

Perbandingan Antara Uji Elisa-Antibodi dan Pemeriksaan Telur Cacing Untuk Mendeteksi Infeksi *Fasciola gigantica* pada Sapi

S. ENDAH ESTUNINGSIH, S. WIDJAJANTI dan GATOT ADIWINATA

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 4 Nopember 2003)

ABSTRAK

ESTUNINGSIH, S.E., S. WIDJAJANTI dan G. ADIWINATA. 2004. Comparison between antibody-elisa test and fecal egg count for detecting *Fasciola gigantica* infection in cattle. *JITV* 9(1): 55-60.

The comparison between antibody-ELISA test and fecal egg count for detection of natural infection of *Fasciola gigantica* in cattle was observed. One hundred and fifty samples of blood, feces and livers were collected from cattle slaughtered in the abattoir in Jakarta. Serum was collected from the blood samples and the level of antibody was determined by using antibody-ELISA test. The fecal samples were processed by using sedimentation technique in order to detect the present of *F. gigantica* eggs. The livers were processed for liver flukes count. The result showed that from the liver examination, 38.7% cattle were negative flukes, 16% had 1-10 flukes, 34% cattle had 11-100 flukes and 11.3% cattle had more than 100 flukes. About 44.7% infected cattle had less than 100 eggs of *F. gigantica* per gram feces, however no eggs of *F. gigantica* were found in 13% infected cattle. The result of antibody-ELISA test showed that from 92 cattle infected with *F. gigantica*, 84 cattle had $OD \geq 0.38$ (range from 0.38-1.77) and 8 cattle had $OD < 0.38$ (range from 0.18-0.37). In contrast, from 58 cattle without flukes, 7 cattle had $OD \geq 0.38$ (range from 0.38-1.95) and 51 cattle with the $OD < 0.38$ (range from 0.1-0.33). The sensitivity of the fecal examination technique was 87% and the specificity was 100%. The sensitivity and specificity for antibody-ELISA test were 91 and 88% respectively.

Key words: Antibody-ELISA, *Fasciola gigantica*, feces, liver

ABSTRAK

ESTUNINGSIH, S.E., S. WIDJAJANTI dan G. ADIWINATA. 2004. Perbandingan antara uji elisa-antibodi dan pemeriksaan telur cacing untuk mendeteksi infeksi *Fasciola gigantica* pada sapi. *JITV* 9(1): 55-60.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antara uji ELISA-antibodi dan pemeriksaan telur pada feses untuk mendeteksi adanya infeksi alam *Fasciola gigantica* pada sapi. Seratus lima puluh sampel darah, feses dan hati telah dikoleksi dari sapi yang dipotong di rumah potong hewan Jakarta. Sampel darah diproses untuk dikoleksi serumnya dan diperiksa tingkat antibodinya dengan uji ELISA. Sampel feses diproses dengan uji sedimentasi untuk pemeriksaan telur cacing *F. gigantica*, sedangkan hati diproses untuk penghitungan jumlah cacing *F. gigantica*. Hasil menunjukkan bahwa dari pemeriksaan hati, 38,7% sapi negatif cacing *F. gigantica*, 16% memiliki cacing *F. gigantica* antara 1-10 ekor, 34% memiliki 11-100 cacing dan sisanya sekitar 11,3% memiliki lebih dari 100 cacing. Dari 13% sapi yang terinfeksi cacing *F. gigantica* tidak mengandung telur cacing hati di dalam fesesnya, sedangkan 44,7% sapi yang positif tersebut memiliki telur cacing kurang dari 100 telur/g fesesnya. Adapun hasil dari uji ELISA-antibodi menunjukkan bahwa dari 92 ekor sapi yang terinfeksi *F. gigantica*, 84 ekor sapi mempunyai $OD \geq 0,38$ (kisaran $OD 0,38-1,77$) dan 8 ekor sapi mempunyai $OD < 0,38$ (kisaran $OD 0,18-0,37$). Sebaliknya dari 58 ekor sapi yang tidak terinfeksi cacing *F. gigantica*, 7 ekor sapi mempunyai $OD \geq 0,38$ (kisaran $OD 0,38-1,95$) dan 51 ekor sapi dengan $OD < 0,38$ (kisaran $OD 0,1-0,33$). Dari penelitian ini diketahui bahwa sensitifitas dari metode pemeriksaan telur cacing adalah 87% dan spesifisitasnya adalah 100%. Adapun sensitifitas dan spesifisitas untuk uji ELISA-antibodi masing-masing adalah 91 dan 88%.

