

Penggunaan Immunostik sebagai Uji Serologi untuk Deteksi *Brucella abortus* pada Sapi

(APPLICATION IMMUNOSTICK ASSAY
FOR SEROLOGICAL TEST BRUCELLA ABORTUS IN BOVINE)

Dhevie Kenny Astarina^{1,2*}, Eko Sugeng Pribadi^{2,3},
Fachriyan Hasmi Pasaribu^{2,3}

¹Badan Karantina Pertanian, Balai Besar Karantina Pertanian Tanjung Priok
Jl. Enggano No.17, Tanjung Priok, Kota Jakarta
Utara, Daerah Khusus Ibukota Jakarta, Indonesia 14310

²Program Studi Mikrobiologi Medik,
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

³Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

*Email: dhevieastarina.dvm@gmail.com

ABSTRAK

Uji serologis merupakan salah satu teknik diagnosis untuk mendeteksi kasus brucellosis. Beberapa teknik diagnosis secara serologik yang dapat dipergunakan untuk mendeteksi brucellosis seperti *Rose Bengal Test* (RBT), *Complement Fixation Test* (CFT) dan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Immunostik memiliki akurasi yang setara dengan ELISA dan mudah diterapkan di lapangan sehingga sangat mungkin untuk diaplikasikan sebagai uji cepat untuk mendeteksi brucellosis. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperkirakan sensitivitas dan spesifitas immunostik yang digunakan untuk deteksi antibodi *Brucella abortus* dengan menggunakan antigen komersil *B. abortus Strain 19* (S19) dan *B. abortus Strain 99* (S99) kemudian dibandingkan dengan ELISA. Pengujian dilakukan dalam dua tahap, yaitu (i) kemampuan immunostik untuk deteksi antibodi pada kelompok serum seropositif dan seronegatif, dan (ii) hasil immunostik dibandingkan dengan ELISA menggunakan kelompok serum yang diketahui dan tidak diketahui statusnya. Sebanyak 250 serum diperiksa untuk mendapatkan contoh seropositif dan seronegatif dan hasilnya menunjukkan bahwa immunostik dapat mendeteksi antibodi *B. abortus* pada serum sapi dengan sensitivitas 100%. Spesifitas immunostik adalah 45,45% untuk antigen *B. abortus* S99 (1); 78,79% untuk *B. abortus* S99 (2) antigen; dan 51,52% untuk antigen *B. abortus* S19. Bila uji dibandingkan dengan ELISA sensitivitas 82,86% dan spesifitas 52,31% untuk antigen *B. abortus* S99 (1); 93,54% dan 79,71% untuk antigen *B. abortus* S99 (2) dan 82,86% dan 58,46% untuk antigen *B. abortus* S19. Immunostik dapat digunakan untuk mendeteksi brucellosis dan memiliki akurasi setara dengan ELISA.

Kata-kata kunci: immunostik; *Brucella abortus*; ternak; uji serologik

ABSTRACT

Serological test is one of diagnostic method to detect pathogenicity brucella. Several methods are being improving such as *Rose Bengal Test* (RBT), *Complement Fixation Test* (CFT) dan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Immunostick has an accuracy equivalent to ELISA and is easy to apply in the field so it is possible to be applied as a rapid test for brucellosis detection. The study aim was to know sensitivity and specificity of immunostick that were used to detect antibody *Brucella abortus* using commercial antigens of *B. abortus* Strain 19 (S19) and *B. abortus* Strain 99 (S99). The test have compared with ELISA. The tests were conducted in two stages, namely (i) immunostick ability to detect antibodies in seropositive and seronegative serum, and (ii) the immunostick result were compared with ELISA result in serum grup that were be know and unknown status. A total of 250 serums were examined and result indicated that immunostick can be detect *B. abortus* antibodies in cattle serum with sensitivity 100%. Immunostick specifity were 45,45% for *B. abortus* S99(1) antigen; 78,79% for *B. abortus* S99(2) antigen and 51,52% for *B. abortus* S19 antigen. When the test compared with ELISA, the sensitivity 82,86% and the spesifity were 52,31% for *B. abortus* S99(1) antigen; 93,54% and 79,71 for *B. abortus* S99(2) antigen and 82,86% and 58,46% for *B. abortus* S19 antigen.

