

Uji Banding Kit Elisa Untuk Deteksi Antibodi Penyakit Jembrana (The Comparative Elisa Test For Detection Antibodies of Jembrana Disease)

Ni Luh Putu Agustini¹, dan Rosmiati Wisindie²

¹. Balai Besar Veteriner Denpasar

². Pusat Veteriner Farma Surabaya

Abstrak

Salah satu metode untuk diagnosa penyakit Jembrana dapat dilakukan dengan uji ELISA. Uji ELISA biasanya banyak dilakukan untuk monitoring hasil vaksinasi. Bahan utama yang diperlukan dalam uji ELISA adalah KIT yang berkualitas sehingga mampu memberikan hasil uji yang akurat. Uji banding KIT Elisa untuk deteksi antibodi penyakit Jembrana telah dilakukan di Laboratorium PMPP Pusat Veteriner Farma Surabaya dari tanggal 22 sampai dengan 25 Desember 2015. Uji ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kesesuaian antara KIT ELISA JD yang diproduksi oleh Pusvetma dengan BBVet Denpasar sebagai laboratorium rujukan untuk diagnosa penyakit Jembrana. Hasil uji banding menunjukkan KIT ELISA JD produksi Pusvetma memberikan kesesuaian yang sangat baik dengan nilai Kappa 0.86. (*Excellent agreement*) Selain itu hasil uji sensitivitas dan spesifitas KIT ELISA JD tersebut berturut-turut 91.3 % dan 94.7%. Dari hasil uji banding dapat disimpulkan bahwa KIT ELISA JD produksi Pusvetma sudah dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi JD setelah mendapatkan nomor registrasi dari POH karena memiliki kesesuaian yang baik dengan KIT ELISA JD BBVet Denpasar.

Kata kunci : Penyakit Jembrana. Uji Elisa dan uji banding

Abstract

One of method for diagnosis of Jembrana disease can be done by the ELISA test. It is usually done for monitoring the results of the vaccination. The qualified ELISA Kit is mainly needed for the test so as to provide accurate test results. Comparative test for the detection of antibodies Jembrana disease has been carried out in the laboratory of Pusat Veteriner Farma Surabaya since 22 until 25 December 2015. The purpose of this test to determine the degree of correspondence between ELISA KIT JD production by Pusvetma with BBVet Denpasar as the reference laboratory for the diagnosis of Jembrana disease. The comparative test results showed ELISA KIT JD production by Pusvetma provide an excellent conformity with Kappa value of 0.86. (*Excellent agreement*) and the test results of sensitivity and specificity of the ELISA KIT is 91.3% and 94.7%. From the comparative test results can be concluded that the ELISA KIT JD production by Pusvetma can already be used to detect antibodies JD after obtaining the registration number of POH because it has a good conformity with ELISA KIT JD BBVet Denpasar

Key word: Jembrana disease, Elisa test, comparative test

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit Jembrana merupakan salah satu penyakit hewan menular yang termasuk dalam daftar Penyakit Hewan Menular strategis (PHMS). Saat ini penyakit Jembrana /Jembrana disease (JD) telah endemik di beberapa daerah di Indonesia seperti di Bali, Lampung, Bengkulu, Sumatra Selatan, Sumatra Barat, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Jambi dan Riau. Salah satu upaya pencegahan JD adalah dengan jalan vaksinasi. Untuk mengetahui tingkat keberhasilan vaksinasi biasanya akan dilakukan pengambilan sampel serum pasca vaksinasi dan selanjutnya akan dilakukan uji ELISA. Uji Elisa merupakan uji serologis yang pertama dikembangkan untuk diagnosa JD Uji ELISA untuk deteksi antibodi JD pada mulanya menggunakan antigen sukrose N90, yang dibuat dari *whole Jembrana virus* yang dalam proses produksinya selalu membutuhkan hewan donor (sapi Bali) dan ultracentrifuge. Untuk menghindari proses produksi antigen N 90 yang mahal tersebut maka diupayakan untuk membuat antigen dengan teknik rekombinan protein Sejak tahun 2003 adopsi teknik pembuatan antigen dengan teknik rekombinan protein telah berhasil dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar dan digunakan untuk antigen ELISA dan *Western Immunoblotting*. Produksi rekombinan protein ini bertujuan untuk mendapatkan antigen baru sebagai pengganti antigen sucrose untuk menghasilkan diagnosa yang cepat dan akurat. Mengingat produksi antigen dan KIT bukan tugas pokok dan fungsi BBVet Denpasar maka pada tahun 2009 dilakukan alih teknologi produksi antigen rekombinan tersebut ke Pusvetma.

