

Evaluasi Performa dan Kesesuaian Uji Antara Uji Aglutinasi *Toxoplasma Modified Agglutination Test* dengan Berbagai Kit Uji Serologis Komersial

(EVALUATION OF ASSAY PERFORMANCE AND INTER RELIABILITY AGREEMENT
BETWEEN TOXOPLASMA MODIFIED AGGLUTINATION TEST AND SEVERAL
COMMERCIAL SEROLOGICALS ASSAY KITS)

Sisca Valinata¹, Sulinawati¹, Didik Tulus Subekti^{2*}

¹ Balai Veteriner Lampung,
JL. Untung Suropati No. 2, Bandar Lampung, Lampung, Indonesia 35142

² Balai Besar Penelitian Veteriner,
JL. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114, Jawa Barat, Indonesia

*E mail : subektididik96@yahoo.com; subekti@pertanian.go.id

ABSTRAK

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis dengan jalur penularan utama di Indonesia berupa *food borne diseases*. Monitoring kesehatan hewan secara berkala dengan surveilans sangat penting dan memerlukan dukungan perangkat diagnostik yang memiliki akurasi cukup baik dan ketersediaan secara kontinyu dengan biaya yang terjangkau. Teknik pengujian serologis dengan metode aglutinasi merupakan pilihan yang sesuai dan tepat karena cukup akurat dan aplikasinya sederhana serta tidak memerlukan sumberdaya manusia yang berkemampuan khusus. Penelitian bertujuan untuk mengembangkan kit uji aglutinasi dan mengevaluasi performanya secara komparatif dengan beberapa kit komersial. Sebanyak 98 sampel serum standar positif dan negatif yang telah dipastikan dengan uji menggunakan empat kit komersial digunakan untuk mengevaluasi kit aglutinasi yang telah dikembangkan, *Toxoplasma Modified Agglutination Test* (ToMAT). Selanjutnya 186 sampel serum lapang digunakan untuk membandingkan kesesuaian uji antara kit ToMAT dengan empat kit uji komersial dan imunoblotting. Hasil evaluasi performa dari kit aglutinasi ToMAT berupa sensitifitas, spesifisitas dan akurasi diagnostik, masing-masing sebesar 98,55% ; 86,21% dan 94,9%. Adapun nilai PPV (*positive predictive value*) dan NPV (*negative predictive value*) sebesar 94,4% ; 96,2% Kit uji ToMAT memiliki derajat kesesuaian yang baik (*good agreement*) dengan imunoblotting (76%) dan kit ELISA Toxotest (74,1%) didasarkan pada nilai dari *Gwet's AC₁*.

Kata-kata kunci: toksoplasmosis; uji serologi; uji aglutinasi; ELISA” ToMAT

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease and known as Food borne diseases as main transmission pathway in Indonesia. Regular monitoring of animal health with surveillance is very important and requires a diagnostic devices that have good accuracy and continuous availability at affordable costs. Serological testing techniques with agglutination method are suitable and appropriate choices because they are quite accurate and simple in their application and does not require skilled human resources. Aims of study aims are to develops an agglutination test kit and evaluate its performance comparatively with several commercial kits. 98 samples of positive and negative standard serum that have been confirmed by using 4 commercial serological kits were used to evaluate the inhouse-toxoplasma modified agglutination kit (ToMAT). Furthermore 186 field serum samples were used in inter reliability agreement assay for comparing the ToMAT kit with four commercial kits available in Indonesian market's and immunoblotting. Performance evaluation of the ToMAT shows the sensitivity, specificity and diagnostic accuracy, were 98.55%; 86.21% and 94.9% respectively. The value of PPV and NPV is 94.4%; 96.2%. The ToMAT test kit had a good agreement with immunoblotting (76%) and the Toxotest ELISA kit (74.1%) was based on the value of *Gwet's AC₁*.

Keywords: toxoplasmosis; serological assay; agglutination test; ELISA; ToMAT

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis bersumber dari binatang khususnya keluarga kucing (*Felidae*) yang disebabkan oleh infeksi *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*). Namun jalur penularan yang utama adalah *food borne diseases, soil transmitted diseases* maupun *air and water borne diseases. Food borne diseases* merupakan jalur yang krusial untuk penularan toksoplasmosis di Indonesia. Hal ini terbukti dengan adanya sejumlah penelitian yang mengindikasikan besarnya risiko jalur tersebut. Seran *et al.* (2016) melaporkan prevalensi toksoplasmosis di Kabupaten Minahasa, Sulawesi Utara sebesar 50%. Berdasarkan laporan tersebut dinyatakan bahwa 95% dari individu seropositif tersebut terkait dengan konsumsi daging yang dibakar dalam memasaknya. Hal serupa juga dilaporkan oleh Aditama *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa 60,7% faktor risiko terkena toksoplasmosis di Kota Semarang, Jawa Tengah berkaitan dengan pola konsumsi daging yang tidak dimasak dengan baik. Adapun Retmanasari *et al.* (2017) melaporkan kasus toksoplasmosis di Jawa Tengah sebesar 62,5% dengan faktor risiko yang nyata karena kontak dengan daging mentah.

Ditinjau dari jenis produk hewani yang potensial menjadi sumber penularan di Indonesia adalah produk pangan asal ikan, ayam dan sapi. Adapun produk pangan dari kambing/domba dan babi relatif kecil. Hal tersebut dikaitkan dengan kemungkinan risiko pola konsumsi masyarakat Indonesia serta data BPS (Badan Pusat Statistik) Nasional yang menyatakan bahwa rerata konsumsi per kapita seminggu pada tahun 2016 dan 2017 untuk bahan pangan hewani asal ikan (ikan, udang cumi dan kerang) sebesar 0,302 dan 0,326 kg (BPS, 2018). Adapun rerata konsumsi perkapita seminggu daging ayam (ras maupun buras) sebesar 0,111 dan 0,124 kg serta daging sapi maupun kerbau sebesar 0,008 dan 0,009 kg pada tahun yang sama (BPS, 2018). Berdasar data BPS tersebut, rerata konsumsi ikan selama 10 tahun mengalami peningkatan 2,6 kg per tahun sedangkan konsumsi daging ayam dan sapi masing-masing mengalami peningkatan 5,7 dan 0,7 kg per tahun.

Di sisi lain, kasus toksoplasmosis pada ikan dan kerang, ayam serta sapi sudah banyak dilaporkan. Toksoplasmosis pada ikan atau hewan air tawar maupun air laut telah banyak dilaporkan diantaranya oleh Dluogońska (2017)

yang melaporkan pada berbagai jenis hewan air. Laporan toksoplasmosis pada ikan dan kerang di Tiongkok juga telah dilaporkan oleh Zhang *et al.* (2014) serta pada ikan mas di Iraq (Aakool dan Abidalli, 2015). Adapun kasus toksoplasmosis pada ayam secara serologis juga sudah dilaporkan di Sumatera Utara pada tahun 1998 sebesar 19,6% (Iskandar, 1999 ; Subekti *et al.*, 2005). Pada tahun 2008, toksoplasmosis secara serologis di Jawa sebesar 24,4% dan berhasil diisolasi takizoitnya (Dubey *et al.*, 2008). Demikian pula di Bali juga telah dilaporkan seroprevalensi toksoplasmosis pada ayam sebesar 24,8% dan juga berhasil diisolasi parasitnya (Dwinata *et al.*, 2012). Toksoplasmosis di ayam tidak hanya terjadi pada ayam buras tetapi juga terjadi pada ayam ras yang dipelihara intensif (Asgari *et al.*, 2008 ; Insan *et al.*, 2019).