Keywords: immunostick assay; *Brucella abortus*; bovine; serologic test

PENDAHULUAN

Metode baku (*gold standard*) untuk mendiagnosis brucellosis adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penyebab. Namun, cara ini membutuhkan sarana keamanan laboratorium yang tinggi, yaitu dengan *biosecurity level* (BSL) 3, tenaga terampil, waktu pelaksanaan yang lama dan melakukan tata kerja yang berbahaya. Oleh karena itu diagnosis laboratorium yang dilakukan pada umumnya menggunakan metode pengujian serologis atau molekuler dari serum atau cairan tubuh. Beberapa metode pengujian serologis tersebut di antaranya adalah *Rose Bengal Test* (RBT), *Complement Fixation Test* (CFT) dan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Poester, 2010).

Beberapa metode diagnosis serologis telah dikembangkan untuk mendiagnosis beberapa penyakit. Pengembangan uji cepat dengan tingkat ketelitian yang setara dengan ELISA dapat dimungkinkan supaya memberikan kemudahan penerapannya sesuai kebutuhan di lapangan. Imunostik merupakan jenis uji serologis multi sasaran, memiliki kesamaan prinsip dengan *indirect* ELISA (*i-ELISA*), memiliki kesesuaian (*true agreement*) berkisar antara 95,88% sampai 100% dan akurasi setara dengan ELISA, mudah dilaksanakan di lapangan atau di laboratorium tanpa memerlukan peralatan khusus dan pelaksana yang berpengalaman (Subekti dan Kusumaningtyas, 2011).

Aplikasi dan penelitian mengenai imunostik antara lain digunakan untuk mendiagnosis schistosomiasis (Rossi *et al.*, 1991; Al-Sherbiny *et al.*, 1999); imunostik untuk mendiagnosis toksoplasmosis (Jin *et al.*, 2005; Subekti dan Kusumaningtyas, 2011); imunostik untuk mendeteksi daging ikan kerapu (*grouper*) yang sering dipalsukan karena bernilai ekonomis tinggi di pasaran (Asensio dan Samaniego, 2008), mendeteksi antibodi anti *Aeromonas hydrophila* secara cepat pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Mufidah *et al.*, 2015) dan mendeteksi IgM spesifik *Brucella* pada kasus brucellosis pada manusia (Clavijo *et al.*, 2003).

Deteksi brucellosis di Indonesia saat ini masih bergantung pada hasil uji RBT dan CFT. Adanya keterbatasan kemampuan masing-masing metode, lamanya waktu untuk melakukan konfirmasi hasil uji RBT, dan perbedaan kemampuan dan sumber daya antar laboratorium diagnostik veteriner di Indonesia

mebutuhkan pengembangan metode pengujian yang dapat memberikan kemudahan di lapangan. Imunostik sebagai uji serologik yang memiliki tingkat kemudahan dan akurasi yang setara dengan ELISA dapat digunakan untuk uji serologis cepat guna mendeteksi brucellosis di lapangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifitas uji menggunakan imunostik untuk mendeteksi *B. abortus* pada sapi menggunakan antigen komersil sel utuh *B. abortus* Strain 19 (S19) dan *B. abortus* Strain 99 (S99).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada periode bulan Agustus 2016 sampai dengan Februari 2017 di Laboratorium Karantina Hewan, Balai Besar Karantina Pertanian Tanjung Priok (BBKP Tanjung Priok) Jakarta dan Laboratorium Bakteriologi, Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) Bogor.

Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan arsip sampel hasil kegiatan lalu lintas atau *monitoring* di Balai Besar Karantina Pertanian Tanjung Priok, Balai Besar Karantina Pertanian Surabaya, Balai Karantina Pertanian Kelas I Kupang, Stasiun Karantina Pertanian Kelas I Pare-Pare, dan Stasiun Karantina Pertanian Kelas II Mamuju. Adapun cara pengambilan sampel menggunakan kajian *Detect of Diseases* dan telah diperiksa menggunakan metode RBT. Serum positif dan negatif hasil uji RBT diambil masing-masing 50 sampel mewakili tiap-tiap lokasi. Serum kontrol pada penelitian ini menggunakan *International B. abortus Standard Serum* (IBASS) dari Laboratorium Balai Besar Veteriner Maros dan serum kontrol dari Balai Besar Penelitian Veteriner (Bblitvet), Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma), *Innovative Diagnostic* (IDvet) dan *IDEXX BioResearch* (IDEXX).

