*. *T. evansi* dilaporkan dapat menginfeksi berbagai jenis hewan baik ternak, piaraan maupun satwa liar. Hewan ternak yang dapat diinfeksi *T. evansi* dan menderita Surra diantaranya adalah kuda, kerbau, sapi, unta, kambing, domba, babi, anjing (Desquesnes *et al.* 2013) dan kucing (Indrakamhang 1995; Tarello 2005). Adapun pada hewan liar yang telah dilaporkan dapat terinfeksi *T.*

evansi adalah rusa, gajah, antelop, tapir, serigala, jaguar, harimau, beruang, badak, marsupialia, rodensia dan masih banyak lainnya (Muhammad *et al.* 2007; Desquesnes *et al.* 2013; Thompson *et al.* 2014). Pada tahun 2015, Yuniarto (unpublished) juga menyatakan adanya infeksi dan berhasil diisolasi *T. evansi* pada rusa sambar di Kalimantan Timur.

Metoda uji untuk diagnosa Surra sangat beragam diantaranya adalah MHCT (*microhematocrite centrifugation technique*), MAECT (*miniature anion exchange chromatography technique*), preparat ulas

darah, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), uji aglutinasi dan PCR (*polymerase chain reaction*) (OIE 2012). Diantara ke enam teknik diagnosa tersebut, ELISA tidak mudah diaplikasikan untuk uji serologi multispecies. Hal ini disebabkan setiap spesies hewan memerlukan konjugat yang spesifik sedangkan konjugat komersial pada beberapa hewan terutama satwa liar belum tersedia. Disisi lain, teknik diagnosa ELISA merupakan teknik diagnosa serologis yang memiliki akurasi, sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. ELISA juga merupakan teknik yang harus diaplikasikan untuk pernyataan bebas dari Surra pada hewan yang akan diekspor maupun deklarasi status daerah bebas dan diharuskan melakukan pengujian selama 40 hari (OIE 2012).

Oleh karena luasnya jenis hewan yang dapat menderita Surra, maka dibutuhkan perangkat diagnostik yang universal untuk berbagai spesies. Setiap spesies hewan yang berbeda akan memerlukan konjugat yang berbeda maka diperlukan suatu konjugat yang universal untuk multispecies. Konjugat yang bersifat universal akan mampu berikatan dengan antibodi dari berbagai macam spesies. Konjugat demikian yaitu protein A dan protein G yang berlabel enzim (protein A/G). Protein A diproduksi oleh *Staphylococcus aureus*, sementara protein G diproduksi oleh *Streptococcus* spp. Lancefield Group G (Boyle & Reis 1987). Sauer-Eriksson *et al.* (1995) menyatakan bahwa protein G berasal dari *Streptococcus* spp., grup C dan G., sementara Nymo *et al.* (2013) menyatakan bahwa protein G diproduksi *Streptococcus* spp. dari *β hemolitic group A*.

Keuntungan menggunakan protein A/G sebagai konjugat universal dalam ELISA yaitu tidak memerlukan konjugat yang spesifik untuk setiap spesies sehingga dapat dimanfaatkan pada berbagai macam spesies hewan (Schaefer *et al.* 2012). Beberapa peneliti telah melaporkan penggunaan konjugat protein A/G-HRP dalam ELISA misalnya untuk deteksi *Borreliosis* atau *Lymne diseases* (Bhide *et al.* 2004), *Brucellosis* (Nymo *et al.* 2013) dan *Toxoplasmosis* (Zhang *et al.* 2010).

Berpangkal dari kondisi tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi perbandingan antara penggunaan konjugat universal seperti protein A/G yang berlabel enzim dengan konjugat yang spesifik spesies pada aplikasi ELISA untuk Surra, khususnya pada sampel serum bovis (kerbau dan sapi). Antisipasi kemungkinan adanya reaksi non spesifik yang muncul, maka digunakan beberapa

larutan dapar pengencer (*dilution buffer*) sebagai pereduksi. Larutan dapar pengencer akan mereduksi reaksi non spesifik pada serum sampel maupun konjugat sehingga diperoleh hasil ELISA yang baik.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel serum yang digunakan berasal dari Balai Veteriner Banjarbaru. Sampel seropositif (serum positif) merupakan serum yang telah dinyatakan positif dengan ELISA, uji aglutinasi, PCR dan MHCT ataupun ulas darah. Adapun sampel seronegatif (serum negatif) merupakan serum yang telah dinyatakan negatif dengan ELISA, uji aglutinasi, PCR dan MHCT dan ulas darah. Sampel standar berasal dari sapi dan kerbau yang telah diketahui bereaksi kuat dengan *anti bovine IgG-HRP* maupun protein A/G-HRP.