Setelah produksi antigen rekombinan protein tersebut berhasil diadopsi oleh Pusvetma maka dilakukan produksi KIT Elisa untuk deteksi antibodi Jembrana. Sebelum diedarkan ke pasaran sebagai KIT diagnostik maka KIT ELISA JD perlu dilakukan beberapa pengujian seperti uji banding sehingga hasil uji dari KIT tersebut dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Sesuai dengan Surat Keputusan Menteri Pertanian No : 89/Kpts/PD 620/1/2012 : Balai Besar Veteriner Denpasar ditunjuk sebagai laboratorium rujukan untuk diagnosa Penyakit Jembrana. Berdasarkan hal tersebut maka uji banding Kit ELISA JD produksi Pusvetma dilakukan dengan BBVet Denpasar.

B. Tujuan.

Uji banding KIT ELISA JD ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kesesuaian hasil uji, KIT ELISA JD produksi Pusvetma dengan KIT ELISA JD BBVet Denpasar serta mengetahui sensitivitas dan spesifisitasnya.

MATERI DAN METODE

A. Materi

Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam uji banding ini antara lain : *multichanel pipet*, mikropipet, mikrotip, inkubator, *Elisa washer* dan *Elisa Reader*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam uji banding ini adalah KIT ELISA JD produksi Pusvetma dan KIT ELISA JD BBVet Denpasar, serum sapi Bali hasil vaksinasi JD koleksi Pusvetma, serum lapangan (hasil vaksinasi JD) dari Kalimantan Selatan dan Kalimantan Timur.

B. Metode

Uji banding KIT ELISA JD untuk deteksi antibodi Jembrana dilakukan di Laboratorium PPMPP Pusat Veteriner Farma Surabaya dari tanggal 22 sampai dengan 25 Desember 2015. Pelaksanaan uji banding dilakukan dengan cara menguji serum yang sudah diketahui identitasnya, pengujian dilakukan secara duplo menggunakan dua macam KIT yang berbeda (KIT ELISA JD Pusvetma dan BBVet Denpasar), dengan prosedur kerja sebagai berikut:

Plate yang sudah dilapisi antigen diblok dengan menggunakan 50 µl *skim milk* 5% diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruangan. Selanjutnya plate dicuci 3 kali dengan PBST. Serum sampel diencerkan 1 :100 dengan *skim milk* 5% sedangkan serum kontrol negatif diencerkan mulai 1:100 s/d 1:200 serta serum kontrol positif diencerkan 1 :100 s/d 1: 400. Masukkan masing masing serum tersebut kedalam *well* plate uji dengan cara duplo, selanjutnya plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Plate dicuci kembali dengan PBST. Konjugat antibovine Ig.G Horse radish peroxidase diencerkan dengan perbandingan 1:2000 selanjutnya 50 µl dari konjugat yang telah diencerkan tersebut ditambahkan ke semua *well*. Plate diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam. Cuci plate 3 kali dengan PBST. Tambahkan ke masing-masing *well* 50 µl substrate Horse Radish Peroxidase yang sudah diencerkan 1 : 9. Biarkan selama 2 menit. Stop reaksi yang terjadi dengan cara menambahkan semua *well* 50 µl asam oksalat 2%. Baca reaksi pada *Elisa reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

Interpretasi hasil dilakukan dengan membandingkan nilai OD sampel dengan nilai OD kontrol positif 1 :100. Jika nilai OD sampel lebih besar atau sama dengan nilai OD pengenceran

kontrol positif 1 : 100 maka sampel dikatakan positif. Bila sebaliknya, nilai OD sampel lebih kecil dari nilai OD kontrol positif 1 :100 maka sampel dikatakan negatif.