Total sampel yang dipergunakan untuk mendapatkan kelompok seropositif dan kelompok seronegatif sebesar 250 sampel. Serum dinyatakan seropositif apabila positif menggunakan metode RBT, CFT dan *i-ELISA*, demikian sebaliknya. Jika salah satu uji menyatakan hasil yang berbeda, maka serum dikelompokkan pada *unknown* sera. Validasi imunostik dilakukan menggunakan 100 sampel terdiri dari 34 seropositif dan 64

seronegatif. Validasi dilakukan menggunakan beberapa uji yaitu RBT, CFT, ELISA, dan Imunostik. Perbandingan uji dilakukan dengan membandingkan hasil ELISA dan imunostik menggunakan 100 sampel terdiri dari 25 seropositif, 60 seronegatif dan 15 *unknown* sera.

Penyiapan Imunostik

Antigen yang digunakan merupakan antigen RBT *B. abortus* milik Pusvetma (*B. abortus* S19), Bbalitvet (*B. abortus* S99 (1)) dan IDEXX (*B. abortus* S99(2)). Konsentrasi antigen dari masing-masing kemudian ditetapkan dengan metode *Bradford* (Bradford, 1976) dengan sedikit perubahan. Pengukuran konsentrasi antigen secara ringkas dimulai dengan pembuatan protein baku. Protein baku dibuat menggunakan BSA (Sigma[®], USA) dengan konsentrasi 0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50 mg/mL. Sebanyak 10 µL dari masing-masing antigen dan protein baku dilarutkan ke dalam 190 µL larutan *Biorad Protein Assay* (Biorad, USA). Setelah dihomogenkan, sebanyak 80 µL dari setiap larutan protein standar dan protein antigen dimasukkan ke cawan mikro dan dibaca menggunakan pembaca ELISA (*Multiscan EX*, Thermo Scientific) dengan panjang gelombang (λ) 600 nm. Nilai absorbansi diubah menjadi konsentrasi protein menggunakan program *ProQuant Estimation of Protein Concentration*.

Pembuatan perangkat imunostik dilakukan mengikuti alur menurut Subekti dan Kusumaningtyas (2011). Sebanyak lima mikroliter antigen (10 µg/mL) dilapiskan ke permukaan imunostik (Nunc, Thermo Fisher) kemudian imunostik diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Imunostik dicuci dengan air suling, permukaan imunostik direndam dalam larutan PBS (Sigma[®], USA) yang mengandung 0,05% Tween 20 (Sigma[®], USA) dan BSA 0,5 g. (Sigma[®], USA). Imunostik diinkubasi kembali pada suhu 4°C selama 24 jam. Imunostik dicuci kembali dengan air suling, dikeringkan dan disimpan dalam lemari pendingin hingga digunakan untuk pengujian.

Uji Imunostik

Deteksi antibodi terhadap sampel sapi lapang dilakukan dengan beberapa uji yaitu RBT, CFT, ELISA, dan Imunostik. Pengujian menggunakan imunostik dilakukan mengikuti alur menurut Subekti dan Kusumaningtyas (2011). Sampel diencerkan dalam perbandingan 1:100 dalam PBS (Sigma[®], USA) pH 7,2 yang

mengandung 0,05% Tween 20 dan dihomogenkan kemudian, diambil sebanyak 800 µL dituangkan ke dalam tabung. Imunostik yang telah siap pakai direndam ke dalam tabung dan diinkubasi pada suhu ± 27°C selama 10 menit. Imunostik dikeluarkan dari dalam tabung dan dicuci dengan air suling. Imunostik direndam dalam tabung yang berisi konjugat *antibovine* IgG-HRP (1:3000) (Sigma[®], USA) dan diinkubasi pada suhu ±27°C selama 10 menit. Setelah perendaman di dalam konjugat, imunostik kembali dicuci dengan air suling. Terakhir, imunostik direndam ke dalam tabung berisi substrat *O*-Dianisidine (ODN) (Sigma[®], USA) selama tiga menit. Imunostik dicuci dengan air suling dilihat secara visual. Apabila terbentuk bulatan berwarna jingga atau oranye di permukaan imunostik pada lokasi pelapisan antigen, maka sampel tersebut dinyatakan sebagai seropositif terpapar *B. abortus*.

