

Performa Perangkat Diagnostik Elisa Toksoplasmosis pada Serum Domba dan Manusia

Didik T. Subekti¹, Lisda Hayati² & Sujud M. Raharja³

¹ Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor 16114, ²Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, ³Dinas Kesehatan Kabupaten Lumajang.

Email: subekti.vmd@lycos.com

ABSTRACT

Performance of ELISA Toxoplasmosis Diagnostic Kits on Sheep and Human Sera Toxoplasma seropositivity in Indonesia have a high prevalence, both in human and animals. Unfortunately, the availability of diagnostic tools to support dynamic surveillance are limited. Recently, the diagnostic tools for toxoplasmosis, namely ELISA BM were developed. The technology was based on ELISA technique using soluble tachyzoite antigen from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Kit performance is one of the important issue for acceptance of diagnostic tools prior to wide application. The purpose of the studies was to asses the quality of diagnostic tools performances. The assesment comprises of four stages. First stage was to evaluate the performance of ELISA BM compared to Latex Agglutination Test (LAT) on sheep sera. Secondly, to evaluate the performance of ELISA BM to descriminate true seropositive and seronegative toxoplasmosis on human sera. The last stage were comparing ELISA BM, ELISA TL (commercial kit) and LAT on predetermined and unknown human sera. The results show that the accuracy of ELISA BM is slightly better than ELISA TL. Agreement of ELISA BM with LAT was better againts ELISA TL with LAT. However, all performance as determined using Cohen's κ and Gwet's AC_1 of ELISA BM, ELISA TL and LAT were good up to very good agreement.

Keywords: Toxoplasmosis, ELISA, Latex Agglutination, inter reliability agreement.

PENDAHULUAN

Kasus toksoplasmosis secara serologis di beberapa wilayah Indonesia cukup tinggi, baik pada manusia (> 40 %) maupun hewan yang prevalensinya bervariasi mulai dari 10 – 60 % (Subekti *et al.* 2005). Meskipun berbagai survei telah dilakukan namun umumnya masih bersifat sporadik dan tidak dilakukan secara terencana. Salah satu syarat untuk dapat memprogram dan melaksanakan

diagnosis untuk kepentingan epidemiologis dengan sigi secara berkala atau periodik adalah ketersediaan perangkat diagnostik di dalam negeri. Demikian pula halnya dalam diagnsosis rutin di laboratorium klinik, umumnya masih tergantung pada produk impor. Ketergantungan pada kit komersial seringkali tidak sesuai untuk tujuan tertentu, misalnya kit ELISA untuk manusia tidak dapat dipakai untuk hewan. Aplikasi diagnosis toksoplasmosis pada

veteriner (diagnosis pada hewan) umumnya masih mengandalkan pada teknik uji aglutinasi yang didasarkan pada produk serologis manusia.

Berdasarkan latar belakang tersebut, pengembangan kit diagnostik untuk toksoplasmosis yang lebih peka dan akurat dengan basis teknologi ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) dalam bidang veteriner maupun untuk diagnosis pada manusia menjadi penting dan dibutuhkan. Oleh karena itu pengujian awal untuk pengembangan ELISA diarahkan pada pengujian serum hewan dan manusia. Hewan model yang dipilih adalah domba. Pemilihan hewan target berupa domba didasarkan pada kenyataan bahwa prevalensi seropositif toksoplasmosis pada domba umumnya sangat tinggi pada berbagai daerah di Indonesia, yaitu berkisar antara 27,54 – 71,97% (Subekti *et al.* 2005). Disisi lain kasus toksoplasmosis pada manusia juga cukup tinggi berkisar 20 – 88% (Ma'roef & Sumantri 2003). Dengan demikian hal tersebut mempermudah untuk mendapatkan sampel seropositif yang memadai.

Secara klinis, toksoplasmosis tidak memiliki gejala yang khas sehingga penetapan diagnosis berdasarkan gejala klinis tidak dapat dijadikan tolak ukur (Jin *et al.* 2005). Oleh sebab itu peneguhan diagnosis untuk toksoplasmosis umumnya dilakukan secara serologis, baik pada hewan maupun manusia (Figueiredo *et al.* 2001). Uji serologis yang banyak diaplikasikan di dunia maupun di Indonesia untuk diagnosa serologis pada manusia dan hewan adalah ELISA dan aglutinasi latek (Subekti & Kusumaningtyas 2011). Pada pengembangan

ELISA, terdapat dua jenis protein antigen *T. gondii* yang dikenal yaitu protein solubel dari takizoit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) dan protein sekretori-ekskretori. Seleksi dari kedua protein tersebut diharapkan dapat menetapkan protein yang paling spesifik dan sensitif untuk pengujian serologis dengan ELISA.

BAHAN DAN CARA KERJA

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH yang tersimpan dalam nitrogen cair pada Laboratorium Protozoologi Balai Besar Penelitian Veteriner. Takizoit diremajakan dan diperbanyak dalam rongga peritoneum mencit. Takizoit kemudian dipanen dari cairan peritoneum dan disentrifus pada 3500 rpm selama 15 menit di suhu 4°C (Beckman GPR, Beckman, USA). Supernatan kemudian dibuang dan peletnya diresuspensi dalam 1 ul larutan dapar fosfat fisiologis (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS; Sigma Chem., USA) dengan pH 7.2 atau medium RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, USA). Konsentrasi akhir takizoit dalam PBS maupun RPMI 1640 adalah 10^9 takizoit/ul.