Laporan toksoplasmosis pada sapi telah lama diketahui di berbagai belahan dunia. Di Indonesia dilaporkan cukup tinggi yaitu 36,4% di Sumatera Utara pada tahun 1998 (Iskandar, 1999 ; Subekti *et al.*, 2005). Selanjutnya juga dilaporkan sebesar 23% di Banda Aceh (Hanafiah *et al.*, 2010) dan 92,7% di Bandar Lampung (Wulandari *et al.*, 2019). Toksoplasmosis pada kambing/domba sesungguhnya juga dominan dibanding sapi, namun karena konsumsi perkapitanya rendah di Indonesia, maka produk pangan asal hewan ini relatif sulit diprediksi.

Oleh karena risiko penularan toksoplasmosis dari hewan ke manusia di Indonesia cukup tinggi, maka upaya memantau kesehatan hewan secara berkala menjadi sangat penting. Pemantauan secara berkala dengan surveilans memerlukan dukungan perangkat diagnostik yang memiliki akurasi cukup baik dan ketersediaan secara kontinyu dengan biaya yang terjangkau. Hal demikian diperlukan untuk menjamin keberlangsungan program surveilans tersebut pada berbagai jenis komoditas hewan dan manusia.

Teknik pengujian serologis dengan metode aglutinasi merupakan pilihan yang sesuai dan tepat ditinjau dari berbagai sisi. Pertama, *Office International des Epizooties* (OIE) merekomendasikan uji serologi aglutinasi, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dan IFA (*immunofluorescence assay*) untuk mengetahui prevalensi kasus dengan surveilans (OIE, 2017). Kedua, aglutinasi merupakan uji yang sederhana, akurat, dan berbiaya lebih murah. Ketiga, dalam penerapannya, uji aglutinasi tidak memerlukan dukungan peralatan yang kompleks maupun sumberdaya manusia yang

berkemampuan khusus sehingga dapat diterapkan pada berbagai jenjang laboratorium kesehatan hewan dan manusia. Oleh sebab itu, pengembangan uji serologi dengan teknik aglutinasi secara mandiri perlu dilakukan dan dievaluasi performanya sekaligus dibandingkan dengan beberapa uji serologis dengan beberapa kit toksoplasmosis komersial. Penelitian ini, bertujuan mengevaluasi performa kit uji aglutinasi yang dikembangkan serta kesesuaian hasil uji dibandingkan dengan beberapa uji serologis lainnya.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian dan Penetapan Serum Uji Terstandar

Penelitian dilakukan secara bertahap, pertama kali adalah penetapan serum standar untuk pengujian performa kit aglutinasi. Serum standar positif dan negatif toksoplasmosis ditetapkan dengan pengujian menggunakan empat kit komersial dan imunoblotting. Sampel serum standar positif dan negatif (seropositif dan seronegatif) yang telah ditetapkan berdasar keempat kit uji tersebut (sebanyak 98 sampel) digunakan untuk mengevaluasi performa uji kit aglutinasi yang telah dikembangkan (*Toxoplasma Modified Agglutination Test*, ToMAT). Evaluasi performa pengujian kit aglutinasi ToMAT dengan menetapkan akurasi, spesifikasi dan sensitivitas diagnosis menggunakan serum standar positif dan negatif.

Selanjutnya, tahap kedua dari penelitian adalah uji kesesuaian diagnosis (*inter reliability agreement*) terhadap 186 sampel lapang yang dibandingkan dengan uji serologis lainnya. Uji serologis pembanding yang digunakan adalah ELISA menggunakan Toxotest (IDEXX, USA), IDScreen (IDVet, France) dan TOXO Ab (Cusabio, China). Uji serologis pembanding lain yang juga disertakan adalah uji aglutinasi menggunakan Pastorex (BioRad, France) dan imunoblotting (*Western Blotting*). Pada penelitian ini, uji aglutinasi yang dikembangkan dan digunakan adalah *Modified Agglutination* menggunakan *formaline fixed tachyzoite* sehingga disebut ToMAT, sedangkan teknik yang digunakan dalam uji aglutinasi menggunakan Pastorex adalah *Latex Agglutination*.

Penyiapan Suspensi Antigen untuk Pembuatan Kit Aglutinasi (ToMAT)

Suspensi takizoit *T.gondii* yang telah

dipurifikasi diinaktivasi menggunakan formalin 6% selama 24 jam pada suhu 4°C. Suspensi takizoit kemudian dicuci tiga kali dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2 dan disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm. Endapan yang diperoleh kemudian diresuspensi dalam dapar borat (Borate Buffer pH 8,4) yang mengandung Eosin Y (0,01%), *Bovine Serum Albumin*/BSA (0,2%) dan NaN_3 (0,1%). Konsentrasi akhir takizoit di dalam dapar borat adalah $10^6 - 10^7$ takizoit/mL yang selanjutnya siap digunakan sebagai antigen untuk pembuatan kit uji aglutinasi dengan nama *Toxoplasma Modified Agglutination Test*.

Prosedur Uji Aglutinasi ToMAT

Serum terlebih dahulu diencerkan 1:20 dengan PBS dan dihomogenisasi. Masing-masing 25 uL serum dan 25 uL suspensi takizoit dimasukkan kedalam lubang mikrotiter (*U shape bottomed*) dan dihomogenisasi. Lempeng mikrotiter diinkubasi pada suhu 4°C - 8°C semalam. Lempeng mikrotiter dibaca secara visual, hasil dinyatakan negatif apabila membentuk "*pink button*" pada dasar lubang mikrotiter dan dinyatakan positif apabila terdispersi pada dasar lubang mikrotiter. Serum dinyatakan negatif apabila menunjukkan hasil negatif pada pengenceran di bawah 1:20.

Prosedur ELISA dan Imunoblotting

Serum yang akan diuji dengan ELISA diencerkan mengikuti prosedur yang telah ditetapkan masing-masing produsen kit komersial tersebut. Hasil pengujian serum dengan ELISA dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm dan ditetapkan seropositivitasnya mengikuti ketentuan dari masing-masing kit komersial.

Protein *T. gondii* diisolasi dengan cara sonikasi menggunakan Q-Sonica 500 dengan pulse 10:0,5, AMP 80% dengan siklus pengulangan lima kali selama 1,5 jam. Hasil sonikasi kemudian disentrifus pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dan dipisahkan supernatannya sebagai *Soluble Toxoplasma Antigen* (STA). Protein yang telah diperoleh kemudian dikuantifikasi untuk menentukan kadar proteinnya menggunakan metode Bradford. Sekitar 10 μg STA dicampur (1:1) dengan *buffer sampel* (BioRad, Prancis). Setiap sampel dimasukkan ke dalam lajur dari gel (*TGX™ pre cast gel 12%*, BioRad, Prancis) pada konsentrasi 10 μg /lajur bersama dengan marka protein (*Broad Range Spectra Multicolor*,

Thermo Scientific). Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *Mini Protean* (BioRad) pada 150 volt sekitar 45-50 menit. Hasil elektroforesis kemudian ditransfer pada membran nitroselulosa menggunakan *Transblot Turbo* (BioRad, Prancis) dan sebagian lainnya divisualisasikan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue*.

Hasil transfer pada membran nitroselulosa dicuci dengan air suling steril. Membran nitroselulosa kemudian di blok (*blocking*) dengan PBS-Tween 20-BSA selama satu jam. Membran nitroselulosa kembali dicuci dengan PBS-Tween 20, kemudian masing-masing direaksikan dengan serum pada pengenceran 1:200 serta diinkubasi selama satu jam. Membran nitroselulosa kembali dicuci dengan PBS-Tween 20 dan selanjutnya direaksikan dengan konjugat anti Bovine IgG – HRP (1:10.000) selama satu jam. Terakhir, membran dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 dan direaksikan dengan substrat ODN (*s dianisidine*), apabila telah tervisualisasi, maka membran nitroselulosa dicuci dengan air suling steril.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis untuk mengetahui performa ujinya dengan Tabel Kontingensi 2x2 (*Diagnostic Test*) menggunakan MedCalc 18.9. Adapun uji kesesuaian (*inter reliability agreement*) dianalisis berdasarkan beberapa nilai koefisien menggunakan *online software* ReCal2 (Freelon, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Performa Uji Kit Aglutinasi ToMAT

Performa uji suatu perangkat diagnostik dievaluasi berdasarkan beberapa variabel penilaian yang menggambarkan akurasi dalam diagnosis. Pengukuran akurasi diagnostik dapat dievaluasi dari beberapa kriteria diantaranya adalah sensitivitas (*sensitivity*), spesifisitas (*specificity*), akurasi (*accuracy*), PPV (*positive predictive value*), NPV (*negative predictive value*), LR + (*positive likelihood ratio*), LR – (*negative likelihood ratio*), AUC (*area under curve*), dan *Youden's Index* (Okeh and Okoro, 2012 ; Eusebi, 2013;).

