

AKURASI RAPID TEST SERUM FASE AKUT SIMPAN DALAM MENDIAGNOSIS JAPANESE ENCEPHALITIS

Ida Bagus Subanada, I Komang Kari

Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar

ABSTRAK

Japanese encephalitis (JE) merupakan ensefalitis virus terbanyak dengan angka kematian dan sekuele yang cukup tinggi. Terdapat beberapa cara untuk mendiagnosis JE, tetapi masih memiliki keterbatasan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akurasi *rapid test* terhadap serum fase akut simpan dalam mendiagnosis JE. Dilakukan uji diagnostik (*rapid test*) terhadap serum fase akut simpan penderita ensefalitis dengan baku emas pemeriksaan MAC ELISA dari cairan serebrospinal dari subjek yang sama, kemudian dihitung prevalensi JE, sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif (NPP), nilai prediksi negatif (NPN), rasio kemungkinan positif (RK+), rasio kemungkinan negatif (RK-), dan *post-test probability*. Didapat prevalensi JE sebesar 42,1%, sensitivitas 15,7% (IK95% 9,2% sampai 22,2%), spesifisitas 95,7% (IK95% 92,1% sampai 99,3%), NPP 72,7% (IK95% 64,8% sampai 80,6%), NPN 60,9% (IK95% 52,2% sampai 69,6%), RK(+) 3,7, RK(-) 0,9, dan *post-test probability* 0,73. Disimpulkan bahwa *rapid test* serum fase akut simpan tidak sensitif tetapi sangat spesifik dalam mendiagnosis JE. [MEDICINA 2013;44:22-26]

Kata kunci: serum simpan fase akut, *rapid test*, akurasi

ACCURACY OF RAPID TEST OF STORED ACUTE PHASE SERUM FOR DIAGNOSE JAPANESE ENCEPHALITIS

Ida Bagus Subanada, I Komang Kari

Department of Child Health, Medical School, Udayana University/Sanglah Hospital Denpasar

ABSTRACT

Japanese encephalitis (JE) is common viral encephalitis with high sequela and mortality. With some limitations, there are several diagnostic tool to diagnose of JE. The objective of this study was to know the accuracy of rapid test of stored acute phase serum for diagnose of JE. We conducted diagnostic test of stored acute phase serum of encephalitis patients with MAC ELISA of cerebrospinal fluid as a gold standard. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value NPV), positive likelihood ratio (PLR), negative likelihood ratio (NLR), and post-test probability were calculated. This study found the prevalence of JE was 42.1%, test sensitivity 15.7 % (95% CI 9.2 to 22.2%), specificity 95.7% (95% CI 92.1 to 99.3%), PPV 72.7% (95% CI 64.8 to 80.6%), NPV 60.9% (95% CI 52.2 to 69.6%), PLR 3.7, NLR 0.9, and post-test probability was 0.73. We concluded that rapid test of acute phase stored serum was insensitive but specific to diagnose of JE. [MEDICINA 2013;44:22-26]

Keywords: acute phase stored serum, *rapid test*, accuracy

PENDAHULUAN

Japanese encephalitis (JE) merupakan penyakit yang menyerang susunan saraf pusat (otak, medula spinalis, dan meningen) yang disebabkan oleh *Japanese encephalitis virus* (JEV), dan ditularkan dari binatang melalui gigitan nyamuk *Culex tritaeniorhynchus*.¹⁻³ Penyakit

ini pertama kali ditemukan di Jepang pada tahun 1935, kemudian menyebar ke beberapa negara tetangga seperti Korea, Cina, Siberia, Taiwan, Nepal, Vietnam, Muangtai, Laos, Kamboja, Myanmar, Bangladesh, Srilanka, Malaysia, Singapura, Filipina, dan Indonesia.¹ Penelitian di Jakarta tahun 1981 dengan diagnosis berdasarkan *immune*

adherence hemagglutination (AIHA) mendapatkan kasus JE sebesar 25,4% (30 kasus JE dari 118 kasus ensefalitis),⁴ sedangkan penelitian di Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Anak FK Unud/RSUP Sanglah Denpasar tahun 1990-1995 dengan diagnosis JE berdasarkan manifestasi klinis dan pemeriksaan laboratorium [spesimen serum dan cairan serebrospinal (CSS) pada

fase akut dan konvalesen dengan memakai *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)] mendapatkan kasus *JE* sebesar 52% (40 kasus *JE* dari 77 kasus ensefalitis).⁵ Penelitian lanjutan di Bali pada tahun 2001-2003 dengan diagnosis *JE* berdasarkan *IgM capture ELISA* (MAC ELISA) serum dan CSS pada fase akut dan konvalesen mendapatkan kasus *JE* sebesar 34,8% (55 kasus *JE* dari 158 penderita ensefalitis).⁶