Selanjutnya takizoit *T. gondii* dalam PBS pH7,2 akan digunakan untuk isolasi protein solubel (*soluble tachyzoite antigen*, ST-Ag). Isolasi ST-Ag dilakukan mengikuti prosedur dari Fatoohi *et al.* (2004) dengan sedikit modifikasi. Secara singkat, 10^9 takizoit/ul dalam 1 ul PBS dihancurkan dengan sonikator (Branson Sonifier 250, USA). Suspensi takizoit yang telah disonikasi kemudian

disentrifus pada 3500 rpm selama 15 menit di suhu 4°C. Supernatan yang mengandung protein ST-Ag dipisahkan dari debris dalam pelet dan dipindahkan ke tabung ependorf baru.

Adapun suspensi takizoit dalam medium RPMI 1640 (tanpa serum, NaHCO₃ dan L-Glutamin) akan digunakan untuk mengisolasi protein sekretorik-ekskretorik (*secretory-excretory antigen*, SE-Ag). Isolasi protein SE-Ag dilakukan dengan mengacu pada prosedur dari Son dan Nam (2001) dengan sedikit modifikasi. Secara ringkas, 10⁹ takizoit/ul dalam 1 ul medium RPMI 1640 diinkubasi pada suhu 37°C dan diagitasi dalam inkubator beragitator (Dynatech IS89) selama 1 jam. Selanjutnya suspensi takizoit disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung protein SE-Ag dipisahkan dari takizoit dalam pelet dan dipindahkan ke tabung ependorf baru. Adapun takizoit dalam pelet masih dapat diinfeksi kembali ke mencit untuk penyegaran dan perbanyakan ulang sebelum disimpan beku dalam nitrogen cair.

Selanjutnya supernatan yang mengandung protein ST-Ag maupun SE-Ag didekonsentrasi. Dekonsentrasi dilakukan dengan evaporasi pelarut menggunakan *Centrifugal Evaporator* JOUAN RC10-09/RCT90. Proses dekonsentrasi protein dilakukan selama satu jam pada suhu 30°C di ruang evaporator dan -40°C di ruang *cold trap*. Protein yang telah diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam PBS atau RPMI sampai konsentrasinya mencapai sekitar 1 mg

ul⁻¹. Protein yang diperoleh masing-masing diukur kadarnya dengan metoda Bradford menggunakan *Bio-Rad DC Protein Assay* (Bio-Rad, France). Larutan protein ST-Ag dan SE-Ag kemudian dialikot dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan.

Sampel diperoleh dari domba di wilayah Jakarta, dan Bogor sebanyak 50 sampel. Darah diambil dari vena jugularis tanpa antikoagulan dan disentrifus dengan kecepatan 14.811 g (~12.000 rpm) menggunakan sentrifus *Eppendorf Centrifuge 5417C*. Serum yang terpisah dialikot dan ditampung dalam tabung ependorf 0,5 ul serta disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Kontrol negatif digunakan serum domba komersial (Sigma S2382, Sigma Chem-USA) yang kemudian diencerkan 1:1000, dialikot dan disimpan dalam -20°C. Penggunaan serum domba komersial untuk sumber kontrol negatif dilakukan mengingat sulitnya mendapatkan serum seronegatif toksoplasmosis dari lapangan karena kasus toksoplasmosis pada domba yang demikian tinggi. Adapun 68 sampel serum manusia diperoleh dari Laboratorium Klinik Prodia-Bogor, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat-Banjarmasin dan Dinas Kesehatan Kabupaten Lumajang. Sampel dialikot dan disimpan dalam suhu -20°C.

Sebelum digunakan untuk pengujian kit diagnostik toksoplasmosis berbasis ELISA (diberi kode : Kit ELISA BM) untuk serum domba, sampel serum domba yang telah dikoleksi dari lapangan terlebih dahulu diseleksi dan diuji untuk

penentuan seropositif atau seronegatifnya menggunakan perangkat uji aglutinasi latek (UAL) komersial yaitu *Biokit*[®] (Biokit S.A.-Spain) sehingga disebut *predetermined serum*. Kriteria utama seleksi tersebut adalah bahwa hasil pengujian dengan UAL harus menunjukkan seropositif kuat dan secara fisik jernih. Adapun sampel dengan hasil seropositif lemah dan dubius pada penelitian tahap ini akan diuji ulang dengan pengenceran 1:5. Apabila hasil ulangan masih tetap dubius maka akan dieliminasi. Seleksi *predetermined serum* diperlukan untuk menseleksi sampel serum domba dengan kualitas baik dan menjamin bahwa sampel yang digunakan seronegatif atau seropositif toksoplasmosis kuat. Demikian pula halnya serum manusia, sampel serum seropositif dan seronegatif diperoleh dari kit komersial dan Laboratorium Klinik Prodia-Bogor. Sampel serum seropositif dan seronegatif toksoplasmosis tersebut kemudian dideterminasi ulang dengan menggunakan kit komersial UAL dan ELISA *Universal EIA Ab* (Test Line Ltd, Czech). Hasil yang tetap konsisten dengan kedua uji tersebut digunakan sebagai kontrol seropositif dan seronegatif. Melalui seleksi ini akan diperoleh sampel yang memiliki kualitas seropositivitas atau seronegativitas kuat sehingga walaupun jumlah sampelnya kecil namun tetap akurat.