Sensitivitas dan spesifisitas bukan suatu ukuran prediktif, keduanya hanya menggambarkan secara umum bagaimana hasil tes tertentu dapat memperkirakan suatu penyakit atau tidak (Eusebi, 2013). Sensitivitas umum-

nya dinyatakan dalam persentase dan menyatakan besarnya hasil tes serologis positif pada individu yang benar-benar terinfeksi atau terpapar antigen *T.gondii*. Adapun spesifisitas juga dinyatakan dalam persentase dan menyatakan besarnya hasil tes serologis negatif pada individu yang benar-benar sehat. Oleh karena itu, sensitivitas menyatakan besarnya kemampuan suatu perangkat uji diagnostik untuk menetapkan seropositif pada individu yang benar-benar terinfeksi atau tertapar oleh antigen *T.gondii*. Adapun spesifisitas menyatakan besarnya kemampuan suatu perangkat uji diagnostik untuk menetapkan seronegatif pada individu yang benar-benar sehat. Berdasarkan nilai sensitivitas dan spesifisitas tersebut dapat ditentukan akurasi diagnostik dari suatu perangkat uji diagnostik. Dengan demikian, akurasi diagnostik merupakan besarnya kemampuan suatu perangkat uji diagnostik dalam menetapkan seropositif pada individu yang benar-benar terinfeksi atau tertapar oleh antigen *T.gondii* dan menetapkan seronegatif pada individu yang benar-benar sehat.

Pada penelitian ini, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik dari ToMAT masing-masing sebesar 98,55% dan 86,21%. Dengan demikian kemampuan ToMAT dalam mendeteksi individu yang positif toksoplasmosis sebesar 98,55% dan kemampuan mendeteksi individu yang sehat sebesar 86,21%. Pada kit ToMAT, akurasi yang diperoleh adalah 94,9% yang secara umum menunjukkan ketepatan diagnosis terhadap individu yang diuji. Performa tersebut serupa dengan laporan Da-Silva *et al.* (2012) yang menguji toksoplasmosis pada manusia di Umarama, Brazil. Da-Silva *et al.* (2012) melaporkan bahwa sensitivitas, spesifisitas dan akurasi MAT tersebut adalah 100% ; 75% dan 93,2%.

Evaluasi terhadap akurasi uji diagnosis juga dapat diketahui berdasarkan nilai AUC dan *Youden's Index* (Šimundiæ, 2008 ; Okeh and Okoro, 2012). *Youden's index* (YI) adalah salah satu ukuran untuk menentukan akurasi diagnostik secara umum (Šimundiæ, 2008 ; Okeh and Okoro, 2012). Namun demikian, YI memiliki kelemahan penting yaitu tidak peka dalam membedakan sensitivitas dan spesifisitas suatu perangkat uji diagnostik. Suatu perangkat uji diagnostik dengan sensitivitas 0,9 dan spesifisitas 0,4 akan memiliki nilai YI yang sama (yaitu 0,3) sebagaimana uji diagnostik lainnya yang memiliki sensitivitas 0,6 dan spesifisitas 0,7 (Šimundiæ, 2008 ; Okeh dan

Tabel 1. Performa Uji dari Kit *Toxoplasmosis Modified Agglutination Test (ToMAT)* dan Derajat Kesesuaian Pengujian dengan Status Serum Uji.

Variabel Pengujian	Nilai	Tolok Ukur
Performa Pengujian		
Sensitivity(<i>Diagnostic sensitivity</i>)	98,55	–
Specificity(<i>Diagnostic specificity</i>)	86,21	–
Accuracy(<i>Diagnostic accuracy</i>)	94,90	–
PPV(<i>Predictive positive value</i>)	94,4	–
NPV(<i>Predictive negative value</i>)	96,2	–
LR +(<i>Positive likelihood rasio</i>)	7,145	<i>Effect on Posttest Probability of disease : Moderate increase</i> ¹
LR –(<i>Negative likelihood rasio</i>)	0,016	<i>Effect on Posttest Probability of disease : Large decrease</i> ¹
AUC (<i>area under curve</i>)	0,924	<i>Excellent</i> ²
Youden’s Index	0,848	<i>Very good</i> ³
Derajat Kesesuaian Pengujian (<i>Inter Reliability Agreement</i>)		
Cohen’s Kappa	0,874	<i>Very good agreement</i> ⁴ <i>Almost perfect agreement</i> ⁵
Scott’s Pi(Fleiss’ Kappa)	0,874	<i>Very good agreement</i> ⁴ <i>Almost perfect agreement</i> ⁵
Krippendorff’s Alpha	0,874	<i>Very good agreement</i> ⁴ <i>Almost perfect agreement</i> ⁵
Gwet’s AC ₁	0,914	<i>Very good agreement</i> ⁴ <i>Almost perfect agreement</i> ⁵
Indeks Pemanfaatan Klinis (<i>Clinical Utility Index = CUI</i>)		
Positive Clinical Utility	0,931	<i>Excellent</i> ⁶
Negative Clinical Utility	0,829	<i>Excellent</i> ⁶

Keterangan :

- ¹ Kriteria *likelihood rasio* menurut Riddle dan Stratford (1999).
- ² Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk AUC menurut Šimundiæ (2008).
- ³ Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk Youden’s index menurut Okeh dan Okoro (2012).
- ⁴ Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk *inter reliability agreement* menurut Altman (1991).
- ⁵ Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk *inter reliability agreement* menurut Landis dan Koch (1977).
- ⁶ Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk *clinical utility* menurut Mitchell (2011).

Okoro, 2012). Sangat jelas bahwa kedua perangkat uji diagnostik tersebut secara riil tidak memiliki akurasi diagnostik yang sebanding. Dengan demikian menetapkan akurasi perangkat diagnostik hanya berdasarkan YI saja akan mengakibatkan kekeliruan dalam menyimpulkan akurasi diagnostiknya. Berdasarkan Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa

akurasi diagnostik kit ToMAT dengan mengacu pada nilai YI dikategorikan memiliki akurasi diagnostik yang sangat baik.

Area under curve (AUC) juga merupakan salah satu ukuran akurasi diagnostik lainnya. Kit ToMAT memiliki akurasi diagnostik yang luar biasa (*excellent*) apabila didasarkan pada nilai AUC sebagaimana dipaparkan dalam Tabel

1. Namun demikian, AUC juga memiliki kelemahan penting sebagaimana YI, yaitu tidak memberikan informasi apa pun tentang sensitivitas dan spesifisitas, yang mengacu pada nilai ambang (*cut off*) tertentu (Šimundiæ, 2008 ; Eusebi, 2013). Nilai AUC suatu perangkat uji diagnostik yang lebih tinggi hanya akan menunjukkan akurasi yang lebih tinggi dibanding perangkat uji diagnostik lainnya. Oleh sebab itu, evaluasi akurasi diagnostik secara ringkas dan cepat dari suatu perangkat uji dapat berdasarkan AUC dan YI. Namun, hasil evaluasi tersebut harus ditunjang dengan informasi yang lebih lengkap berdasarkan nilai akurasi diagnostik yang diturunkan dari nilai sensitivitas dan spesifisitas.

