

Perbandingan Profil Protein Takizoit *Toxoplasma gondii* yang Difiksasi Aseton dan PBS untuk Deteksi IgG dan IgM

Comparison Protein Profile of Acetone and PBS-Fixed Toxoplasma gondii Tachyzoites for Detection of IgG and IgM

Sisca Valinata^{1*}, Umi Cahyaningsih², Arifin Budiman Nugraha², Dyah Ayu Kurniawati³,
Muhammad Ibrahim Desem⁴, Sulinawati⁵

¹Pascasarjana Program Studi Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Bomedis, IPB University, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Parasitology, Sekolah Kedokteran Hewan dan Bomedis, IPB University, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

³Balai Besar Pengujian Standar Instrumen Veteriner, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16124

⁴Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong, Jawa Barat, Indonesia 16911

⁵Balai Veteriner Lampung, Lampung, Indonesia 35142

*Corresponding autor; Email: umi-ch@apps.ipb.ac.id

Naskah diterima: 27 Desember 2024, direvisi: 16 Januari 2025, disetujui: 30 Maret 2025

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan that causes zoonotic diseases. The prevalence of toxoplasmosis in humans in Indonesia ranges from 9.7-70%. This parasite is difficult to find in tissues, and testing using a serological approach is the most commonly used method to determine the stage of infection. Previous studies have reported that agglutination testing with acetone-fixed tachyzoites is only positive for acute infections. The aim of this study was to determine the relationship between acetone-fixed tachyzoites and the detection of IgG and IgM seropositivity and to identify specific proteins recognized by IgG and IgM. Tachyzoites were fixed with acetone (A) and PBS (P). After the fixation process, tachyzoites were made into smear preparations to observe their morphology and sonicated to obtain Soluble Toxoplasma Antigen (STA). STA was then subjected to SDS-PAGE and western blotting. The addition of acetone fixation will result in changes in morphology, protein and protein concentration. Even though changes occur, acetone-fixed tachyzoites can still be IgG-seropositive. Protein bands that can be used as markers for IgG seropositivity in western blot testing are bands measuring 20, 24, 27, 73, and 110 kDa, and the combination of acetone fixation with anti-goat IgM conjugate will produce a specific IgM seropositive band measuring 86 kDa.

Key words: acetone, SDS PAGE, seropositive, *Toxoplasma gondii*, western blot.

Abstrak

Toxoplasma gondii merupakan protozoa obligat intraseluler yang menyebabkan penyakit zoonosis. Prevalensi toxoplasmosis pada manusia di Indonesia berkisar antara 9,7-70%. Parasit ini sulit ditemukan di jaringan, pengujian dengan pendekatan metode serologi adalah yang paling umum digunakan untuk menentukan stadium infeksi. Penelitian terdahulu menyatakan pengujian aglutinasi dengan takizoit yang difiksasi aseton hanya positif untuk infeksi akut. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui keterkaitan antara takizoit yang difiksasi aseton dengan deteksi seropositif IgG dan IgM, serta mengidentifikasi protein spesifik yang dikenali IgG dan IgM. Takizoit difiksasi dengan dua bahan: aseton (A) dan PBS (P). setelah proses fiksasi, takizoit dibuat preparat ulas untuk melihat morfologi dan disonikasi untuk mendapatkan Soluble Toxoplasma Antigen (STA). STA kemudian dilakukan SDS PAGE dan western blotting. Penambahan fiksasi aseton akan mengakibatkan

perubahan secara morfologi, konsentrasi protein dan protein. Walaupun terjadi perubahan, tetapi takizoit yang difiksasi aseton tetap dapat seropositif IgG. Pita protein yang dapat digunakan sebagai penanda seropositif IgG pada pengujian western blot yaitu pita berukuran 20, 24, 27, 73, 110 kDa, dan kombinasi penggunaan fiksasi aseton dengan konjugat anti *goat* IgM akan mendapatkan pita spesifik seropositif IgM yaitu ukuran 86 kDa.

Key words: aseton, SDS PAGE, seropositif, *Toxoplasma gondii*, western blot.

