

Pengembangan Biosensor Penyakit Surra (*Trypanosoma evansi*) Berbasis Protein dengan Metode *Differential Pulse Voltammetry*

(Development of Protein-based Biosensor for Surra (*Trypanosoma evansi*) using *Differential Pulse Voltammetry Method*)

Wardhana AH^{1,2}, Munawar H¹, Sawitri DH¹, Maryam R¹

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jalan RE. Martadianata No. 30 Bogor 16114

²Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115
Wardhana24id@yahoo.com

ABSTRACT

Trypanosoma evansi remains a major cause of Trypanosomiasis in Indonesia, called Surra. However, the lack of accessibility and affordability for diagnostic tests: *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis/T. evansi* – CATT/*T. evansi*; ELISA, and PCR lead to unsuccessful control of Surra in the field. Accordingly, the accurate, rapid and applicable kit for alternative Surra diagnosis is needed, for example biosensor. The study aimed to investigate the performance of protein-based biosensor of Surra (*Trypanosoma evansi*) for distinguishing positive and negative sera. Herein, protein was obtained from the *T. evansi* propagation. This protein was immobilized by carbodiimide reaction on the surface of carbon screen printed electrode as the lowest interaction material with serum/antibody (% I <90%). The sensor method used in this present study was differential pulse voltammetry (DPV). Data were normalized and analyzed using PStTrace 5.8 program. The results demonstrated that false negative and false positive of sensor were observed at 64 and 2 dilution times respectively. The positive serum analyzed using DVP (potential range -0.2 - +1.0 V, scan rate 0.1 Vs⁻¹) revealed that the slope of positive serum (1.84) was higher than those of the negative serum (1.01) indicating the sensitivity of the produced biosensor for Surra (*T. evansi*). Similarly, these results were confirmed by serological test (CATT/*T. evansi*). From this study, the obtained protein-based biosensor is a promising tool for Surra detection in livestock.

Key words: Biosensor, DPV, Protein, *Trypanosoma evansi*, Surra

ABSTRAK

Trypanosoma evansi masih menjadi penyebab utama penyakit trypanosomiasis di Indonesia, yang dikenal dengan nama Surra. Namun demikian, kelemahan dalam mendiagnosa yang tepat dari *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis/T. evansi* (CATT/*T. evansi*), ELISA, dan PCR menyebabkan pengendalian Surra di lapang masih menghadapi kendala. Untuk itu, diperlukan alternatif piranti diagnosis yang cepat, akurat dan mudah diaplikasikan, yaitu biosensor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kinerja biosensor Surra (*Trypanosoma evansi*) dalam mengidentifikasi sampel serum positif dan negatif. Sumber protein diisolasi dari *T. evansi* yang

dipropagasi. Protein diimobilisasi dengan reaksi carbodiimide pada permukaan sensor (elektrode) karbon sebagai material yang memiliki respon terendah terhadap serum/antibodi anti *T. evansi* (persentase arus listrik/elektron <90). Metode yang digunakan pada pengembangan biosensor ini adalah *differential pulse voltammetry* (DPV). Data yang diperoleh dinormalisasi dan dianalisis menggunakan program PSTrace 5.8. Hasil penelitian membuktikan bahwa positif dan negatif palsu sensor dideteksi pada pengenceran serum 2 dan 64 kali. Serum positif yang dianalisis dengan metode DPV (kisaran potential listrik - 0.2 hingga +1.0 V dengan tingkat kecepatan pembacaan 0,1 Vs⁻¹) menunjukkan bahwa slope serum positif (1,84) lebih tinggi dibandingkan dengan sampel negatif (1,01) yang mengindikasikan sensitivitas biosensor terhadap Surra (*T. evansi*). Hasil ini dikonfirmasi dengan melakukan pengujian serologis pada sampel menggunakan (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis/T. evansi - CATT/T. evansi*). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa biosensor Surra/*T. evansi* berbasis protein merupakan piranti yang menjanjikan untuk dikembangkan dalam mendeteksi Surra pada ternak.

Kata kunci: Biosensor, DPV, Protein, *Trypanosoma evansi*, Surra

PENDAHULUAN

Efektitas dan ketepatan dalam memilih metode pemeriksaan adalah kunci fundamental dalam penegakan diagnosis suatu penyakit. Faktor ini penting untuk mencegah kesalahan diagnosa dan penentuan pengobatan, mencegah terjadinya resistensi obat, termasuk untuk mengendalikan dan memonitor suatu wabah epidemi (Teles et al. 2010). Surra yang disebabkan oleh *Trypanosoma evansi* masih menjadi permasalahan utama pada ternak, bahkan akhir-akhir ini cenderung menular ke manusia (zoonosis) (Wardhana & Sawitri 2018; Dewi et al. 2019a).