Penelitian dibagi menjadi beberapa tahapan. Tahap pertama dilakukan pengujian serologis untuk menentukan jenis protein yang paling sesuai untuk ELISA. Tahap ini sekaligus menguji kesesuaian dan performa ELISA BM

yang dikembangkan dengan kit komersial UAL. Tahap kedua (setelah ditetapkan antigen terseleksi pada tahap pertama), pengujian performa ELISA BM dengan menggunakan serum manusia yang telah diketahui seropositivitas dan seronegativitasnya (*true seropositive* dan *true seronegative*). Seropositivitas/seronegativitas ditetapkan sebagaimana dijelaskan sebelumnya. Tahap ketiga, dilakukan uji perbandingan antara ELISA BM yang dikembangkan dengan kit komersial, baik UAL maupun ELISA menggunakan serum yang telah diketahui seropositivitas dan seronegativitasnya maupun yang belum diketahui statusnya.

Uji aglutinasi latek dilakukan dengan menggunakan *Biokit*[®] (Biokit S.A., Spain). Prosedur pengujian dilakukan dengan mengikuti prosedur yang ditetapkan produsennya. Secara umum, sebanyak 50 ul serum diteteskan pada selembar kartu khusus. Selanjutnya diteteskan 50 ul suspensi latek dan digoyang dalam rotator selama 7 – 10 menit. Serum yang positif akan memperlihatkan adanya aglutinasi seperti butiran pasir, sehingga sampel dapat dinyatakan seropositif toksoplasmosis. Adapun jika tidak terjadi aglutinasi maka sampel dinyatakan seronegatif toksoplasmosis. Apabila terjadi keraguan karena sulit ditetapkan statusnya (dubius), maka serum diencerkan 1:5 dengan PBS dan diuji ulang dengan prosedur yang sama.

Pengujian sampel dengan ELISA BM, prinsip dasar pengujian ELISA pada manusia dan hewan adalah sama, hanya berbeda pada konjugat yang digunakannya. Demikian pula antara kit ELISA BM yang sedang dikembangkan

dan kit komersial ELISA. Pengujian serologis dengan ELISA BM didahului dengan melapiskan antigen ST-Ag (10 ul^{-1} dalam $0,005 \text{ M sodium carbonate buffer pH } 9,8$) sebanyak 100 ul/sumuran kedalam mikroplat $96 \text{ sumuran (96 well-flat bottomed Maxisorb microplate ; Nunc, Denmark)}$ dan diinkubasi dalam *refrigerator* selama semalam. Setelah inkubasi, lempeng mikro dicuci dengan dengan $0,01\text{M PBS pH } 7,2$ -Triton X100 ($0,05\%$) sebanyak 4 kali dan PBS sebagai penutup sehingga total pencucian dilakukan 5 kali. Volume pencucian adalah 200 uL/sumuran . Selanjutnya lempeng mikro di blok dengan PBS ($0,01\text{M}$)-BSA $0,5 \%$ (*blocking buffer*) dan di inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Pada tahapan selanjutnya pencucian dilakukan seperti sebelumnya. Setelah pencucian, serum sampel yang akan diuji diencerkan dengan larutan dapar inkubasi (*incubation buffer*) $1:50$ dan dimasukkan pada setiap lubang sebanyak 100 ul serta diinkubasi selama 1 jam pada 37°C . Larutan dapar inkubasi yang digunakan adalah PBS- $0,05\%$ Triton X100 yang mengandung $0,05 \%$ BSA.

Setelah inkubasi sampel, dilakukan pencucian ulang sebagaimana sebelumnya. Selanjutnya ditambahkan konjugat *anti sheep IgG-AP* (Sigma Chem., USA) dengan pengenceran $1:3000$ (dalam larutan dapar inkubasi) serta diinkubasi selama 1 jam pada 37°C . Pada manusia, konjugat yang digunakan adalah *anti human IgG-AP* (Sigma Chem., USA) dengan pengenceran $1:3000$. Pada tahap terakhir, yaitu setelah dilakukan pencucian kembali sebanyak

5 kali, maka ditambahkan substrat *p - nitrophenylphosphate* (Sigma Chem., USA) ke dalam masing-masing lubang dari mikroplat dan kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya setelah inkubasi selesai dapat ditambahkan 2N NaOH untuk menghentikan reaksi dan diukur pada panjang gelombang 405 nm menggunakan Multiskan-EX ELISA Reader (Labsystem, Finland). Sampel dinyatakan seropositif toksoplasmosis apabila nilai kerapatan optik (OD, optical density) yang terbaca lebih besar dari nilai kritis (*cut off*) yaitu OD kontrol negatif $+ 2 \times (\text{SD})$ kontrol negatif. Seropositifitas juga dapat ditentukan berdasarkan nilai indeks positif yang dihitung berdasarkan rumus : “nilai OD sampel / nilai OD kritis”. Nilai indeks > 1 dinyatakan seropositif, sedangkan nilai indeks < 1 maka dinyatakan seronegatif.