Pendahuluan

Toxoplasma gondii adalah obligat parasit intraseluler yang berasal dari filum Apicomplexa yang menginfeksi satu per tiga populasi dunia (Lourido, 2019). *Toxoplasma gondii* dapat membentuk kista pada jaringan, yang dapat menginfeksi semua hewan berdarah panas (mamalia dan burung) dan manusia (Tenter *et al.*, 2000). Prevalensi toksoplasmosis pada manusia dilaporkan di beberapa wilayah Indonesia dengan prevalensi berkisar antara 9,7-70% (Terazawa *et al.*, 2003; Retmanasari *et al.*, 2017; Konishi *et al.*, 2000; Tuda *et al.*, 2017; Durfee *et al.*, 1976; Febianingsih *et al.*, 2017). Sementara itu, studi seroprevalensi pada hewan di Indonesia (ayam, bebek, sapi, kambing, domba dan kerbau) berkisar antara 10-92,65% (Wulandari *et al.*, 2019; Hanafiah *et al.*, 2010; Riyanda *et al.*, 2019; Dewi *et al.*, 2013; Hadi, 2022).

Parasit *Toxoplasma gondii* seringkali sulit ditemukan di bagian jaringan, tetapi mungkin terlihat di bagian otak dan plasenta terutama toksoplasmosis pada manusia (WOAH, 2018). pengujian dengan pendekatan metode serologi adalah yang paling umum digunakan untuk menentukan stadium infeksi (Sensini, 2006). Teknik pengujian yang pertama kali berkembang untuk diagnosa toksoplasmosis adalah *Sabin Feldman dye test* (DT). DT dianggap sebagai standar dalam pengujian serologis untuk *Toxoplasma*, namun pengujian ini memiliki keterbatasan dan resiko yang tinggi karena sulitnya memperoleh dan menyimpan organisme serta potensi risiko bagi pegawai laboratorium (Wyrosdick dan Schaefer, 2015). Beberapa teknik diagnosis yang saat ini berkembang antara lain PCR dan histopatologi untuk mendeteksi antigen, IFAT, ELISA, DAT/MAT untuk mendeteksi antibodi (WOAH, 2018).

Terdapat perbedaan hasil pada uji aglutinasi menggunakan takizoit yang difiksasi dengan formalin dan aseton, uji aglutinasi

dengan takizoit yang difiksasi dengan aseton hanya positif dengan serum dari pasien pada tahap infeksi akut, sedangkan takizoit terfiksasi formalin, hasil positif diperoleh pada tahap infeksi akut dan kronis (laten) (Suzuki *et al.*, 1988). Hal tersebut juga dipertegas oleh hasil penelitian Ali dan Habib (2012) yang menyatakan bahwa uji aglutinasi aseton dan formalin dapat dianggap sebagai alat yang berguna untuk membedakan antara toksoplasmosis eksperimental akut dan kronis. IgM diproduksi sebagai respons imun primer, yang meningkat pada awal infeksi, sedangkan IgG sebagian besar disintesis dalam respons imun sekunder, yang diproduksi mengikuti IgM dan kemudian menggantikannya (Justiz, *et al.*, 2023; Nieman, *et al.*, 1991. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keterkaitan antara takizoit yang difiksasi aseton dengan deteksi seropositif IgG dan IgM, serta mengidentifikasi protein spesifik yang dikenali IgG dan IgM.

Materi dan Metode

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Hewan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB University, dengan Nomor: 071/KEH/SKE/VII/2023.

Propagasi Takizoit *Toxoplasma gondii*

Takizoit dari *Toxoplasma gondii* galur RH diperbanyak dengan cara disuntikkan secara intraperitoneal ke mencit Balb/c umur 6-8 minggu. Takizoit diperoleh dari stok milik Balai Besar Pengujian Standar Instrumen Pertanian Veteriner Bogor. Setelah 4 hari, takizoit kemudian dipanen dari cairan peritoneum dan disentrifus dengan kecepatan 3350 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dibuang dan peletnya diresuspendi dalam 1 ml larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Sigma Chem., USA) dengan pH 7,2 (konsentrasi akhir adalah 10⁹ takizoit/ml).

Suspensi takizoit *Toxoplasma gondii* yang telah dipurifikasi difiksasi menggunakan aseton, yaitu takizoit diberikan aseton 30% dalam PBS pH 7,2 pada suhu 4 °C selama 72 jam (Suzuki *et al.*, 1990). Suspensi takizoit disentrifus dengan kecepatan 3350 g selama 10 menit, kemudian dilakukan pemisahan antara supernatan dan endapan. Endapan kemudian dicuci tiga kali dengan PBS pH 7,2 dan disentrifus dengan kecepatan 3350 g selama 10 menit. Takizoit tanpa fiksasi, PBS hanya digunakan untuk pencucian tiga kali dan disentrifus dan langsung diproses untuk isolasi protein (Valinata *et al.*, 2020).