Beberapa metode diagnosis untuk Surra telah banyak dikembangkan, namun umumnya masih memiliki kelemahan (Wardhana & Sawitri 2019). Metode ulas darah kurang sensitif pada infeksi kronis atau ketika tingkat parasitemianya rendah. Uji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) terlihat sederhana, namun memerlukan waktu cukup lama dan operator terlatih. Adapun metode (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis/T. evansi - CATT/T. evansi*) dilaporkan memiliki reaksi silang dengan antibodi terhadap spesies *Trypanosoma* lainnya dan sulit untuk diperoleh di Indonesia (Luckins 1992). Demikian pula uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memerlukan peralatan dan bahan kimia yang relatif mahal (Dewi et al. 2019b). Tidak seperti pendekatan *bioassay* atau bioanalisis secara konvensional, teknik biosensor tidak membutuhkan langkah atau proses tambahan (bahan kimia atau yang lainnya) karena telah dikonstruksi dalam suatu alat yang siap untuk digunakan. Disain biosensor ditujukan untuk membuat metode diagnosis lebih selektif, sensitif, cepat, mudah dibawa, mudah dioperasikan, murah, dan mempresentasikan respon yang proporsional (Teles et al. 2010).

Saat ini, teknologi biosensor berbasis elektrokimia telah banyak dikembangkan karena mempunyai berbagai keunggulan dibandingkan dengan metode sebelumnya. Preparasi sensor elektrokimia lebih sederhana dan analisis sampelnya relatif cepat (Munawar et al. 2020a; 2020b). Secara garis besar, proses modifikasi sensor terdiri dari tiga pendekatan teknik, yaitu *self-assembly monolayer* (SAM) (Merli et al. 2016), *electroplating* (Saleh et al. 2011), dan *entrapment* (Dridi et al. 2015). Perbedaan ketiga teknik ini terletak pada preparasi sensornya, tetapi ketiganya dapat dibaca dengan metode *differential pulse voltammetry* (DPV), yaitu pengukuran intensitas arus listrik (elektron) dalam larutan di daerah yang memiliki perbedaan potensial listrik.

Walaupun teknik biosensor telah banyak dikembangkan (Campuzano et al. 2017), namun pemanfaatannya terhadap deteksi parasit *T. evansi* (Surra) belum banyak dilaporkan. Theint et al. (2019) mengembangkan biosensor optik untuk mendeteksi *T. evansi* dan *Plasmodium*, tetapi peralatan yang digunakan kurang efektif karena masih menggunakan alat-alat besar. Biosensor berbasis antibodi dengan metode *amperometry* dilaporkan mampu mendeteksi *Plasmodium falciparum* dengan deteksi limit hingga $0,36 \text{ ngml}^{-1}$ (Castilho et al. 2011). Selain pada *Plasmodium*, biosensor dengan menggunakan DNA (aptamer) juga dapat mendeteksi *Leishmania infantum* hingga $0,01 \text{ pgml}^{-1}$ dengan menggunakan metode *electrochemical impedance spectroscopy* (EIS) (Garcia et al. 2016). Pemanfaatan biosensor untuk *T. cruzi* juga telah dilaporkan dengan pendekatan metode *amperometry* dan EIS (Ferreira et al. 2005; Ribone et al. 2006; Pereira et al. 2011; Campuzano et al. 2017). Biosensor untuk *T. cruzi* menggunakan antibodi sebagai molekul pengenalnya mampu mendeteksi hingga 3 ngml^{-1} . Berdasarkan studi-studi tersebut, teknik biosensor juga dapat dikembangkan untuk mendeteksi penyakit Surra yang disebabkan oleh *T. evansi*. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk menunjukkan respon biosensor berbasis protein yang dapat bekerja secara optimal pada penentuan serum negatif dan positif terhadap Surra yang diperoleh di lapang. Status serum yang diuji selanjutnya dikonfirmasi dengan uji serologis CATT/*T. evansi* yang lebih efisien baik secara penggunaan bahan kimia dan proses analisis daripada ELISA dan PCR.

MATERI DAN METODE

Etik penelitian

Penggunaan hewan coba dalam kegiatan penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Kesejahteraan Hewan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (KKHB) dengan nomor registrasi Balitbangtan/BBLitvet/Rm/01/2017.

Isolat dan propagasi *Trypanosoma evansi*

Isolat *T. evansi* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari BBLitvet Culture Collection (BCC). Isolat yang disimpan didalam nitrogen cair dikeluarkan dan dithawing. Setelah dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop untuk melihat tingkat pergerakan *T. evansi*, isolat tersebut diinokulasikan pada dua ekor mencit (*Mus musculus*) secara intraperitoneal. Tingkat parasitemia diamati dua hari sekali hingga tingkat parasitemia mencapai 10^4 , dan selanjutnya diinokulasikan pada tiga ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) secara intraperitoneal untuk mempropagasi *T. evansi* yang nantinya digunakan sebagai sumber isolasi protein. Ketika tingkat parasitemia mencapai 10^8 - 10^9 , *T. evansi* dikoleksi dari jantung dan ditampung pada tabung yang mengandung zat anti pembekuan darah (Laha et al. 2008).

Pemurnian *T. evansi* dari darah dan isolasi protein

Proses pemurnian *T. evansi* dilakukan dengan cara mensentrifugasi darah tikus yang mengandung *T. evansi* dengan kecepatan 1000 g selama 10 menit pada suhu 4°C . *Buffy coat* bersama dengan plasma dikoleksi, dikumpulkan dan dilarutkan dalam 20 mL Phosphate Buffered Saline Glucose (PBSG) dan dimurnikan dengan kolom DEAE *amino-exchange* (Diethyl amino-ethyl -cellulose, D0909, Sigma-Aldrich). Parasit dicuci dua kali dengan PBSG pH 8, selanjutnya disentrifugasi 1000 g selama 10 menit, kemudian supernatannya dibuang dan peletnya ditampung pada tabung baru, berlabel, dan disimpan pada suhu -20°C .

