

## EVALUASI KIT DETEKSI CEPAT TERHADAP SAMPEL OTAK ANJING TERINFEKSI VIRUS RABIES

### *Evaluation of Rapid Detection Kit against Brain Samples Infected with Rabies Virus*

Michael Haryadi Wibowo<sup>1</sup>, Tri Untari<sup>1</sup>, Sidna Artanto<sup>1</sup>, Surya Amanu<sup>1</sup>, AETH. Wahyuni<sup>1</sup>, dan  
Widya Asmara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta  
E-mail: mhwibowo@ugm.ac.id

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi kit deteksi cepat *Anigen*<sup>®</sup> *rapid test kit rabies Ag* dalam mendeteksi virus rabies pada sampel otak anjing yang diperoleh dari lapangan yang meliputi batas deteksi, kecepatan reaksi, uji sensitivitas, dan spesifisitas. Batas deteksi ditentukan dengan pengenceran secara serial kontrol positif virus rabies dan selanjutnya diuji dengan *rapid test kit* sesuai petunjuk produsen. Uji reaksi silang dilakukan dengan *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella* sp. Uji sensitivitas dan spesifisitas dilakukan terhadap sampel otak yang telah dikonfirmasi positif rabies dengan uji *fluorescent antibody technique*. Konfirmasi uji *rapid test* tersebut dilakukan dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction*. Berdasarkan data yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *Anigen*<sup>®</sup> *rapid test kit rabies Ag* mampu mendeteksi sampel yang mengandung virus rabies dengan titer  $0,5 \times \log 10^{6.5}/0,03$  ml, dengan rata-rata kecepatan reaksi 1,8 menit 29,35 detik (kurang dari 2 menit). Di samping itu *Anigen*<sup>®</sup> *rapid test kit rabies* menunjukkan tidak terdapat reaksi silang dengan *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella* sp. serta mempunyai sensitivitas 92,30% dan spesifisitas 97,90%.

Kata kunci: rabies, deteksi, potensi, imunokromatografi

#### ABSTRACT

This study was aimed to determine the potency of *anigen*<sup>®</sup> *rapid test kit rabies Ag* for the detection of rabies virus in the brain samples obtained from field. Some tests carried out were the potential test include detection limit, time limit of reaction to achieve the result, cross-reaction test, sensitivity and specificity test. The detection limit was done by serial dilution of positive control virus and to be tested using the rapid detection test as recommended by manufacture's protocol. Cross reaction test was done to detect antigens other than rabies virus, e.g.: *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* sp. Sensitivity and specificity test were applied to brain samples which were confirmed as rabies virus positive by fluorescent antibody technique. To confirm of the result of rapid test was then being done by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Based on these results it can be concluded that, *Anigen*<sup>®</sup> *rapid test kit rabies Ag* is able to detect antigen-containing samples having titer up to  $0.5 \times \log 10^{6.5}/0.03$  mL with the average time to perform final result was less than 2 minutes. Further more *Anigen*<sup>®</sup> *rapid test kit rabies* showed no cross-reaction with *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* sp. The kit showed sensitivity and specificity were 92.3% and 97.9% respectively.

Key words: rabies, detection, potency, immunochromatography

#### PENDAHULUAN

Penyakit rabies merupakan penyakit infeksi tertua yang telah dikenali sejak zaman Yunani kuno, 2300 BC. Penyakit tersebut dapat menyerang semua hewan berdarah panas, termasuk manusia, bersifat fatal, dan mematikan. Pada dasarnya penyakit rabies merupakan penyakit primer pada hewan golongan Canidae, seperti anjing, serigala, *fox*, dan *jackhals*. Penyakit rabies di negara yang telah maju banyak terjadi secara alami pada hewan-hewan liar. Hewan liar yang dapat bertindak sebagai penyebar rabies ke hewan lain antara lain *skunk* dan kelelawar penghisap darah di Amerika, *fox* dan *wolve* di Eropa. Kasus rabies di negara berkembang banyak dilaporkan terjadi pada anjing, kucing, hewan ternak, dan manusia. Gejala klinis rabies ada dua bentuk, yaitu *furious*/kegilaan dan paralitik. Bentuk klinis kegilaan teramati antara lain hewan tampak *nervous*, agresif, menggigit apa saja, dan hidropobia. Virus yang telah mencapai saraf menyebabkan encephalitis yang ditandai dengan bentuk paralisis. Pada tahap akhir penyakit teramati koma dan kematian biasanya terjadi setelah 2-14 hari dari gejala klinis (Yousaf *et al.*, 2012).