Analisis Data

Hasil penelitian ditampilkan secara deskriptif. Sensitivitas dan spesifitas uji dilakukan menggunakan tabel 2x2, sedangkan tingkat kesesuaian antara dua uji dilakukan menggunakan *Cohen's Kappa*. Adapun akurasi pengujian dievaluasi dengan *The Curve Diagnostic Accuracy* (AUC) (Simundic, 2009; Dohoo *et al.*, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kelompok Seropositif dan Seronegatif

Hasil pengujian menggunakan metode RBT, CFT, dan ELISA pada 250 sampel diperoleh kelompok seropositif 22,98% (54/250) sampel, kelompok seronegatif 77,02% (181/250) sampel, dan *unknown* sera 6% (15/250) sampel (Tabel 1).

Hasil pengujian menggunakan tiga teknik pengujian yaitu RBT, CFT dan ELISA (Tabel 5) diperoleh hasil positif lebih sedikit dibandingkan dengan menggunakan satu atau dua teknik pengujian. Hasil uji tapis tidak berbeda nyata jika menggunakan salah satu teknik yaitu RBT atau ELISA. Tetapi, hasil uji berbeda nyata jika menggunakan dua teknik pengujian, yaitu RBT dan CFT atau ELISA dan CFT. Perbedaan hasil pengujian disebabkan karena perbedaan prinsip dan tujuan pengujian, sehingga serum dinyatakan positif menggunakan RBT belum

Tabel 1. Hasil pengujian menggunakan RBT, CFT, dan ELISA

Teknik uji	Hasil (n= 250)				250
	Positif	%	Negatif	%	
RBT	64	25.6	186	74.4	250
CFT	58	23.2	192	76.8	250
ELISA	63	25.2	187	74.8	250
RBT & CFT	57	23.95	181	76.05	250
RBT & ELISA	57	23.95	181	76.05	250
RBT & CFT & ELISA	54	22.78	183	77.21	250

Keterangan: RBT= *Rose Bengal Test*; CFT= *Complement Fixation Test*; ELISA= *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

tentu akan dinyatakan positif menggunakan CFT atau ELISA, demikian sebaliknya. OIE (2016) menyatakan bahwa tidak ada satu jenis uji serologik yang dapat digunakan sebagai dasar mendiagnosis brucellosis. Semua teknik uji memiliki keterbatasan apabila digunakan sebagai uji tapis (*screening test*) pada setiap individu hewan.

Pemeriksaan serologik terhadap brucellosis secara konvensional dapat dilakukan menggunakan teknik RBT, CFT, *Fluorescence Polarisation Assay (FPA)*, dan ELISA. Teknik ELISA dan FPA dianggap sebagai teknik uji yang lebih baik dibandingkan dengan CFT karena kedua teknik ini lebih mudah dilakukan dan stabil. Lembaga OIE menyarankan diagnosis terhadap *Brucella* spp. menggunakan beberapa teknik (*complementary test*) untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifitas hasil pengujian saat mendeteksi *B. abortus* secara serologik. Hasil dari masing-masing teknik kemudian dilakukan analisis menyeluruh untuk menyimpulkan hasil diagnosis terhadap brucellosis (OIE, 2016).