Larutan dapar yang digunakan dalam penelitian terdiri atas 4 jenis yaitu PBST, *RedBuff A* (RBA), *RedBuff B* (RBB) dan *Low Cross* (LC). PBST terdiri dari PBS (*phosphate buffered saline*) dan 0,05% Tween 20. PBS (pH 7,2 – 7,4) terdiri atas NaCl (8 gram), KCl (0,2 gram), Na₂HPO₄ (1,44 gram), KH₂PO₄ (0,24 gram) dilarutkan dalam aquadest steril sampai volume 1 L. *RedBuff A* terdiri dari PBS dengan penambahan 0,1% Tween20 (Sigma Chem., USA) dan 2M urea (JT Baker, USA). Adapun *RedBuff B* terdiri dari PBS dengan penambahan 0,1% Triton X-100 (Labchem, Australia) dan 2M urea. Sebaliknya, *Low Cross* merupakan larutan dapar pengencer komersial (Candor, Germany).

Pengujian ELISA Surra pada penelitian ini untuk evaluasi awal perbandingan penggunaan konjugat *anti bovine IgG-HRP* dengan protein A/G-HRP. Sampel uji yang digunakan pada penelitian ini adalah 23 serum standar terdiri dari 12 serum standar positif dan 11 serum standar negatif.

Protein TSA (*trypanosome soluble antigen*) dari *T. evansi* galur N372 dari Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Protein TSA dilapiskan (*coating*) pada mikroplat *Nunc Maxisorp flat bottomed 96 well* (Nunc, Denmark) dengan konsentrasi 5 ug/mL. Mikroplat tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 – 24 jam. Mikroplat dicuci dengan PBS-Twen 20 (0,05%) sebanyak 4 kali dan dilakukan *blocking* menggunakan PBS-0,05% Tween 20-0,5% BSA (*bovine serum albumin*). Mikroplat selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 – 24 jam.

Mikroplat kembali dicuci dengan PBS-Tween20 sebanyak 4 kali dan siap untuk digunakan. Total mikroplat yang disiapkan dalam penelitian ini adalah 8 buah.

Seluruh serum sampel standar, masing-masing diencerkan dengan empat macam larutan dapar pengencer (1:800). Masing-masing serum pada pengenceran yang berbeda dimasukkan ke dalam sumur (*well*) mikroplat (100 uL/sumuran) dilakukan secara duplo dan diinkubasi pada suhu ruang (27°C) selama satu jam. Seluruh mikroplat kemudian dicuci dengan PBS-Tween 20 (0,05%) sebanyak 4 kali. Ke delapan mikroplat selanjutnya dibagi kedalam dua kelompok. Empat mikroplat akan dideteksi dengan konjugat *anti bovine* IgG-HRP dan empat lainnya akan dideteksi dengan konjugat protein A/G-HRP.

Konjugat *anti bovine* IgG-HRP (Sigma Chem., USA) dan protein A/G-HRP (Thermo Scientific, USA), masing-masing diencerkan 1:10.000 dengan PBS-(0,05%) Tween20. Setiap mikroplat yang telah direaksikan dengan serum standar pada langkah sebelumnya dilanjutkan dengan penambahan konjugat. Masing-masing konjugat (100 uL) ditambahkan ke dalam setiap sumur dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 27°C. Pencucian kembali dilakukan dengan PBS-Tween20 sebanyak 6 kali. Ke dalam sumur ditambahkan 100 uL substrat TMB (*tetramethyl benzidine*) dan diinkubasi pada suhu 27°C selama 10 – 20 menit. Apabila telah terjadi perubahan warna, reaksi dihentikan dengan 100 uL 2N H₂SO₄. Mikroplat kemudian dibaca dengan ELISA reader *Multiskan EX*

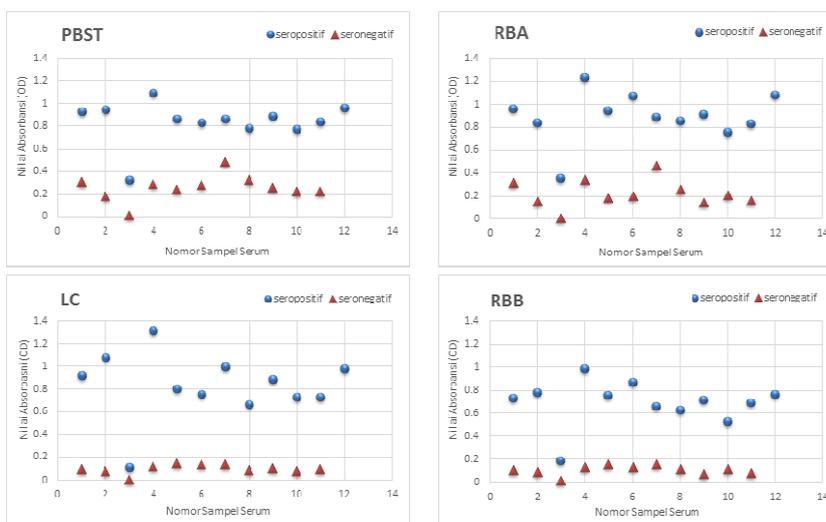
Colorimeter Reader (Thermo Scientific, Finlandia) pada panjang gelombang 450 nm.