Penyebab penyakit rabies adalah Rhabdovirus yang termasuk keluarga Rhabdoviridae dan genus Lyssavirus. Rhabdovirus merupakan virus *ribonucleic acid* (RNA) untai tunggal, polaritas negatif, dan terdiri atas lima protein struktural, yaitu nukleoprotein (N), nukleokapsid yang berasosiasi dengan fosfoprotein (P), matriks (M), glikoprotein (G), dan polimerase (L) (Tordo, 1996; Murphy *et al.*, 2000). Berdasarkan analisis tingkat gen pada studi epidemiologi, protein N merupakan salah satu protein yang bersifat sangat lestari pada virus rabies. Amplop glikoprotein yang disandi oleh gen G, bertanggung jawab pada pengikatan reseptor dan infeksi pada sel hospes. Protein G tersebut juga merupakan target utama respons imun dan oleh karenanya penting dalam program vaksinasi rabies (Tordo, 1996; Murphy *et al.*, 2000; Assenberg *et al.*, 2010; Yousaf *et al.*, 2012). Diagnostik tingkat molekular pada umumnya ditujukan dengan mengamplifikasi gen N dan G tersebut (Sacramento *et al.*, 1992; Schaefer *et al.*, 2005; Susetya *et al.*, 2005; Nishizono *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 20012; Dibia *et al.*, 2014).

Wabah rabies di Asia terutama dilaporkan menginfeksi dan disebarkan pada anjing. Tingkat kematian rabies pada orang di Asia dan Afrika

diperkirakan mencapai 55.000 ribu per tahun, meskipun data riil bisa lebih tinggi dari yang dilaporkan (Knobel *et al.*, 2005; Yousaf *et al.*, 2012). Kasus rabies di Indonesia terjadi pertama kali dilaporkan tahun 1884 pada hewan kerbau, sedangkan pada tahun 1889 dilaporkan pada anjing, dan manusia yang terjadi di Jawa Barat (Anonimus, 2000). Penyebaran rabies terus meluas ke berbagai daerah di P. Jawa, P. Sumatera, dan P. Sulawesi. Pulau Bali, P. Nusa Tenggara Barat, P. Maluku, Kalimantan Barat, dan Papua dinyatakan bebas penyakit rabies sampai pada tahun 1999. Kasus rabies di Flores dilaporkan sejak pada tahun 1997 (Windiyansih *et al.*, 2004; Scott-or *et al.*, 2008), sedangkan P. Bali yang pada awalnya merupakan daerah bebas rabies sampai akhir November 2008 (Susilawathi *et al.*, 2012), sejak akhir tahun 2008, P. Bali dilaporkan menjadi daerah wabah rabies yang tertuang dalam Peraturan Menteri Pertanian nomor 1637.1/2008, tanggal 1 Desember 2008 (Suparta *et al.*, 2009; Clifton, 2010) dan endemis sampai sekarang.

Pada umumnya penyakit rabies bersifat fatal oleh karena itu pada awalnya diagnosis berdasarkan gejala klinis yang teramati. Peneguhan diagnosis dilakukan di laboratorium dengan pemeriksaan histopatologi otak dan diketemukannya *negri bodies* bernilai diagnostik rabies (Teierkel dan Atanasu, 1996). Diagnosis rabies yang direkomendasikan oleh WHO dan OIE sebagai *gold standard* adalah uji *fluorescent antibody technique* (FAT). Dewasa ini teknik molekuler telah dikembangkan untuk mengamplifikasi genom virus rabies sebagai sarana diagnosis modern. Salah satu metode deteksi tersebut adalah deteksi RNA virus dari sampel otak, saliva, dan jaringan yang terinfeksi (Susilawathi *et al.*, 2012) yang dilakukan dengan metode *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Uji tersebut mempunyai sensitivitas jauh lebih baik, dapat mencapai 100-1000 kali lebih sensitif (OIE, 2009). Menurut Susilawathi *et al.* (2012) deteksi virus rabies dengan RT-PCR menunjukkan sensitivitas sangat tinggi, mencapai 100%. Kendala utama uji tersebut adalah diperlukan sarana dan prasarana diagnosis yang memadai, PCR *mix* perlu dilakukan pada kondisi dingin, serta perlu dilakukan oleh tenaga yang terlatih.