Japanese encephalitis virus merupakan virus penyebab terbanyak ensefalitis.⁷ Manifestasi klinis *JE* susah dibedakan dengan ensefalitis lainnya, tetapi angka kematiannyarelatiftinggiantara 7,3%⁶ sampai 48,6%.² Dari kasus yang hidup, 50% mengalami sekuele, sekuele pada anak lebih banyak dari dewasa,² sedangkan di Bali sekuele sebesar 45,5%.⁶ Oleh karena itu perlu diketahui angka kejadian *JE* setiap tahun sehingga kelak dapat dipakai sebagai dasar untuk mempersiapkan upaya preventif (vaksinasi) dan kontrol penyakit *JE*.

Terdapat beberapa cara (dengan keterbatasan yang dimiliki) untuk mengetahui adanya *JE* seperti mengisolasi virus (dengan keterbatasan biayanya yang mahal serta jumlahvirusyangadadisirkulasi rendah dan cepatnya terbentuk *neutralizing antibodies*),^{2,7,8} tes hemaglutinasi inhibisi (HI) (dengan keterbatasan memerlukan 2 kali pemeriksaan serum yaitu serum fase akut dan konvalesen serta ada reaksi silang dengan virus dengue),^{7,8} MAC ELISA (merupakan baku emas, dengan keterbatasan

memerlukan punksi lumbal),⁸⁻¹¹ dan *polymerase chain reaction* (dengan keterbatasan JEV cepat menghilang dari CSS maupun serum).⁸ Untuk mengurangi keterbatasan tersebut diperlukan pemeriksaan lain yang relatif murah, mudah, kurang invasif, memberikan hasil yang lebih cepat dan tidak jauh berbeda dengan tes sebelumnya. Atas dasar itu dilakukanlah penelitian ini dengan menggunakan serum simpan sebagai bahan uji.

BAHAN DAN METODE

Desain

Desain penelitian ini adalah uji diagnostik, dilakukan pada bulan April-Mei 2012, dan memakai sampel serum fase akut simpan penderita ensefalitis penelitian sebelumnya.

Sampel

Sampel dipilih secara *stratified random sampling* berdasarkan strata tahun dari tahun 2001 sampai 2007. Besar sampel dihitung berdasarkan rumus "sampel tunggal untuk estimasi proporsi suatu populasi". Dalam perhitungan besarsampel, dipilihnilai P yang memberikan hasil (n) terbesar. Jadi peneliti menetapkan nilai $P = 0,5$, sehingga nilai $Q = 0,5$; $\alpha = 0,05$ sehingga $Z\alpha = 1,96$, dan penyimpangan (d) = 10%. Berdasarkan rumus di atas didapatkan $n = 96$, artinya diperlukan 96 subjek penderita *JE*. Dari penelitian sebelumnya didapatkan bahwa proporsi penderita *JE* dari seluruh penderita ensefalitis sebesar 37% sehingga untuk

mendapatkan 96 subjek penderita *JE* diperlukan subjek penderita ensefalitis sebesar $100/37 \times 96 = 260$. Oleh karena spesimen yang memenuhi kriteria penelitian hanya ada 121, maka semua spesimen ini dijadikan sampel [dengan sampel sebesar ini diperoleh penyimpangan (d) sebesar 15%].

Kriteria inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah spesimen serum fase akut yang disimpan pada suhu -60°C (*deep freezer*) penderita ensefalitis baik *JE* maupun *non-JE* dari penelitian sebelumnya.

Kriteria eksklusi

Serum yang memenuhi kriteria inklusi akan dieksklusi bila ternyata botolnya kosong, adanya endapan pada serum, hasil MAC ELISA CSS dari subjek yang sama pada fase akut negatif tetapi positif pada fase konvalesen, hasil MAC ELISA CSS dari subjek yang sama pada fase akut tidak ada karena tidak ada spesimen CSS tetapi positif pada fase konvalesen, hasil MAC ELISA CSS dari subjek yang sama pada fase akut negatif tetapi spesimen CSS pada fase konvalesen tidak ada.