Variabel lain yang digunakan dalam mengevaluasi performa suatu perangkat uji diagnostik adalah LR +, LR -, PPV dan NPV. Keempat variabel tersebut dipengaruhi prevalensi penyakit pada populasi sedangkan sensitivitas, spesifisitas dan akurasi diagnostik tidak dipengaruhi prevalensi penyakit. Dengan demikian, keempat variabel tersebut lebih bermanfaat pada aplikasi perangkat uji karena memiliki sifat prediksi hasil uji pada suatu populasi. Nilai LR + menginformasikan seberapa besar kemungkinan hasil tes positif terjadi pada individu dalam populasi yang berpenyakit (sakit) dibandingkan pada individu dalam populasi yang tidak berpenyakit (sehat). Semakin jauh LR + dari skor nilai 1, semakin kuat bukti adanya penyakit. Apabila LR + sama dengan 1, maka uji atau tes tersebut tidak dapat membedakan orang sakit dengan yang sehat (Eusebi, 2013). Adapun LR - menginformasikan seberapa kecil (seberapa jarang) kemungkinan hasil tes negatif terjadi pada individu dalam populasi yang berpenyakit (sakit) dibandingkan pada individu dalam populasi yang tidak berpenyakit (sehat). LR - umumnya kurang dari 1, semakin rendah LR -, semakin kuat bukti tidak adanya penyakit (Eusebi, 2013). Dengan kalimat lain, LR + menetapkan kemungkinan sakit (adanya penyakit) sedangkan LR - mengabaikan kemungkinan sakit (tidak ada penyakit).

Likelihood ratio berkaitan dengan perubahan dari *pretest probability* ke *posttest probability*. *Pretest probability* yaitu kemungkinan adanya suatu kondisi (penyakit) sebelum tes diagnostik dilakukan, sedangkan *posttest probability* yaitu kemungkinan adanya suatu kondisi (penyakit) setelah uji atau tes diagnostik dilakukan. Hasil *posttest probability* dapat

positif (seropositif) atau negatif (seronegatif) tergantung hasil akhir uji diagnostiknya. Pada penelitian ini diketahui bahwa LR + dari kit ToMAT adalah 7,15 yang bermakna bahwa uji diagnostik yang dilakukan akan menghasilkan perubahan berupa peningkatan moderat yaitu peningkatan sebesar 45% dari kemungkinan adanya penyakit pada individu yang diuji. Sebaliknya, LR - pada kit ToMAT sebesar 0,02 yang bermakna bahwa uji diagnostik yang dilakukan akan menghasilkan perubahan berupa penurunan yang besar yaitu penurunan sebesar 55% dari kemungkinan adanya penyakit pada individu yang diuji menurut kriteria yang dinyatakan Riddle dan Stratford (1999) dan McGee (2002).

Dua variabel lain untuk menguji performa kit uji diagnostik ToMAT adalah PPV dan NPV. *Positive predictive value* (PPV) adalah proporsi pasien yang hasil ujinya dinyatakan positif dan benar-benar terpapar atau menderita sakit. *Negative predictive value* (NPV) adalah proporsi pasien yang hasil ujinya negatif dan betul-betul tidak menderita sakit atau sehat. Hal ini menunjukkan bahwa apabila hasil uji seseorang dinyatakan positif, maka persentase besarnya kemungkinan seseorang tersebut benar-benar menderita penyakit terilustrasi pada PPV. Apabila hasil uji seseorang dinyatakan negatif, maka persentase besarnya kemungkinan seseorang tersebut betul-betul tidak menderita penyakit terilustrasi pada NPV.

Pada kit ToMAT nilai PPV dan NPV sebesar 94,4% dan 96,2% (Tabel 1). Nilai sensitivitas dan spesifisitasnya adalah 98,55% dan 86,21% (Tabel 1). Berdasarkan sensitivitas kit uji ToMAT tersebut, 98,55% mampu menetapkan status seropositif dengan benar pada seseorang yang diuji. Diantara individu yang telah diuji dan dinyatakan seropositif tersebut, 94,4% kemungkinannya benar-benar seropositif. Adapun berdasarkan spesifisitas kit uji ToMAT tersebut, 86,21% mampu menetapkan status seronegatif dengan benar pada seseorang yang diuji. Diantara individu yang telah diuji dan dinyatakan seronegatif tersebut, 96,2% kemungkinannya benar-benar seronegatif.

Hasil pengujian kesesuaian antara hasil uji kit diagnostik ToMAT dengan status sampel uji menunjukkan derajat kesesuaian yang sangat baik berdasarkan beberapa nilai koefisien atau indeks kesesuaian sebagaimana dipaparkan pada Tabel 1. Demikian pula halnya dengan indeks kegunaan klinis yang dinyatakan dengan kategori luarbiasa (*excellent*) berdasarkan tolok

ukur yang ditetapkan Mitchell (2011). Dengan demikian, secara keseluruhan kit uji serologis ToMAT memiliki performa uji yang baik ditinjau dari berbagai variabel pengujian.

Uji Kesesuaian Kit Uji Aglutinasi dibandingkan ELISA dan Immunoblotting

Pada Tabel 2 disajikan bahwa derajat kesesuaian antara hasil uji ToMAT yang berbasis metode aglutinasi (*Modified Agglutination Test*, MAT) dengan beberapa kit uji ELISA komersial dan immunoblotting (*western blotting*) yang berbasis metode *enzyme immunoassay* menunjukkan adanya keragaman. Derajat kesesuaian terbaik adalah dengan immunoblotting dan ELISA menggunakan kit Toxotest (IDEXX) dengan derajat kesesuaian yang baik sampai sangat baik (berdasarkan tolok ukur Altman, 1991) atau derajat kesesuaian yang besar sampai hampir sempurna (menurut tolok ukur Landis dan Koch, 1977). Penetapan derajat kesesuaian yang baik (*good agreement*) atau derajat kesesuaian yang besar (*substantial agreement*) antara kit uji ToMAT dengan immunoblotting dan kit ELISA Toxotest (IDEXX) didasarkan pada nilai dari Gwet's AC_1 (Tabel 2). Dengan demikian, secara umum kit uji ToMAT lebih dekat kesesuaian hasil uji serologisnya dengan immunoblotting dan kit ELISA menggunakan Toxotest (IDEXX) dibanding kit ELISA komersial lainnya. Hasil uji kesesuaian tersebut serupa dengan laporan Gu *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa antara MAT dengan immunoblotting memiliki derajat kesesuaian moderat berdasarkan nilai Cohen's Kappa. Pada penelitian ini memiliki hasil yang lebih baik meskipun sama-sama memiliki kesesuaian lebih dekat dengan immunoblotting.

Nilai dari Gwet's AC_1 memiliki keserupaan atau kesamaan dengan nilai kesesuaian secara matematis (RPA = *relative percent agreement*), yaitu 76% bersesuaian dengan hasil uji immunoblotting dan 74,1% bersesuaian dengan hasil uji kit ELISA Toxotest (IDEXX). Adapun nilai uji kesesuaian lainnya baik berupa nilai *kappa* (Cohen's Kappa maupun Fleiss' Kappa), *pi* (Scott's Pi) maupun nilai *alpha* (Krippendorff's Alpha) tidak tepat untuk digunakan. Hal demikian telah dijelaskan oleh Gwet (2008) dan Wongpakaran *et al.* (2013), bahwa Gwet's AC_1 memiliki kelebihan dibanding dari berbagai koefisien lainnya. Gwet's AC_1 lebih tahan (*resistant*) terhadap perubahan prevalensi, probabilitas marjinal (*marginal probability*) atau homogenitas marjinal (*marginal homogeneity*) yang menyebabkan terjadinya *paradox kappa*

(Gwet, 2008 ; McCray, 2013 ; Wongpakaran *et al.*, 2013 ; Walsh *et al.*, 2014). Ketidakseimbangan homogenitas atau probabilitas marjinal baik secara simetris maupun asimetris atau vertikal maupun horisontal akan mengakibatkan ketidakstabilan dan merosotnya nilai koefisien *kappa* (k), *pi* (p) dan *alpha* (a). Adapun nilai koefisien dari Gwet's AC_1 lebih stabil dan konsisten dibanding nilai koefisien lainnya. Demikian pula halnya nilai skor dari F-measure, meskipun menghasilkan skor nilai yang tinggi namun kategorisasi dari tolok ukur yang dihasilkan terlalu berlebihan (*overestimate*) dibandingkan nilai kesesuaian matematisnya.