Isolasi protein dilakukan dengan cara meresuspensi pelet *T. evansi* dengan 1 mL *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan dimasukkan ke dalam *microtube* (Eppendorf bervolume 1,5 mL), kemudian dilakukan *freeze-thawing* sebanyak 3 kali dalam nitrogen cair dan air hangat (air diletakkan diatas *hot plate* dan suhu diatur 50 - 60°C). Setelah tiga kali, suspensi diperiksa di bawah mikroskop untuk memastikan bahwa semua *T. evansi* telah hancur. Selanjutnya, suspensi disentrifugasi $10.000 \times g$ selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan yang diperoleh dikoleksi dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang baru (tabung Eppendorf bervolume 1,5 mL) sebagai protein *T. evansi* yang akan digunakan untuk analisis lebih lanjut. Sebagai pembanding, protein *T. evansi* standar juga digunakan pada penelitian ini yang diperoleh dari *Institute of Tropical Medicine*, Belgia.

Preparasi serum

Serum yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari ternak kerbau yang positif terinfeksi *T. evansi* secara alami di daerah Bogor, sedangkan serum negatif diperoleh dari ternak tanpa infeksi *T. evansi* di daerah Pematang. Sebelum diuji, serum positif dan negatif diencerkan dengan larutan 25 mM *ferril/ferrocyanide*

($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) dalam 0,01 M PBS dari 2 sampai dengan 64 kali dengan volume masing-masing 500 μl .

Instrumentasi dan metode sensor

Metode sensor yang digunakan dalam penelitian ini adalah *differential pulse voltammetry* (DPV) yang akan mengukur intensitas arus listrik (elektron) dalam larutan di daerah beda potensial yang sudah ditentukan, yaitu dari -0,2 sampai +1,0 Volt yang didukung dengan kecepatan pengukurannya 0,1 Vs^{-1} dalam waktu 15 detik. Metode DPV dilakukan menggunakan *Value screen printed carbon electrodes and gold electrodes* (catalogue no. A-AC-C-AC-303-N dan A-AC-G-AC-303-N, Zimmer&Peacock As, Horten, Norway) dengan dua jenis sensor, yaitu karbon dan emas yang berfungsi sebagai penghantar elektron dalam larutan. Sensor (*elektrode*) ini tersusun dari Ag/AgCl sebagai *reference* (RE) dan *counter electrode* (CE) dan karbon atau emas sebagai *working electrode* (WE). Hasil respon sensor dibaca menggunakan potentiostat Ana Pot (Zimmer & Peacock As, Hoerten, Norway) yang dilengkapi dengan software PS. Trace 5.8. Kedua jenis sensor ini dibandingkan untuk memperoleh jenis sensor yang memberikan respon terbaik dalam pengujian serum.

Proses modifikasi sensor (*electrode*) dengan protein *T. evansi*

Proses modifikasi sensor menggunakan pendekatan metode *self-assembly monolayer* (SAM) (Merli et al. 2016). Metode ini memiliki prosedur yang sangat sederhana dibandingkan dengan metode yang lain. Protein *T. evansi* diimobilisasi pada permukaan WE menggunakan *1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide* dan *N-Hydroxysuccinimide* (EDC/NHS) (Pagán et al. 2015; Welch et al. 2017; Ying et al. 2018; Oberhaus et al. 2020) tanpa adanya *pretreatment* pada WE. Protein yang digunakan diencerkan 3 kali kemudian diimobilisasi pada permukaan sensor. Selanjutnya, sensor diinkubasi dalam larutan tersebut hingga 24 jam pada suhu 4°C. Sensor dibilas dengan PBS 0,01 M dan siap digunakan untuk analisis sampel.

Pemilihan bahan sensor

Pemilihan bahan sensor dilakukan dengan membandingkan hasil pengujian serum tanpa protein dan pengujian serum dengan protein (serum + protein). Pengujian ini akan dilakukan pada dua jenis sensor, yaitu sensor emas dan sensor karbon. Sebanyak 50 μL serum (positif dan negatif) diteteskan di atas permukaan sensor karbon dan emas tanpa protein, kemudian dianalisis menggunakan metode DPV dengan kondisi alat yang sudah dijelaskan sebelumnya. Pengujian ini diulang pada sensor karbon dan emas yang sudah dimodifikasi dengan protein. Data ini akan dinormalisasi dengan PStace 5.8 dan akan dikonversi dalam bentuk grafik

batang dan linier dengan menghubungkan antara pengenceran serum dengan persentase arus listrik (elektron). Persentase arus listrik ini akan dihitung berdasarkan perbandingan arus listrik dari serum dibagi dengan arus listrik dari 25 mM *ferriferrocyanide* dalam 0,01 M PBS.