HASIL

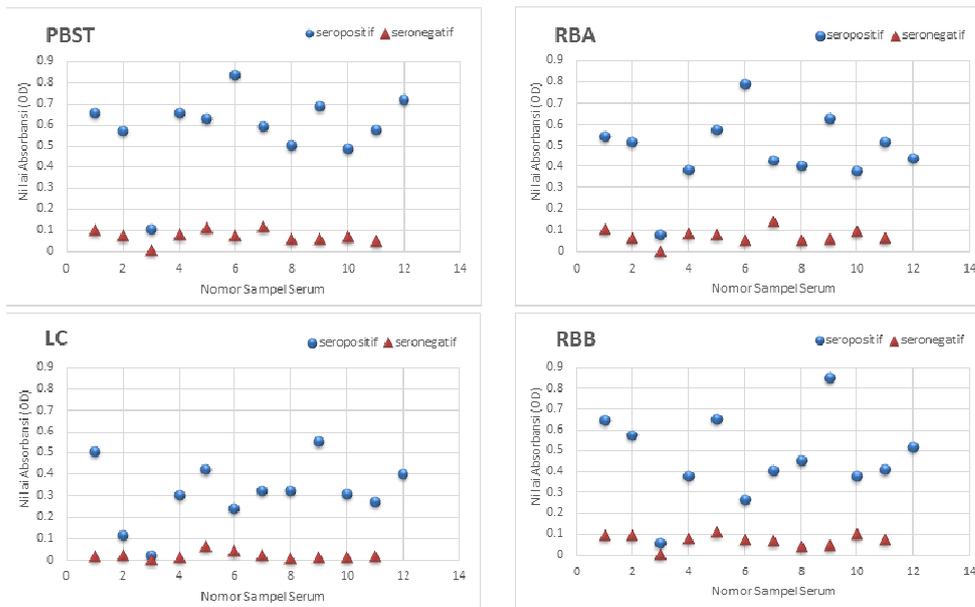
Perbandingan penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP dengan protein A/G-HRP

Diantara serum sampel positif, sampel serum nomor 3 yaitu ternak kerbau yang menunjukkan positif pada ulas darah dan MHCT memperlihatkan nilai absorbansi ELISA yang sangat rendah sehingga dianggap sebagai *outlier* atau pencilan (Gambar 1) dengan konjugat *anti bovine* IgG-HRP; (Gambar 2) dengan konjugat protein A/G-HRP). Nilai absorbansi ELISA dari sampel nomor 3 dengan konjugat *anti bovine* IgG-HRP menggunakan PBST, RBA, RBB dan LC masing-masing memiliki nilai absorbansi 0,326 ; 0,353 ; 0,18 dan 0,104 (Gambar 1). Adapun nilai absorbansi ELISA dengan konjugat protein A/G-HRP pada keempat larutan dapar tersebut masing-masing adalah 0,103; 0,08; 0,058 dan 0,024 (Gambar 2).

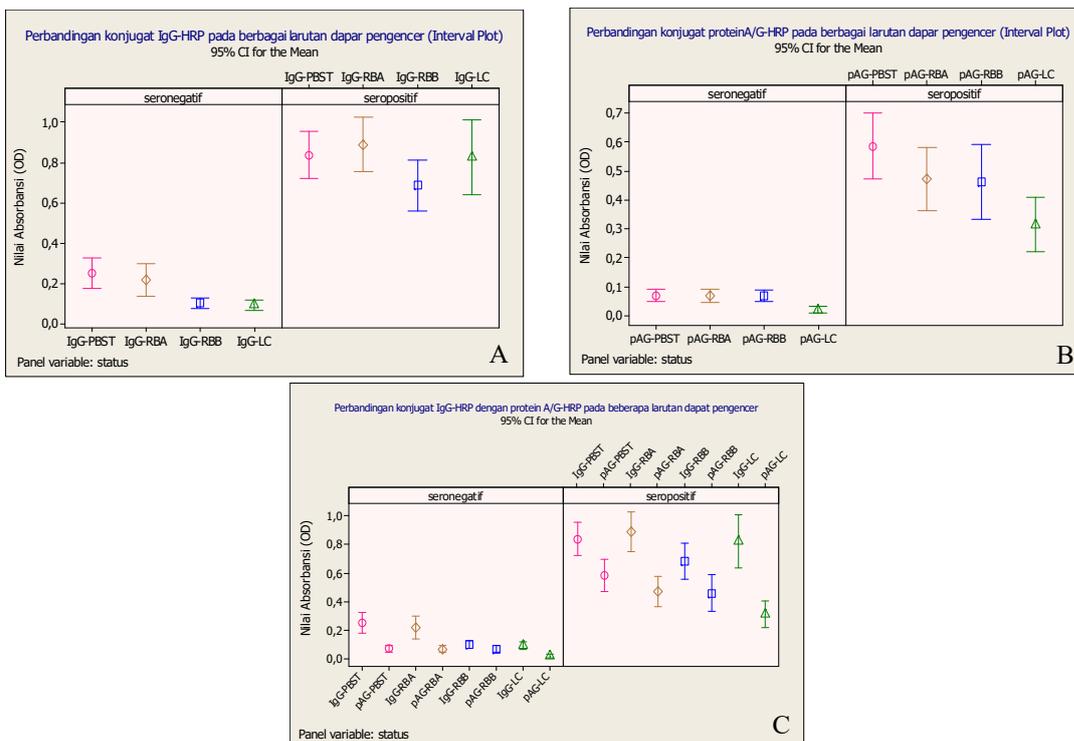
Apabila sampel serum positif no 3 diabaikan, maka penggunaan *anti bovine* IgG-HRP dengan larutan dapar pengencer PBST dan RBB untuk serum positif memberikan hasil ELISA yang lebih seragam. Adapun pada serum negatif, penggunaan *anti bovine* IgG-HRP dengan larutan dapar pengencer RBB dan LC memberikan hasil ELISA relatif seragam (Gambar 1 dan 3). Sebaliknya penggunaan konjugat protein A/G-HRP hanya memberikan hasil ELISA yang lebih seragam pada serum negatif saja (Gambar 2 dan 3).