Adapun hasil uji aglutinasi dengan kit komersial Pastorex (BioRad) yang berbasis metode *Latex Agglutination Test* (LAT) dengan uji ELISA dan immunoblotting (*western blotting*) yang berbasis metode serologis *enzyme immunoassay* juga menunjukkan adanya keragaman (Tabel 3). Derajat kesesuaian antara Pastorex (BioRad) yang terbaik mengikuti ketentuan nilai dari Gwet's AC_1 , yaitu memiliki derajat kesesuaian moderat sebesar 68,89% dengan kit ELISA IDScreen (IDVet) dan 62,96% dengan kit ELISA Toxo Ab (Cusabio). Nilai koefisien dari Gwet's AC_1 pada perbandingan uji kesesuaian antara uji aglutinasi (baik ToMAT maupun Pastorex) dengan uji serologi berbasis enzim immunoasai tetap konsisten dan mampu mengkategorikan derajat kesesuaian uji dengan tepat. Hal demikian dapat terlihat dari kesesuaian antara kategori derajat kesesuaian yang ditetapkan oleh nilai skor dari Gwet's AC_1 dengan persentase kesesuaian yang diperoleh secara matematis.

Dengan demikian secara keseluruhan, meskipun ToMAT dan Pastorex sama-sama berbasis metode aglutinasi, namun keduanya memiliki kesesuaian dengan uji serologis komersial yang berbeda. Kemungkinan perbedaan tersebut berkaitan dengan metode yang dipergunakan dalam pengembangannya. Kit ToMAT menggunakan teknik MAT dalam metode uji aglutinasi yang didasarkan pada takizoit *T.gondii* secara utuh, sedangkan Pastorex menggunakan teknik LAT yang didasarkan pada penggunaan protein solubel dari takizoit *T.gondii* yang telah dihancurkan dan dilapiskan pada permukaan mikropartikel lateks.

Secara teoritis, semestinya Pastorex (BioRad) juga memiliki kesesuaian yang dekat dengan immunoblotting maupun kit ELISA Toxotest (IDEXX) karena juga menggunakan

Tabel 2. Uji Kesesuaian (*Inter Reliability Agreement*) antara *Toxoplasma Modified Agglutination Test* (ToMAT) dengan beberapa metode uji serologis untuk deteksi toksoplasmosis

	Cohen's Kappa	Scott's Pi (Fleiss' Kappa)	Gwet's AC ₁	Krippendorff's Alpha	F-Measure	RPA (%)
Western Blotting	0,288	0,287	0,639	0,29	0,848	76
	Fair agreement	Fair agreement	Good agreement* Substantial agreement**	Fair agreement	Very Good agreement* Almost perfect agreement**	
Toxotest (IDEXX)	0,279	0,222	0,611	0,225	0,836	74,1
	Fair agreement	Fair agreement	Good agreement* Substantial agreement**	Fair agreement	Very Good agreement* Almost perfect agreement**	
IDScreen (IDVet)	0,095	-0,231	-0,115	-0,227	0,521	41,5
	Poor agreement* Slight agreement**	Poor agreement	Poor agreement	Poor agreement	Moderate agreement	
Toxo Ab (Cusabio)	0,026	-0,586	-0,585	-0,58	0,219	20,7
	Poor agreement* Slight agreement**	Poor agreement	Poor agreement	Poor agreement	Fair agreement	

Tolok Ukur (*Benchmarking*): * Mengikuti kriteria dari Altman (1991) ; ** Mengikuti kriteria dari Landis dan Koch (1977)

Tabel 3. Uji Kesesuaian (*Inter Reliability Agreement*) antara *Latex Agglutination Test* (Pastorex) dengan beberapa metode uji serologis untuk deteksi toksoplasmosis

	Cohen's Kappa	Scott's Pi (Fleiss' Kappa)	Gwet's AC ₁	Krippendorff's Alpha	F-Measure	RPA (%)
Western Blotting	-0,039	-0,395	-0,392	-0,387	0,326	30,34
	Poor agreement	Poor agreement	Poor agreement	Poor agreement	Fair agreement	
Toxotest (IDEXX)	0,009	-0,097	-0,081	-0,093	0,475	45,19
	Poor agreement* Slight agreement**	Poor agreement	Poor agreement	Poor agreement	Moderate agreement	
IDScreen (IDVet)	0,301	0,3	0,44	0,303	0,533	68,89
	Fair agreement	Fair agreement	Moderate agreement	Fair agreement	Moderate agreement	
Toxo Ab (Cusabio)	0,03	-0,047	0,427	-0,043	0,194	62,96
	Poor agreement* Slight agreement**	Poor agreement	Moderate agreement	Poor agreement	Poor agreement* Slight agreement**	

Tolok Ukur (*Benchmarking*) : * Mengikuti kriteria dari Altman (1991) ; ** Mengikuti kriteria dari Landis dan Koch (1977)

protein solubel dari takizoit *T.gondii* yang telah dihancurkan dan dilapiskan (*coating*) pada membran nitroselulosa (untuk imunoblotting) dan permukaan sumuran microplat (untuk ELISA Toxotest). Namun kenyataannya justru Pastorex (BioRad) lebih dekat kesesuaiannya dengan Kit ELISA IDScreen (IDVet) dan Toxo Ab (Cusabio). Penyebab pasti dari anomali kesesuaian tersebut belum dapat diketahui, namun diperkirakan berkaitan dengan perbedaan jenis protein yang terlapiskan pada mikro-partikel lateks dengan yang terlapiskan pada permukaan mikroplat dan membran nitroselulosa. Perbedaan tersebut kemungkinan juga terkait dengan metode validasi yang dilakukan pada saat pengembangan kit Pastorex tersebut.

Kit ELISA IDScreen (IDVet) menggunakan protein rekombinan p30 dari takizoit *T.gondii* serta menggunakan konjugat protein A-HRP. Demikian pula kit Toxo Ab (Cusabio) juga diperkirakan menggunakan antigen p30. Antigen p30 dari takizoit *T.gondii* mengacu pada protein SAG1 dan umumnya berupa protein rekombinan. Penggunaan protein rekombinan tunggal pada ELISA secara umum memiliki akurasi uji dibawah penggunaan protein solubel dari takizoit. Pada umumnya protein rekombinan secara tunggal menunjukkan antigenisitas dan reaktivitas yang buruk dengan sampel serum dari lapangan ketika diuji sebagai antigen untuk ELISA. Oleh karena itu, pendekatan alternatifnya adalah menentukan formulasi kombinasi penggunaan sejumlah protein rekombinan sebagai antigen yang dapat mewakili seluruh antigen dalam takizoit *T.gondii* (Abdelbaset *et al.*, 2017). Secara kolektif, perangkat diagnostik uji IgG ELISA yang dikembangkan berdasarkan formula kombinasi dari beberapa protein rekombinan memiliki kinerja diagnostik yang lebih baik daripada perangkat uji diagnostik ELISA yang dikembangkan berdasarkan penggunaan protein rekombinan secara tunggal untuk mendeteksi infeksi *T.gondii* pada kucing, dan performa terbaik yang memiliki sensitivitas serta spesifisitas tinggi adalah ELISA menggunakan protein solubel dari takizoit *T.gondii* (Abdelbaset *et al.*, 2017).