Penentuan hasil positif dan negatif palsu

Setelah pemilihan bahan sensor, tahap selanjutnya adalah penentuan hasil positif dan negatif palsu yang dilakukan dengan cara pengujian serum sensor terpilih sensor karbon, sensor karbon dengan protein (sensor + protein), dan sensor karbon dengan protein komersial (sensor + standar). Pemilihan sensor karbon berdasarkan hasil optimasi bahan sensor untuk imobilisasi protein (Gambar 3). Pada tahap ini, sebanyak 50 μ L serum positif untuk setiap pengenceran diteteskan di atas permukaan semua jenis sensor dan kemudian dianalisis menggunakan metode DPV. Data ini akan dinormalisasi dengan PStTrace 5.8 dan akan dikonversi dalam bentuk grafik batang yang menghubungkan antara pengenceran serum dan persentase arus listrik (elektron). Persentase arus listrik ini dihitung berdasarkan perbandingan arus listrik dari serum dibagi dengan arus listrik dari 25 mM *ferriferrocyanide* [$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$] dalam 0,01 M PBS.

Uji Biosensor *T. evansi* dan serologis dengan CATT/*T. evansi*

Penentuan serum negatif dan positif akan diuji dengan sensor karbon yang sudah dimodifikasi dengan protein. Pada tahap ini, sebanyak 50 μ L serum positif dan serum negatif untuk setiap pengenceran (4-32 kali) diteteskan di atas permukaan sensor, lalu dianalisis dengan metode DPV. Data akan dinormalisasi dengan PStTrace 5.8 dan dikonversi dalam bentuk grafik linier yang menghubungkan antara pengenceran serum dan persentase arus listrik (elektron). Lalu slopenya ditentukan untuk masing-masing serum. Persentase arus listrik ini akan dihitung berdasarkan perbandingan arus listrik dari serum dibagi dengan arus listrik dari 25 mM *ferriferrocyanide* dalam 0,01 M PBS. Status serum dikonfirmasi dengan uji serologi CATT/*T. evansi* dengan pengenceran serum 1:8 (Wardhana & Sawitri 2019).

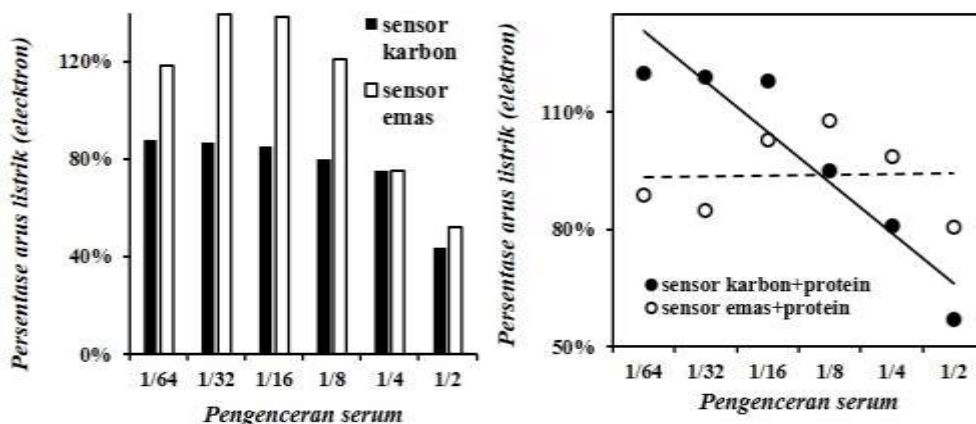
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi bahan sensor untuk imobilisasi protein

Pemilihan bahan sensor yang tepat mempunyai peran dalam menghasilkan data pengukuran yang akurat. Tahapan ini telah dilaporkan pada studi sebelumnya, tetapi metode pembacaan sensornya menggunakan *cyclic voltammetry* (Martins et al. 2020) sedangkan pada penelitian ini menggunakan *differential pulse voltammetry* (DVP). Meskipun berbeda metode dalam penentuan pemilihan bahan sensor,

namun tujuannya tetap sama, yaitu untuk membaca respon sensor yang merupakan interaksi antara protein *T. evansi* dan serum (antibodi). Oleh karena itu, diperlukan pemilihan bahan sensor yang optimal berdasarkan pada tingkat interaksi minimum antara bahan sensor dengan serum, sehingga data yang diperoleh merupakan respon dominan dari interaksi protein *T. evansi* dan serum.

Gambar 1A menunjukkan bahwa sensor berbahan karbon umumnya memiliki respon yang sangat rendah (44-88%) dibandingkan dengan sensor berbahan emas (52-139%) pada berbagai pengenceran serum. Data menunjukkan penurunan respon relatif stabil dari pengenceran 1/64 – 1/4 pada sensor karbon dibandingkan pada sensor emas. Hasil ini mengindikasikan bahwa respon interaksi antara sensor karbon dan serum jauh lebih rendah dibandingkan interaksi antara sensor emas dan serum. Interaksi yang cukup besar antara sensor emas dan serum dikarenakan interaksi gugus thiol (-SH) pada serum berinteraksi dengan emas, sehingga pembacaan biosensor untuk interaksi protein dan serum akan terganggu karena interaksi emas dan gugus thiol (Au-S) tersebut (Galal et al. 2012; Martins et al. 2020).



Gambar 1. (A) Perbandingan respons antara sensor karbon dan sensor emas terhadap pengenceran serum positif. (B) Perbandingan respons antara sensor karbon dan sensor emas yang keduanya dilapisi dengan protein *T. evansi* terhadap pengenceran serum positif. Pengenceran serum 2 sampai 64 kali dengan 25 mM *ferrilferrocyanide* dalam 0,01 M PBS. Metode pembacaan sensor : *differential pulse voltammetry* (DPV). Pengaturan kondisi pembaca sensor : *potential range* -0,2 hingga +1,0 V dan *scan rate* 0,1 Vs⁻¹ dengan waktu pengukuran 15 detik untuk setiap sampel.