Pengujian sampel serum menggunakan kit komersial ELISA *Universal EIA Ab* (Test Line Ltd, Czech) hanya dilakukan untuk sampel serum manusia. Hal ini dikarenakan kit ELISA komersial (ELISA TL) dibuat secara khusus untuk manusia dan tidak dapat dipergunakan untuk pengujian serologis terhadap sampel serum asal hewan. Secara umum, kit terdiri atas mikroplat yang telah dilapisi antigen, kontrol negatif, kontrol *cut off*, kontrol positif, konjugat (*anti human IgG-HRP*), larutan pengencer, konsentrat larutan pencuci, substrat (TMB = $3,3',5,5' - \text{tetramethylbenzidine}$) dan larutan H_2SO_4 . Pada prinsipnya, sampel serum diencerkan $1 : 100$ dengan larutan pengencer dan dimasukkan kedalam lubang mikroplat

sebanyak 100 ul/lubang. Selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, dilakukan 5 kali pencucian dengan lautan pencuci yang sebelumnya telah diencerkan dengan H_2O steril (1 : 19). Selanjutnya dimasukkan 100 ul konjugat/lubang dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Tahap berikutnya kembali dilakukan 5 kali pencucian seperti sebelumnya dan dilanjutkan dengan penambahan 100 ul substrat/lubang dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, 100 ul larutan penghenti yaitu H_2SO_4 /lubang ditambahkan dan diinkubasi kembali selama 30 menit sebelum dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Serum dinyatakan seropositif apabila nilai IP (*index of positivity*) > 1. Persamaan untuk menghitung nilai IP adalah :

$$\text{IP} = \frac{\text{Absorbans dari sampel}}{\text{Absorbans dari cut off}} = \frac{\text{nilai OD sampel}}{\text{nilai OD cut off}}$$

Data yang telah diperoleh kemudian ditabulasikan sebagaimana Tabel 1., dan dianalisis dengan uji *inter reliability agreement* menggunakan *Cohen's Kappa estimator* (κ) dan *Gwet's AC₁ statistic* serta dianalisis kekuatan pengukuran (*power of measurement*). Selanjutnya berdasarkan nilai κ dan AC_1 ditetapkan derajat kesesuaian (*The strength of agreement*) yang diinterpretasi sesuai dengan kriteria yang ditetapkan oleh Altman (1991).

Nilai κ dihitung dengan persamaan berikut (Viera & Garrett 2005 ; Cunningham 2009) : $\kappa = (p_o - p_e)/(1 - p_e)$,

dimana $p_o = (a)+(d)/(i)$,

sedangkan $p_e = [(e)*(g)+(f)*(h)]/(i)^2$

Adapun nilai AC_1 dihitung dengan persamaan berikut (Gwet 2002 ; 2008) :

$$\text{AC}_1 = (p - e\delta / 1 - e\delta),$$

dimana $p = (a)+(d)/(i)$, sedangkan $e\delta = 2 p_1(1 - p_1)$,

$$\text{dimana } p_1 = [(e)+(\delta)/2]/(i)$$

Kriteria derajat kesesuaian yang ditetapkan Altman (1991) adalah :

< 0,2 = *poor*

0,21 – 0,4 = *fair*

0,41 – 0,6 = *moderate*

0,61 – 0,8 = *good*

0,81 – 1 = *very good*.

Adapun kekuatan pengukuran (*power of measurement*) guna menentukan akurasi dari perbandingan dua alat uji serologis tersebut ditetapkan menggunakan rumus yang dideskripsikan oleh Hripcsak & Rothschild (2005) :

$$F_1 = 2 \times \frac{[a/(a+b)] \times [a/(a+c)]}{[a/(a+b)] + [a/(a+c)]}$$

dimana :

$a / (a + b)$ = presisi atau PPV (*positive predictive value*)

$a / (a + c)$ = sensitivitas atau recall

HASIL

Hasil Uji Serologis dengan Uji Aglutinasi Latek

Pengujian serologis dengan uji aglutinasi latek untuk seleksi awal agar diperoleh *predetermined* serum dilakukan dua kali. Pertama, dengan tanpa pengenceran kemudian dilakukan uji ulang dengan pengenceran serum

Tabel 1. Format tabulasi data perbandingan pengujian serologis ELISA dan UAL.

		Uji Pembanding		Jumlah
		Seropositif	Seronegatif	
Uji yang dibandingkan	Seropositif	a	b	g
	Seronegatif	c	d	h
Jumlah		e	f	i

dalam PBS (1:5). Apabila masih terdapat serum yang dubius maka serum tersebut dieliminasi, dengan demikian diharapkan sampel yang terseleksi akan benar-benar seropositif dan seronegatif kuat.

Hasil pengujian ELISA dengan menggunakan protein ST-Ag dan SE-Ag menunjukkan adanya perbedaan akurasi. Apabila dibandingkan dengan UAL maka penggunaan protein ST-Ag lebih akurat dibanding dengan SE-Ag (Tabel 2). Hasil ini mengindikasikan bahwa penggunaan ELISA dengan protein ST-Ag lebih sesuai untuk diagnosis toksoplasmosis menggunakan teknik ELISA dibanding SE-Ag.

Pengujian selanjutnya adalah membandingkan UAL, ELISA BM dan ELISA TL terhadap serum manusia. Pada pengujian menggunakan serum manusia juga menggunakan ELISA TL yang merupakan kit ELISA komersial. Adapun ELISA BM adalah kit ELISA yang sedang dikembangkan dan diteliti. Penambahan ELISA komersial karena pada manusia, perangkat kit komersial berbasis teknologi ELISA sudah tersedia, sedangkan pada sampel hewan tidak tersedia. Adapun UAL yang digunakan pada hewan sesungguhnya adalah produk universal, baik untuk hewan maupun manusia.