Baku emas

Baku emas yang dipergunakan untuk mendeteksi adanya *IgM* virus yang spesifik adalah MAC ELISA dari CSS dengan memakai reagen dari *Armed Forces Research Institute of Medicine Sciences (AFRIM)* Bangkok yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya.

Prosedur penelitian

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya yang meneliti surveilans JE di Bali. Setiap subjek (penderita ensefalitis) pada penelitian sebelumnya dilakukan pengambilan CSS dan serum baik pada fase akut maupun fase konvalesen, kemudian disimpan di dalam lemari es pada suhu -60°C. *Rapid test* merupakan tes untuk memeriksa kadar IgM anti-JE pada penderita ensefalitis. Serum fase akut simpan yang terpilih sebagai sampel dilakukan pemeriksaan *rapid test* oleh petugas laboratorium yang terlatih. Petugas laboratorium tidak mengetahui apakah serum tersebut berasal dari penderita JE atau non-JE. Adapun cara melakukan *rapid test* adalah sbb: [1] Dengan menggunakan pipet mikro, tambahkan 5 µl serum atau plasma ke dalam lubang sampel yang ditandai "S", [2] Teteskan 3-4 tetes *assay diluent* ke dalam lubang *assay diluent* yang berbentuk bulat, [3] Interpretasi hasil dalam 15-20 menit (bila dibaca setelah 20 menit dapat memberi hasil yang salah). Hasil dikatakan negatif bila hanya ada satu garis pink "C" pada *result window*, dan berarti tidak terdeteksi antibodi IgM. Hasil dikatakan positif bila ada 2 garis pink "C" dan "T" pada *result window*, dan berarti ada antibodi IgM untuk virus JE. Hasilnya bisa juga tidak valid bila tidak tampak garis kontrol (C) pada *result window*. Pada keadaan ini dianjurkan melakukan tes ulang menggunakan alat baru.

Setelah selesai melakukan *rapid test*, peneliti kemudian mentabulasi atau

membandingkan dengan hasil baku emas yaitu pemeriksaan MAC ELISA dari CSS fase akut. Hasil MAC ELISA dikatakan JE positif bila terdeteksi IgM anti-JEV pada CSS dengan pengenceran 1:10, dan dikatakan JE negatif bila tidak terdeteksi IgM anti-JEV pada CSS dengan pengenceran 1:10. Bila hasil MAC ELISA pada fase akut negatif akan dikonfirmasi dengan hasil MAC ELISA fase konvalesen. Hasil akhir dinyatakan negatif bila hasil MAC ELISA pada fase konvalesen juga negatif. Hasil pemeriksaan MAC ELISA dari CSS ini diambil dari data laboratorium penelitian sebelumnya.

Kelaikan etik

Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian FK Unud/RSUP Sanglah Denpasar.

Analisis data

Dari data yang terkumpul akan dihitung

sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif (NPP), nilai prediksi negatif (NPN), rasio kemungkinan positif (RK+), rasio kemungkinan negatif (RK-), serta *post-test probability*-nya.

HASIL

Dari 176 spesimen yang memenuhi kriteria inklusi, 55 spesimen dieksklusi antara lain karena hasil MAC ELISA CSS pada fase akut negatif tetapi positif pada fase konvelesen (19 subjek), hasil MAC ELISA CSS tidak ada pada fase akut tetapi positif pada fase konvelesen (1 subjek), dan hasil MAC ELISA CSS pada fase akut negatif tetapi spesimen CSS pada fase konvalesen tidak ada (35 subjek) sehingga total sampel yang diteliti adalah 121 sampel yang terdiri dari 3 sampel berasal dari tahun 2001, 7 sampel berasal dari tahun 2002, 27 sampel berasal dari tahun 2003, 29 sampel berasal dari tahun 2004, 20 sampel berasal dari tahun 2005, 14 sampel