Kata kunci: ELISA-antibodi, *Fasciola gigantica*, feses, hati

PENDAHULUAN

Fasciolosis adalah merupakan salah satu penyakit parasiter yang disebabkan oleh infeksi cacing hati (*Fasciola* spp.). Penyakit ini biasanya menyerang ternak ruminansia, pada daerah tropis disebabkan oleh infeksi *F. gigantica*, sedangkan di daerah subtropis disebabkan oleh infeksi *F. hepatica* (BORAY, 1985). Prevalensi fasciolosis di Indonesia antara 60-90% (EDNEY dan

MUHLISH, 1962; SUHARDONO *et al.*, 1991), sedangkan kerugian ekonomi yang disebabkan oleh penyakit ini diperkirakan sekitar 153,6 milyar rupiah setiap tahunnya (ANONYMUS, 1990). Kerugian ekonomi tersebut berupa kerusakan hati, kekurusan dan penurunan tenaga kerja pada sapi yang terinfeksi.

Diagnosis penyakit ini didasarkan atas penemuan telur cacing *Fasciola* di dalam feses hewan yang terinfeksi (BORAY, 1985). Pemeriksaan jumlah telur

yang relatif sedikit pada feses merupakan kesulitan yang besar dalam mendiagnosa penyakit tersebut. Diagnosis awal dengan menemukan telur dalam feses adalah tidak mungkin karena telur *Fasciola* spp. tidak akan ditemukan dalam feses sampai cacing hati mencapai dewasa antara 10–14 minggu setelah infeksi (ARMOUR *et al.*, 1997).

Pendekatan alternatif untuk mengatasi kesulitan dalam mendiagnosa fasciolosis adalah dengan serodiagnosis yaitu pemeriksaan antibodi terhadap antigen yang spesifik untuk *Fasciola* spp. dalam serum darah disamping penemuan cacing dewasanya di dalam hati ternak. Serodiagnosis dilakukan dengan uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), yang telah dikembangkan dan digunakan untuk mendiagnosa infeksi *F. hepatica* pada sapi dan domba (FARRELL *et al.*, 1981; ZIMMERMAN *et al.*, 1982). Antigen dari *excretory/secretory* (ES) cacing dewasa merupakan antigen yang biasa digunakan dalam uji ELISA dan antibodi terhadap antigen ES ini dapat dideteksi pada awal infeksi yaitu pada minggu ke 2-4 dan puncaknya pada minggu ke 8-10 setelah infeksi (SANTIAGO dan HILLYER, 1988; FAGBEMI dan GUOBADIA, 1995). Hasil ini menunjukkan bahwa uji ELISA bisa diaplikasikan untuk diagnosis dan kontrol fasciolosis pada infeksi alam di lapangan.

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk membandingkan antara uji ELISA antibodi, pemeriksaan feses dan hati untuk mendeteksi adanya infeksi alam *F. gigantica* pada sapi.

MATERI DAN METODE

Sampel

Seratus lima puluh sampel feses, darah dan hati sapi dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) Jakarta secara acak sederhana. Sampel-sampel tersebut dibawa ke Laboratorium Parasitologi Balai Penelitian Veteriner untuk dilakukan pemeriksaan. Sampel feses diproses untuk pemeriksaan telur cacing *F. gigantica*, sampel darah diproses untuk dikoleksi serumnya dan diperiksa tingkat antibodi *F. gigantica* dengan uji ELISA. Sedangkan, sampel hati diproses untuk pemeriksaan dan penghitungan jumlah cacing *F. gigantica*.

Pemeriksaan feses

Sampel feses diproses dan diperiksa terhadap telur cacing *F. gigantica* dengan menggunakan uji sedimentasi yang mengikuti prosedur PARFITT dan BANK (1977) dengan modifikasi sebagai berikut: Sebanyak 3 g feses ditempatkan ke dalam tabung plastik yang berbentuk kerucut (*conical flask*) berukuran 250 ml, kemudian ditambahkan air sampai batas 250 ml sambil diaduk. Larutan feses dalam tabung

kerucut didiamkan selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Endapan feses yang tertinggal sekitar 15 ml dalam tabung dilarutkan lagi dengan air seperti sebelumnya dan didiamkan lagi selama 5 menit. Proses pengendapan tersebut diulang sampai 3 kali. Endapan yang terakhir ditambah 1-2 tetes *methylen blue* diperiksa dibawah mikroskop stereo. Telur cacing *F. gigantica* berwarna kekuningan.