Uji Kemampuan Deteksi ELISA BM

Pengujian awal yang dilakukan adalah memastikan bahwa ELISA BM dapat mendeteksi sampel seropositif dan seronegatif toksoplasmosis. Penetapan sampel yang seropositif dan seronegatif toksoplasmosis sesungguhnya (*true seropositive* dan *true seronegative*) dilakukan dengan menseleksi sampel sera dengan dua uji, UAL dan ELISA TL. Apabila terdeteksi positif oleh kedua uji diagnostik tersebut, maka sampel serum manusia tersebut dinyatakan seropositif (*true seropositive*) toksoplasmosis. Sebaliknya, apabila suatu sampel serum terdeteksi negatif dengan dua uji tersebut (UAL dan ELISA TL) maka sampel dinyatakan seronegatif (*true seronegative*) toksoplasmosis. Adapun jika hasil uji kedua kit diagnostik tersebut tidak bersesuaian maka sampel tersebut dieliminasi untuk pengujian awal.

Hasil pengujian awal terhadap sampel seropositif dan seronegatif toksoplasmosis disajikan dalam Tabel 3. Berdasarkan pengujian diketahui bahwa ELISA BM yang dikembangkan dengan menggunakan protein ST-Ag memiliki performa yang sangat baik dengan akurasi 98,25 – 98,73%. Dengan demikian pengujian selanjutnya adalah

membandingkannya dengan UAL dan ELISA TL menggunakan sampel seropositif, seronegatif dan sampel yang tidak diketahui statusnya dengan tepat (*unknown sera*).

Perbandingan Hasil Uji ELISA dengan Uji Aglutinasi Latek. Perbandingan antara ELISA dengan UAL ternyata menunjukkan hasil yang berbeda tergantung dari jenis kit yang digunakan. Kit komersial ELISA menunjukkan derajat kesesuaian yang baik (*good agreement*) dengan UAL (Tabel 4). Adapun kit ELISA BM yang dikembangkan ternyata memiliki derajat kesesuaian yang sangat baik (*very good agreement*) dengan UAL (Tabel 5). Apabila antara kit ELISA BM dibandingkan dengan ELISA komersial diperoleh data derajat kesesuaian hasil uji yang baik (*good agreement*) sebagaimana tercantum dalam Tabel 6.

PEMBAHASAN

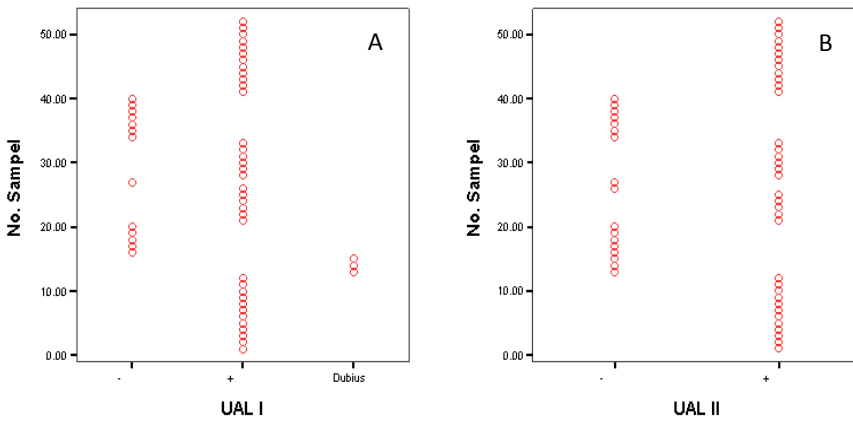
Pengenceran serum pada UAL dimaksudkan untuk mengetahui apakah suatu sampel yang dubius atau positif tersebut tetap bereaksi positif. Apabila suatu sampel yang positif pada pengujian awal, kemudian setelah diencerkan dan diuji ulang menjadi negatif, maka kemungkinan sampel tersebut memiliki titer antibodi yang rendah sehingga

seropositif toksoplasmosisnya lemah. Namun produsen kit tersebut umumnya akan menyatakan bahwa jika terdapat fenomena demikian maka dinyatakan positif palsu dan dikategorikan pada sampel yang seronegatif toksoplasmosis.

Setelah seropositifitas dan seronegatifitas toksoplasmosis kuat pada sampel serum domba dapat ditentukan dengan UAL, dilanjutkan dengan pengujian ELISA BM untuk mengetahui performanya. Pada uji serologis dengan ELISA BM digunakan dua jenis protein yaitu ST-Ag dan SE-Ag. Protein ST-Ag memiliki performa yang lebih tinggi di berbagai kategori dibanding SE-Ag dalam diagnosis serologis pada serum domba (Tabel 1). ST-Ag diketahui merupakan protein yang juga digunakan dalam kit UAL maupun kit ELISA pada umumnya. Oleh karena itu, baik UAL maupun ELISA BM sama-sama menggunakan ST-Ag sebagai antigen sehingga kesesuaian hasil uji yang diperoleh juga sangat tinggi ($\kappa = 0,9569$; $AC_1 = 0,9653$). Namun demikian, kelemahan ST-Ag adalah harus menghancurkan takizoit sehingga untuk isolasi senantiasa memperbanyak takizoit kembali. Adapun protein SE-Ag dalam produksinya tidak perlu mematikan dan menghancurkan takizoit, sehingga dapat dipergunakan secara berulang untuk isolasi proteinnya. Akurasi uji ELISA BM menggunakan

Tabel 2. Performa relatif kit diagnostik serologis toksoplasmosis dengan teknik ELISA pada inkubasi 30 menit paska penambahan substrat.

