

## Pelacakan Secara Imunohistokimiawi Antigen Ekskretori-Sekretori pada Sapi Bali yang Terinfeksi *Fasciola gigantica*

(IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS IN BALI CATTLE INFECTED BY *FASCIOLA GIGANTICA*)

Ida Bagus Oka Winaya<sup>1</sup>, I Nyoman Mantik Astawa<sup>2</sup>,  
I Made Damriyasa<sup>3</sup>, Nyoman Sadra Dharmawan<sup>3</sup>, I Ketut Berata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Patologi, <sup>2</sup>Laboratorium Virologi,  
<sup>3</sup>Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Udayana, Jln Sudirman, Denpasar, Bali Indonesia 80232  
Tel/Fax: 0361223791. Email : [okawinaya@gmail.com](mailto:okawinaya@gmail.com).

### ABSTRAK

Untuk melacak distribusi antigen ekskretori-sekretori (ES) *Fasciola (F.) gigantica* pada jaringan hati sapi bali terinfeksi telah dibuat antibodi monoklonal (AbMo) terhadap antigen ES cacing tersebut. Sel *myeloma immortal* asal mencit difusikan dengan limfosit asal mencit yang sebelumnya telah diimunisasi dengan antigen ES cacing tersebut. Fusi kedua jenis sel tersebut menghasilkan sel hibrid yang disebut dengan hibridoma yang sebagian kecil di antaranya menghasilkan AbMo terhadap antigen ES. AbMo yang diproduksi kemudian diuji dengan *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA). AbMo yang secara spesifik mengenali antigen ES digunakan untuk melacak antigen ES pada jaringan hati sapi bali terinfeksi *F. gigantica*. Sebanyak lima AbMo yang diproduksi dalam penelitian ini, dua di antaranya bereaksi dengan intensitas sedang dengan antigen ES *F. gigantica*. Antigen ES terlacak pada jaringan hati yang difiksasi dengan formalin. Pada sapi terinfeksi, antigen ES terlacak pada sitoplasma sel hati dan sitoplasma sel epitel saluran empedu dengan intensitas sedang. Hasil ini menunjukkan bahwa AbMo yang diproduksi dalam penelitian ini dapat digunakan untuk melacak antigen ES pada sapi bali terinfeksi *F. gigantica*.

Kata-kata kunci: Antigen ekskretori-sekretori, *F. gigantica*, antibodi monoklonal, sapi bali.

### ABSTRACT

In order to study the distribution of excretory-secretory (ES) *F. gigantica* in liver tissue of infected bali cattle a research was established using monoclonal antibodies (mAbs) against ES antigens. Immortal mouse myeloma cells were fused with the lymphocytes derived from the spleen of mice that immunized with ES antigen. The mAbs were tested for their specificity by using *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Five specific mAbs against ES antigens were isolated and two mAbs were used for immunodetection of ES antigens in liver tissue of bali cattle. Immunohistochemical ES antigens were not detected in paraffin embedded tissue of negative confirmed fasciolosis samples. ES antigens was detected in hepatocytes and cytoplasm of bile duct epithelims in the bali cattle that infected with fasciolosis in moderate intensity. Therefore indicated that mAbs produced in this study are applicable for detecting ES antigens in bali cattle infected by *F. gigantica*.

Keywords : excretory-secretory antigens, *F. gigantica*, mAbs, Bali cattle.

### PENDAHULUAN

Fasciolosis adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh trematoda hermaprodit dari genus *Fasciola* yaitu *Fasciola (F.) hepatica* dan *F. gigantica* (Arjona *et al.*, 1995). Penyakit ini menyerang ternak ruminansia. Di daerah tropis penyakit ini disebabkan oleh *F. gigantica*, sedangkan pada daerah beriklim dingin disebabkan oleh *F. hepatica* (Khramer dan Schneider, 1998; Mas-Coma *et al.*, 2005; Ai *et al.*, 2011). Penyakit ini bersifat zoonosis, dan manusia biasanya terinfeksi dengan mengkonsumsi tanaman air yang mengandung metacercaria infeksi. Infeksi larva cacing