Evaluasi Morfologis Takizoit

Cairan yang mengandung takizoit setelah selesai proses fiksasi, diambil sebanyak 10 µl dan ditetaskan ke atas gelas objek kemudian dibuat preparat ulas. Preparat ulas selanjutnya diberi kode dan dikeringkan. Setelah itu preparat dilakukan pewarnaan dengan pewarna MDT dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Purifikasi Protein dari Takizoit *Toxoplasma gondii*

Protein *Toxoplasma gondii* diisolasi dengan cara sonikasi menggunakan Q-Sonica 500 dengan pulse 10:0,5, (AMP) 80% dengan siklus pengulangan lima kali selama 1,5 menit. Hasil sonikasi kemudian disentrifus pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dan dipisahkan supernatannya sebagai *Soluble Toxoplasma Antigen* (STA) (Valinata *et al.*, 2020). STA kemudian dikuantifikasi untuk menentukan kadar proteinnya menggunakan metode Bradford.

SDS PAGE dan Immunoblotting (Western Blot)

Sekitar 10 µg STA dicampur (1:1) dengan laemmli sampel buffer (Bio-Rad, USA). Setiap sampel dimasukkan ke dalam lajur dari gel Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gels, 4-12% (Invitrogen™, USA) pada konsentrasi 10 µg/lajur bersama dengan marka protein (Broad Range Spectra Multicolor, Thermo Scientific). Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan mini gel tank Thermofisher, (Invitrogen™, USA) pada 100 volt sekitar 1 jam. Hasil elektroforesis kemudian ditransfer pada membran PVDF menggunakan transblot turbo (Bio-Rad, USA). Hasil transfer pada membran dicuci

dengan akuades, kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF membranes (Invitrogen™, USA) dan dipotong setiap lajurnya. Setelah itu membran di blocking dengan Pierce™ Protein-Free (TBS) blocking buffer (Thermo Scientific™, USA) selama 24 jam, dan kembali dicuci dengan PBS-Tween 20, kemudian masing-masing direaksikan dengan serum pada pengenceran 1:400 serta diinkubasi selama 60 menit. Selanjutnya membran kembali dicuci dengan PBS-Tween 20 dan selanjutnya direaksikan dengan konjugat rabbit anti goat IgM dan rabbit anti goat IgG, (Sigma-Aldrich, USA) dengan pengenceran 1:20.000 serta diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam. Terakhir, membran dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 dan direaksikan dengan substrat Pierce™ 1-Step Ultra TMB Blotting solution (Thermo Scientific™, USA) sekitar 3-5 menit apabila telah tervisualisasi, maka membran PVDF dicuci dengan akuades.

Analisa Data

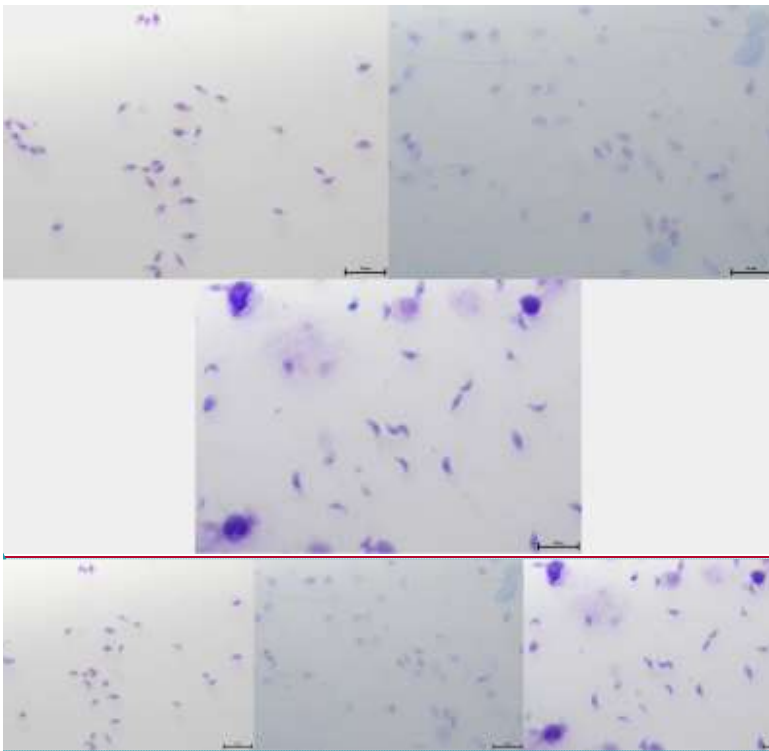
Analisis data pengukuran takizoit menggunakan uji-t pada SPSS 26.0. Penghitungan berat molekul protein dilakukan dengan cara melakukan pengukuran marka terlebih dahulu, yang selanjutnya dibuat regresi polinomial. Selanjutnya dilakukan pengukuran migrasi dari tiap protein, kemudian nilai tersebut akan dimasukkan kepersamaan dari regresi polinomial untuk mendapatkan berat molekul tiap protein. Aplikasi yang digunakan untuk mengukur jarak migrasi adalah ImageJ dan pembuatan regresi polinomial pada Microsoft Excel. Hierarchical cluster analysis (HCA) menggunakan metoda Ward Linkage dilakukan untuk menganalisis hasil western blot..