Gambar 1. Distribusi sampel seropositif dan seronegatif hasil ELISA Surra dengan konjugat *anti bovine* IgG-HRP.



Gambar 2. Distribusi sampel seropositif dan seronegatif hasil ELISA Surra dengan konjugat protein A/G-HRP.



Keterangan: (A) konjugat anti bovine IgG-HRP, (B) konjugat protein A/G-HRP, (C) perbandingan konjugat anti bovine IgG-HRP dan protein A/G-HRP

Gambar 3. Interval plot dari penggunaan konjugat anti bovine IgG-HRP dengan protein A/G-HRP menggunakan berbagai larutan dapar pengencer serum.

Secara umum penggunaan konjugat protein A/G-HRP memberikan nilai absorbansi (OD) hasil ELISA yang lebih rendah dibanding penggunaan konjugat anti bovine IgG-HRP (Tabel 1). Secara umum, total reduksi nilai absorbansi hasil ELISA

pada penggunaan konjugat protein A/G-HRP dibanding konjugat anti bovine IgG-HRP berkisar 36,16% - 69,30%, lihat pada Tabel 1. Pada penggunaan konjugat protein A/G-HRP, serum positif umumnya tereduksi 34,99% - 61,72%,

Tabel 1. Ringkasan deskripsi data perbandingan penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP dan protein A/G-HRP dengan berbagai larutan dapar pengencer.

	PBST (1)	RedBuff A (2)	Δ (1→2)	RedBuff B (3)	Δ (1→3)	Low Cross (4)
IgG-HRP	-	-	-	-	-	-
Nilai Absorbansi seronegatif (OD)	0,005–0,477	0,003–0,463	18,33% *	0,009–0,155	39,39% *	0,002–0,140
Nilai Absorbansi seropositif (OD)	0,326–1,091	0,353–1,229	52,17% ^	0,180–0,985	91,30% ^	0,104–1,319
Protein A/G-HRP	-	-	-	-	-	-
Nilai Absorbansi seronegatif (OD)	0,003–0,115	0,001–0,138	21,21% *	0,005–0,111	23,11% *	0,001–0,063
Nilai Absorbansi seropositif (OD)	0,103–0,838	0,08–0,792	73,91% ^	0,058–0,848	73,91% ^	0,024–0,55
Rerata reduksi nilai OD (IgG-HRP ke Protein A/G-HRP)	51,76 %	56,64%	-	36,16%	-	69,30%
Total sampel tereduksi (IgG-HRP ke Protein A/G-HRP)	95,65%	100%	-	91,30%	-	100%
Rerata reduksi nilai OD– seronegatif IgG-HRP ke Protein A/G-HRP	68,52%	66,02%	-	34%	-	77,56%
Jumlah sampel tereduksi - seronegatif (IgG-HRP ke Protein A/G-HRP)	100%	100%	-	90,91%	-	100%
Rerata reduksi nilai OD seropositif (IgG-HRP ke Protein A/G-HRP)	34,99%	48,05%	-	38,13%	-	61,72%
Jumlah sampel tereduksi - seropositif (IgG-HRP ke Protein A/G-HRP)	91,67%	100%	-	91,67%	-	100%
Kesesuaian (κ)	0,913	0,913	-	1	-	0,913
Kesesuaian (AC1)	0,913	0,914	-	1	-	0,913
Kesesuaian (F)	0,957	0,96	-	1	-	0,957

Keterangan : * = rerata reduksi (%) nilai absorbansi karena perubahan larutan dapar pengencer ; ^ = jumlah sampel yang mengalami reduksi (%) nilai absorbansi karena perubahan larutan dapar pengencer.

sedangkan serum negatif tereduksi 34% - 77,56% dibanding menggunakan konjugat *anti bovine* IgG-HRP. Jumlah sampel serum yang mengalami reduksi pada penggunaan konjugat protein A/G-HRP berkisar 91,30% - 100% dibanding menggunakan konjugat *anti bovine* IgG-HRP (Tabel 1).