Dewasa ini banyak dikembangkan diagnosis cepat yang berbasis reaksi imunologi untuk memenuhi kebutuhan alat deteksi cepat dan tepat yang dapat diaplikasikan di lapangan, sehingga penanganan kasus rabies dapat dilakukan dengan tepat dan cepat. Model uji imunokromatografi telah dikembangkan dan memiliki beberapa kelebihan, yaitu mudah dilakukan, dapat dikerjakan oleh seseorang tanpa keahlian khusus, tidak diperlukan sarana laboratorium khusus, dan dapat digunakan di tempat kejadian penyakit (Kang *et al.*, 2007; Fooks *et al.*, 2009). Metode imunokromatografi strip tersebut juga diteliti oleh Nishizono *et al.* (2008), dengan menggunakan antibodi monoklonal yang mengenali epitop II dan III nukleoprotein virus rabies. Metode tersebut diyakini sederhana dan cepat untuk mendeteksi virus rabies. Menurut Markotter *et al.*

(2009) kit deteksi cepat diperlukan dan dapat diaplikasikan di lapangan, terutama pada daerah yang minim sarana dan prasarana diagnosis rabies atau daerah dengan kendala transportasi sampel ke laboratorium diagnostik.

Salah satu sarana deteksi cepat yang dikembangkan oleh pabrik Bionote Inc., Korea adalah *Anigen<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag*. Produk deteksi cepat ini diharapkan dapat diaplikasi dan digunakan sebagai sarana diagnosis awal di lapangan, sebelum dilakukan konfirmasi lebih lanjut di laboratorium. Penelitian ini bertujuan melihat kemampuan deteksi dengan mengevaluasi potensi, stabilitas, sensitivitas, dan spesifisitas kit deteksi cepat rabies tersebut.

## MATERI DAN METODE

### Materi

Materi penelitian yaitu *Anigen<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag* dengan nomor lot yang berbeda yang diproduksi Bionote Inc., Korea dengan waktu kedaluwarsa atau *expired date* (ED) satu tahun 07-08-2010 nomor lot 1801044, kit dengan ED 9 bulan, dengan batas ED tanggal 14-11-2010 nomor lot 1801047; dan kit deteksi yang belum ED yaitu dengan batas ED tanggal 14-12-2011, dengan nomor lot 1801054; kit ekstraksi RNA; kit amplifikasi RT-PCR; dan elektroforesis dengan sarana pendukungnya. Untuk kontrol positif digunakan virus rabies galur Pasteur yang diinaktivasi dengan beta propiolakton (koleksi Pusat Veterina Farma (Pusvetma), Surabaya), untuk kontrol negatif digunakan *phosphate buffered saline* (PBS). Sampel yang diuji diambil dari gerusan otak anjing (koleksi Balai Besar Veteriner (BBV), Wates dan Balai Penyelidikan Penyakit Hewan (BPPH), Lampung) yang menunjukkan gejala sakit rabies dan telah dikonfirmasi positif rabies dengan uji FAT. Uji reaksi silang menggunakan *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella* sp.

### Metode

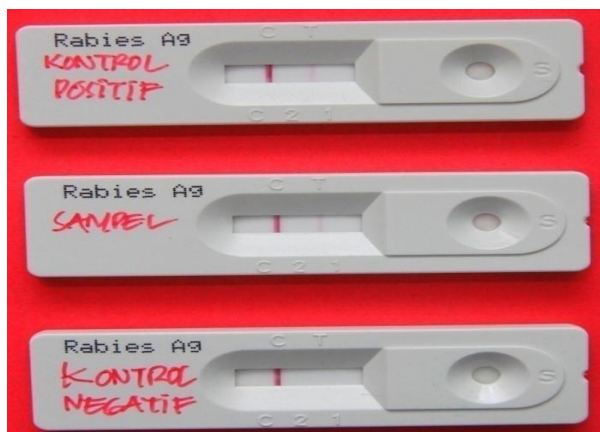
Metode yang digunakan untuk melakukan pengujian batas deteksi, kecepatan waktu reaksi, uji stabilitas, uji reaksi silang, dan uji sensitivitas-spesifisitas berdasarkan prosedur uji yang dilakukan oleh produsen *Anigen<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag* dengan modifikasi dan amplifikasi genom virus rabies dengan RT-PCR.