Teknik RBT memiliki beberapa kelemahan, yaitu memungkinkan terjadinya reaksi silang dengan antibodi yang dirangsang oleh beberapa jenis bakteri lain, seperti *Yersinia*, *Bordetella*, *Salmonella* atau *Pasteurella* sehingga terjadi reaksi positif palsu. Positif palsu dapat terjadi karena antigen menetap pasca vaksinasi pada sapi dewasa. Negatif palsu dapat terjadi karena terbentuknya IgG₁. Komponen IgG₁ merupakan aglutinator yang kurang baik karena menghasilkan fenomena *prozone*, yaitu keadaan yang disebabkan oleh tingginya kadar antibodi yang tinggi melapisi partikel antigen sehingga mencegah aglutinasi. Teknik CFT merupakan salah satu teknik uji yang dapat dipergunakan

untuk uji peneguhan hasil RBT. Namun, pada uji ini sering terjadi kegagalan uji karena sifat komplemen yang tidak stabil dapat merusak sel darah merah dan mengakibatkan serum mengalami hemolisis. Teknik *i*-ELISA, yang menggunakan antigen utuh, memiliki sensitivitas lebih baik dibanding RBT dan CFT (OIE, 2016).

Optimasi Imunostik

Hasil pengukuran konsentrasi sediaan antigen sel utuh *B. abortus* ini menjadi dasar untuk menentukan jumlah antigen yang dilapiskan pada permukaan imunostik. Data optimasi perangkat imunostik didapatkan pada pengenceran antigen 10 mg/mL, pengenceran serum sapi 1:100, pengenceran IgG-HRP *anti bovine* 1:3000 dan waktu untuk menghentikan reaksi antara substansi dan enzim menjadi tiga menit. Optimasi perangkat imunostik dilakukan dengan menggunakan lima serum standar positif dan empat serum standar negatif yang berasal dari BBVet Maros (IBASS), Bblitvet, Pusvetma, IDvet dan IDEXX. Hasil optimasi perangkat imunostik menunjukkan kemampuan deteksi seronegatif 100% dan seropositif 100% sebagaimana disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1.

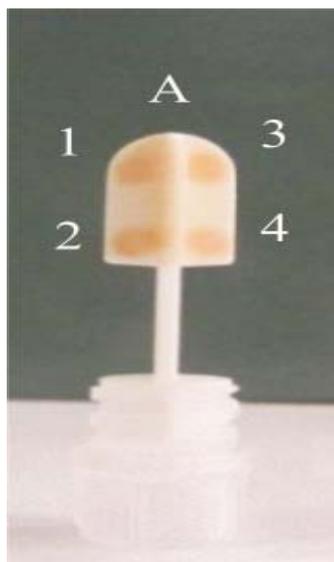
Validasi Imunostik

Sebelum dilakukan perbandingan uji, perangkat imunostik dievaluasi menggunakan sampel seropositif dan seronegatif brucellosis (*true positive* dan *true negative*) untuk memastikan bahwa perangkat imunostik berkerja dengan baik membedakan seropositif dan seronegatif. Sebanyak 100 contoh serum digunakan untuk validasi imunostik terdiri dari 34 seropositif dan 66 seronegatif. Hasil evaluasi perangkat imunostik disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 2. Hasil optimasi perangkat imunostik menggunakan antigen komersil *B. abortus* S99 dan *B. abortus* S19 menggunakan serum *refrence*

	Pengenceran serum	Konsentrasi antigen (mg/mL)											
		<i>B. abortus</i> S99(1)				<i>B. abortus</i> S99(2)				<i>B. abortus</i> S19			
		0,5	2	5	10	0,5	2	5	10	0,5	2	5	10
Kontrol Positif	1:100												
	1	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	2	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	3	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	4	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	5	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	1:200												
	1	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	2	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	3	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	4	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	5	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	1:400												
	1	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	2	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	3	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	4	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	5	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
	1:800												
	1	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
2	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	
3	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	
4	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	
5	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	
Kontrol negatif	1:100												
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1:200												
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1:400												
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1:800												
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Keterangan: (N): Negatif; (P): Positif; *B. abortus* S99 (1): antigen *B. abortus* komersil local; *B. abortus* S99 (2): antigen *B. abortus* komersil impor; (1) Sero positif IBASS; (2) Seropositif Balitvet; (3) Seropositif Pusvetma; (4) Seropositif IDEXX; (5) Seropositif IDvet; (6) Seronegatif IBASS; (7) Seronegatif Balitvet; (8) Seronegatif IDEXX ; (9) seronegatif IDvet.