Hasil dan Pembahasan

1. Morfologi Takizoit *Toxoplasma gondii*

Berikut dibawah ini adalah gambar dari takizoit yang telah diberi aseton, PBS dan takizoit murni.

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan melakukan pemeriksaan preparat ulas dari cairan yang mengandung takizoit yang diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x. Selanjutnya dilakukan pengukuran takizoit untuk mengetahui perbedaan *Toxoplasma gondii* yang diberi fiksasi aseton dan PBS dan dibandingkan dengan takizoit



Gambar 1. Gambaran takizoit yang difiksasi dengan (a) PBS, (b) aseton, (c) takizoit murni dari peritonerum mencit diwarnai dengan pewarnaan MDT dan diamati dengan perbesaran 1000x.

yang diambil langsung dari peritoneum mencit tanpa ada pemerosesan.

Pengamatan secara morfologi takizoit yang diberi aseton dan PBS memiliki bentuk yang berbeda. Takizoit yang murni diambil secara langsung dari peritoneum (Gambar 1.c) dan langsung diwarnai, terlihat bentuknya seperti pisang atau bulan sabit yang terlihat melengkung. Takizoit yang diberi aseton dan PBS (Gambar 1.a dan b), gambaran takizoit berubah tidak seperti gambaran bulan sabit, takizoit tampak lebih menggembung pada bagian tengah, terutama pada takizoit yang diberi aseton. Hal tersebut terbukti dari hasil pengukuran takizoit, takizoit yang diberi aseton memiliki ukuran lebar yang lebih besar dibandingkan takizoit murni dan takizoit yang diberi PBS (Tabel 1).

Takzoit yang difiksasi aseton tidak terlalu jelas gambarnya dibandingkan dengan PBS, dengan dinding yang tidak terlalu tegas (Gambar

1). Pemberian aseton dan PBS dalam pemerosesan takizoit akan mempengaruhi dan mengakibatkan perubahan ukuran takizoit. Menurut Hoetelmans *et al.*, (2001) fiksasi aseton mengakibatkan hilangnya integritas struktur intraseluler dan dapat merusak struktur subseluler. Pemberian PBS mengakibatkan ukuran takizoit berubah menjadi lebih kecil Pada penelitian ini, pemberian PBS sebagai pembanding terhadap takizoit yang diberi aseton. Menurut Budi *et al.*, (2024) PBS adalah larutan isotonik yang tidak beracun bagi sel, dan mempertahankan osmolalitas sehingga ideal untuk proses pencucian dalam kultur sel dan uji imunologi seperti ELISA dan imunohistokimia dan penggunaan larutan PBS sebagai media pencuci tidak menyebabkan kerusakan membran sel.