Pemeriksaan hati

Hati sapi ditempatkan di atas nampan yang dasarnya berwarna hitam. Seluruh saluran empedu dibuka untuk mengeluarkan semua cacing hati yang berada di dalam saluran empedu tersebut dan cacing dikumpulkan di dalam kontainer yang berisi air. Hati sapi dipotong tipis-tipis dan potongan tersebut diperiksa sambil dipijit supaya cacing hati yang masih tertinggal dalam saluran empedu yang terpotong atau yang masih di dalam parenkim hati bisa keluar dan cacing hati tersebut dikumpulkan dalam kontainer yang sama. Potongan hati dicuci dengan menggunakan saringan yang berukuran 710 µm agar cacing hati yang masih tertinggal dapat dikoleksi. Selanjutnya, potongan hati tersebut ditempatkan ke dalam nampan untuk diperiksa lagi kemungkinan masih ada cacing hati yang tertinggal. Semua cacing hati yang ditemukan dihitung dan diukur panjangnya.

Pembuatan antigen

Metode pembuatan antigen ES dari cacing *F. gigantica* dewasa sama seperti yang telah diuraikan oleh WIJFFELS *et al.* (1994) setelah dimodifikasi sebagai berikut: Cacing *F. gigantica* dewasa dikoleksi dari saluran empedu pada hati sapi yang dipotong di RPH. Cacing hati yang masih dalam keadaan hidup ditempatkan dalam kontainer yang berisi larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 15-20 menit (kira-kira 50 ekor cacing setiap 100 ml PBS). Cacing yang sudah terlihat bersih dipindahkan ke dalam kontainer yang berisi media RPMI yang mengandung antibiotik yang bersuhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya, semua cacing hati yang masih hidup dan bersih dipindahkan lagi ke dalam medium RPMI yang baru dan diinkubasi selama 4-6 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi larutan yang telah mengandung ES antigen disentrifugasi dan disimpan dalam suhu -20°C sampai digunakan.

Uji ELISA

Uji ELISA yang digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi *F. gigantica* adalah sama dengan yang dilakukan oleh WIJFFELS *et al.* (1994) dengan modifikasi. Cawan ELISA yang mempunyai lubang 96

(NUNC, Maxisorf) dengan dasar datar dilapisi dengan 100 ul/lubang yang mengandung 2 ug/ml antigen ES dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Cawan ELISA dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan PBS yang mengandung 0,1% Tween 20 (PBST) kemudian diinkubasi dengan 5% skim milk dalam larutan PBST sebanyak 200 ul/lubang pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, cawan ELISA dicuci lagi 3 kali dengan PBST dan sebanyak 100 ul serum dengan pengenceran 1:100 dimasukkan dalam setiap lubang sebelum diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setiap sampel serum dilakukan duplikasi dan setiap cawan ELISA ada kontrol positif dan kontrol negatifnya. Setelah pencucian lagi, 100 ul yang mengandung 1:500 anti-bovine IgG peroxidase conjugate (SIGMA) ditambahkan ke setiap lubang dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 1 jam. Substrat disiapkan dengan melarutkan tablet *Tetramethylbenzidine* (TMB) ke dalam 1 ml *Dimethylsulfoxid* (DMSO) (1 tablet untuk 1 cawan ELISA), kemudian dicampurkan ke dalam 9 ml substrat buffer dan 2 ul H₂O₂. Setelah cawan dicuci lagi, 100 ul larutan substrat tersebut ditambahkan ke dalam setiap lubang cawan ELISA dan ditunggu 10-15 menit sampai ada perubahan warna. Kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan 25 ul H₂SO₄ dan reaksi akan berwarna kekuning-kuningan. *Optical density* (OD) dibaca/diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan mesin ELISA (Multiskan Ex).