Gambar 1. Hasil optimasi imunostik

Keterangan: Positif (adanya bulatan oranye)
Konsentrasi antigen: (1) 0,5 mg/mL;
(2) 2 mg/mL; (3) 5 mg/mL; (4) 10 mg/mL

Hasil pemeriksaan menggunakan perangkat imunostik yang dilapisi antigen *B. abortus* S19 memperlihatkan bahwa perangkat ini memiliki nilai sensitivitas sebesar 100%, spesifitas sebesar 51,52%, akurasi sebesar 68%, dan nilai AUC sebesar 0,68. Nilai AUC memperlihatkan bahwa perangkat imunostik ini memiliki diagnostik akurasi cukup. Perangkat imunostik yang menggunakan antigen *B. abortus* S19 memperlihatkan hasil kurang memuaskan dengan status contoh seropositif dan seronegatif jika dibandingkan dengan antigen *B. abortus* S99. Antigen *B. abortus* S99 (1) dengan antigen *B. abortus* S99 (2) memiliki kemampuan yang berbeda untuk mendeteksi *B. abortus* walaupun memiliki kesamaan galur. Perangkat imunostik yang menggunakan antigen *B. abortus* S99 (1) memiliki nilai sensitivitas sebesar 100%, spesifitas sebesar 45,45%, akurasi sebesar 64%, dan nilai AUC 0,64. Nilai AUC memperlihatkan bahwa

perangkat imunostik dengan antigen *B. abortus* S99 (1) memiliki diagnostik akurasi cukup. Perangkat imunostik yang menggunakan antigen *B. abortus* S99 (2) memiliki nilai sensitivitas sebesar 100%, spesifitas sebesar 78,79%, akurasi sebesar 86%, dan nilai AUC sebesar 0,86. Hasil yang terakhir ini memperlihatkan bahwa perangkat imunostik yang menggunakan antigen *B. abortus* S99 (2) memperlihatkan kesesuaian yang baik dan ketelitian diagnostik yang sangat baik.

Metode imunostik merupakan modifikasi dari metode ELISA untuk mendeteksi brucellosis. Teknik ELISA dilaporkan memiliki sensitivitas sebesar 96% dan spesifitas 93,8%. Metode RBT memiliki nilai sensitivitas sebesar 81,2% dan spesifitas sebesar 86,30%. CFT memiliki nilai sensitivitas sebesar 89% dan spesifitas sebesar 83,5% (Gall dan Nielsen, 2004). Adanya persamaan teknik dasar yang digunakan menyebabkan perangkat imunostik dan *i*-ELISA memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan dengan RBT dan CFT. Hasil validasi imunostik menggunakan kelompok serum negatif menyatakan bahwa antigen *B. abortus* S99 jauh lebih spesifik dibandingkan antigen *B. abortus* S19. Akan tetapi, sesama antigen *B. abortus* S99 belum tentu memiliki spesifitas yang sama.

Pada penelitian ini imunostik memiliki sensitivitas 100%, namun spesifitasnya berbeda-beda dipengaruhi oleh jenis antigen yang dipergunakan. Spesifitas dari antigen *B. abortus* S19 51,52%, antigen *B. abortus* S99 (1) 45,45% dan antigen *B. abortus* S99(2) 78,79%. Hasil validasi menggunakan antigen *B. abortus* S99 lokal dan impor walaupun memiliki kesamaan jenis atau strain (*B. abortus* S99 Weybridge) ternyata memiliki spesifitas yang berbeda. Perbedaan spesifitas antigen *B. abortus* S19 dengan sesama antigen *B. abortus* S99 lokal dan impor dapat dipengaruhi oleh jenis antigen, metode perlakuan antigen dan status contoh serum. Pengujian serologik menggunakan perangkat imunostik tidak dapat membedakan jenis antibodi yang terlacak karena hasil vaksinasi atau infeksi alam. Netralisasi antigen

Tabel 3. Data hasil validasi perangkat imunostik

Keterangan	S19	S99(1)	S99(2)
Sensitivitas	100,00%	100,00%	100,00%
Spesifisitas	51,52%	45,45%	78,79%
Akurasi	68,00%	64,00 %	86,00%
AUC(Diagnostic accuracy)	0,68(cukup)	0,64(cukup)	0,86(sangat baik)