hati pada ternak sapi dan manusia secara umum bersifat subklinis namun tanda klinis pada manusia bisa berupa mual-mual dan rasa nyeri pada rongga abdomen (Pilet *et al.*, 2010). Pada fase akut penyakit ini dapat menyebabkan kematian dan menimbulkan keadaan patologis pada tubuh akibat hepatomegali dan sirosis hati pada infeksi kronis (Mas-Coma *et al.*, 2009; Sripta *et al.*, 2010). Di Indonesia, prevalensi fasciolosis antara 60-90% (Suhardono *et al.*, 1988). Kerugian ekonomi pada industri peternakan akibat penyakit ini di seluruh dunia lebih dari 3.10<sup>9</sup> \$ Amerika Serikat per tahunnya (Sobhon *et al.*, 1998).

Diagnosis fasciolosis pada umumnya berda-

sarkan penemuan telur cacing dalam feses hewan yang terinfeksi (Boray, 2007; Saphiro, 2005). Namun demikian, karena jumlah telur cacing yang terlalu sedikit dalam feses dan telur tidak akan ditemukan sampai cacing hati mencapai dewasa, sehingga akan terjadi kesulitan dalam menegakkan diagnosa fasciolosis. Cacing hati mulai memproduksi telur biasanya antara minggu ke 10-14 setelah hewan terinfeksi (George dan Mitchell, 2003). Pelacakan dini menjadi sangat penting untuk dilakukan agar dapat melakukan upaya pengobatan yang tepat. Saat ini uji imunodiagnosis dirasakan sangat membantu dan beberapa antigen telah digunakan sebagai antibodi pendeteksi anti *Fasciola*. Antigen ekskretori-sekretori (ES) adalah antigen yang dapat dipercaya untuk serodiagnosis fasciolosis namun masih ditemukan adanya reaksi silang pada serum terinfeksi oleh parasit lain. Salah satu alternatif imunodiagnosis fasciolosis pada berbagai jenis inang yang rentan adalah uji secara imunohistokimia (IHK). Keunggulan teknik ini adalah (1) dapat melacak distribusi antigen ES pada jaringan sehingga dapat dipakai untuk mengetahui patogenesis infeksi cacing hati *F. gigantica* pada sapi, (2) Aman karena dilakukan pada organ yang telah difiksasi dengan netral buffer formalin 10 %, (3) penggunaan antibodi monoklonal (AbMo) sebagai antibodi primer disertai metode *labeled streptavidin biotin* (LSAB) yang dapat meningkatkan akurasi uji. Senyawa AbMo merupakan antibodi yang hanya berikatan dengan satu epitop pada struktur antigen (Campbell, 1991; Michelle, 2006; Kimbal 2008) dengan demikian dapat mengenali antigen ES dengan spesifisitas yang tinggi. Penggunaan metode LSAB dapat meningkatkan sensitivitas uji karena dalam satu molekul streptavidin ditemukan empat situs pengikatan (*binding sites*) terhadap biotin (Howarth *et al.*, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk melacak distribusi antigen ES *F.gigantica* pada jaringan hati sapi bali yang terinfeksi.

## METODE PENELITIAN

### Parasit

Cacing *F. gigantica* dewasa diperoleh dari kantung empedu hati sapi bali terinfeksi yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Mambal, Kabupaten Badung, Bali. Cacing hati *F.gigantica* kemudian dicuci dengan salin steril.

### Antigen Ekskretori-Sekretori (ES) *F. gigantica*

Metode pembuatan antigen ES cacing *F. gigantica* dewasa sama seperti yang telah diuraikan oleh Estuningsih *et al.*, (2004) setelah dimodifikasi sebagai berikut: Cacing *F.gigantica* dewasa dikoleksi

dari kantung empedu hati sapi yang dipotong di RPH Mambal Kabupaten Badung. Cacing hati yang masih hidup dimasukkan ke dalam pot yang telah berisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 15 sampai dengan 20 menit (50 ekor cacing pada setiap 100 mL PBS). Cacing yang sudah terlihat bersih dipindahkan ke dalam pot yang telah berisi media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) dan simpan pada ruangan dengan suhu 37° C selama 20 menit. Selanjutnya semua cacing hati yang sudah bersih dan masih hidup dipindahkan lagi ke dalam RPMI dan inkubasikan selama 4-6 jam pada suhu 37° C. Setelah inkubasi, larutan yang sudah mengandung ES antigen disentrifugasi dan supernatannya disimpan pada suhu -20° C hingga saat digunakan.