Nilai *cut-off* ELISA ditentukan dengan cara menghitung nilai rata-rata OD yang diperoleh dari 58 sampel sapi yang negatif *F. gigantica* baik pada hati maupun pada fesusnya. Tiga kali standard deviasi (HILLYER *et al.*, 1992) ditambahkan pada penghitungan nilai rata-rata tersebut untuk menentukan nilai positif (OD_≥0,38).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan hati terhadap cacing *F. gigantica* pada sapi yang dipotong di RPH Jakarta dapat dilihat pada Tabel 1. Secara keseluruhan sebanyak 38,7% sapi tidak ditemukan adanya cacing *F. gigantica* pada hatinya, 16% sapi memiliki cacing *F. gigantica* antara 1-10 ekor, 34% memiliki 11-100 cacing dan sekitar 11,3% sapi memiliki lebih dari 100 cacing *F. gigantica*

pada hatinya. Berdasarkan ukuran dari panjang cacing, sebagian besar cacing yang ditemukan adalah cacing dewasa (> 26 mm) dan ada juga beberapa cacing yang masih muda yang berukuran kurang dari 16 mm (data tidak ditampilkan).

Table 1. Jumlah cacing *F. gigantica* pada sapi yang dipotong di RPH Jakarta

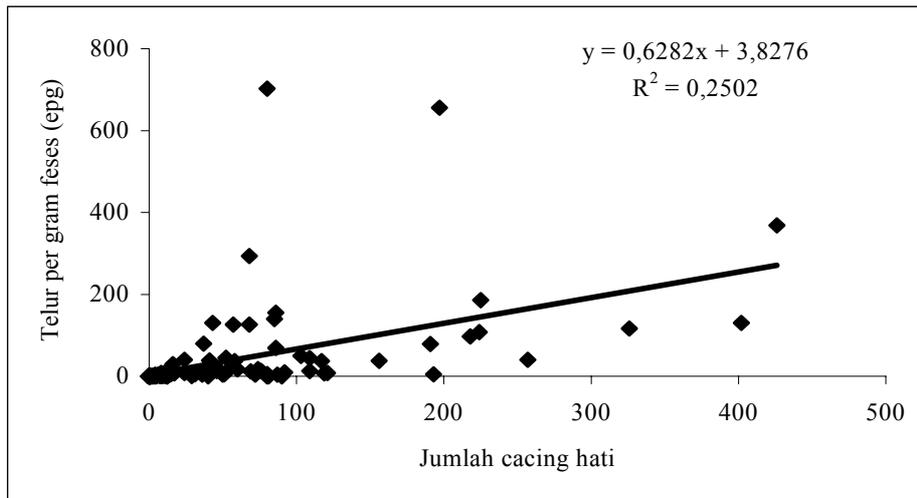
Jumlah cacing <i>F. gigantica</i> dalam hati	Jumlah sapi
0	58 (38,7%)
1-10	24 (16 %)
11-20	14 (9,3 %)
21-50	15 (10 %)
51-100	22 (14,7 %)
101-200	10 (6,7 %)
>200	7 (4,6 %)
Total	150

Hasil pemeriksaan telur *F. gigantica* pada fesep yang dihubungkan dengan adanya cacing *F. gigantica* pada hati sapi dapat dilihat pada Tabel 2. Sebanyak 92 (61%) dari 150 ekor sapi yang dipotong di RPH positif cacing *F. gigantica*. Dari 92 ekor sapi yang positif cacing, 80 (87%) sapi tersebut positif telur cacing dalam fesusnya, sedangkan 12 (13%) sapi yang terinfeksi tersebut tidak ditemukan telur cacing dalam fesusnya (negatif). Sapi yang positif cacing tetapi tidak ditemukan telur cacing dalam fesusnya kebanyakan terinfeksi kurang dari 5 ekor cacing di dalam hatinya.