### Prosedur Pengujian dengan *Anigen<sup>®</sup> Rapid Test Kit Rabies Ag*

*Swab* sampel dimasukkan ke dalam tabung spesimen yang mengandung 1 ml *diluents assay*, kemudian dicampur. Sampel diambil dengan menggunakan *dropper* yang tersedia dan dipindahkan dalam *tube*. Alat tes diambil dan ditempatkan di permukaan yang rata dan kering. Dengan menggunakan *dropper* ditambahkan 4-5 tetes supernatan dari sampel ke dalam lubang sampel. Uji berjalan baik apabila terlihat warna ungu bergerak melalui jendela hasil di

bagian tengah alat tes. Apabila migrasi tidak tampak setelah 1 menit, ditambahkan lagi satu tetes sampel ke dinding lubang sampel. Hasil dapat dibaca 5-10 menit kemudian. Pembacaan tidak boleh lebih dari 10 menit. Kontrol positif sampel berupa virus yang sudah diketahui nilai LD<sub>50</sub>, sedangkan untuk kontrol negatif sampel berupa saliva anjing sehat dan gerusan otak tikus sehat, kemudian diuji dengan prosedur yang sama.

Hasil negatif apabila hanya muncul satu garis warna (C) pada jendela hasil sedangkan hasil positif apabila muncul 2 garis warna (C dan T) pada jendela hasil tanpa mempedulikan garis yang muncul lebih dahulu seperti yang disajikan pada Gambar 1. Hasil *invalid* apabila garis ungu tidak muncul setelah dilakukan pengujian dan harus diulang dengan spesimen yang sama.



**Gambar 1.** Contoh foto hasil uji *Anigen*<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag. Hasil positif pada sampel dan kontrol positif ditunjukkan teramati dua garis pada C dan T dan hasil negatif pada kontrol negatif teramati satu garis pada C saja

### Pengujian Batas Kemampuan Deteksi, Kecepatan Waktu Reaksi, dan Stabilitas Kit

Virus rabies *strain* Pasteur yang telah dikembangkan di Laboratorium Pusvetma sebagai kontrol positif dengan titer log 10<sup>6.5</sup>, diencerkan serial 1, 1/4, 1/8, dan 1/16, kemudian masing-masing enceran diuji dengan *Anigen*<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag dan dikonfirmasi dengan uji RT-PCR. Kontrol negatif digunakan PBS. Menurut produsen batasan deteksi alat ini adalah titer 10<sup>2.0</sup> LD<sub>50</sub>/0,03 ml.

Kecepatan waktu reaksi diuji seperti prosedur yang disarankan oleh produsen. Waktu reaksi dicatat saat mulai terjadi perubahan warna ungu pada garis uji (C dan T) dari *Anigen*<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag. Uji stabilitas kit dilakukan dengan menguji kit yang telah ED selama 1 tahun, yaitu 07-08-2010 dengan nomor lot 1801044, kit deteksi yang telah ED selama 9 bulan 14-11-2010, dengan nomor lot 1801047, dan kit deteksi yang belum ED, yaitu 14-12-2011 nomor lot 1801054.

### Uji Reaksi Silang

Uji reaksi silang dilakukan terhadap beberapa agen patogen yang lain, yaitu *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella* sp.

### Uji Sensitivitas dan Spesifisitas

Untuk mengetahui tingkat sensitivitas dan spesifisitas *Anigen*<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag, hasil uji rapid test tersebut terhadap sampel otak yang sudah dikonfirmasi positif rabies, yang dikoleksi BPPH wilayah Lampung dan BBV Wates, Daerah Istimewa Yogyakarta, kemudian dikonfirmasi dengan metode RT-PCR. Sampel yang diuji berupa gerusan otak yang diambil dengan menggunakan *swab* steril.

Isolasi RNA virus rabies dilakukan dengan menggunakan *Micro-to Midi RNA isolation kit* (Invitrogen, USA) sesuai dengan prosedur standar yang disarankan oleh Invitrogen. Pada prinsipnya, sejumlah 0,2 ml suspensi otak anjing ditambahkan ke dalam 0,2 ml larutan pelisis yang mengandung 0,002 ml β-mercaptoethanol. Campuran tersebut, kemudian disentrifugasi pada 12.000xg selama 2 menit suhu 25° C (*refrigerated microcentrifuge*, model 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Selanjutnya supernatan dipindahkan ke dalam tabung bersih dan ditambah dengan 0,2 ml etanol absolut, kemudian dimasukkan ke dalam *RNA spin cartridge*, dan disentrifugasi pada 12.000xg selama 15 menit 25° C. *Cartridge* dicuci satu kali dengan 0,7 ml *wash buffer I* dan satu kali dengan 0,5 ml *wash buffer II*. *Cartridge* tersebut kemudian dipindahkan ke dalam *RNA recovery tube*. RNA diperoleh dengan melakukan elusi *cartridge* tersebut dengan 0,03 ml *RNAse-free water* dengan cara disentrifus dengan kecepatan 12.000xg selama 2 menit 25° C. Suspensi RNA yang diperoleh, kemudian dipakai untuk *template* pada reaksi RT-PCR.