Langkah selanjutnya adalah menguji respon sensor karbon dan sensor emas setelah dilapisi dengan protein *T. evansi* terhadap serum (antibodi anti *T. evansi*). Gambar 1B membuktikan bahwa respon yang sangat baik dari sensor karbon – protein *T. evansi* terhadap serum (antibodi anti *T. evansi*) dibandingkan dengan

sensor emas – protein *T. evansi*. *Trend* data pada sensor karbon menurun sangat tajam dibandingkan dengan sensor emas. Hal ini membuktikan interaksi antara protein *T. evansi* dan serum (antibodi anti *T. evansi*). Berbeda dengan sensor emas yang menunjukkan kecenderungan relatif landai terhadap serum (antibodi anti *T. evansi*). Oleh karena itu, sensor yang berbahan karbon dipilih untuk uji selanjutnya dalam pengembangan biosensor *T. evansi*.

Morfologi voltammogram data dari *differential pulse voltammetry*

Morfologi data dari DPV adalah kurva parabola yang menghubungkan beda potensial (*potential*) dengan arus listrik (*current*). Semakin banyak elektron yang terdapat dalam larutan, kurva semakin naik. Morfologi voltammogram larutan PBS menunjukkan respon paling rendah (Gambar 2A – garis titik titik) dimana aliran elektron pada larutan PBS sangat kecil. Sebaliknya, larutan *ferrilferrocyanide* mempunyai puncak paling tinggi dibandingkan dengan yang lain (Gambar 2A – garis putus-putus/sensor karbon (2); garis hitam/sensor emas(3)). Hal ini menunjukkan bahwa larutan *ferrilferrocyanide* mempunyai aktivitas elektron sangat tinggi.

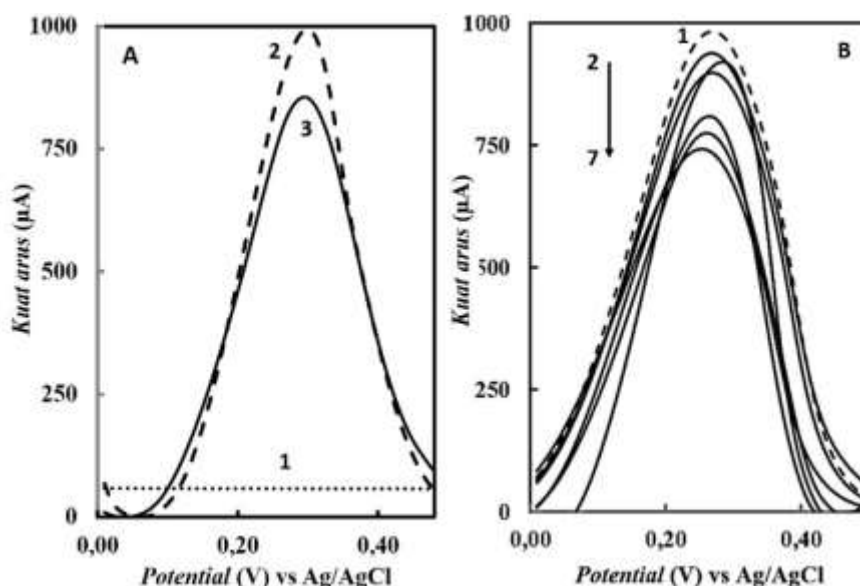
Ferrilferrocyanide digunakan sebagai sumber elektron (*redox couple system*) dalam larutan karena interaksi antara protein dan serum memberikan aktivitas elektron yang sangat kecil, sehingga pendekatan metode pengukuran respon ini adalah *gate effect* (Sharma et al. 2019). Prinsipnya yaitu respon interaksi antara protein dan serum yang akan menghambat aktivitas elektron dari *ferrilferrocyanide*, sehingga respon biosensor akan menurun dari pengenceran yang tinggi (1/64) ke pengenceran yang rendah (1/2) (Gambar 2B (3-8)). Hasil ini membuktikan bahwa aktivitas elektron dari *ferrilferrocyanide* terhambat karena interaksi antara protein *T. evansi* dan serum pada permukaan sensor seperti yang telah dilaporkan (Munawar et al. 2020a).