Untuk melihat tingkat kesesuaian antara KIT Elisa JD Pusvetma dengan BBVet Denpasar maka dilakukan, analisa berdasarkan *Agreement between Test* (Kappa) Vierra dan Garret 2005, dan Robertson 2008.

HASIL

Hasil uji banding dari masing-masing KIT Elisa dicatat selanjutnya direkapitulasi dalam bentuk tabel data hasil uji banding disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1.

Data Hasil uji Banding KIT ELISA Jembrana Pusvetma dan BBVet Denpasar.

KIT ELISA JD PUSVETMA			KIT ELISA JD BBVET DENPASAR		
No	Kode Sampel	Hasil Uji	No	Kode Sampel	Hasil Uji
1	PV3	Negatif	1	PV3	Negatif
2	PV9	Negatif	2	PV9	Negatif
3	J14	Negatif	3	J14	Negatif
4	45	Positif	4	45	Positif
5	32	Positif	5	32	Positif
6	18	Negatif	6	18	Negatif
7	29	Negatif	7	29	Negatif
8	20	Negatif	8	20	Negatif
9	3	Negatif	9	3	Positif
10	23	Negatif	10	23	Negatif
11	9	Negatif	11	9	Negatif
12	54	Negatif	12	54	Negatif
13	30	Negatif	13	30	Negatif
14	5	Negatif	14	5	Negatif
15	160	Positif	15	160	Positif
16	33	Negatif	16	33	Negatif
17	40	Positif	17	40	Positif
18	120	Negatif	18	120	Negatif
19	23	Negatif	19	23	Negatif
20	1	Negatif	20	1	Negatif
21	35	Negatif	21	35	Negatif
22	122	Negatif	22	122	Positif
23	30	Negatif	23	30	Negatif
24	JDV17.1	Negatif	24	JDV17.1	Negatif

25	JDV 17.2	Positif	25	JDV 17.2	Positif
26	JDV17.3	Positif	26	JDV17.3	Positif
27	JDV17.4	Positif	27	JDV17.4	Positif
28	JDV17.5	Positif	28	JDV17.5	Positif
29	JDV17.6	Positif	29	JDV17.6	Positif
30	JDV17.7	Positif	30	JDV17.7	Positif
31	JDV17.8	Positif	31	JDV17.8	Positif
32	JDV 17.9	Positif	32	JDV 17.9	Positif
33	JDV17.10	Positif	33	JDV17.10	Positif
34	JDV17.11	Positif	34	JDV17.11	Positif
35	JDV17.12	Positif	35	JDV17.12	Positif
36	JDV17.13	Positif	36	JDV17.13	Positif
37	JDV17.14	Positif	37	JDV17.14	Positif
38	JDV17.15	Positif	38	JDV17.15	Positif
39	JDV17.16	Positif	39	JDV17.16	Positif
40	JDV17.17	Positif	40	JDV17.17	Positif
41	JDV17.18	Positif	41	JDV17.18	Positif
42	JDV17.19	Positif	42	JDV17.19	Negatif

Ket: Data Uji Banding dianalisis berdasarkan *agreement between test* (kappa) (Vierra dan Garrett, 2005, Robertson, 2008).

$$\text{Kappa} = \frac{(Po - Pe)}{1 - Pe}$$

Keterangan :

$$Po : \text{Observed agreement} = \frac{(a+d)}{n}$$

$$Pe : \text{Expected agreement} =$$

$$\frac{[(a+c) \times (a+b)]}{n} + \frac{[(b+d) \times (c+d)]}{n}$$

- a : Jumlah hasil uji positif KIT ELISA BBVet Denpasar dan KIT ELISA Pusvetma
 b : Jumlah hasil uji positif KIT ELISA Pusvetma dan negatif KIT ELISA BBVet Denpasar
 c : Jumlah hasil uji positif KIT ELISA BBVet Denpasar dan negatif KIT ELISA Pusvetma
 d : Jumlah hasil uji negatif KIT ELISA BBVet Denpasar dan KIT ELISA Pusvetma
 n : Jumlah keseluruhan sampel yang diuji (a+b+c+d).