Fraksi Protein	Sensitivitas	Spesifisitas	Akurasi	F_1	κ	AC_1	Concordance
ST-Ag	97,14%	100%	98,08%	0,9855	0,9569	0,9653	98,08%
SE-Ag	85,71%	94,12%	88,46%	0,9091	0,7528	0,7848	88,46%



Gambar 1. Distribusi seropositif dan seronegatif serum domba yang diuji dengan Uji Aglutinasi Latex (Biokit[®]) A = Pengujian dengan UAL yang pertama (50 mL serum + 50 mL suspensi Latex) B = Pengujian dengan UAL yang ke dua setelah dilakukan pengenceran serum (1:5).

ST-Ag pada pengujian serum domba sebesar 98,08%. Nilai akurasi tersebut sebanding dengan nilai F_1 yaitu 0,9855, dengan demikian menunjukkan akurasi uji yang tinggi.

Oleh karena itu, protein ST-Ag menjadi protein terpilih yang akan dipergunakan untuk pengujian selanjutnya dengan ELISA BM pada sampel serum manusia yang telah terseleksi (*true seropositive* dan *true seronegative*). Hasil pengujian ELISA BM menggunakan sampel terseleksi menunjukkan akurasi 98,25% dengan nilai F_1 sebesar 0,9873 (Tabel 3). Hasil ini bersesuaian pula dengan pengujian menggunakan sampel serum dari domba yang seluruhnya menunjukkan akurasi diatas 98%. Adapun derajat kesesuaian hasil pengujian dengan ELISA BM dikategorikan sangat baik (*very good agreement*) dengan nilai $\kappa = 0,9588$ dan

$$AC_1 = 0,9695 \text{ (Tabel 3).}$$

Perbandingan selanjutnya adalah antara kit komersial ELISA TL (Universal EIA Ab ; Test Line Ltd, Czech) dengan UAL menggunakan serum sampel manusia baik terseleksi maupun yang tidak diketahui statusnya (*unknown sera*). Perbandingan tersebut untuk mengetahui seberapa besar derajat kesesuaian antar dua kit serologis komersial yang digunakan. Hasil pengujian (Tabel 4) memperlihatkan bahwa derajat kesesuaian antara kit ELISA TL dan UAL pada pengujian serum manusia menunjukkan kesesuaian yang baik (*good agreement*) dengan nilai $\kappa = 0,6389$ dan $AC_1 = 0,7097$. Sebaliknya kit ELISA BM yang telah dikembangkan dalam penelitian ini memiliki kesesuaian yang sangat baik (*very good agreement*) dengan nilai $\kappa = 0,8432$ dan $AC_1 = 0,8616$.

(Tabel 5). Adapun akurasi kit ELISA TL secara relatif sebesar 83,32 – 87,91% (Tabel 4), sedangkan ELISA BM memiliki akurasi 92,65 – 94,12% (Tabel 5). Hasil tersebut menunjukkan bahwa derajat kesesuaian ELISA BM setingkat lebih baik dibanding kit komersial ELISA TL. Demikian pula halnya dengan akurasi uji juga lebih baik dibanding kit ELISA TL.

Fakta tersebut memperlihatkan bahwa sekalipun jenis antigen yang digunakan adalah sama (ST-Ag) tidak selalu menjamin bahwa hasil pengujian akan senantiasa memiliki derajat kesesuaian yang sama. Hal ini disebabkan karena faktor yang mempengaruhi akurasi suatu teknik uji serologis tidak hanya ditentukan jenis

antigen. Beberapa faktor tersebut diantaranya adalah, jenis atau tipe konjugat yang digunakan, jenis teknik serologis yang diaplikasikan, perangkat yang dipergunakan ataupun prosedurnya. Perbedaan dasar antara ELISA BM yang dikembangkan dengan kit komersial ELISA TL adalah pada penggunaan konjugat. Pada ELISA TL menggunakan konjugat berlabel enzim HRP (*horse radish peroxidase*) sedang ELISA BM menggunakan konjugat berlabel enzim AP (*alkaline phosphatase*). Enzim HRP akan meningkat aktivitasnya dengan adanya non ionik deterjen, sedangkan enzim AP tidak terpengaruh (Crowther 2009). Sifat tersebut beresiko terjadinya reaksi latar non spesifik (*non specific backgroud reaction*) yang akan

Tabel 3. Perbandingan hasil uji serologis toksoplasmosis dengan ELISA pada serum Manusia (Sampel terseleksi untuk penetapan *true seropositive & seronegative*).

UAL + ELISA TL				
		Seropositif	Seronegatif	Jumlah
ELISA BM	Seropositif	39	0	39
	Seronegatif	1	17	18
Jumlah		40	17	57

Keterangan : $\kappa = 0,9588$, $AC_1 = 0,9695$, $F_1 = 0,9873$, Sensitivitas (*sensitivity*) = 97,5% Spesifisitas (*specificity*) = 100%, Akurasi (*accuracy*) : = 98,25%.

Tabel 4. Perbandingan hasil uji serologi toksoplasmosis antara UAL dengan kit ELISA komersial (ELISA TL) pada sampel serum manusia.