2. Immunoblotting

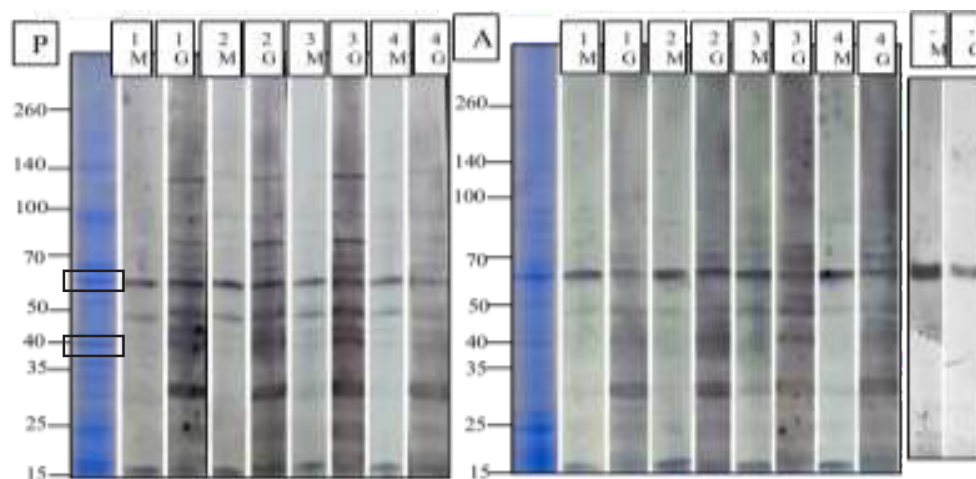
Jumlah takizoit yang dibutuhkan untuk mendapatkan konsentrasi 10 µg/ µl protein pada

Tabel 1. Hasil pengukuran panjang dan lebar takizoit yang diberi bahan fiksasi aseton dan PBS

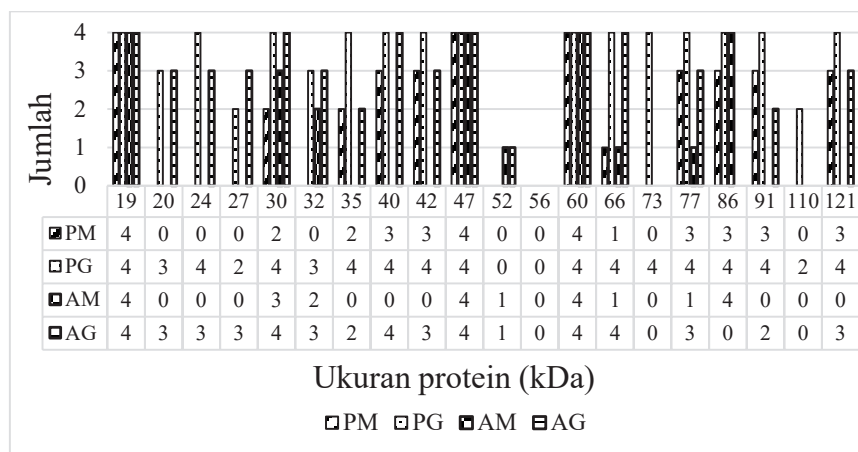
Fiksasi	Panjang takizoit (µm)	Lebar takizoit (µm)	Jumlah takizoit	Volume (µl)/ Konsentrasi protein 10µg	Jumlah takizoit/ 10µg
PBS	4,24±0,46	1,55±0,27	6,6x10 ⁸	9,14	7,22 x10 ⁷
Aseton	4,67±0,24	2,31±0,24	18,8x10 ⁸	6,32	2,97x10 ⁸
Murni	4,75±0,49	1,64±0,44	-	-	-

perlakuan dengan difiksasi aseton lebih banyak 4 kali dibandingkan dengan takizoit yang diberi PBS yaitu $2,97 \times 10^8$ pada takizoit yang difiksasi aseton sedangkan takizoit yang hanya diberi PBS memerlukan seperempat jumlah takizoit yaitu $7,22 \times 10^7$. Menurut Suvarna *et al.*, (2019) agen fiksasi seperti aseton, mendenaturasi protein dengan memutus ikatan hidrofobik yang bertanggung jawab untuk mempertahankan struktur tersier protein. Sebagian besar protein menjadi kurang larut dalam lingkungan organik, dan 13% protein dimungkinkan hilang (Horobin (1982) dalam Suvarna *et al.*, (2019)). Pada penelitian ini konsentrasi protein yang difiksasi aseton berkurang 35% dibandingkan dengan PBS. Protein hasil sonikasi kemudian dilakukan SDS PAGE dan *western blot*. Hasil SDS PAGE dan *western blot* dapat dilihat pada Gambar 2.