### Produksi dan Karakterisasi Antibodi Monoklonal Anti ES *F. gigantica*

Antibodi monoclonal/AbMo anti ES *F.gigantica* diproduksi mengikuti metode Ohnishi *et al.*, (2005) dengan beberapa modifikasi. Mencit Balcb/C betina berumur 7-8 minggu diimunisasi empat kali. Imunisasi pertama dengan 0,2 mL (setara dengan 60 µg) emulsi cairan ES *F. gigantica* dengan *Freund's Complete Adjuvant* disuntikkan secara intraperitoneal. Imunisasi kedua dilakukan 14 hari dari imunisasi pertama dengan 0,2 mL emulsi cairan ES *F. gigantica* dengan *Freund's incomplete adjuvant*. Imunisasi ketiga dan keempat dilaksanakan secara berturut-turut dua minggu dari imunisasi sebelumnya. Rute pemberian dan dosis cairan ES *F. gigantica* juga sama. Seminggu sebelum fusi, dilakukan pengukuran terhadap kandungan antibodi dalam serum menggunakan uji ELISA. Hari ke 7, 14, 15, dan, 16 setelah imunisasi yang terakhir, terhadap mencit dilakukan *booster* dengan antigen yang sama namun tanpa *adjuvant*. Selanjutnya mencit dikorbankan nyawa ya secara dislokasi servikalis, limpanya diambil dan digunakan untuk bahan hibridoma. Sebanyak  $2 \times 10^7$  sel myeloma immortal difusi dengan  $10^8$  sel limfosit mencit yang telah diimunisasi dengan cairan ES *F.gigantica*. Fusi kedua tipe sel terjadi menggunakan 50% *polyethylene glycol* (PEG) (Sigma Co, USA) dan dihasilkan sel hibrid yang disebut dengan hibridoma. Klon sel hibridoma yang menghasilkan AbMo khas ES *F. gigantica* ditentukan dengan uji *indirect ELISA* menggunakan cairan ES *F. gigantica* sebagai antigen. AbMo stok dibuat dengan cara menumbuhkan klon hibridoma dalam media *Dulbecco's Modified Essential Medium-Hypoxantine Thymidine* (DMEM-HT) sampai terlihat tanda kematian pada hibridoma. Cairan supernatannya kemudian ditampung dan disimpan pada suhu -20° C.

**Uji Imunohistokimia (IHK)**

Uji IHK ini mengikuti metode yang telah dilakukan oleh Ohnishi *et al.*, (2005) disertai beberapa modifikasi. *Paraffin embedded tissue* dipotong menggunakan *microtome* dengan ketebalam 5 µm. Potongan jaringan diletakkan di atas gelas objek yang telah dilapisi *Poli-L Lysine* selanjutnya dideparafinisasi dengan cara direndam dalam larutan xylol I, II, dan III masing-masing selama tiga menit. Dilanjutkan dengan rehidrasi menggunakan alkohol berbagai konsentrasi mulai dari konsentrasi 70%, 95% dan alkohol absolute masing-masing selama tiga menit. Sediaan dicuci dengan PBS sebanyak dua kali dan diberi perlakuan 0,05% trypsin selama 10 menit pada suhu 37°C. Inaktivasi *endogenous peroxidase* dilakukan dengan cara meneteskan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam PBS selama 30 menit pada suhu 37°C. Terhadap sediaan kemudian dilakukan *blocking* dengan 2% *normal goat serum* selama 45 menit pada suhu 37° C. Penambahan 100 µL antibodi primer anti ES *F. gigantica* dilakukan pada masing-masing sediaan, inkubasikan selama 12 jam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi sediaan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali kemudian ditambahkan 100 µL *biotynilated goat anti mouse IgG* (Biodesign Internationale) dan *avidin-horse radish peroxidase* (HRP) (Sigma Co, USA). Setelah diinkubasikan selama 20 menit pada suhu ruang, sel yang terinfeksi divisualisasikan dengan penambahan kromogen *diaminobenzidine* (DAB) (Sigma Co, USA, 50 mg/50 mL PBS mengandung 0,007% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Imunisasi Mencit Balb/C dengan Antigen Sekretori/ES Cacing *F. gigantica***