Tidak ada satu pun ELISA yang menggunakan antigen rekombinan dari masing-masing protein rekombinan secara tunggal yang mampu mendeteksi semua sampel positif IgG ataupun positif IgM positif ketika menguji semua sampel serum pada berbagai tahapan penyakit yang berbeda. (Aubert *et al.*, 2000). Namun demikian,

kombinasi dari tiga protein rekombinan (p29 + p30 + p35) pada kit ELISA IgG dan kombinasi tiga protein rekombinan (p29 + p35 + p66) pada kit ELISA IgM ternyata mampu mendeteksi hampir semua sampel serum yang positif IgG dan IgM (Aubert *et al.*, 2000). Oleh karena itu semua kombinasi protein rekombinan tersebut harus dipertimbangkan secara bersamaan dalam pembuatan kit ELISA. Pernyataan lain yang serupa yaitu bahwasanya ELISA konvensional yang menggunakan protein solubel dari takizoit *T.gondii* sebagai antigen menunjukkan tingkat kesesuaian yang tinggi dengan DT (*dye test*), MAT (*modified agglutination test*) atau IFAT (*immunofluorescence antibody technique*) yang mendeteksi IgG atau IgM pada manusia dan hewan. (Liu *et al.*, 2015). Kombinasi beberapa protein rekombinan telah terbukti juga lebih sensitif dan spesifik daripada menggunakan protein rekombinan secara tunggal (Liu *et al.*, 2015). Pendapat ini bersesuaian dengan hasil penelitian ini dan ToMAT memiliki derajat kesesuaian yang baik dengan ELISA dan Imunoblotting.

Secara umum, penggunaan protein rekombinan secara tunggal cenderung meningkatkan spesifisitas dan menurunkan sensitivitas. Hal demikian dapat menyebabkan *false negative* yang lebih besar pada ELISA menggunakan satu jenis protein rekombinan. Akibatnya hasil pengujian berupa seronegatif akan lebih tinggi dibanding seropositif yang terdeteksi. Adapun penggunaan protein solubel dari takizoit *T.gondii*, apabila tidak dioptimasi dan dikontrol kualitasnya dengan maksimal akan cenderung meningkatkan sensitivitas dibanding spesifisitas. Konsekuensinya, hasil pengujian *false positive* akan meningkat kecuali optimasi dan validasi dilakukan sangat tepat. Hal ini diperlukan agar keseimbangan sensitivitas dan spesifisitas akan dapat dicapai. Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa ELISA *sandwich* menggunakan antigen berupa protein solubel dari takizoit lebih sensitif dan lebih spesifik untuk mendeteksi antibodi IgM manusia dibandingkan IFAT. Lebih lanjut Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa ELISA *sandwich* yang menggunakan protein rekombinan p35 lebih spesifik untuk diagnosa infeksi akut daripada ELISA IgM yang menggunakan protein solubel dari takizoit. Penggunaan protein rekombinan pada ELISA secara tunggal atau terpisah memiliki sensitivitas 81% dan 88%, adapun kombinasi dari dua protein rekombinan akan meningkatkan sensitivitas hingga 96% (Holec-Ga^oior, 2013).

Oleh karena itu, protein ini dapat digunakan bersama sebagai campuran / kombinasi antigen untuk serodiagnosis toksoplasmosis. Selanjutnya, beberapa campuran protein rekombinan yang disarankan untuk mendeteksi antibodi IgG terhadap *T. gondii* adalah GRA7, GRA8, dan SAG1 (Holec-Ga^oior, 2013).

Indikasi penggunaan p30 atau rekombinan SAG1 secara tunggal yang beresiko mengakibatkan rendahnya sensitivitas telah dikemukakan oleh Aubert *et al.* (2000) maupun Holec-Ga^oior (2013). Oleh sebab itu mereka menyarankan untuk menggunakan kombinasi beberapa protein rekombinan dalam ELISA. Fakta tersebut serupa dengan laporan Jalallou *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa sensitivitas dan spesifisitas dari ELISA yang berbasis protein rekombinan dibandingkan dengan ELISA yang tersedia secara komersial adalah 88,4% dan 88%, masing-masing untuk mendeteksi IgG. Adapun Selseleh *et al.* (2012) menyatakan bahwa sensitivitas dan spesifisitas IgG ELISA menggunakan protein rekombinan yang dihasilkan, jika dibandingkan dengan ELISA komersial adalah 93% dan 95%, dan sensitivitas dan spesifisitas IgM ELISA rekombinan yang dihasilkan masing-masing adalah 87% dan 95%.

Demikian pula penggunaan protein A-HRP akan mereduksi kekuatan ikatan dengan beberapa jenis antibodi dibanding menggunakan konjugat antibovine IgG-HRP sebagaimana dilaporkan Subekti dan Yuniarto (2017). Konsekuensinya, akan berisiko terjadi pergeseran kecenderungan kemampuan mendeteksi seronegatif lebih kuat dibanding kemampuan mendeteksi seropositif. Dengan demikian menggabungkan penggunaan protein rekombinan p30 sebagai antigen dalam ELISA dan protein A/G-HRP sebagai konjugat akan menyebabkan meningkatnya risiko *false negative* sehingga hasil uji yang menyatakan seronegatif memiliki probabilitas lebih tinggi. Oleh karena itu sangat wajar apabila ToMAT memiliki kesesuaian yang rendah dengan kedua kit komersial tersebut. ToMAT, Toxotest (IDEXX) dan imunoboting memiliki potensi atau risiko *false positive* lebih tinggi sedangkan IDScreen (IDVet) dan Toxo Ab (Cusabio) memiliki potensi atau risiko *false negative* yang lebih tinggi. Adapun Pastorex yang menggunakan metode LAT memiliki kesesuaian moderat dengan IDScreen (IDVet) dan Toxo Ab (Cusabio) kemungkinan terkait dengan jenis protein tertentu dari protein solubel berikatan dengan permukaan mikropartikel lateks.

Perbandingan antar Uji Aglutinasi

Hasil evaluasi performa uji aglutinasi yang berbasis MAT maupun LAT sangat beragam sehingga tidak mudah disimpulkan secara umum. Uji serologi aglutinasi berbasis MAT dilaporkan memiliki sensitivitas dan spesifisitas 36,8% dan 97,3% (Gu *et al.*, 2015). Sebaliknya, Fanco *et al.* (2003) melaporkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas MAT adalah 85% dan 100%. Kemungkinan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Gu *et al.* (2015) terlalu rendah (*underestimate*) dibanding Franco *et al.* (2003) dan hasil penelitian lainnya. Pada penelitian ini (kit ToMAT) diperoleh sensitivitas dan spesifisitas sebesar 98,55% dan 86,21% yang sangat berkebalikan dengan laporan Gu *et al.* (2015). Hasil penelitian ini juga sesuai dengan Da-Silva *et al.* (2012) yang melaporkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas MAT sebesar 100% dan 75%. Demikian pula Sroka *et al.* (2008) yang juga melaporkan hal serupa, yaitu sensitivitas dan spesifisitas MAT adalah 100% dan 77,8%. Adapun hasil penelitian Langoni *et al.* (2007) yang melaporkan sensitivitas dan spesifisitas MAT sebesar 100% dan 91,5%. Dengan demikian, baik penelitian Langoni *et al.* (2007), Sroka *et al.* (2008), Da-Silva *et al.* (2012) dan hasil penelitian ini berada pada satu kesimpulan yang serupa. Meskipun keempat hasil tersebut memiliki perbedaan dengan hasil Franko *et al.* (2003) namun keempat hasil tersebut menunjukkan tingkat akurasi diagnostik yang serupa atau hampir setara.