Perbandingan penggunaan larutan dapar pengencer

Beragamnya larutan dapar pengencer yang digunakan dalam penelitian ini bertujuan untuk meminimalkan reaksi nonspesifik dan mengurangi terjadinya reaksi latar (*background reaction*). Pada penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP dengan larutan dapar LC menyebabkan reduksi nilai absorbansi hasil ELISA sebesar 39,39% pada serum negatif dan 91,30% pada serum positif dibanding menggunakan larutan dapar PBST (Tabel 1). Namun demikian, apabila ditinjau dari jumlah sampel serum yang mengalami reduksi, larutan dapar RBB paling

baik dari larutan lainnya. Hal ini karena larutan dapar RBB dapat mereduksi 91,20% serum sampel yang diuji dibanding larutan dapar PBST (Tabel 1).

Sebaliknya pada penggunaan konjugat protein A/G-HRP, larutan dapar pengencer LC menyebabkan reduksi pada semua sampel serum yang diuji (100%). Rerata reduksi nilai absorbansi hasil ELISA pada sampel serum dengan larutan dapar LC sebesar 59,5% dibanding menggunakan larutan dapar PBST. Kemampuan reduksi konjugat protein A/G-HRP dengan larutan dapar LC lebih besar dibanding konjugat *anti bovine* IgG-HRP maupun protein A/G-HRP dengan larutan dapar lainnya (Tabel 1). Secara umum reduksi oleh RBA, RBB dan LC, masing-masing sebesar 18,33%, 39,39% dan 44,87% dibandingkan larutan dapar pengencer yang umum digunakan dalam ELISA yaitu PBST.

PEMBAHASAN

Perbandingan penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP dengan protein A/G-HRP.

Konjugat *anti bovine* IgG-HRP merupakan antibodi yang mengenali IgG dari bovis (sapi, kerbau, bison dan sejenisnya). Pada umumnya konjugat *anti bovine* IgG-HRP terdapat beberapa macam yaitu *whole molecule*, *γ chain specific*, *Fc fragment specific* dan *F(ab')₂ fragment specific*. Konjugat *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*) umumnya memiliki sensitivitas yang sangat tinggi tetapi beresiko terjadi reaksi silang dengan klas antibodi lain misalnya IgA ataupun IgM. Hal ini karena konjugat jenis ini mengenal seluruh molekul antibodi target. Adapun konjugat *anti bovine* IgG-HRP (*γ chain specific* dan *Fc fragment specific*) memiliki kelebihan rendah reaksi silang sehingga spesifisitasnya meningkat tetapi sensitivitasnya sangat menurun. Ditinjau dari sisi sensitivitasnya, *γ chain specific* lebih tinggi dibanding *Fc fragment specific*.

Konjugat protein A/G-HRP merupakan gabungan dari protein A dan protein G yang dikonjugasikan dengan enzim HRP (*horseradish peroxidase*). Protein A umumnya berikatan lemah dengan bagian Fc (*Fc fragment*) dari IgG bovis, sementara protein G umumnya berikatan kuat dengan bagian Fc dari IgG bovis (Boyle and Reis, 1987). Perbedaan kemampuan mengenali dan berikatan dengan bagian Fc dari IgG oleh protein A dan G tidak hanya pada kelompok hewan bovis semata tetapi juga pada berbagai spesies lainnya (Bhide *et al.* 2004). Oleh karena itu dengan menggabungkan protein A dan G diharapkan dapat lebih mengenali IgG berbagai spesies hewan dengan lebih baik.

Nymo *et al.* (2013) telah membandingkan perbedaan kemampuan protein A dan G terhadap IgG dari beberapa hewan pada ELISA untuk mendeteksi *Brucellosis*. Pada anjing laut dan karibu (*Caribou*), protein A lebih kuat mendeteksi IgG anti *Brucella* dibanding protein G, sedangkan pada beruang kutub dan ikan paus justru sebaliknya (Nymo *et al.*, 2013). Oleh sebab itu menggabungkan protein A dan G (protein A/G) akan memberikan keuntungan yaitu mampu mendeteksi IgG berbagai spesies dengan berbagai derajat kekuatan ikatan yang berbeda-beda. Namun demikian, oleh karena protein A

dan protein G berikatan pada bagian Fc dari IgG maka secara umum kemampuan deteksinya setara dengan *anti bovine* IgG-HRP (*Fc fragment specific*).