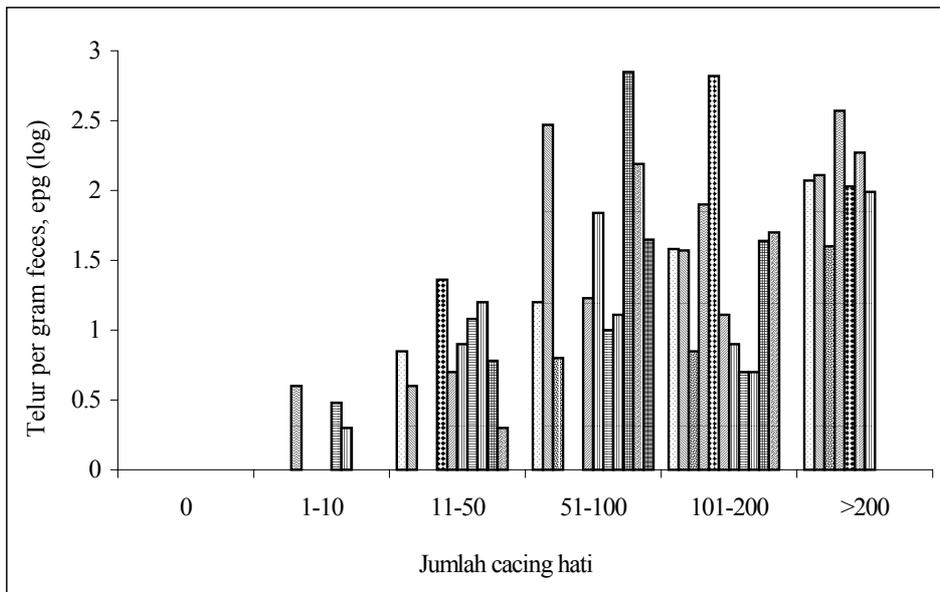
Sensitifitas dan spesifisitas dari pemeriksaan telur cacing *F. gigantica* pada fesep dengan uji endapan dihitung dari hasil yang telah dipaparkan dalam Tabel 2 (SMITH, 1995). Sensitifitas dari pemeriksaan fesep untuk mendeteksi adanya infeksi *F. gigantica* adalah 87% (80/92 x 100%), sedangkan spesifisitasnya adalah 100% (58/58 x 100%). Pada Gambar 1 terlihat ada sedikit korelasi yang positif (R² = 0,25) antara jumlah cacing di dalam hati dengan jumlah telur cacing dalam fesep. Keadaan ini didukung dengan semakin banyak cacing yang ditemukan dalam hati, semakin banyak pula telur cacing yang ditemukan dalam fesep (Gambar 2).

Table 2. Hasil pemeriksaan telur *F.gigantica* pada fesep dan penemuan cacing *F. gigantica* pada hati sapi yang dipotong di RPH Jakarta

	Positif cacing <i>F. gigantica</i>	Negatif cacing <i>F. gigantica</i>	Total
Positif telur <i>F. gigantica</i>	80	0	80
Negatif telur <i>F. gigantica</i>	12	58	70
Total	92	58	150



Gambar 1. Korelasi antara jumlah cacing dalam hati dengan jumlah telur dalam feses



Gambar 2. Hubungan antara jumlah cacing hati dengan telur cacing dalam feses

Selanjutnya, hasil uji ELISA dari sampel serum dikelompokkan berdasarkan nilai *cut-off* ($OD = 0,38$) dapat dilihat pada Tabel 3 yang menunjukkan bahwa dari 91 ekor sapi yang positif cacing *F. gigantica*, 84 ekor sapi mempunyai $OD \geq 0,38$ (kisaran $OD 0,38-1,77$) dan 8 ekor sapi mempunyai $OD < 0,38$ (kisaran $OD 0,10-0,17$). Dari data tersebut telah dihitung sensitifitas dan spesifisitas dari uji ELISA, yang hasilnya masing-masing adalah 91% ($84/92 \times 100\%$) dan 88% ($51/58 \times 100\%$).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa dari 150 ekor sapi yang dipotong di RPH Jakarta didapatkan sebanyak 92 (61,3%) sapi positif cacing hati dan 58 (38,7) sapi

negatif cacing hati. Tabel 2 menunjukkan bahwa dari 92 ekor sapi yang positif cacing hati, didapatkan 80 (86,9%) sapi positif telur cacing hati dan 12 ekor sapi (13%) negatif telur cacing hati dalam fesesnya, sedangkan 58 ekor sapi yang negatif cacing hati tidak didapatkan telur cacingnya. Ditemukannya sapi yang negatif telur cacing *F. gigantica* dalam fesesnya akan tetapi ternyata terinfeksi cacing hati menunjukkan bahwa diagnosis infeksi *F. gigantica* dengan pemeriksaan telur cacing dalam fesesnya hanya bisa digunakan untuk mendeteksi adanya infeksi setelah periode prepaten (SANCHEZ-ANDRADE *et al.*, 2000). ABDEL-RAHMAN *et al.* (1998) juga menyatakan bahwa