Uji serologi aglutinasi dengan teknik LAT juga dilaporkan lebih bervariasi antar berbagai laporan penelitian. Villard *et al.* (2012) melaporkan bahwa Pastorex (BioRad) yang merupakan salah satu kit aglutinasi yang menggunakan teknik LAT memiliki sensitivitas dan spesifisitas sebesar 98,8% dan 98,8%. Nilai performa diagnostik tersebut kemungkinan terlalu tinggi (*overestimate*) dibanding kenyataan di berbagai laporan penelitian yang tersedia. LAT secara umum dinyatakan memiliki sensitivitas 86-94% dan spesifisitas 100% pada serum manusia serta memiliki sensitivitas rendah yaitu 78,6% dan spesifisitas 61,9% pada serum domba (Liu *et al.*, 2015). Hasil penelitian tersebut serupa dengan pengujian Pastorex (BioRad) yang dilaporkan Subekti dan Kusumaningtyas (2011), yaitu memiliki sensitivitas dan spesifisitas 70,46% dan 100% pada serum sapi. Laporan lain yang serupa dikemukakan oleh Mazumder *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa perbandingan LAT dengan

ELISA untuk deteksi toksoplasmosis menunjukkan bahwa LAT memiliki sensitivitas dan spesifisitas sebesar 86% dan 100%.

Berdasarkan pada hasil penelitian ini, uji LAT menggunakan kit Pastorex (BioRad) memiliki sensitivitas dan spesifisitas sebesar 32,35% dan 92,5% jika diuji berdasarkan kesepakatan antara kit ELISA IDScreen (IDVet) dan Toxo Ab (Cusabio). Hasil tersebut serupa dengan Sroka *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas Pastorex (BioRad) sebesar 47,2% dan 91,4%. Dengan demikian, bukti ini memperkuat dugaan bahwa penyebab rendahnya nilai sensitivitas tersebut terkait dominansi dari spesifisitas yang terlalu tinggi.

Ryu *et al.* (1996) melaporkan bahwa LAT memiliki derajat kesesuaian yang rendah (*poor agreement*) dengan ELISA untuk diagnosis toksoplasmosis pada 899 sampel sera wanita hamil. Pada penelitian ini Pastorex menunjukkan derajat kesesuaian yang moderat (*moderate agreement*) dengan kit ELISA IDScreen dan Toxo Ab. Hasil tersebut sesuai dengan laporan Subekti dan Kusumanintyas (2011) yang membandingkan Pastorex dengan *in-house* ELISA yang telah dikembangkannya dan memiliki derajat kesesuaian moderat (*moderate agreement*). Namun Subekti *et al.* (2012) melaporkan derajat kesesuaian uji yang baik (*good agreement*) antara LAT (Toxocell, Biokit) dengan ELISA. Demikian pula Kistiah *et al.* (2011) melaporkan derajat kesesuaian uji yang baik (*good agreement*) antara Pastorex dengan ELISA untuk deteksi toksoplasmosis pada manusia. Shekatkar *et al.* (2010) juga melaporkan derajat kesesuaian uji yang baik (*good agreement*) antara LAT dengan ELISA pada leptospirosis. Namun, Subekti dan Kusumanintyas (2011) mengkritisi dan menyatakan bahwa peneliti tersebut lebih dominan menggunakan sampel seronegatif yang telah ditetapkan dengan ELISA. Hal ini tentu akan menyebabkan kesesuaian yang tinggi sebab sampel yang terdeteksi negatif oleh ELISA memiliki peluang yang sangat besar terdeteksi negatif pada LAT. Kelemahan umum dari LAT adalah dalam mendeteksi sampel seronegatif (Subekti dan Kusumanintyas, 2011). Hal ini selaras dengan hasil penelitian ini maupun laporan Sroka *et al.* (2008) yang membuktikan bahwa tingginya spesifisitas dan rendahnya sensitivitas berkonsekuensi pada mening-

katnya peluang kekeliruan dalam menetapkan serum seronegatif yang seharusnya seropositif (*false negative*). Kondisi demikian pula yang menyebabkan kesesuaian lebih dekat pada ELISA IDScreen (IDVet) dan Toxo Ab (Cusabio) dibanding Toxotest (IDEXX) dan imunoblotting sebagaimana telah dibahas.

SIMPULAN

Sensitivitas, spesifisitas dan akurasi diagnostik dari kit agutinasi yang telah dikembangkan, yaitu ToMAT masing-masing sebesar 98,55% ; 86,21% dan 94,9%. Adapun nilai PPV dan NPV sebesar 94,4% ; 96,2% Kit uji ToMAT memiliki derajat kesesuaian yang baik (*good agreement*) atau derajat kesesuaian yang besar (*substantial agreement*) dengan imunoblotting dan kit ELISA Toxotest (IDEXX) didasarkan pada nilai dari Gwet's AC_1 . Dengan demikian, secara umum kit uji ToMAT lebih dekat kesesuaian hasil uji serologisnya dengan imunoblotting dan kit ELISA menggunakan Toxotest (IDEXX) dibanding kit ELISA komersial lainnya, yaitu 76% bersesuaian dengan hasil uji imunoblotting dan 74,1% bersesuaian dengan hasil uji kit ELISA Toxotest (IDEXX).

SARAN

Perbedaan kesesuaian hasil pengujian antara dua uji aglutinasi dengan ELISA mengindikasikan adanya kemungkinan perbedaan uji diantara kit ELISA komersial. Dengan demikian pengujian perbandingan antar kit ELISA untuk deteksi toksoplasmosis juga perlu dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr Hardiman selaku Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor (BBLITVET) dan Ir Chaerunisa Syafitri MSi selaku Kepala Bidang Kerjasama dan Pendayagunaan Hasil Penelitian BBLITVET yang telah mendukung terselenggaranya penelitian ini. Ucapan terima kasih yang sangat besar juga diucapkan kepada Drh Syamsul Ma'arif, MSi selaku Kepala Balai Veteriner Lampung yang telah banyak memberikan dukungan dana DIPA APBN dan fasilitas penelitian di Balai Veteriner Lampung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aakool AAK, Abidalli SJ. 2015. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in native freshwater fish *Cyprinus carpio* in Wasit Province Iraq. *Int J Sci Engine Res* 4(7): 1-10. IJSER15875.
- Abdelbaset AE, Alhasan A, Salman D, Karram MH, Rushdi MAE, Xuenan X, Igarashi M. 2017. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 172: 1-4.
- Aditama N, Nurjazuli, Dina RA. 2016. Determinan lingkungan dan perilaku berhubungan dengan terjadinya penyakit infeksi Toxoplasmosis di wilayah kota Semarang. *J Kes Masy* 4(5): 67-76.
- Altman DG. 1991. *Practical Statistics for Medical Research*. London. Chapman and Hall. Hlm. 403-409.
- Asgari Q, Mohajeri A, Kalantari M, Esmaeilzadeh B, Farzaneh A, Moazeni M, Ghalebi SR, Saremi F, Kalyani MZ, Motazedian MH. 2008. Chicken Toxoplasmosis in different types of breeding : a seroprevalence survei in southern Iran. *Int J Poult Sci* 7(12): 1247-1250.
- Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan F, Pinon JM. 2000. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in human sera by Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 38(3): 1144-1150.
- BPS (Badan Pusat Statistik). 2018. <https://www.bps.go.id/statictable/2014/09/08/950/rata-rata-konsumsi-per-kapita-seminggu-beberapa-macam-bahan-makanan-penting-2007-2017.html> [update terakhir 4 April 2018].
- Da-Silva DV, Marques JM, Correa NAB, Velasquez LG, Da-Silva RC, Langoni H, Von Söhsten AL, Da-Silva AV. 2012. Evaluation of modified agglutination test and enzyme linked immunosorbent assay in detection of *Toxoplasma gondii* antibody in human sera. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR* 16(1): 17-20.
- Dlużońska H. 2017. Are poikilothermic animals real hosts for *Toxoplasma gondii* ? *Ann. Parasitol.* 63(1): 3-5.
- Dubey JP, Huong LTT, Lawson BWL, Subekti DT, Tassi P, Cabaj W, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OCH, Su C. 2008. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland, and Vietnam. *J Parasitol* 94(1): 68-71.
- Dwinata IM, Oka IBM, Suratma NA, Damriyasa IM. 2012. Seroprevalensi dan isolasi *Toxoplasma gondii* pada ayam kampung di Bali. *J. Veteriner* 13(4): 340-344.
- Eusebi P. 2013. Diagnostic Accuracy Measures. *Cerebrovasc Dis.* 36: 267-272. DOI:10.1159/000353863.
- Franco WAC, Bergamaschi DP, Richtzenhain LJ, Nogueira Y, Camargo LMA, Souza SLP, Gennari SM. 2003. Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of *Toxoplasma gondii* in dogs. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 40: 452-456.
- Freelon DG. 2010. ReCal: Intercoder reliability calculation as a web service. *Int J Inter Sci* 5(1): 20-33.
- Gu Y, Wang Z, Cai Y, Li X, Wei F, Shang L, Li J, Liu Q. 2015. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in mink using a modified agglutination test, a Western blot, and enzyme-linked immunosorbent assays. *J Vet Diag Invest* 27(5): 616-620.
- Gwet KL. 2008. Computing interrater reliability and its variance in the presence of high agreement. *British J Math Stat Psychol* 61: 29-48.
- Hanafiah M, Kamaruddin M, Nurcahyo W, Winaruddin. 2010. Studi infeksi Toksoplasmosis pada manusia dan hubungannya dengan hewan di Banda Aceh. *JKed Hewan* 4(2): 87-92.
- Holec-Ga^oior L. 2013. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human Toxoplasmosis: current status of studies. *Clin Vacc Immunol* 20(9): 1343-1351.