Tabel 1. Karakteristik dan manifestasi klinis subjek

Variabel	JE (N=51)	Non-JE (N=70)	Total (N=121)
Jenis kelamin, laki, n(%)	33(65)	36(51)	69(57,0)
Ada babi di sekitar rumah dalam jarak 100 m, n(%)	35(69)	35(50)	70(57,9)
Ada sawah di sekitar rumah dalam jarak 100 m, n(%)	35(69)	34(49)	69(57,0)
Umur, th, n(%):			
≤ 2	7(14)	27(39)	34(28,1)
>2-4	17(33)	15(21)	32(26,4)
>4-6	14(27)	10(14)	24(19,8)
>6-8	5(10)	12(17)	17(14,0)
>8-10	6(12)	6(9)	12(9,9)
>10-12	2(4)	0	2(1,6)
Panas, n(%)	51(100)	70(100)	121(100)
Kejang, n(%)	29(57)	42(0,6)	71(58,7)
Muntah, n(%)	22(43)	26(37)	48(39,7)
Kaku kuduk, n(%)	16(31)	11(16)	27(22,3)

Tabel 2. Hasil pemeriksaan *rapid test* serum fase akut simpan dan MAC ELISA CSS pada 121 sampel penderita ensefalitis

Hasil MAC ELISA CSS (AFRIM)

		Positif	Negatif	Jumlah
Hasil <i>Rapid test</i> serum	Positif	8	3	11
	Negatif	43	67	110
	Jumlah	51	70	121

Sensitivitas = 15,7% (IK95% 9,2% sampai 22,2%.)

Spesifisitas = 95,7% (IK95% 92,1% sampai 99,3%)

Nilai prediksi positif = 72,7% (IK95% 64,8% sampai 80,6%)

Nilai prediksi negatif = 60,9% (IK95% 52,2% sampai 69,6%)

Prevalensi = 42,1%

RK positif = 3,7

RK negatif = 0,9

Post-test probability = 0,73

berasal dari tahun 2006, dan 21 sampel berasal dari tahun 2007. Karakteristik dan manifestasi klinis subjek dapat dilihat pada **Tabel 1.**

Berdasarkan baku emas, didapatkan 51 sampel subjek penderita *JE*; sedangkan *rapid test* mendapatkan hasil positif sebesar 11 sampel. Hasil lengkap kedua pemeriksaan di atas dapat dilihat pada **Tabel 2.**

DISKUSI

Sekitar 3 milyar orang hidup di area endemik *JE*.³ Sebuah penelitian melaporkan prevalensi *JE* sebesar 33,5%,⁷ sedangkan penelitian ini mendapatkan prevalensi *JE* sebesar 42,1%.

Japanese encephalitis umumnya banyak mengenai usia >3 tahun² dan jenis kelamin laki.³ Penelitian ini mendapatkan penderita *JE* lebih banyak pada usia >4 tahun dan laki-laki sebesar 65%. Faktor usia dihubungkan dengan perilaku anak-anak yang lebih besar yang suka main-main ke luar rumah menjelang malam.²

Japanese encephalitis adalah penyakit musiman, kebanyakan kasus pada daerah beriklim sedang terjadi pada bulan Juni-September, sedangkan daerah sub-tropis terjadi pada bulan Maret-Oktober. Pada beberapa daerah tropis termasuk Indonesia, transmisi bisa terjadi sepanjang tahun.³ Adanya vaksinasi masal telah menurunkan kasus *JE* di Jepang, Taiwan, dan Korea Selatan.⁷

Penelitian sebelumnya oleh Solomon dkk⁷ yang menggunakan *IgM capture dot enzyme immunoassay (MAC DOT)* sebagai alat uji dan MAC ELISA sebagai baku emas mendapatkan sensitivitas 98,3%, spesifisitas 99,2%, NPP 0,98, NPN 0,99. Perbedaan hasil ini karena perbedaan spesimen yang dipakai (pada penelitian Solomon dkk memakai kombinasi spesimen serum dan CSS baik untuk baku emas maupun alat uji).

Pembentukan antibodi spesifik *IgM* dalam darah terhadap virus (termasuk

arbovirus) pada infeksi pertama kali akan terjadi pada hari ketiga setelah sakit dan kemudian menghilang dalam 1-3 bulan. Pada infeksi berulang atau reaktivasi, akan menghasilkan profil serologi yang berbeda.⁸ Hal ini tentu akan mempengaruhi hasil tes bila pengambilan sampel dilakukan sebelum hari ketiga. Oleh karena itu direkomendasi untuk memeriksa antibodi selama dirawat dan pada hari ketujuh.⁷ Pada penelitian ini kami mengeksklusi subjek dengan hasil MAC ELISA negatif pada fase akut tetapi positif atau tidak ada spesimen CSS pada fase konvalesen. Begitu juga dengan spesimen CSS pada fase akut tidak ada tetapi positif pada fase konvalesen. Hal ini dilakukan karena tidak ada data tentang waktu pengambilan spesimen pada fase akut dihubungkan dengan awitan sakit, sedangkan penelitian ini bertujuan untuk mencari akurasi *rapid test* pada fase akut.