Tabel 4. Data hasil perbandingan uji antara ELISA dan imunostik pada kelompok seropositif, seronegatif dan serum yang tidak diketahui statusnya (*unknowsera*)

Keterangan	S99(1)	S19	S99(2)
Sensitivitas	82,86%	82,86%	93,55%
Spesifisitas	58,46%	52,31%	79,71%
Akurasi	67,00%	63,00%	84,00%
AUC(<i>Diagnostic accuracy</i>)	0,67(cukup)	0,63(cukup)	0,84(sangat baik)

oleh antibodi terjadi jika antigen dapat dikenali oleh antibodi. Bagian antigen yaitu epitop yang homolog akan berikatan dengan paratop antibodi spesifik. Perbedaan epitop antigen berpengaruh pada kemampuan antigen untuk mengenali dan berikatan dengan paratop antibodi. Antigen *B. abortus* S19 dan S99 pada penelitian ini merupakan antigen dalam bentuk sel utuh (*whole cell*) adanya perbedaan hasil pengujian antara teknik ELISA dan perangkat imunostik karena adanya perbedaan jenis antigen yang digunakan yaitu kit *i*-ELISA yang dipergunakan dilapis menggunakan (sLPS) *B. abortus*.

Perbandingan Uji ELISA dan Imunostik

Hasil perbandingan uji dengan metode imunostik dan ELISA terhadap kelompok sampel serum seropositif, seronegatif dan kelompok serum yang tidak diketahui statusnya didapatkan hasil seperti yang disajikan dalam Tabel 4.

Perangkat imunostik menggunakan antigen *B. abortus* S19, S99 (1) dan S99 (2) mampu membedakan serum positif *Brucella* sebesar 29% (29/100). Serum dinyatakan negatif oleh ELISA dan perangkat imunostik menggunakan antigen *B. abortus* S19 sebesar 38% (38/100), antigen *B. abortus* S99 (1) sebesar 34% (34/100), antigen *B. abortus* S99 (2) sebesar 55% (55/100). Jumlah serum yang dinyatakan negatif palsu (*false negative*) menggunakan antigen *B. abortus* S19 sebesar 27% (27/100), *B. abortus* S99 (1) sebesar 31% (31/100) dan *B. abortus* S99 (2) sebesar 14% (14/100). Jumlah serum yang dinyatakan positif palsu (*false positive*) menggunakan antigen *B. abortus* S19 dan *B. abortus* S99 (1) sebesar 6% (6/100) sedangkan *B. abortus* S99 (2) sebesar 2% (2/100).

Perbandingan uji antara ELISA dan imunostik merupakan proses berkelanjutan setelah dilakukan validasi imunostik. Hasil validasi dan perbandingan uji diperoleh data

yang tidak berbeda nyata dan konsisten pada perangkat imunostik yang dilapis menggunakan antigen *B. abortus* S19, S99 (1) dan S99 (2). Adanya persamaan metode dasar yang digunakan, menyebabkan perangkat imunostik dan ELISA memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan dengan RBT dan CFT. Hasil pengujian menggunakan imunostik menggunakan kelompok serum negatif menyatakan bahwa antigen *B. abortus* S99 jauh lebih spesifik dibandingkan antigen *B. abortus* S19 akan tetapi, sesama antigen *B. abortus* S99 belum tentu memiliki spesifitas yang sama.

Lembaga OIE (2016) menyatakan bahwa uji RBT, CFT, dan *indirect*-ELISA merupakan metode uji yang disarankan untuk tindakan eradikasi dan surveilans terhadap brucellosis maka, untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifitas hasil pengujian untuk mendeteksi secara serologik *B. abortus* pada ternak dilakukan pengujian menggunakan beberapa metode (*complementary test*). Hasil dari masing-masing metode kemudian dilakukan analisis menyeluruh untuk menyimpulkan hasil diagnosis terhadap brucellosis. Adanya persamaan prinsip pengujian antara *i*-ELISA dengan imunostik memungkinkan penggunaan imunostik sebagai metode cepat untuk mendeteksi *B. abortus* pada sapi di lapang. Sensitivitas dan spesifitas juga setara dengan *i*-ELISA.