Amplifikasi gen G virus rabies dilakukan dengan metode RT-PCR. Reaksi dilakukan dengan kit *superscript III-one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen) menggunakan *gene-amp PCR system 2400* (Applied Biosystem, USA). Amplifikasi dilakukan dengan primer untuk mengamplifikasi protein G virus (Sacramento *et al.*, 1992), yang menghasilkan amplicon target sebesar 902 nt. Susunan primer yang digunakan adalah F: primer G (5' GACTTGGGTCCCAATGGG-3') R: Primer G (5'-CAAAGGAGAGTTGTAGTC-3') dan primer RAVNIF: GCAGATAGGATAGAGCAAAT (S) RAFNIR: AAAGTGAATGAGATTGAACA (AS). Kontrol positif merupakan virus rabies *strain* Pasteur, yang dikembangkan oleh Pusvetma, Surabaya sebagai *seed* vaksin rabies di Indonesia, sedangkan kontrol negatif menggunakan PBS.

Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel *agarose* 2% dan pewarnaan dengan *sybr*<sup>®</sup> safe deoxyribonucleic acid (DNA) gel stain (Invitrogen). Pita DNA yang teramplifikasi diamati di dalam ruangan gelap menggunakan UV *transluminator*, untuk selanjutnya didokumentasi.

### Penentuan Sensitivitas dan Spesifisitas

Uji sensitivitas dan spesifisitas menggunakan Tabel 2x2 menurut Stevenson (2005) dengan membandingkan hasil uji rapid test dengan uji RT-PCR.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kemampuan Deteksi, Kecepatan Reaksi, dan Stabilitas Anigen® Rapid Test Kit Rabies

Uji kemampuan deteksi Anigen® rapid test kit rabies Ag dilakukan dengan pengenceran bertingkat terhadap kontrol positif virus rabies yang telah dikarakterisasi di Laboratorium Pusvetma Surabaya, dengan titer virus uji adalah log 10<sup>6,5</sup>. Virus rabies terdeteksi sampai dengan pengenceran 1/4 dari titer virus kontrol log 10<sup>6,5</sup>, sedangkan pengenceran virus 1/6 dan seterusnya menunjukkan hasil negatif. Kemampuan deteksi Anigen® rapid test kit rabies Ag tersebut menunjukkan bahwa kit masih mampu mendeteksi virus rabies strain Pasteur yang diinaktivasi menggunakan beta propiolakton sampai dengan titer 0,5 x log 10<sup>6,5</sup>/0,03 ml. Kang *et al.* (2007), melaporkan batas deteksi rapid immunodiagnostic test (RIDT) produksi Anigen sebesar 10<sup>1,7</sup> LD<sub>50</sub>/0,03 ml dengan menggunakan virus rabies galur Era (strain vaksin yang digunakan di Korea). Perbedaan ini kemungkinan terjadi karena beberapa faktor, antara lain karena perbedaan strain virus rabies dan perlakuan inaktivasi sampel. Deteksi virus rabies menggunakan Anigen® rapid test kit rabies Ag memiliki sensitivitas lebih rendah dibandingkan dengan metode RT-PCR, meskipun demikian kit tersebut memiliki kelebihan dibanding RT-PCR dalam kecepatan deteksi dan kemudahan aplikasi sehingga tidak harus ditangani personal laboran yang terlatih. Menurut Servat *et al.* (2012) RIDT produksi BioNote Inc. Korea, mampu membuktikan bahwa kit deteksi tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi virus rabies dalam kisaran genotipe yang cukup luas, yaitu genotipe 1,2 (Lagos Bat virus), genotipe 3 (Mokola virus), serta mampu mendeteksi semua genotipe virus rabies di Eropa, dikenal sebagai genotipe 1, termasuk European Bat Lyssavirus 1 dan 2 atau yang dikenal sebagai genotipe 5 dan 6, yang terdistribusi di Eropa dan Barat Laut Eropa.