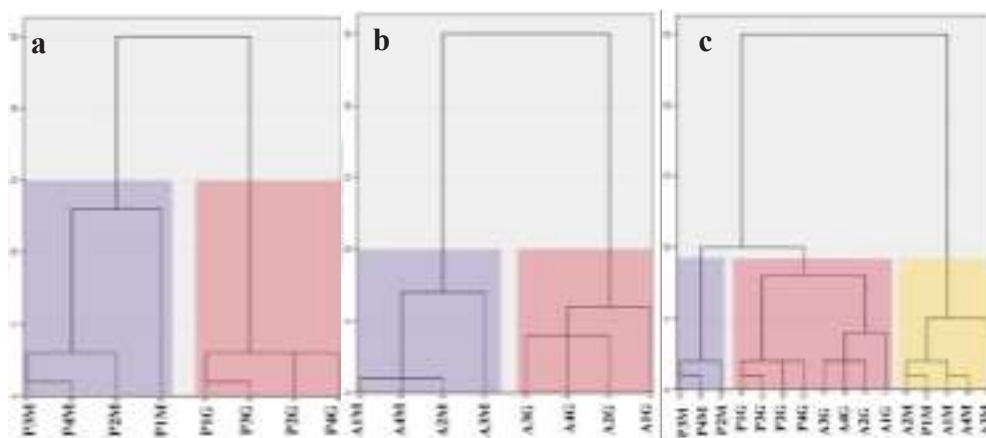
Pada SDS PAGE (Gambar 2) terdapat 18 pita protein pada fiksasi PBS dan 16 pita pada fiksasi aseton. Perbedaan tersebut terletak pada pita berukuran 56 dan 91 hanya terdapat pada gel hasil SDS PAGE protein takizoit dengan fiksasi PBS (P). Hasil dari *western blot* (Gambar 2 dan Gambar 3), protein ukuran 56 kDa pada kelompok P tidak bereaksi terhadap sampel serum, sehingga tidak ditemukannya pita protein tersebut, Pita berukuran 56 kDa ini, bukanlah protein imunogenik sehingga tidak bereaksi terhadap antibodi serum. Protein ukuran 91 kDa yang tidak terlihat pada hasil SDS PAGE takizoit yang difiksasi aseton, saat dilakukan *western blot* terdapat reaksi terhadap dua sampel serum yang menggunakan konjugat IgG. Menurut Schagger (2006) pewarnaan coomassie cocok untuk protein minimum 0,2



Gambar 2. Hasil SDS PAGE dan *western blot* protein *Toxoplasma* yang difiksasi PBS dan aseton dengan konjugat anti *goat* IgG dan IgM. P : Takizoit yang difiksasi PBS, A: Takizoit yang difiksasi aseton, G: Menggunakan konjugat anti *goat* IgG, M: Menggunakan konjugat anti *goat* IgM, 1-4 : kode sampel.



Gambar 3. Jumlah positif pita protein *Toxoplasma gondii* yang difiksasi PBS dan Aseton dengan konjugat anti *goat* IgG dan IgM pada pengujian *western blot*. P : Takizoit yang difiksasi PBS, A: takizoit yang difiksasi aseton, G: Menggunakan konjugat anti *goat* IgG, M: Menggunakan konjugat anti *goat* IgM.



Gambar 4. Dendrogram hasil HCA metode *Ward linkage* dari immunoblotting, a= Kelompok perlakuan dengan PBS, b = Kelompok perlakuan dengan aseton, c = gabungan antara a dan b., P : Takizoit yang difiksasi PBS, A: takizoit yang difiksasi aseton, G: Menggunakan Konjugat anti *goat* IgG, M: Menggunakan konjugat anti *goat* IgM, 1-4 : kode sampel.

µg, sensitivitas protokol pewarnaan coomassie ini relatif tinggi, jumlah protein yang jauh lebih kecil dapat divisualkan pewarnaan perak. Hal ini dimungkinkan konsentrasi protein 91 lebih kecil dari 0,2 µg, sehingga tidak tervisualisasi.

Takizoit kelompok P menunjukkan beberapa protein yang hanya bereaksi terhadap konjugat IgG, yaitu protein berukuran 20, 24, 27, 32, 73, dan 110 kDa. Protein lainnya yaitu yang berukuran 19, 30, 35, 40, 42, 47, 60, 66, 77, 86, 91, dan 121 kDa juga dapat bereaksi dengan kedua jenis konjugat. Pada kelompok A protein yang hanya bereaksi terhadap konjugat IgG, antara lain protein ukuran 20, 24, 27, 32, 35, 40, 42, 91, dan 121 kDa. Protein lainnya yaitu yang berukuran 19, 30, 47, 52, 60, 66, dan 77 kDa bereaksi dengan kedua jenis konjugat. Hasil *western blot* kelompok A dan P, protein spesifik yang hanya bereaksi terhadap konjugat IgG yaitu pita berukuran 20, 24, 27, 73 dan 110 kDa. Dari ke-5 protein tersebut, protein ukuran 24 kDa adalah yang paling banyak hasil positif terhadap konjugat anti *goat* IgG, yaitu 7 dari 8 sampel. Protein ukuran 24 kDa banyak diidentifikasi sebagai *Granule-1* (GRA1) yang merupakan protein antigen eksresi dan sekresi. Protein ini terletak pada *dense granule* yang terdapat pada bentuk takizoit dan bradizoit yang disekresikan oleh vakuola parasitiporus (Sibley *et al.*, 1995). Menurut Muflikhah dan Artama (2017) protein rekombinan GRA1 diketahui memiliki aktivitas immunogenik yang tinggi pada penderita toksoplasmosis dan dapat digunakan sebagai penanda untuk diagnosis toksoplasmosis.