TABULASI HASIL UJI BANDING KIT ELISA JEMBRANA (KIT ELISA JD) PUSVETMA DAN BBVET DENPASAR.

Hasil Uji	Kit BBVet Positif	Kit BBve Negatif	Total
Kit Pusvetma (+)	a	b	a+b
Kit Pusvetma (-)	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	n(a+b+c+d)

Interpretasi Nilai Kappa

- > 0,8 - 1 = Excellen Agreement
 0,6 - 0,8 = Substantial Agreement
 0,4 - 0,6 = Moderate Agreement
 0,2 - 0,4 = Fair Agreement
 0,0 - 0,2 = Slight Agreement
 0,0 = Poor Agreement
 -1 - 0 = Disagreement

HASIL UJI BANDING

Hasil Uji	Kit BBVet Positif	Kit BBvet Negatif	Total
Kit Pusvetma (+)	21	1	22
Kit Pusvetma (-)	2	18	20
Total	23	19	42

Hasil analisa Kappa = 0.86 (*Excellent Agreement*).

MENGHITUNG SENSITIVITAS DAN SPESIVISITAS KIT ELISA JD

$$\text{Sensitivitas Kit ELISA JD Pusvetma} = \frac{21}{23} \times 100\% = 91.3\%$$

$$\text{Spesivisitas Kit ELISA JD Pusvetma} = \frac{18}{19} \times 100\% = 94.7\%$$

PEMBAHASAN

Hasil uji laboratorium dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain : bahan uji/KIT yang berkualitas, metode uji yang memiliki sensitivitas dan spesivisitas yang tinggi, serta sumber daya manusia yang memiliki ketrampilan yang memadai. Salah satu cara untuk mengetahui kehandalan bahan uji dan metode uji tersebut adalah dengan cara melakukan uji banding.

Menurut SNI ISO/IEC 17043 : 2010 disebutkan bahwa uji banding telah secara luas digunakan secara internasional dan penggunaannya semakin meningkat. Adapun tujuan dilakukannya uji banding adalah : melakukan evaluasi dan pemantauan unjuk kerja mutu laboratorium secara berkelanjutan;

melakukan identifikasi permasalahan di laboratorium serta tindakan untuk perbaikan dan peningkatan; peningkatan kepercayaan pelanggan terhadap laboratorium; identifikasi perbedaan hasil pengukuran antar laboratorium selain itu juga untuk meningkatkan kepercayaan pelanggan.

Menurut Sujarwo, 2014, mengatakan bahwa ada beberapa manfaat dari uji banding antara lain : dari data uji banding yang ada mampu mendeteksi adanya penyimpangan pengujian (metoda, peralatan, pelaksanaan pengujian serta menentukan penyebab masalah yang terjadi dan cara koreksi perbaikan yang harus dilakukan. Selain itu program uji banding merupakan salah satu jaminan mutu hasil uji dalam laboratorium.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan reaksi ikatan antara antigen dengan antibodi dengan bantuan enzim sebagai penanda. ELISA merupakan teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi atau antigen dalam sampel (Crowther 2001; Hartaningsih *et al.*, 1994). Uji Elisa merupakan metoda uji yang bisa dilakukan dalam jumlah besar. Metode uji ELISA yang digunakan pada KIT ELISA JD produksi Pusvetma mengacu kepada KIT ELISA JD yang dikembangkan di BBVet Denpasar (Agustini, 2009 ; Hartaningsih 2002).

Hasil uji banding KIT ELISA JD produksi Pusvetma dengan BBVet Denpasar menunjukkan nilai