Positif dan negatif palsu

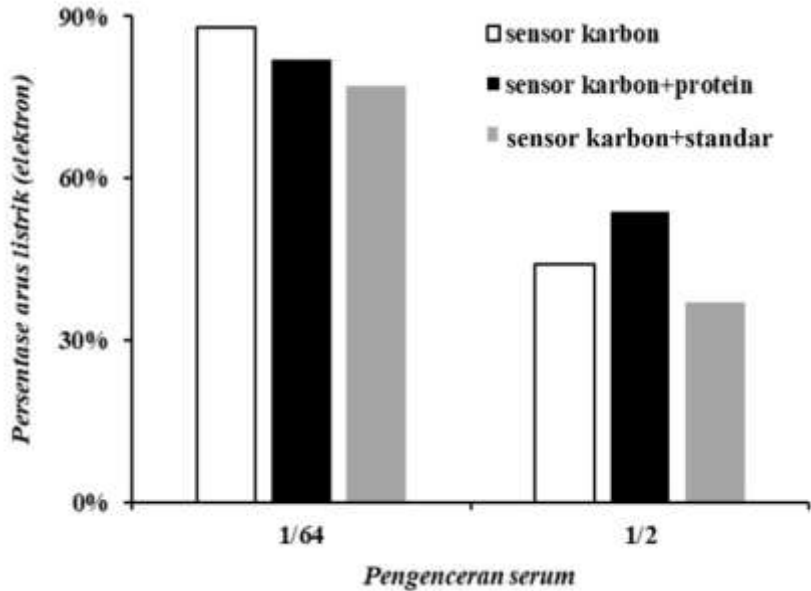
Sebelum melakukan uji biosensor terhadap serum positif dan negatif *T. evansi*, respon hasil positif dan negatif palsu perlu diperhatikan agar pembacaan biosensor terhadap serum dapat tertelusur. Pada penelitian ini, penentuan positif dan negatif palsu dibatasi dengan pendekatan yang lebih sederhana dibandingkan pada penentuan positif dan negatif palsu dari penelitian sebelumnya (Martins et al. 2020).

Penentuan hasil palsu ini diidentifikasi melalui pengukuran serum dengan sensor karbon, sensor karbon yang dilapisi dengan protein *T. evansi* (sensor karbon + protein), dan sensor karbon yang dilapisi protein standar (sensor karbon + standar). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa pada pengenceran serum 1/64 memberikan respon yang hampir berdekatan dari setiap sensor (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa pengenceran serum 64 kali mempunyai respon yang hampir

sama terhadap respon *ferriferrocyanide* sehingga berpotensi menjadi negatif palsu. Sebaliknya, dengan analogi yang sama, pengenceran serum 1/2 menunjukkan respon yang sama dari sensor karbon, sensor karbon + protein, dan sensor karbon + standar (Gambar 3). Kondisi ini berpotensi menimbulkan bias dalam hasil pembacaan sensor ketika pengenceran 2 kali dimasukkan dalam pengukuran. Oleh karena itu, pengenceran 2 kali dan 64 kali tidak disertakan dalam analisis selanjutnya karena dipertimbangkan sebagai positif dan negatif palsu.



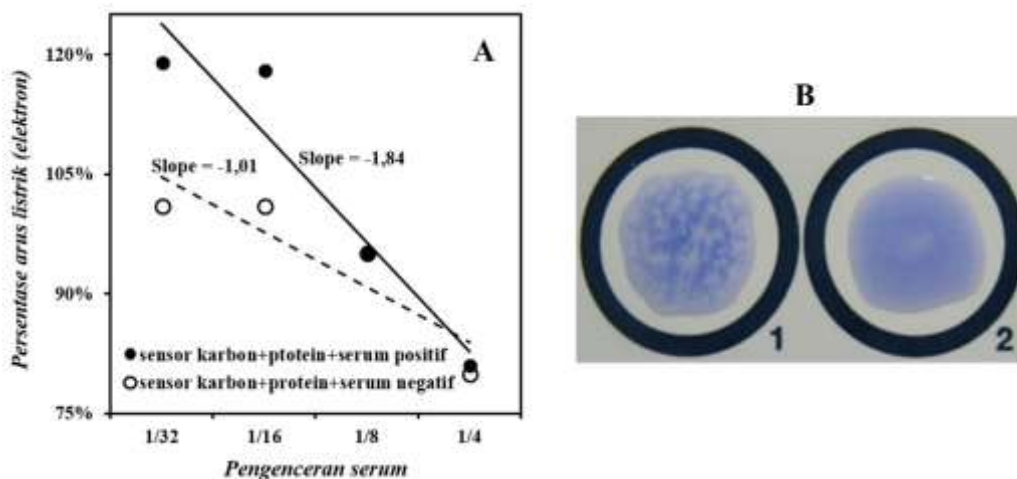
Gambar 2. (A) Voltammogram dari PBS 0,01 M (1) dan 25 mM *ferriferrocyanide* dalam 0,01 M PBS (2) yang diukur dengan sensor karbon, dan 25 mM *ferriferrocyanide* dalam 0,01 M PBS (3) yang diukur dengan sensor emas. (B) Respon penurunan tren voltammogram dari 25 *ferriferrocyanide* dalam 0,01 M PBS (1) dan serum dengan pengenceran bertingkat (pengenceran 2 sampai 64 kali dengan 25 mM *ferriferrocyanide* dalam 0,01 M PBS) (2-7) yang diukur dengan sensor karbon yang dilapisi protein *T. evansi*. Metode pembacaan sensor : *differential pulse voltammetry* (DPV). Pengaturan kondisi alat pembaca sensor : *potential range* -0,2 hingga +1,0 V dan *scan rate* 0,1 Vs⁻¹ dengan waktu pengukuran 15 detik untuk setiap sampel.