Hasil menunjukkan bahwa titer antibodi anti ES *F. gigantica* dalam serum mencit berkisar antara 2<sup>18</sup> sampai dengan 2<sup>21</sup> OD 450 (Tabel 1).

Tabel 1. Titer antibodi anti ES *F. gigantica* pada mencit yang diimunisasin

Mencit Nomor	Titer antibodi Anti ES <i>F. gigantica</i>
1	2 <sup>19</sup>
2	2 <sup>20</sup>
3	2 <sup>20</sup>
4	2 <sup>18</sup>
5	2 <sup>21</sup>
6	2 <sup>21</sup>

Keiterangan : ES=ekskretori-sekretori

**Hasil Fusi Sel Mieloma dengan Limfosit Mencit yang Diimunisasi dengan antigen ES Cacing *F. gigantica* Sapi Bali**

Fusi sel mieloma dengan limfosit mencit yang diimunisasi dengan antigen ES cacing *F. gigantica* telah dilakukan sebanyak empat kali. Setelah empat kali percobaan fusi dihasilkan sebanyak 1027 klon sel hibridoma, yang terdiri dari 312 klon sel hibridoma pada fusi I, 52 klon sel hibridoma pada fusi II, 58 klon sel hibridoma pada fusi III dan 605 klon sel hibridoma pada fusi IV. Skrining dengan uji ELISA menunjukkan bahwa diperoleh lima klon sel hibridoma yang menghasilkan antibodi terhadap antigen ES cacing *F. gigantica* (Tabel 2).

**Karakteristik Antibodi Monoklonal (AbMo) terhadap antigen ES *F. gigantica***

Lima antibodi monoklonal (AbMo) yang dihasilkan telah diuji reaktivitasnya pada uji *Western blotting* namun belum memberikan hasil yang memuaskan. Uji ELISA menunjukkan lima klon sel hibridoma secara stabil memproduksi AbMo yang bereaksi dengan antigen ES cacing *F. gigantica*. Terjadi peningkatan *optical density*/OD setelah

Tabel 2. Hasil fusi sel mieloma dengan sel limfosit mencit yang kebal terhadap cairan ES cacing *F. gigantica*

Fusi	Imunogen	Jumlah Hibridoma	ELISA		Western Blotting
			Antigen ES <i>F. gigantica</i>	Antigen Plasma Sapi	
I	ESFg	312	2	0	Belum bereaksi *
II	ESFg	52	0	0	
III	ESFg	58	0	0	
IV	ESFg	605	3	0	Belum bereaksi *
Jumlah		1027	5	0	