Diagnosis yang lebih akurat harus tetap dilakukan pada tingkat laboratorium menggunakan metode uji serologik lainnya. Perangkat imunostik dapat membantu mempercepat pemeriksaan terhadap brucellosis di lapang dengan hasil yang memuaskan. Perangkat imunostik juga memungkinkan untuk digabungkan dengan uji serologik penyakit lainnya dalam satu stik, sehingga dapat dimungkinkan untuk dilakukan diagnosis banding penyakit gangguan reproduksi secara serologik dalam satu waktu dengan satu perangkat imunostik.

SIMPULAN

Imunostik dapat digunakan untuk mendeteksi brucellosis dan memiliki akurasi setara dengan ELISA sebesar 93%. Antigen sel utuh *B. abortus* S19 dan antigen *B. abortus* S99 memiliki sensitivitas hampir sama sebesar 82,86% sampai 100% untuk mendeteksi brucellosis, namun memiliki spesifitas yang beragam. Antigen *B. abortus* S99 memiliki sensitivitas lebih baik dibandingkan dengan antigen *B. abortus* S19, namun sesama antigen *B. abortus* S99 belum tentu memiliki spesifitas yang sama untuk mendeteksi brucellosis.

SARAN

Dari hasil penelitian ini ada beberapa saran untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai: perlu dilakukan peninjauan kembali jenis antigen *B. abortus* S99 lokal untuk proses produksi antigen komersil, pengembangan metode imunostik menggunakan antigen sel utuh *B. abortus* untuk mendeteksi IgM, pengembangan metode imunostik menggunakan antigen sel utuh *B. abortus* yang telah dikarakterisasi atau menggunakan bagian dari *Brucella* (LPS, OMP) sehingga dapat diterapkan sebagai metode diagnostik cepat, dan pengembangan metode imunostik menggunakan antibodi spesifik *B. abortus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Badan Karantina Pertanian, Kementerian Pertanian Republik Indonesia, UPT Balai Besar Karantina Pertanian Tanjung Priok yang telah mendanai dan memberikan izin penelitian hingga terselesaikannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Sherbiny MM, Osman AM, Hancock K, Deelder AM, Tsang VCW. 1999. Application of immunodiagnostic assays detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings. *J Trop Med Hyg* 60(6): 960-966.
- Asensio L, Samaniego L. 2008. Detection of grouper mislabelling in fish market by an immunostick colorimetric ELISA assay. *Food and Agricultural Immunology* 19(2): 141-147.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Clavijo E, Díaz R, Anguita A, García A, Pinedo A. 2003. Comparison of a dipstick assay for detection of *Brucella*-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnose of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 612-615.
- Dohoo I, Martin W, Stryhn H. 2010. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2th ed. VER Inc. Charlottown.
- Gall D dan Nielsen K. 2004. Serological diagnose of bovine brucellosis a review of test performance and cost comparison. *Off Int Epiz* 23(3): 989-1002.
- Jin SZY, Chang X, Ming, Wei CLMH, Shen LY, Gand GX, Hong. 2005. Fast dipstick dye immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies of human *Toxoplasmosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 198-201.
- Mufidah T, Wibowo H, Subekti DT. 2015. Pengembangan ELISA dan metode deteksi cepat dengan imunostik terhadap antibodi anti *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *JIS* 10: 4.
- Office International des Epizooties. 2016. Brucellosis version adopted by the world assembly of delegates of the OIE in terrestrial manual. www.oie.int.
- Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Ling, Yu, Nielsen W. 2010. Diagnosa of brucellosis. *Vet Scie J* 4: 46-60.
- Rossi CL, Tsangand VCW, Pilcher JB. 1991. Rapid, low technology field- and laboratory-Applicable Enzyme Linked Immunosorbent Assays for immune diagnose of *Schistosoma mansoni*. *J Clin Microbiol* 29: 183-184.
- Simundic A. 2009. Measures of diagnostic accuracy basic definitions. *eJIFCC* 19(4): 203-211.
- Subekti DT, Kusumaningtyas E. 2011. Comparison of serological test for toxoplasmosis using immunostick assay, ELISA and latex agglutination test. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 16(3): 224-233.