Pada kelompok P tidak ada protein khusus yang hanya bereaksi terhadap konjugat IgM. Sedangkan, takizoit kelompok A terdapat protein yang hanya bereaksi pada konjugat IgM yaitu protein berukuran 86 kDa. Pada kelompok P protein ukuran 86 kDa bereaksi terhadap kedua konjugat. Oleh karena itu, kombinasi penggunaan fiksasi aseton dan konjugat anti *goat* IgM akan mendapatkan hasil pemeriksaan spesifik terhadap infeksi akut. Menurut Son dan Nam (2001) protein 86 kDa kemungkinan besar terlabel pada struktur *mikroneme* takizoit. Menurut Soldati *et al.*, (2001) pada sebagian besar *Apicomplexa*, gerakan meluncur dan invasi sel inang terkait erat dengan pelepasan protein *mikroneme* di ujung apikal parasit dan redistribusinya ke kutub posterior. Menurut Cérède *et al.*, (2005) *Apicomplexa* menyerang sel melalui mekanisme unik yang melibatkan keluarnya vesikel sekretori yang disebut *mikroneme*. Protein *mikroneme* (MIC) mencakup protein transmembran dan protein larut yang mengekspresikan domain perekat berbeda. Domain *chitin binding-like* (CBL) pada *mikroneme* terutama MIC3 sebagai pemain kunci dalam toksoplasmosis yaitu peran sinergis MIC dalam virulensi. Parasit *Toxoplasma* telah mengembangkan banyak interaksi ligan-reseptor untuk memastikan invasi pada jenis sel yang berbeda selama perjalanan infeksi.

Kesimpulan

Penambahan fiksasi aseton akan mengakibatkan perubahan secara morfologi,

konsentrasi protein, dan protein. Protein takizoit yang fiksasi aseton dapat juga mendeteksi seropositif *Toxoplasma* Pita protein yang dapat digunakan sebagai penanda seropositif IgG pada pengujian *western blot* yaitu pita berukuran 20, 24, 27, 73, 110 kDa. Kombinasi penggunaan fiksasi aseton dengan konjugat anti *goat* IgM untuk mendapatkan pita spesifik seropositif IgM yaitu 86 kDa.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penyuluhan dan Pengembangan SDM Pertanian yang telah memberikan kesempatan dan beasiswa program magister. Dyah Ayu Kurniawati, Muhammad Ibrahim Desem dan Sulinawati yang telah membantu selama proses penelitian.