Gambar 3. Penentuan false positif dan negatif untuk mengidentifikasi respon sensor karbon dengan membandingkan terhadap serum anti *T. evansi* dengan membandingkan sensor karbon, sensor karbon yang dilapisi protein *T. evansi* dan sensor karbon yang dilapisi dengan protein standar. Pengenceran serum 2 sampai 64 kali dengan 25 mM *ferril/ferrocyanide* dalam 0,01 M PBS. Metode pembacaan sensor: *differential pulse voltammetry* (DPV). Pengaturan kondisi pembaca sensor: *potential range* -0,2 hingga +1,0 V dan *scan rate* 0,1 Vs⁻¹ dengan waktu pengukuran 15 detik untuk setiap sampel

Uji *T. evansi* secara biosensor dan serologis (CATT/*T. evansi*)

Pengukuran serum positif dan negatif dengan biosensor dilakukan pada pengenceran serum 4 sampai dengan 32 kali. Gambar 4 menunjukkan *trend* yang sangat tajam pada pengukuran sampel serum positif dibandingkan dengan serum negatif. Hasil ini membuktikan bahwa interaksi antara serum positif dan protein (1,84) lebih tinggi dua kali dengan interaksi antara serum negatif dan protein (1,01). Selain itu, hasil ini juga mengindikasikan sensitifitas biosensor *T. evansi* (Surra) berbasis protein ini sangat tinggi karena mampu membedakan antara serum positif dan negatif.



Gambar 4. (A) Perbandingan slope sensor karbon yang diuji dengan serum positif (garis hitam) dan serum negatif (garis hitam putus-putus). Pengenceran serum 2 sampai 64 kali dengan 25 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ dalam 0,01 M PBS. Metode pembacaan sensor: *differential pulse voltammetry* (DPV). Pengaturan kondisi pembaca sensor : *potential range* -0,2 – +1,0 V dan *scan rate* 0,1 Vs^{-1} dengan waktu pengukuran 15 detik untuk setiap sampel. (B). Hasil uji serologis sampel lapang positif dengan *CATT/T. evansi*. Tampak serum positif menunjukkan reaksi aglutinasi (1) dibandingkan dengan negatif (2).

Untuk memperoleh kesimpulan yang tangguh (*robust*) dari penelitian ini, diperlukan pengujian lanjutan menggunakan sampel lapang yang lebih banyak walaupun serum positif telah dikonfirmasi berdasarkan uji *CATT/T. evansi* dengan tingkat aglutinasi yang tergolong kuat (+++). Biosensor berbasis protein pada penelitian ini memberikan respon yang cukup signifikan terhadap serum positif, yang ditunjukkan dengan nilai slope untuk presentase arus listrik pada serum positif lebih tinggi (1,84) dibandingkan serum negatif (1,01). Artinya biosensor yang didisain pada penelitian ini mempunyai sensitifitas lebih tinggi terhadap serum positif. Data *slope* dari penelitian ini belum bisa dijadikan patokan dasar sebagai nilai akhir untuk menjustifikasi serum positif dan negatif di lapang. Biosensor Surra (*T. evansi*) yang dikembangkan dalam studi ini sangat menjanjikan untuk diproduksi secara masal setelah dilakukan beberapa rangkaian uji lanjutan seperti uji stabilitas, spesifisitas dan sensitifitas dengan menggunakan sampel dari laboratorium dan lapang.

KESIMPULAN

Studi ini merupakan tahap awal dari proses pengembangan biosensor untuk mendeteksi Surra (*T. evansi*). Desain biosensor berbasis protein yang dikembangkan dengan metode DVP ini terbukti mampu membedakan serum positif dan negatif,

sehingga berpotensi untuk dijadikan piranti dalam mendeteksi Surra di lapang. Untuk menyempurnakan respon interaksi antara protein dan antibodi Surra, maka perlu dilakukan optimasi konsentrasi protein, reaksi silang (*crosslinker*), dan pengenceran serum, sehingga keakuratan dari biosensor dapat terukur, termasuk melakukan uji stabilitas, sensitivitas dan spesifisitas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Zimmer Peacock Ltd (UK), Zimmer Peacock As (Norway) dan PT Mitra Asiatek Biosensor (Indonesia) yang memfasilitasi Potentiostat Ana Pot dan CSPE, sehingga kegiatan penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

KONTRIBUSI PENULIS

Semua penulis adalah kontributor utama dalam penyusunan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. 2017. Electrochemical Biosensing for the Diagnosis of Viral Infections and Tropical Diseases. *Chem Electro Chem*. 4:753-777.
- Castilho M, Laube T, Yamanaka H, Alegret S, Pividori MI. 2011. Magneto immunoassays for plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 related to malaria based on magnetic nanoparticles. *Anal Chem*. 83:5570–5577.
- Dewi R, Wardhana A, Soejoedono R, Mulatsih S. 2019. Evaluation of Surra treatment strategies attacking horse and buffaloes in East Sumba District, Nusa Tenggara Timur Province of Indonesia (2010-2016). *JITV*. 24:39-48.
- Dewi R, Wardhana A, Soejoedono R, Mulatsih S, Basri C. 2019. Economic analysis for selection of diagnostic methods against Surra in Buffalo on East Sumba Island, Indonesia. *Adv Heal Sci Res*. 19:115-119.
- Dridi F, Marrakchi M, Gargouri M, Garcia-Cruz A, Dzyadevych S, Vocanson F, Saulnier J, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F. 2015. Thermolysin entrapped in a gold nanoparticles/polymer composite for direct and sensitive conductometric biosensing of ochratoxin A in olive oil. *Sensors Actuators, B Chem* [Internet]. 221:480–490. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.120>
- Ferreira AAP, Colli W, Da Costa PI, Yamanaka H. 2005. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. *Biosens Bioelectron*. 21:175-181.
- Galal A, Atta NF, El-Ads EH. 2012. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles - Towards selective electrochemical sensors. *Talanta* [Internet]. 93:264–273. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.032>
- Garcia MFK do. S, Andrade CAS, de Melo CP, Gomes DS, Silva LG, Dias R V., Balbino VQ, Oliveira MDL. 2016. Impedimetric sensor for *Leishmania infantum* genome