Oleh karena kemampuan berikatan antara protein A/G dengan antibodi (IgG) anti Surra yang terdapat pada serum positif maupun negatif hanya terjadi pada bagian Fc maka intensitas warna yang dihasilkan akan lebih rendah dibanding *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*) sebagaimana yang digunakan pada penelitian ini. Hal tersebut disebabkan *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*) akan mengenali dan berikatan dengan seluruh struktur antibodi (IgG) anti Surra. Dengan demikian secara kuantitatif konjugat *anti bovine* IgG-HRP yang berikatan dengan satu molekul IgG anti Surra yang terdapat pada serum sampel akan lebih banyak. Konsekuensinya, enzim HRP yang terikat pada konjugat tersebut akan bereaksi dengan substrat TMB lebih banyak sehingga menyebabkan reaksi perubahan warna lebih cepat dengan intensitas warna yang lebih kuat.

Manifestasi dari reaksi *anti bovine* IgG-HRP dengan antibodi dari serum sampel menyebabkan nilai absorbansi (OD) pada ELISA Surra lebih tinggi dibanding protein A/G-HRP sebagaimana terlihat pada Tabel 1 dan Gambar 3. Dengan demikian, konjugat *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*) yang digunakan pada penelitian ini terbukti lebih sensitif dibanding protein A/G-HRP. Walaupun demikian hasil penelitian ini berbeda dengan Al-Adhami dan Gajadhar (2014) yang melaporkan bahwa protein A/G-HRP menghasilkan intensitas warna yang lebih kuat dibandingkan *anti porcine* IgG-HRP pada ELISA Toksoplasmosis.

Fenomena yang menarik adalah sampel serum positif nomor 3 dari sampel kerbau senantiasa memiliki nilai absorbansi rendah bersama dengan nilai absorbansi sampel serum negatif. Satu-satunya yang memiliki nilai absorbansi lebih tinggi dibanding nilai absorbansi serum negatif adalah pada penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP dengan larutan dapar pengencer RBB. Penyebab dari fenomena tersebut adalah, hewan donor serum positif nomor 3 kemungkinan baru saja terinfeksi sehingga pada pemeriksaan ELISA terdeteksi IgG yang masih rendah. Namun demikian hasil uji ELISA terhadap IgM dengan konjugat *anti bovine* IgM-HRP (*whole molecule*) terdeteksi

positif yang sangat kuat. Hasil ini memperkuat bukti bahwa hewan donor sampel serum nomor 3 sedang terinfeksi (infeksi akut) yang baru saja terjadi (umumnya kurang dari 2 minggu paska infeksi). Penggunaan konjugat *anti bovine* IgM-HRP (*whole molecule*) tidak dapat digantikan oleh protein A/G-HRP karena tidak dapat berikatan dengan IgM dari bovis.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penggunaan konjugat protein A/G-HRP menyebabkan peningkatan variasi atau dispersi nilai absorbansi dari serum positif pada semua perlakuan sebesar 41,48% dibanding penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*). Adapun pada serum negatif, penggunaan konjugat protein A/G-HRP menurunkan variasi nilai absorbansi sebesar 6,88% dibanding konjugat *anti bovine* IgG-HRP apabila menggunakan larutan dapar pengencer PBST dan RBA. Sebaliknya, apabila menggunakan larutan dapar RBB dan LC akan menyebabkan peningkatan variasi nilai absorbansi sebesar 29,09%. Hasil ini memperlihatkan bahwa penggunaan konjugat protein A/G-HRP pada ELISA Surra berpotensi menyebabkan tingginya variasi dari nilai absorbansi serum positif dan sebagian serum negatif sekaligus menurunkan sensitifitas deteksinya dibanding konjugat *anti bovine* IgG-HRP. Hasil yang lebih seragam pada sebagian serum negatif pada penggunaan konjugat protein A/G-HRP kemungkinan berkaitan dengan rendahnya reaksi non spesifik dibandingkan penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*).

Perbandingan penggunaan larutan dapar pengencer

Larutan dapar pengencer RBA dan RBB memiliki konsentrasi deterjen yang lebih besar dan kuat. Pada PBST, konsentrasi Tween 20 (*mild detergent*) adalah 0,05% sedangkan pada RBA konsentrasinya sebesar 0,1%. Adapun pada RBB, deterjen yang digunakan adalah Triton X100 (*strong detergent*) dengan konsentrasi 0,1%. Adanya deterjen akan mengeliminasi beberapa reaksi non spesifik dari reaksi antigen – antibodi.