Daftar Pustaka

- Ali, N.M., Habib, K.S.M. (2012). Kinetics and time dependence of the differential agglutination of acetone [AC]- and formalin [HS]-fixed *Toxoplasma* tachyzoites by serum of mice with experimental toxoplasmosis. *Parasit Diseases*. 36(1):112-119.
- Budi, H. S., Setyawati, M. C., Anitasari, S., Shen, Y.K., Pebriani, I., Ramadan, D. E. (2024). Cell detachment rates and confluence of fibroblast and osteoblast cell culture using different washing solutions. *Brazilian Journal of Biology*. 84:e265825.
- Chen, A., Leith, M., Tu, R., Tahim, G., Sudra, A., Bhargava, S. (2017). Effects of diluents on cell culture viability measured by automated cell counter. *PLoS ONE*. 12(3): e0173375.
- Dannemann, B.R., Vaughan, W.C., Thullies, P., Remington, J.S. (1990). Differential Agglutination Test for Diagnosis of Recently Acquired Infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical microbiology*. 28(9):1928-1933.
- Dewi, N.M.Y.N., Damriyasa, I.M., Suratma, N.A. (2013). Seroprevalensi *Toxoplasma gondii* pada kambing dan bioassay patogenitasnya pada kucing. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan*. 1(2):76-80.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P., Powell, E.C. (1995). Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *American Journal of Veterinary Research*. 56(8):1030-1036.
- Durfee, P.T., Cross, J.H., Rustam, Susanto. (1976). Toxoplasmosis in man and animals in South Kalimantan (Borneo), Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 25(1):42-47.
- Febianingsih, N.P.E., Indriani, C., Artama, W.T. (2017). Seroprevalensi toksoplasmosis di Gianyar Bali. *Berita Kedokteran Masyarakat*. 33(2):61-66.
- Hadi, S. (2022). Uji serologis toxoplasmosis pada kambing lokal di Sulawesi Selatan dengan metode ELISA. *Jurnal Triton*. 13(1): 22-29.
- Hanafiah, M., Kamaruddin, M., Nurcahyo, W., Winaruddin, W. (2010). Study of toxoplasmosis infection in human and related to animal in Banda Aceh. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 4(2):87-92.
- Hoetelmans, R.W.M., Prins, F.A., Ten Velde, I.C., Van Deer Meer, J., Van De Velde, C.J.H., Van Dierendonck, J.H. (2001). Effects of Acetone, Methanol, or Paraformaldehyde on Cellular Structure, Visualized by Reflection Contrast Microscopy and Transmission and Scanning Electron Microscopy. *Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 9(4): 346–351.
- Justiz Vaillant, A.A., Jamal, Z., Patel, P., *et al.*, (2023). Immunoglobulin. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/> [1 Februari 2025]
- Konishi, Houki, Y., Harano, K., Mibawani, R.S., Marsudi, D., Alibasah, S., Dachlan, Y.P. (2000). High prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* among humans in Surabaya, Indonesia. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 53(6):238-241.
- Lourido, L. (2019). *Toxoplasma gondii*. *Trend in parasitology*. 35(11):944-945.

- Retmanasari, A., Widartono, B.S., Wijayanti, M.A., Artama, W.T. (2017). Prevalence and risk factors for toxoplasmosis in Middle Java, Indonesia. *EcoHealth*. 14:162–170.
- Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L. (1991). The Effects of Acute and Chronic Exercise on Immunoglobulins. *Sports Med*. 11:83–201.
- Riyanda, A.P.P., Suwandi, J.F., Utami, H.D., Susianti, S. (2019). Seroprevalensi *Toxoplasma gondii* pada hewan ternak kambing di Kota Bandar Lampung. *Agromedicine*. 6(1):25-29.
- Schagger, H. (2006). Protocol tricine SDS PAGE. *Nature protocols*. 1(1): 16-23
- Sensini, A. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 12: 504–512
- Suvarna, S.K., Christopher, L., Bancroft, J.D. (2019). *Theory and practice of hytological techniques eight edition*. Elsevier.China.
- Suzuki, Y., Thulliez, P., Desmonts, G., Remington, J.S. (1988). Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of toxoplasma infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 26(5):901-905.
- Suzuki, Y., Thulliez, P., Remington, J.S. (1990). Use of acute-stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of acute toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(8):1734-1738.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 30: 1217-1258
- Terazawa, A., Muljono, R., Susanto, L., Margono, S.S., Konishi, E. (2003). High toxoplasma antibody prevalence among inhabitants in Jakarta, Indonesia. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 56:107-109.
- Tuda, J., Adiani, S., Seki, M.I., Umeda, K., Nishikawa, Y. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in humans and pigs in North Sulawesi, Indonesia. *Parasitology International*. 66(5):615-618.
- Valinata, S., Sulinawati, Subekti, D.T. (2020). Evaluasi performa and kesesuaian uji antara uji aglutinasi toxoplasma modified agglutination test dengan berbagai kit uji serologis komersial. *Jurnal Veteriner*. 21(2):278-291.
- [WOAH]. (2018). OIE Terrestrial Manual Chapter 3.10.8 tentang Toxoplasmosis.
- Wulandari, R., Suwandi, J.F., Mutiara, H., Sulinawati, Hanriko, R. (2019). Seroprevalensi *Toxoplasma gondii* pada hewan ternak sapi di Kota Bandar Lampung. *Agromedicine*. 6(1):1-5.
- Wyrosdick, H.M., Schaefer, J.J. (2015). *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. *Animal Health Research Reviews*. 16(2):150–162.