Keterangan : ES=ekskretori-sekretori

ESF: ekskretori-sekretori *F. gigantica*

\*) sudah diuji namun hasil masih belum jelas



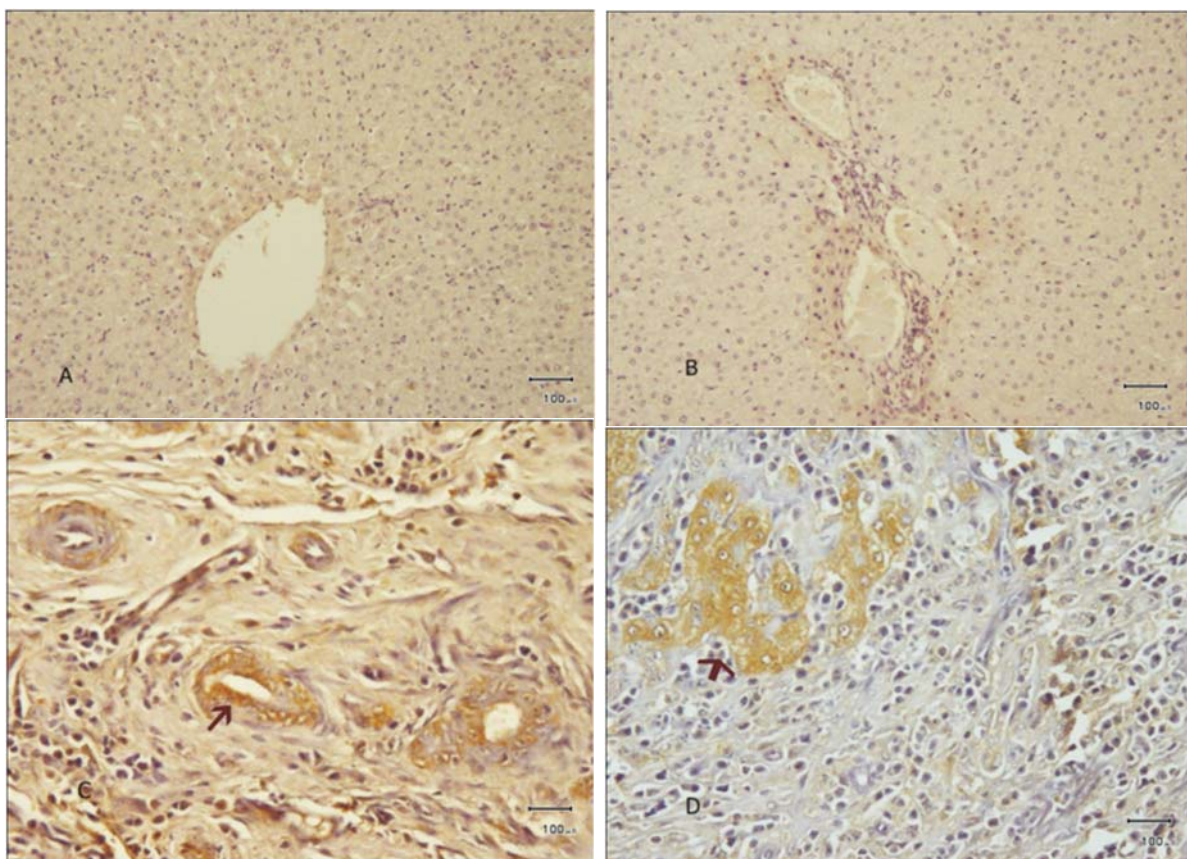
dilakukan tiga kali uji ELISA yaitu dari sekitar 0,5 pada uji pertama; 0,7 pada uji kedua; dan 1,5 pada uji ketiga. Dua AbMo juga telah diuji reaktivitasnya pada uji imunohistokimia (IHK) yang menunjukkan bahwa keduanya dapat digunakan untuk melacak antigen ES cacing *F. gigantica* pada jaringan sapi bali penderita fasciolosis. Antigen ES terlacak di dalam sitoplasma sel hati dan epitel saluran empedu yang ditandai oleh adanya warna coklat (Gambar 1).

Penggunaan antigen kasar untuk diimunisasikan pada mencit dalam memproduksi AbMo terlihat bukan faktor penting untuk menghasilkan hibridoma stabil yang mensekresikan AbMo terhadap antigen ES cacing *F. gigantica*. Hal ini dapat dibuktikan bahwa seluruh isolat hibridoma secara konsisten memproduksi AbMo terhadap antigen ES cacing *F. gigantica* dan bukan terhadap komponen protein lainnya. Penggunaan protein relatif kasar untuk diimunisasikan pada mencit untuk memproduksi AbMo telah juga dilaporkan oleh Wickramasinghe *et al.*, (1993) dan Pantophlet *et al.*, (2001). Metode skrining nampaknya menjadi faktor yang lebih penting dalam keberhasilan melakukan seleksi terhadap hibridoma

penghasil antibodi anti ES cacing *F. gigantica*. Pada penelitian ini antigen yang digunakan dalam uji ELISA untuk skrining hibridoma adalah antigen ES cacing *F. gigantica* yang masih memungkinkan untuk mengenali antigen sel atau serum asal cacing itu ditemukan. Karena itu, semua AbMo yang diproduksi juga harus diuji dengan antigen sapi normal.