- based on gold nanoparticles dispersed in polyaniline matrix. *J Chem Technol Biotechnol.* 91:2810-2816.
- Laha R, Sasmal N, Bandyopadhyay S. 2008. Comparative polypeptide profiles of whole cell lysate antigens of *Trypanosoma evansi* isolated from three different hosts of eastern India. *J Protozool Res.* 18:11-16.
- Luckins AG. 1993. Methods for diagnosis of Trypanosomiasis in livestock. [place unknown]. In : Improving the diagnosis and control of trypanosomiasis and other vector-borne diseases of African livestock using immunoassay methods. International Atomic Energy Agency. INIS Clearinghouse, Vienna, Austria.
- Martins BR, Barbosa YO, Andrade CMR, Pereira LQ, Simão GF, de Oliveira CJ, Correia D, Oliveira RTS, da Silva M V., Silva ACA. 2020. Development of an Electrochemical Immunosensor for Specific Detection of Visceral Leishmaniasis Using Gold-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes. *Biosensors.* 10:81.
- Merli D, Ferrari C, Cabrini E, Dacarro G, Pallavicini P, Profumo A. 2016. A gold nanoparticle chemically modified gold electrode for the determination of surfactants. *RSC Adv.* 6:106500–106507.
- Munawar H, Garcia-Cruz A, Majewska M, Karim K, Kutner W, Piletsky S. 2020. Electrochemical determination of fumonisin B1 using a chemosensor with a recognition unit comprising molecularly imprinted polymer nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem* [Internet]. 321:128552. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128552>
- Munawar H, Mankar JS, Sharma MD, Garcia-Cruz A, Fernandes LAL, Peacock M, Krupadam RJ. 2020. Highly selective electrochemical nanofilm sensor for detection of carcinogenic PAHs in environmental samples. *Talanta* [Internet]. 219:121273. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121273>
- Oberhaus F V., Frense D, Beckmann D. 2020. Immobilization Techniques for Aptamers on Gold Electrodes for the Electrochemical Detection of Proteins: A Review. *Biosensors.* 10(5) : 45. Available from: <https://doi.org/10.3390/bios10050045>
- Pagán M, Suazo D, del Toro N, Griebenow K. 2015. A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of an efficient nano-structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. *Biosens Bioelectron.* 64:138–146.
- Pereira S V., Bertolino FA, Fernández-Baldo MA, Messina GA, Salinas E, Sanz MI, Raba J. 2011. A microfluidic device based on a screen-printed carbon electrode with electrodeposited gold nanoparticles for the detection of IgG anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. *Analyst.* 136:4745-4751.
- Ribone ME, Belluzo MS, Pagani D, Marcipar IS, Lagier CM. 2006. Amperometric bioelectrode for specific human immunoglobulin G determination: Optimization of the method to diagnose American trypanosomiasis. *Anal Biochem.* 350:61-70.
- Saleh Ahammad AJ, Choi YH, Koh K, Kim JH, Lee JJ, Lee M. 2011. Electrochemical detection of cardiac biomarker troponin I at gold nanoparticle-modified ITO electrode by using open circuit potential. *Int J Electrochem Sci.* 6:1906-1916.

- Sharma PS, Garcia-Cruz A, Cieplak M, Noworyta KR, Kutner W. 2019. 'Gate effect' in molecularly imprinted polymers: the current state of understanding. *Curr Opin Electrochem* [Internet]. 16:50–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.020>
- Teles F, Tavira L, Fonseca L. 2010. Biosensors as rapid diagnostic tests for tropical diseases. *Cri Rev Cli Lab Sci*. 47:139–169.
- Theint H, Walsh J, Wong S, Voon K, Shitan M. 2019. Development of an optical biosensor for the detection of *Trypanosoma evansi* and *Plasmodium berghei*. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spec*. 218:348-358.
- Wardhana A, Sawitri D. 2018. Surra: Trypanosomiasis pada ternak yang berpotensi sebagai penyakit zoonosis. *Wartazoa*. 28:139-151.
- Wardhana A, Sawitri D. 2019. Deteksi Surra yang Disebabkan *Trypanosoma evansi* pada Kerbau di Kabupaten Pandeglang, Propinsi Banten. In: Martindah E, Wina E, editors. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner "Mendukung Kemandirian Pangan di Era Ind 40."* Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian; p. 451-461.
- Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. 2017. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases*. 12:02D301.
- Ying GQ, Wang MJ, Yi Y, Chen JS, Mei JF, Zhang YL, Chen SQ. 2018. Construction and application of an electrochemical biosensor based on an endotoxin aptamer. *Biotechnol Appl Biochem*. 65:323-327.