Demikian pula penambahan urea yang akan menyebabkan reduksi reaksi non spesifik terutama pada interaksi antibodi dengan antigen dari sampel yang berikatan secara lemah. Hal

ini karena urea dapat menyebabkan disosiasi antara antigen – antibodi yang berikatan lemah atau memiliki aviditas lemah pada ELISA *Toxoplasmosis* (Liesenfeld *et al.* 2001; Lappalainen & Heldman 2004; Tekkesin 2012; Haeri *et al.* 2014) maupun ELISA penyakit viral seperti SARS (*severe acute respiratory syndrome*) maupun *west nile* (Levett *et al.* 2005; Chan *et al.* 2007). Penggunaan urea umumnya pada konsentrasi 4M–8M, sementara pada penelitian ini digunakan 2M yang hanya akan mereduksi ikatan antigen–antibodi dengan afinitas lemah saja.

Adapun larutan dapar pengencer LC merupakan larutan dapar komersial yang formulanya tidak diketahui (*proprietary*). Rauch *et al.* (2005) menyatakan bahwa LC bekerja dengan mengurangi reaksi nonspesifik, reaksi silang dan reaksi latar. Larutan dapar LC bekerja dengan mengeliminasi ikatan antibodi – antigen yang memiliki afinitas lemah (*weak*) sampai menengah atau medium (Rauch *et al.* 2005). Oleh karena kekuatan reduksinya yang lebih tinggi dibanding RBA dan RBB maka nilai absorbansi pada ELISA Surra yang menggunakan LC sebagai larutan dapar pengencer sampel serum menyebabkan nilai absorbansi lebih rendah (Gambar 3).

Efek penggunaan konjugat dengan larutan dapar pengencer yang berbeda

Secara umum penggunaan konjugat protein A/G-HRP menyebabkan menurunnya nilai absorbansi hasil ELISA Surra dibanding dengan konjugat *anti bovine* IgG-HRP (*whole molecule*). Demikian pula penggunaan larutan dapar RBA, RBB dan LC menyebabkan reduksi ikatan antigen – antibodi dengan derajat yang berbeda-beda sehingga akan menurunkan nilai absorbansi hasil ELISA Surra. Oleh sebab itu penggunaan konjugat yang berbeda dengan larutan yang berbeda akan menyebabkan nilai absorbansi dan keragamannya.

Penurunan nilai absorbansi akan mempengaruhi sensitifitas dan rasio rerata serum positif dengan serum negatif. Penurunan sensitifitas akan berpengaruh pada kesesuaian uji dengan keadaan yang sesungguhnya. Kesesuaian antara hasil uji dengan status sampel yang sesungguhnya akan diketahui dengan uji *inter rater agreement* menggunakan *Cohen's Kappa(k) estimator* (Viera & Garrett, 2005; Wongpakaran *et al.*

2013) dan *Gwet's AC₁ statistic* (Gwet 2002; Gwet 2008; Wongpakaran *et al.* 2013) serta kekuatan pengukuran atau F (*power of measurement*) menurut Hripcsak & Rothschild (2005). Adapun rasio rerata serum positif dan serum negatif (P/N) akan mempengaruhi kemudahan diskriminasi suatu sampel serum positif atau negatif. Semakin besar nilai rasionya akan semakin mudah dalam menetapkan apakah suatu sampel serum tersebut positif atau negatif.

Berdasarkan nilai κ , AC_1 dan F diketahui bahwa larutan dapar RBB merupakan pilihan terbaik untuk digunakan pada penggunaan konjugat *anti bovine* IgG-HRP (Tabel 1). Adapun berdasarkan rasio P/N menunjukkan bahwa larutan dapar RBB dan LC yang paling baik karena memiliki nilai yang tinggi yaitu 7,2 dan 9,6 sementara lainnya dibawah nilai 5. Pada penggunaan konjugat protein A/G-HRP, nilai κ , AC_1 dan F dengan semua larutan dapar adalah sama yaitu 0,913; 0,913 dan 0,956. Namun dari nilai rasio P/N yang memiliki nilai tinggi adalah larutan dapar PBST dan LC dengan nilai 8,8 dan 16,2.

KESIMPULAN

Penggunaan konjugat protein A/G-HRP pada ELISA Surra pada bovis (sapi dan kerbau) akan menurunkan nilai absorbansi dibanding menggunakan konjugat *anti bovine* IgG-HRP meskipun tetap memiliki nilai kesesuaian yang baik. Penggunaan larutan dapar pengencer sampel serum yang mampu mereduksi ikatan antigen – antibodi dengan afinitas lemah dapat menurunkan nilai absorbansi hasil ELISA Surra namun tetap memiliki rasio P/N yang baik.