UAL + ELISA TL				
		Seropositif	Seronegatif	Jumlah
ELISA BM	Seropositif	39	0	39
	Seronegatif	1	17	18
Jumlah		40	17	57

Keterangan : $\kappa = 0,6389$, $AC_1 = 0,7097$, $F_1 = 0,8791$, Sensitivitas (*sensitivity*) = 95,24 Spesifisitas (*specificity*) = 65,38%, Akurasi (*accuracy*) = 83,82%

meningkat pada frekuensi pencucian yang sama. Oleh karena itu secara keseluruhan diduga bahwa adanya sifat-sifat enzim HRP akan memiliki resiko terjadinya peningkatan intensitas warna akibat *non specific backgroud reaction* sehingga akan menyebabkan positif palsu. Hal demikian terlihat pada pengujian ini, dimana sampel seronegatif pada UAL yang terdeteksi seropositif (positif palsu) oleh ELISA BM adalah 3 sampel sedangkan pada ELISA TL terdapat 9 sampel (lihat Tabel 4 dan 5).

Walaupun demikian perlu juga diketahui bahwa perbandingan uji serologis ELISA dengan UAL memiliki derajat kesesuaian yang beragam. Hal ini juga dipengaruhi oleh teknologi yang dikembangkan produsennya. Pada

penelitian ini kesesuaian antara UAL (Biokit) dengan ELISA TL dan BM masing - masing adalah 83,82% dan 92,65% dengan derajat kesesuaian *good* dan *very good agreement* ($\kappa = 0,639$ dan $0,843$). Sebaliknya, perbandingan antara UAL (Pastorex) dengan ELISA dilaporkan memiliki kesesuaian sebesar 75,47% dengan derajat kesesuaian *moderately agreement* (Subekti & Kusumaningtyas 2011).

Beberapa perbandingan lain antara UAL dengan ELISA juga pernah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Mazumder *et al.* (1988) telah mengembangkan UAL dan ELISA untuk diagnosis toksoplasmosis. Mereka melaporkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas UAL cukup baik dibanding

Tabel 5. Perbandingan hasil uji serologi toksoplasmosis antara UAL dengan kit ELISA yang dikembangkan (ELISA BM) pada sampel serum manusia.

		UAL		Jumlah
		Seropositif	Seronegatif	
ELISA BM	Seropositif	40	3	43
	Seronegatif	2	23	25
Jumlah		42	26	68

Keterangan : $\kappa = 0,8432$, $AC_1 = 0,8616$, $F_1 = 0,9412$, Sensitivitas (*sensitivity*) = 95,24 Spesifisitas (*specificity*) = 88,46%, Akurasi (*accuracy*) = 92,65%.

Tabel 6. Perbandingan uji serologis toksoplasmosis antara kit ELISA komersial (ELISA TL) dengan Kit ELISA BM pada sampel serum manusia.

		ELISA TL		Jumlah
		seropositif	Seronegatif	
ELISA BM	Seropositif	42 ^(a)	1 ^(b)	43 ^(g)
	Seronegatif	7 ^(c)	18 ^(d)	25 ^(h)
Jumlah		49 ^(e)	19 ^(f)	68 ⁽ⁱ⁾

Keterangan : $\kappa = 0,7336$, $AC_1 = 0,7908$, $F_1 = 0,9130$, Sensitivitas (*sensitivity*) = 85,71% Spesifisitas (*specificity*) = 94,74%, Akurasi (*accuracy*) = 88,24%.

ELISA (86% dan 100%). Namun yang perlu diperhatikan adalah bahwa antigen yang digunakan diantara kedua teknik tersebut berbeda, terutama ELISA yang diaplikasikan karena menggunakan takzoid utuh sehingga dapat mengurangi akurasi. Hasil yang berbeda dilaporkan Ryu *et al.* (1996) menyatakan bahwa UAL memiliki kesesuaian yang rendah dengan ELISA ($\kappa = 0,109$) untuk diagnosis toksoplasmosis pada 899 sampel sera dari wanita hamil. Kistiah *et al.* (2011) melaporkan kesesuaian antara UAL (Pastorex) dengan ELISA untuk deteksi toksoplasmosis pada manusia cukup baik (*good agreement*) berdasarkan nilai $\kappa = 0,63$. Berdasarkan data Kistiah *et al.* (2011) tersebut dapat dihitung nilai F_1 nya yaitu 0,659. Nilai F_1 tersebut lebih rendah dibanding yang diperoleh dalam penelitian ini, sehingga secara keseluruhan kesimpulan penelitian Kistiah *et al.* menunjukkan bahwa derajat kesesuaian antara UAL dengan ELISA untuk deteksi toksoplasmosis adalah *moderately agreement*.

Pada perbandingan pengujian serologis pada sampel serum manusia menggunakan ELISA BM dengan ELISA TL diperoleh derajat kesesuaian yang baik dengan nilai $\kappa = 0,7336$ dan $AC_1 = 0,7908$. Kategori derajat kesesuaian antara ELISA BM – ELISA TL sama dengan ELISA TL – UAL. Hal ini memperlihatkan bahwa berkurangnya derajat kesesuaian tersebut terkait dengan performa ELISA TL. Namun apabila dilihat nilai skor hasil analisis *inter reliability agreement* dari kesesuaian antara ELISA BM – ELISA TL ($\kappa = 0,7336$ dan $AC_1 = 0,7908$) lebih baik

dibanding kesesuaian antara ELISA TL – UAL ($\kappa = 0,6389$ dan $AC_1 = 0,7097$). Dengan demikian, kesamaan teknik uji serologis diantara keduanya (ELISA BM dan ELISA TL) diperkirakan memiliki peran dalam memperbaiki kesamaan hasil uji. Derajat kesesuaian yang tidak terlalu baik antara ELISA BM – ELISA TL dibandingkan dengan ELISA BM – UAL diduga terkait dengan perbedaan jenis konjugat yang digunakan, perangkat dan prosedur yang dikembangkan serta standar serum kontrol yang digunakan. Pada ELISA BM menggunakan konjugat dengan enzim *alkaline phosphatase* (AP) yang lebih baik dibanding *horse radish peroxidase* (HRP) dalam hal reaksi latar non spesifik (*non specific background*), namun lamban dalam berubah warna. Disisi lain kit ELISA TL memiliki serum kontrol negatif dan prosedur yang berbeda dengan ELISA BM yang dikembangkan.