Kebanyakan infeksi JEV tidak menimbulkan ensefalitis.^{2,3,7} Rasio antara infeksi JEV yang simtomatis dibanding asimtomatis berkisar antara 1:25 sampai 1:300.^{2,7} Infeksi asimtomatis dihubungkan dengan peningkatan *IgM* hanya pada serum. Adanya *IgM* pada CSS mengindikasikan adanya produksi antibodi secara aktif oleh susunan saraf pusat sebagai respon terhadap infeksi JEV. Kebanyakan pasien yang terinfeksi oleh JEV akan teridentifikasi dengan MAC ELISA, akan tetapi beberapa pasien meninggal beberapa

saat setelah rawat inap sebelum membentuk antibodi.⁷

Prognosis JE bervariasi. Ada 2 faktor yang dihubungkan dengan prognosis yang baik yaitu kadar antibodi netralisasi dan kadar IgG anti-JEV yang tinggi pada CSS; sedangkan faktor-faktor yang berhubungan dengan prognosis buruk antara lain usia < 10 tahun, Glasgow coma scale yang rendah, hiponatremia, syok, adanya kompleks imun pada CSS, adanya peningkatan jumlah antibodi antineurofilamen, adanya peningkatan TNF, dan bersamaan dengan neurosistiserkosis.³

Kekurangan penelitian ini adalah memakai sampel serum simpan sebagai spesimen yang diuji sehingga tidak diketahui apakah terjadi penurunan kadar imunoglobulin atau tidak. Bila terjadi penurunan kadar imunoglobulin tentu hal ini bisa memberikan hasil negatif palsu sehingga sensitivitas akan berkurang.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa penelitian ini tidak sensitif tetapi sangat spesifik sehingga bila hasilnya positif besar kemungkinan subjek tersebut menderita JE.

SARAN

Rapid test ini bisa dipakai untuk menyingkirkan JE. Diperlukan penelitian lanjutan dengan memakai serum segar penderita ensefalitis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada PT Mega Medika Mandiri selaku sponsor pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Van Peenen PFD, Irsiana R, Joseph SW, Shope PL. First isolation of Japanese Encephalitis virus from mosquitoes near Bogor, West Java, Indonesia. *J Med Ent.* 1974;12(5):821-3.
2. Solomon T, Dung NM, Kneen R, Gainsborough M, Vaughn DW, Khanh VT. Japanese encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;68:405-15.
3. Jani AA, Cunha BA. Japanese encephalitis (diakses tanggal 16 Maret 2012). Diunduh dari: <http://emedicine.medscape.com/article/233802-overview>
4. Lubis I, Wuryadi S. Penyakit Japanese Encephalitis pada anak-anak di dua Rumah Sakit Jakarta. *Bull Pen Kes.* 1981;11:18-22.
5. Kari IK. Aspek klinis penderita Japanese Encephalitis di Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK Unud/RSUP Sanglah Denpasar. Disampaikan pada Kongres Nasional Ilmu Kesehatan Anak X, Bukittinggi, 18-20 Juli 1996.
6. Kari IK, Liu W, Gautama IMK, Subrata IK, Xu ZY. Clinical profiles and some associated factors

of Japanese encephalitis in Bali. *Paediatr Indones.* 2006;46(1-2):13-9.

7. Solomon T, Thao LTT, Dung NM, Kneen R, Hung NT, Nisalak A, dkk. Rapid diagnosis of Japanese encephalitis by using an immunoglobulin M dot enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):2030-4.
8. Costello M, Yungbluth M. Viral infection. Dalam: Henry JB, penyunting. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* Edisi ke-20. Toronto: WB Saunders; 2001. h. 1045-52.
9. Burke DS, Nisalak A, Essery MA. Antibody capture immunoassay detection of Japanese Encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1982;16:1034-42.
10. Innis BL, Nisalak A, Nimmanitya S, Kusalerdchaisita S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, dkk. An enzyme linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40:418-27.
11. Anonim. Japanese Encephalitis (diakses tanggal 17 Maret 2012). Diunduh dari: <http://emedicine.medscape.com/article/233802-overview#showall>.