Kappa 0.86 (*Excelent Agreement*). Ini mengindikasikan bahwa kesepakatan kesesuaian antara KIT ELISA JD produksi Pusvetma dengan KIT ELISA JD BBVet Denpasar sangat baik, hasil ini dapat terjadi karena antigen yang digunakan berasal dari sumber yang sama. Antigen JD yang dipergunakan pada KIT ELISA JD produksi Pusvetma adalah antigen J Gag 6 *histidine* yang diproduksi dengan teknik rekombinan protein (Agustini, 2009). Menurut Hartaningsih *et al.*, 2002 ada beberapa kelebihan dari teknik rekombinan protein ini antara lain : antigen diproduksi dari bagian spesifik virus JD yaitu Gag6 dimana Gag-6 ini mempunyai perbedaan yang paling besar dengan virus BIV bila dibandingkan dengan bagian Gag lainnya. Dipilihnya Gag-6 ini dengan harapan agar memiliki sensitivitas dan spesivitas tinggi, Adapun kelebihan dari produksi antigen dengan teknik Rekombinan protein adalah : tidak membutuhkan hewan donor/sapi Bali dan ultracentrifugasi dalam proses produksinya (Burkala *et al.*, 1996).

Sensitivitas adalah kemampuan suatu uji untuk mendeteksi sampel yang benar-benar positif terdeteksi positif. Sedangkan spesivitas adalah kemampuan suatu uji untuk mendeteksi sampel yang benar-benar negatif terdeteksi negatif, Nilai sensitivitas dan spesivitas yang dihasilkan KIT ELISA JD Pusvetma masing-masing 91,3% dan 94,7%. Dengan nilai sensitivitas dan spesivitas tersebut diharapkan agar hasil uji KIT ELISA JD tersebut spesifik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari uji banding yang telah dilakukan dapat disimpulkan beberapa hal antara lain:

1. KIT ELISA JD produksi Pusvetma memiliki kesepakatan kesesuaian yang baik dengan KIT ELISA JD BBVet Denpasar dengan nilai Kappa 0.86.
2. Sensitivitas dan spesivitas KIT ELISA JD Pusvetma masing-masing 91.3% dan 94.7%.
3. KIT ELISA JD produksi Pusvetma sudah layak digunakan untuk deteksi antibodi JD.

Saran

Sebelum diedarkan di pasaran KIT ELISA JD produksi Pusvetma perlu mendapatkan nomor registrasi dari Pengawasan Obat Hewan sehingga secara hukum KIT ELISA JD produksi Pusvetma memenuhi persyaratan untuk diperjualbelikan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar dan Kepala Pusat Veteriner Farma Surabaya atas kepercayaan yang diberikan untuk melakukan uji banding ini, Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada staf laboratorium PMPP Pusvetma atas kerjasamanya dalam melakukan uji banding.

Tidak lupa penulis juga mengucapkan terimakasih kepada I Ketut Mayun dan I Wayan Ekaana yang telah membantu kegiatan uji banding ini sehingga bisa berjalan lancar,

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, NLP, and Hartaningsih, N. 2002. Uji Elisa untuk mendeteksi Antibodi Lentivirus Menggunakan Antigen Rekombinan J Gag-6. Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana. Materi Kursus Peningkatan Metode Diagnosa Penyakit Jembrana ACIAR-BPPV VI
- Agustini, NLP. 2009. Protokol Produksi Rekombinan Protein Virus Jembrana J Gag 6 Histidine untuk Diagnosa Serologik penyakit Jembrana
- Burkala, E., Narayani and G.E. Wilcox, 1996. Expression of Recombinant Jembrana Disease Virus Env Protein in *Escherichia coli*, Jembrana Disease and The Bovine Lentriviruses. ACIAR Proceedings No.75,: 150-151
- Hartaningsih, N., Wilcox, G.E., Kertayadnya, G., and Astawa, N. 1994. Antibody response to Jembrana Disease Virus in Bali cattle. Veterinary Microbiology, 39: 15-23
- Hartaningsih, N., Agustini, NLP, and Desport, M. 2002. Pembuatan Rekombinant Protein ELISA Antigen J Gag 6. Manual Diagnosa laboratorik Penyakit Jembrana, Hal : 117-119.
- Crowther John R. 2001 The ELISA Guidebook
- Robertson, L. 2008. VET 641. Principles of Epidemiology Reader, Murdoch University Perth : 148-149
- Sujarwo, 2014. Program Uji Profisiensi, Uji Banding Laboratorium. BMD. PT Bisa Mandiri Strategi. Investasi Street Consulting Services.
- Vierra, A.J. and J.M. Garret . 2005. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic Research Series 37(5): 361-363