Secara umum, ELISA lebih sensitif dibanding UAL karena batas kemampuan deteksinya lebih baik terutama pada sampel serum yang seropositif toksoplasmosis lemah akibat rendahnya titer antibodi. Disisi lain, ELISA juga memiliki keunggulan dalam hal kemampuan untuk pengujian aviditas (terutama untuk diagnosis klinik pada manusia) sehingga dapat ditentukan interval waktu terjadinya infeksi dan kekuatan antibodi yang terbentuk (Remington *et al.* 2004 ; Singh 2003). Demikian pula halnya kemampuan deskriminasi antara IgM, IgG ataupun IgA juga dapat ditentukan dengan mudah menggunakan ELISA, sedangkan UAL tidak mampu melakukannya. Namun

sayangnya, ELISA tidak dapat diaplikasikan dengan mudah dilapangan dan membutuhkan waktu pengujian yang jauh lebih lama (sekitar 4 jam dengan ELISA dan 7 – 10 menit dengan UAL).

KESIMPULAN

ELISA BM yang telah dikembangkan memiliki akurasi yang konsisten pada pengujian dengan menggunakan serum domba maupun manusia. Pada perbandingan dengan UAL, ELISA BM memiliki kesesuaian uji yang lebih baik dibanding ELISA TL. Perbedaan performa antara ELISA BM dengan ELISA TL diduga terkait dengan jenis konjugat, perangkat dan prosedur uji yang diaplikasikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada OKTROI ROOSSENSO BEAREU yang telah membiayai penelitian (DTS) dan Laboratorium Klinik Prodia, Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

Altman, DG. 1991. *Practical statistics for medical research*. Chapman and Hall. London.

Crowther, JR. 2009. *The ELISA Guide Book*. Humana Press. New York.

Cunningham, M. 2009. *More than Just the Kappa Coefficient: A Program to Fully Characterize Inter-Rater Reliability between Two Raters*. SAS Global Forum

2009, Statistics and Data Analysis. Paper 242-200, pp. 1-7.

Figueiredo JF., DAO. Silva, DD. Cabral, & JR. Mineo. 2001. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Goats by the Indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Tests in the Region of Uberlândia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 96(5): 687-692.

Gwet, KL. 2002. *Kappa Statistic is not Satisfactory for Assessing the Extent of Agreement Between Raters*. Statistical Methods For Inter-Rater Reliability Assessment.

Gwet, KL. 2008. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *British J. Math. Stat. Psych.* (61), 29–48.

Hripcsak, G. & AS. Rothschild. 2005. Agreement, the F-Measure, and Reliability in Information Retrieval. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 12(3):296–298.

Jin, S., ZY. Chang, Xu Ming, CL. Min, H Wei, LY. Sheng, & G X. Hong. 2005. Fast Dipstick Dye Immunoassay for Detection of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies of Human Toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(1):198-201.

Kistiah, K., J. Frean, A. Barragan, J. Winiecka-Krusnell & A. Karsaetdt. 2011. An Evaluation of Pastorex Toxo Latex Agglutination Test as a Screening Tool for *Toxoplasma gondii* Antibody Detection in a South African

- Setting. *Ann. Australas. Coll. Trop. Med.* 12(1): 25–27 .
- Ma'roef, S. & S. Soemantri. 2003. Toxoplasmosis in Indonesian Pregnant Woman (Further Study Following Family Health Surveillance on 1995). *Cermin Dunia Kedokteran*. 139: 41–45.
- Mazumder, P., HYK. Chuang, MW. Wentz, & DL. Wiedbrauk. 1988. Latex Agglutination Test for Detection of Antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 26(11): 2444–2446.
- Remington, JS., P. Thulliez & JG. Montoya. 2004. Minireview : Recent Developments for Diagnosis Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 42 (3): 941 – 945.
- Ryu, JS., DK. Min, MH. Ahn, HG. Choi, SC. Rho, YJ. Shin, B. Choi & HD. Joo. 1996. Toxoplasma antibody titers by ELISA and indirect latex agglutination test in pregnant women. *Korean J. Parasitol.* 34(4): 233–238.
- Singh, S. 2003. Mother to Child Transmissin and Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection During Pregnancy. *Indian J. Medic. Microbiol.* 21 (2): 69 – 76
- Subekti, DT., WT. Artama & T. Iskandar. 2005. Perkembangan Kasus dan Teknologi Diagnosis Toksoplasmosis. *Proseding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*. Bogor, 15 September 2005. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan – Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian. Bogor. 253 – 264.
- Subekti, DT. & E. Kusumaningtyas. 2011. Perbandingan Uji Serologi Toksoplasmosis dengan Uji Cepat Imunostik, ELISA dan Aglutinasi Lateks. *JITV* 16 (3) : 163 – 241.
- Viera, AJ.& JM. Garrett. 2005. Understanding Interobserver Agreement : The Kappa Statistic. *Fam. Med.* 37(5):360-363.

Memasukkan: Januari 2012

Diterima: Juni 2012