Dalam uji *Western blotting*, semua AbMo yang diproduksi belum bereaksi dengan antigen ES cacing *F. gigantica*, meskipun pada uji ELISA semua bereaksi dengan baik. Hal ini mungkin disebabkan oleh ketidakmampuan AbMo mengenali antigen cacing yang telah mengalami proses denaturasi. Pada uji *Western blotting* antigen yang digunakan adalah antigen yang telah dipanaskan pada suhu mendidih (95-100°C) dan telah diperlakukan dengan reagen pereduksi protein sehingga molekul protein menjadi terdenaturasi (Bolt dan Mahoney, 1997; Mahmood dan Yang, 2012). Untuk itu masih perlu dilakukan optimalisasi uji *Western blotting* sehingga bobot molekul protein yang bereaksi dengan AbMo dapat ditentukan.

Dua AbMo nampaknya berpotensi untuk



Gambar 1. Pelacakan antigen ES cacing *F.gigantica* pada sapi bali menggunakan teknik imunohistokimia. Jaringan hati tidak terinfeksi fasciolosis (a). jaringan hati kontrol negatif yang diberikan PBS (b). Jaringan hati terinfeksi fasciolosis (c dan d). Sel terinfeksi (tanda panah), pembesaran 200x dengan bar = 100 µm.

digunakan dalam uji imunohistokimia untuk melacak antigen ES cacing *F. gigantica* dalam jaringan hati sapi bali terinfeksi. Pelacakan antigen cacing pada jaringan hati penting dilakukan untuk mengetahui patogenesis antigen cacing dalam jaringan hati yang mungkin berhubungan dengan intensitas kerusakan yang ditimbulkannya. Pada uji imunohistokimia, ikatan antara antigen ES cacing *F. gigantica* dengan AbMo akan dikenali oleh antibodi sekunder berlabel biotin. Ikatan Ag-AbMo- Ab sekunder akan berikatan dengan streptavidin. Afinitas streptavidin terhadap biotin jauh lebih tinggi dibandingkan dengan avidin karena streptavidin yang memiliki empat *binding site* sehingga mampu mengikat empat molekul biotin (Howarth *et al.*, 2006) dengan demikian intensitas warna sel terinfeksi akan menjadi lebih kuat. Penggunaan enzim *horse radish peroxidase* (HRP) pada ikatan Ag-Ab kompleks menyebabkan terjadinya perubahan warna saat diberikan kromogen. Kromogen yang diberikan pada metode ini adalah *diaminobenzidine* (DAB) sehingga sel yang menghasilkan antigen ES dari cacing *F. gigantica* akan berwarna coklat pada sitoplasmanya sedangkan sel tidak menghasilkan antigen ES pada sitoplasma tidak terlihat warna coklat pada sitoplasmanya (Kiernan, 1990).

#### SIMPULAN

Antibodi monoklonal (AbMo) yang diproduksi dalam penelitian ini dapat digunakan dalam metode IHK dan mampu melacak antigen ES cacing *F. gigantica* pada jaringan hati sapi bali terinfeksi fasciolosis.

#### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui temperatur denaturasi optimum agar tidak merusak antigen ES *F. gigantica*.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Universitas Udayana yang telah membiayai penelitian ini melalui dana DIPA RM Universitas Udayana Tahun Anggaran 2012 dengan surat perjanjian Kontrak Nomor : 21.15/UN 14/LPPM/2012. Tanggal 19 Januari 2012.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ai L, Chen MX, Alasaad M, Elsheika HM, Li J, Li HL, Lin RQ, Zou FC, Zhu XQ, Chen JX. 2011. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp by molecular approaches. *Parasites & Vectors* 4 (101) : 1756-1766.
- Arjona R, Riancho JA, Aquado JM, Salesa R, Gonzales-Marbychias J. 1995. *Fasciolosis* in depeloved countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine* 74: 13-23.
- Bolt MW, Mahoney PA. 1997. High-Efficiency blotting of protein of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 247: 185-192.
- Boray JC. 2007. Liver fluke disease in sheep and cattle. *Prime Fact* 446: 1-10.
- Campbell AS. 1991. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: monoclonal antibody and immunosensor technology*. Amsterdam. Elsevier.
- Estuningsih SE, Widjajanti S, Adiwinata G. 2004. Perbandingan antara uji ELISA dan pemeriksaan telur cacing untuk mendeteksi infeksi *Fasciola gigantica* pada sapi. *JITV* 9: 55-60.
- George B, Mitchell B. 2003. *Treatment and control of liver fluke in sheep and Cattle*. Scottish Executiven Enviroment and Rural Affair Department. Pp 1-8.
- Howart M, Chinnapen DJF, Gerrow K, Dorrestein PC, Grandy MR, Kelleher NL, Husseini E, Ting A, Alice Y. 2006. A Monovalen sterptavidin with a single fentomer biotin binding site. *Nature Methods* 3 (4): 267-73.
- Khramer F, Schneider T. 1998. Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int J Parasitol* 28: 1923 - 1929.
- Kimbal W. 2008. Monoclonal Antibody. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/biology/pages/m/monoclonal.html>.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and histochemical method: Theory and practice*. 2<sup>nd</sup>. Oxford England, Pergamon Press. Pp 90-103.
- Mahmood T, Yang PC. 2012. Westerrn blot: technique and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4 (9): 429-434.

- Mas-Coma MS, Bargues MD, Valero MA. 2005. Fasciolosis and other plant-borne trematode zoonosis. *Int J Parasitol* 35:1255-1265.
- Mas-Coma MS, Valero MA, Bargues MD, Rolliasan D, Hay SL. 2009. Fasciola lymnaeids and human fasciolosis with a global overview on disease transmission, epidemiology evolutionary genetic, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69: 41-46.
- Michelle JMS. 2006. Monoclonal Antibody. <http://www.answers.com/topic/monoclonal-antibody>.
- Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Yokota YT, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka M, Hashimoto S, Ato, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kuranel I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T. 2005. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis* 58: 88-94.
- Pantophlet R, Brade R, Brade H. 2001. Generation and serological characterization of murine monoclonal antibodies against O antigens from *Acinetobacter* reference strain. *Clin Diag Lab Immunol* 8 : 825-827.
- Pilet B, Deckers F, Pouillon M, Parizel B. 2010. *Fasciola hepatica* Infection in a 65- Year Old Women. *Radiology Case* 4 (4): 13-19.
- Saphiro LS. 2005. *Pathology and parasitology for veterinary technician*. Canada. Thomson Delmar Learning. Pp 165-170.
- Sobhon P, Anantavara S, Dangprasert T, Viyanant V, Krailas D, Upatham ES, Wanichanon C, Kusamram T. 1998. Studies of tegumen as a basis for the development of immunodiagnosis and vaccine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29 (2): 387-400.
- Sripa B, Kaewkes S, Intapan PM, Maleewong W, Brindley PJ. 2010. Food-borne trematodiasis in southeast asian : epidemiology, pathology, clinical manifestation and control. *Adv Parasitology* 72: 305-350.
- Suhardono H, Widjajanti S, Partoutomo S. 1988. *Freshwater snail of medical and veterinary importance in Indonesia. Asian-Planty Technical Meeting on Snail and Slug of Economic Importance*. June 22-24. Bangkok, Thailand.
- Wickramasinghe R, Meanger J, Enriques JE, Wilcox GE. 1993. Avian reovirus protein associated with neutralization of viral infectivity. *Virology* 194: 688-698.