Konjugat protein A/G-HRP walaupun memiliki keunggulan dapat digunakan pada berbagai spesies hewan tetapi tetap memiliki afinitas yang berbeda-beda. Oleh karena itu penggunaannya pada ELISA Surra harus dilakukan validasi ulang pada masing-masing spesies hewan seperti kuda, unta, babi, anjing dan kucing.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Adhami, BH. & AA. Gajadhar. 2014. A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot. *Veterinary Parasitology* 200: 66-73.
- Bhide, MR., J. Curlikb, M. Travniccka & P. Lazar. 2004. Protein A/G dependent ELISA a promising diagnostic tool in Lyme disease seroprevalence in game animals and hunting dogs. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 27: 191–199.
- Boyle, MDP. & KJ. Reis. 1987. Bacterial Fc Receptors. *Biotechnology* 5:697-703.
- Chan, KH., K. Sonnenberg, M. Niedrig, SY. Lam, CM. Pang, KM. Chan, SK. Ma, WH. Seto & JSM. Peiris. 2007. Use of Antibody Avidity Assays for Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 14 (11): 1433-1436.
- Desquesnes, M., P. Holzmuller, D-H. Lai, A. Dargantes, Z-R. Lunand, & S. Jittaplaong. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research Internasional* Volume 2013, Article ID 194176, 22 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/194176>.
- Gwet, KL. 2002. *Kappa Statistic is not Satisfactory for Assessing the Extent of Agreement Between Raters*. *Statistical Methods For Inter-Rater Reliability Assessment*, No. 1, April 2002.
- Gwet, KL. 2008. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* (61): 29-48.
- Haeri, MR., B. Jalalizadegan & F. Tabatabaie. 2014. Recognition of acute toxoplasmosis with IgG avidity ELISA test in the pregnant women (the first trimester) in Qom Province, Iran, during two years (2012-2013). *American Journal of Life Science*. 2 (6-3): 18-21.
- Hripcsak, G. & AS. Rothschild. 2005. Agreement, the F-Measure, and Reliability in Information Retrieval. *The Journal of the American Medical Informatics Association* 12 (3): 296-298.

- Indrakamhang, P. 1998. Trypanosoma evansi Infection in Livestock in Thailand. *Journal of Protozoology Research* 8: 153-161.
- Lappalainen, M. & K. Heldman. 2004. Serodiagnosis of toxoplasmosis, The impact of measurement of IgG avidity. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 40 (1) : 81-88.
- Levett, PN., K. Sonnenberg, F. Sidaway, S. Shead, M. Niedrig, K. Steinhagen, GB. Horsman, & MA. Drebot. 2005. Use of Immunoglobulin G Avidity Assays for Differentiation of Primary from Previous Infections with West Nile Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12) : 5873-5875.
- Liesenfeld, O., JG. Montoya, S. Kinney, C. Press & JS. Remington. 2001. Effect of Testing for IgG Avidity in the Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women: Experience in a US Reference Laboratory. *The Journal of Infectious Diseases* 183 : 1248-1253.
- Muhammad G., M. Saqib, MS. Sajid & A. Naureen. 2007. *Trypanosoma evansi* Infections in Himalayan Black Bears (*Selenarctos thibetanus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38(1): 97-100.
- Nymo, IH., J. Godfroid, K. Åsbakk, AK. Larsen, CG. das Neves, R. Rødven and M. Tryland. 2013. A protein A/G indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Brucella* antibodies in Arctic wildlife. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(3): 369-375.
- 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.
- Rauch P., A. Zellmer, N. Dankbar, C. Specht, & D. Sperling. 2005. Optimisation of assays: Interference in immunoassays recognize and avoid. *Laborwelt* 6 (4): 1-7
- Sauer-Eriksson, AE., GJ. Kleywegt, M. Uhlen & TA. Jones. 1995. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. *Structure*, 3:265-278.
- Schaefer, JJ., HA. White, SL. Schaaf, HO. Mohammed & SE. Wade. 2012. Chimeric protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G in multiple animal species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24 (3): 572-575.
- Tarello, W. 2005. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. *Revue de Médecine Vétérinaire* 156 (3) : 133-134.
- Tekkesin, N. 2012. Diagnosis of toxoplasmosis in pregnancy: a review. *HOAJ Biology*. <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-0874-1-9.pdf>
- Thompson, CK., SS. Godfrey & RCA. Thompson. 2014. Trypanosomes of Australian mammals: A review. *International Journal for Parasitology : Parasites and Wildlife* 3:57-66.
- Viera, AJ. & JM. Garrett. 2005. Understanding Interobserver Agreement : The Kappa Statistic. *Family Medicine* 37 (5): 360-363.
- Wongpakaran, N., T. Wongpakaran, D. Wedding & KL Gwet. 2013. A comparison of Cohen's Kappa and Gwet's AC1 when calculating inter-rater reliability coefficients: a study conducted with personality disorder samples. *BMC Medical Research Methodology*, 13:61. <http://www.biomedcentral.com/1471-2288/13/61>.
- Zhang, D., Z. Wang, R. Fang, H. Nie, H. Feng, Y. Zhou & J. Zhao. 2010. Use of Protein A/G in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Four Species of Animals. *Clinical and Vaccine Immunology* 17 (3): 485-486.