Tabel 3. Jumlah sapi yang positif ($OD \geq 0,38$) dan negatif ($OD < 0,38$) terhadap cacing *F. gigantica*

Antibodi serum	Positif cacing hati	Negatif cacing hati	Total
$OD \geq 0,38$	84	7	91
$OD < 0,38$	8	51	59
Total	92	58	150

pemeriksaan telur cacing hanya bisa untuk mengetahui adanya infeksi paten. Pengeluaran telur cacing dalam jumlah yang relatif sedikit dari sapi yang terinfeksi cacing *F. gigantica* juga merupakan kendala dalam diagnosis fasciolosis. Salah satu kegagalan dalam penemuan telur cacing *F. gigantica* di dalam feses dari sapi yang terinfeksi kemungkinan disebabkan adanya perlekatan telur pada waktu pemrosesan feses dengan metode pengendapan (WESCOTT *et al.*, 1983) sehingga mempengaruhi dalam penghitungan jumlah telur cacing.

Deteksi infeksi *F. gigantica* pada sapi yang akurat masih sangat sulit, pada penelitian ini sensitifitas dari pemeriksaan telur adalah 87% dan spesifisitasnya 100%. Dari hasil penelitian ANDERSON *et al.* (1999) sensitifitas dari metode pemeriksaan telur cacing dalam feses adalah 66,7% dan spesifisitasnya 100%. Hal ini disebabkan karena di dalam penelitiannya jumlah sapi yang negatif telur cacing *Fasciola* sepertiganya dari jumlah sapi yang positif cacing di dalam hatinya. Sedangkan, pada penelitian ini jumlah sapi yang negatif telur cacing *F. gigantica* sepertujuhnya dari jumlah sapi yang positif cacing hati (Tabel 2). Banyak sedikitnya jumlah sampel yang tidak ditemukan telur cacing hati di dalam feses dari kelompok sapi yang benar-benar positif cacing hati akan mempengaruhi sensitifitas dari metode pemeriksaan telur cacing hati dalam feses.

Selanjutnya, dengan uji ELISA untuk mendeteksi antibodi terhadap antigen ES dari cacing *F. gigantica* pada sapi yang positif, sensitifitasnya adalah 91%. Hasil ini sedikit berbeda yaitu sekitar 4% dibandingkan dengan menggunakan metode pemeriksaan feses. Keadaan ini berbeda dengan hasil yang dilaporkan oleh ANDERSON *et al.* (1999) bahwa perbedaan sensitifitas antara uji ELISA dengan metode pemeriksaan feses mencapai 50%. Uji ELISA bisa digunakan untuk mendeteksi keberadaan cacing hati pada sapi yang terinfeksi awal yaitu pada minggu ke-2 setelah infeksi (SANTIAGO dan HILLYER, 1988; FAGBEMI dan GUOBADIA, 1995) dan uji ELISA lebih bisa digunakan untuk memonitor kejadian fasciolosis pada sapi di lapangan. Dari hasil penelitian ini uji ELISA memberikan gambaran tentang prevalensi fasciolosis pada sapi yang dipotong di RPH Jakarta (61,3%) lebih tinggi dibandingkan dengan metode penemuan telur cacing dalam feses (53,3%).

Pada kelompok sapi yang positif *Fasciola*, dengan uji ELISA serumnya banyak yang positif (seropositif), tetapi biasanya ada juga beberapa sapi termasuk seronegatif. Pada penelitian ini didapatkan sapi yang positif cacing hati tetapi mempunyai $OD < 0,38$ yang merupakan sapi seronegatif. Keadaan ini disebabkan karena kemungkinan sapi tersebut walaupun terinfeksi oleh *F. gigantica* tetapi telah gagal dalam memproduksi antibodi terhadap cacing *F. gigantica*, sehingga dalam pemeriksaan dengan uji ELISA diperoleh OD yang rendah.