- Insan ANM, Suwandi JF, Lisiswanti R, Mutiara H. 2019. Perbandingan Seroprevalensi *Toxoplasma gondii* pada ayam Buras dan Ras di kota Bandar Lampung. *J. Agromedicine* 6(1): 46-50.
- Iskandar T. 1999. Tinjauan tentang Toksoplasmosis pada hewan dan manusia. *Wartazoa* 8(2): 58-63.
- Jalallou N, Bandepour M, Khazan H, Haghghi A, Abdollahi SH, Kazemi B. 2010. Recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii* specific Immunoglobulin G in human sera by ELISA rest. *Iran J Parasitol* 5(2): 1-9.
- Kistiah K, Frean J, Barragan A, Winiacka-Krusnell J, Karstaedt A. 2011. An evaluation of Pastorex Toxo Latex Agglutination Test as a screening tool for *Toxoplasma gondii* antibody detection in a South African setting. *Ann Aust Coll Trop Med* 12: 25-27.
- Landis JR, Koch GG 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- Langoni H, Da-Silva AV, Pezerico SB, De-Lima VY. 2007. Utilization of modified agglutination test and indirect immunofluorescent antibody test for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally exposed horses. *Braz. J Vet Res Anim Sci* 44(1): 27-32.
- Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vector* 8: 292. DOI 10.1186/s13071-015-0902-6
- Mazumder P, Chuang HYK, Wentz MW, Wiedbrauk DL. 1988. Latex agglutination test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 26(11): 2444-2446.
- McCray G. 2013. *Assessing inter-rater agreement for nominal judgement variables. Paper presented at the Language Testing Forum, Nottingham.* University of Lancaster, UK. November 15-17. Available from: http://www.norbertschmitt.co.uk/uploads/27_528d02015a6da191320524.pdf.
- McGee S. 2002. *Simplifying likelihood ratios.* *J Gen Intern Med* 17(8): 647-650.
- Mitchell AJ. 2011. Sensitivity \times PPV is a recognized test called the clinical utility index (CUI+). *Eur J Epidemiol* 26(3): 251-252.
- OIE (Office International des Epizooties). 2017. *Toxoplasmosis, OIE Terrestrial Manual 2017, Chapter 2.9.9, Hlm. 1-12.* France.
- Okeh UM, Okoro CN. 2012. Evaluating Measures of Indicators of Diagnostic Test Performance: Fundamental Meanings and Formulas. *J Biometric Biostat* 3: 132. doi:10.4172/2155-6180.1000132.
- Retmanasari A, Widartono BS, Wijayanti MA, Artama WT. 2017. Prevalence and risk factor for Toxoplasmosis in Middle Jawa, Indonesia. *EcoHealth* 14: 162-170.
- Riddle DL, Stratford PW. 1999. Interpreting validity indexes for diagnostic test : an illustration using the Berg Balance Test. *Phys Ther* 79(10): 939-948.
- Ryu JS, Min DK, Ahn MH, Choi HG, Rho SC, Shin YJ, Choi B, Joo HD. 1996. Toxoplasma antibody titers by ELISA and indirect latex agglutination test in pregnant women. *Korean J Parasitol* 34: 233-238.
- Selseleh M, Keshavarz H, Mohebbali M, Shojaee S, Modarressi MH, Eshragian MR, Selseleh M. 2012. Production and evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant surface antigen 1 (SAG1) for serodiagnosis of acute and chronic Toxoplasma infection in human sera. *Iran J Parasitol* 7(3): 1-9.
- Seran VJT, Kepel BJ, Fatimawali. 2016. Seroepidemiologi toksoplasmosis pada masyarakat di Desa Kumu Kabupaten Minahasa tahun 2015. *J e-Biomed* 4(1): 86-90.
- Shekatkar S, Acharya NS, Harish BN, Parija SC. 2010. Comparison of an in-house latex agglutination test with IgM ELISA and MAT in the diagnosis of leptospirosis. *Indian J Medic Microbiol* 28: 238-240.
- Šimundiæ AM. 2008. Measures of diagnostic accuracy : basic definitions. *eJIFCC* 19(4): 203-211.
- Sroka J, Cencek T, Ziomko I, Karamon J, Zwolinski J. 2012. Preliminary assessment of ELISA, MAT and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pig. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 52: 545-549.
- Subekti DT, Artama WT, Iskandar T. 2005. Perkembangan kasus dan teknologi diagnosis Toksoplasmosis. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Bogor, Indonesia, 15 Sept 2005. Hlm. 253-264.

- Subekti DT, Kusumaningtyas E. 2011. Perbandingan uji serologi toksoplasmosis dengan Uji Cepat Imunostik, ELISA dan Aglutinasi Lateks. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 16(3): 224-233.
- Subekti DT, Hayati L, Raharja SM. 2012. Performa Perangkat Diagnostik ELISA toksoplasmosis pada serum domba dan manusia. *J. Biol. Indon* 8(2): 289-302.
- Subekti DT, Yuniarto I. 2017. Perbandingan penggunaan konjugat antibovine IgG-HRP dengan Protein A/G-HRP dengan beberapa larutan pengencer serum pada ELISA untuk deteksi Surra pada sapi dan kerbau. *J Biol Indon* 13(1): 43-51.
- Villard O, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau H, Houze H, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E. 2012. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. *Diag Microbiol Infect Dis* 73: 231–235.
- Walsh P, Thornton J, Asato J, Walker N, McCoy G, Baal J, Baal J, Mendoza N, Banimahd F. 2014. Approaches to describing inter-rater reliability of the overall clinical appearance of febrile infants and toddlers in the emergency department. *PeerJ* 2:e651; DOI 10.7717/peerj.651
- Wongpakaran N, Wongpakaran T, Wedding D, Gwet KL. 2013. A comparison of Cohen's Kappa and Gwet's AC1 when calculating inter-rater reliability coefficients: a study conducted with personality disorder samples. *BMC Medical Research Methodology* 2013 13:61. doi:10.1186/1471-2288-13-61
- Wulandari R, Suwandi JF, Mutiara H, Sulinawati, Hanriko R. 2019. Seroprevalensi *Toxoplasma gondii* pada ternak sapi di kota Bandar Lampung. *J Agromedicine* 6(1): 1-5.
- Zhang M, Yang Z, Wang S, Tao LF, Xu LX, Yan RF, Song XK, Li XR. 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. *Vet. Parasitol* 200: 85-89.