KESIMPULAN

Dengan melihat hasil-hasil yang telah diuraikan tersebut diatas bisa diambil kesimpulan bahwa sensitifitas dari uji ELISA untuk deteksi antibodi *F. gigantica* adalah 91%, sedangkan sensitifitas untuk deteksi telur *F. gigantica* dalam feses adalah 87%. Disamping itu, bisa dikatakan bahwa kejadian fasciolosis di RPH Jakarta 61,3% berdasarkan penemuan cacing *F. gigantica* pada hati sapi, 60,67% berdasarkan uji ELISA dan 53,3% berdasarkan penemuan telur *F. gigantica* dalam feses.

Diagnosa fasciolosis dengan uji ELISA hanya untuk mendeteksi adanya antibodi dalam tubuh hewan dan tidak bisa untuk mendeteksi adanya infeksi aktif. Untuk itu masih diperlukan teknik diagnosa yang lebih akurat daripada uji antibodi-ELISA. Deteksi *Fasciola* antigen dalam feses ataupun dalam serum dengan menggunakan uji *capture*-ELISA disarankan untuk dikembangkan karena uji ini bisa untuk mendeteksi adanya infeksi aktif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada saudara SUDRAJAT dan SUHARYANTA, teknisi Parasitologi yang telah membantu dalam pengambilan sampel, dan kepada Department for International Development yang telah memberi dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ABDEL-RAHMAN, S.M., K.L. O'REILLY and J.B. MALONE. 1998. Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *Am. J. for Vet. Res.* 59: 533-537.
- ANDERSON, N., T.T. LUONG, N.G. VO, K.L. BUI, P.M. SMOOKER and T.W. SPITHILL. 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 83: 15-24.
- ANONIMOUS. 1990. Data ekonomi akibat penyakit. Direktorat Jenderal Peternakan.
- ARMOUR, J., G.M. URQUHART and J.L. DUNCAN. 1997. *Vet. Parasitol.* 2nd ed.
- BORAY, J.C. 1985. Flukes of domestic animals. In: Parasites, Pests and Predators. S.M. GAAFAR, W.E. HOWARD and R.E. MARSH (Eds.), Elsevier, New York, pp. 179-218.
- EDNEY J.M. dan A. MUCHLISH. 1962. Fasciolosis in Indonesian Livestock. *Comm. Vet.* 6: 49-52.
- FAGBEMI, B.O. and E.E. GUOBADIA. 1985. Immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using a 28-kDa cystein protease of *Fasciola gigantica* adult worms. *Vet. Parasitol.* 57: 309-318.
- FARRELL, C.J., D.T. SHEN and R.B. WESCOTT. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 42: 237-240.
- HILLYER, G.M., M. SOLER DE GALANES, J. RODRIGUEZ-PEREZ, J. BJORLAND, M.S. DELAGRAVA, S.R. GUZMAN and R.T. BRYAN. 1992. Use of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 603-609.
- PARFITT, J.W. and A.W. BANK. 1977. A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the field. *Vet. Rec.* 87: 180-182.
- SANCHEZ-ANDRADE, R., A. PAZ-SILVA, J. SUAREZ, R. PANADERO, P. DIEZ-BANOS and P. MORRONDO. 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 93: 39-46.
- SANTIAGO, N. and G.V. HILLYER. 1988. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74: 810-818.
- SMITH, R.D. 1995. Veterinary Clinical Epidemiology-A Problem-Oriented Approach, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 31-52.
- SUHARDONO, S. WIDJAJANTI, P. STEVENSON and I.H. CARMICHAEL. 1991. Control of *Fasciola gigantica* with triclabendazole in Indonesian cattle. *Trop. Anim. Health and Prod.* 23: 217-220.
- WESCOTT, R.B., C.J. FARRELL and D.T. SHEN. 1983. Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 45: 178-179.
- WUJFFELS, G.L., L. SALVATOR, M. DOSEN, J. WADDINGTON, L. WILSON, C. THOMPSON, N. CAMPBELL, J. SEXTON, J. WICKER, F. BOWEN, T. FRIEDEL and T.W. SPITHILL. 1994. Vaccination of sheep with purified cystein proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp. Parasitol.* 78: 132-148.
- ZIMMERMAN, G.L., L.W. JEN and J.E. CERRO. 1982. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections insheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2097-2100.