Uji kecepatan reaksi Anigen® rapid test kit rabies Ag pada 20 sampel positif menunjukkan rata-rata garis pada indikator tes muncul setelah 1,8 menit 29,35 detik (Tabel 1). Hasil penelitian ini sangat bersesuaian dengan Markotter *et al.* (2009) yang menyatakan uji kecepatan reaksi RIDT produksi Anigen mampu memberikan hasil kurang dari dua menit, mudah diamati, dan tanpa hasil yang meragukan, serta tidak teramati reaksi yang tidak spesifik. Hasil serupa dilaporkan oleh Servat *et al.* (2012), yaitu bahwa garis indikator teramati pada kisaran waktu 2-5 menit. Kecepatan reaksi dilaporkan lebih lama, yaitu dicapai dalam waktu 15 menit dihasilkan dari perangkat diagnostik cepat yang didesain dengan prinsip imunokromatografi terhadap antigen N virus rabies (Nishizono *et al.*, 2008). Sampai saat ini direct rapid immunodiagnostic test, dianggap merupakan metode deteksi antigen yang paling cepat dan membutuhkan waktu pengerjaan 5-10 menit (Lembo *et al.*, 2006). Sejauh ini apabila dibandingkan dengan uji RT-PCR

maka kit deteksi tersebut mampu memberikan data jauh lebih cepat untuk dapat dibaca hasilnya. Pada umumnya lama waktu uji RT-PCR untuk dapat dilihat hasilnya, memerlukan waktu 4 sampai 5 jam.

Uji stabilitas Anigen® rapid test kit rabies Ag terhadap kit yang sudah kedaluwarsa selama 1 tahun ED 08-08-2010, menunjukkan hasil bahwa diantara 15 sampel positif yang diperiksa, 13 sampel adalah positif atau sebesar 84,61%. Pengujian dengan kit yang telah kedaluwarsa selama 9 bulan (ED 14-12-2010) teramati bahwa sebanyak 12 sampel positif yang diperiksa, terdeteksi 100% positif. Hasil yang sama (100%) ditunjukkan oleh kit deteksi yang belum melampaui batas kedaluwarsa, yaitu kit deteksi yang mempunyai ED 14-12-2011. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kit deteksi yang diperiksa memiliki stabilitas yang cukup tinggi. Anigen® rapid test kit rabies Ag merupakan perangkat diagnostik menggunakan prinsip imunokromatografi yang tersusun dari sample pad, gold pad, nitrocellulose paper, dan absorption pad yang disatukan dalam plastic cassettes, serta dikemas dalam kantong plastik yang diberi dessicant. Dessicant menjaga suasana dalam kantong tetap kering dan tidak lembab. Penyimpanan kit deteksi dalam kondisi yang kering akan meningkatkan stabilitas kit. Dalam melakukan uji cepat ini cukup sederhana, tanpa memerlukan tambahan alat laboratorium yang rumit, seperti inkubator, refrigerator, dan tanpa perlakuan khusus seperti kondisi dingin. Hal tersebut juga ditegaskan oleh Reta *et al.* (2013) bahwa proses uji cepat RIDT tidak perlu tambahan alat laboratorium, sarana uji sudah tersedia lengkap dalam kit uji tersebut, mudah dilakukan dan cepat, serta kit dapat disimpan pada suhu kamar.

**Tabel 1.** Uji kecepatan reaksi Anigen® rapid test kit rabies Ag

| No.       | Sampel (Kode) | Kecepatan reaksi |       |
|-----------|---------------|------------------|-------|
|           |               | Menit            | Detik |
| 1.        | W1            | 3                | 9     |
| 2.        | W1            | 2                | 32    |
| 3.        | W1            | 1                | 34    |
| 4.        | W1            | 3                | 40    |
| 5.        | W1            | 1                | 28    |
| 6.        | W1            | 1                | 34    |
| 7.        | Y1            | 3                | 14    |
| 8.        | Y1            | 2                | 41    |
| 9.        | Y1            | 2                | 37    |
| 10.       | Y1            | 2                | 53    |
| 11.       | Y1            | 1                | 57    |
| 12.       | Y1            | 2                | 36    |
| 13.       | Y1            | 1                | 54    |
| 14.       | Y1            | 2                | 2     |
| 15.       | Y1            | 2                | 20    |
| 16.       | Y1            | 2                | 3     |
| 17.       | Y1            | 1                | 53    |
| 18.       | Y1            | 2                | 0     |
| 19.       | Y1            | 2                | 11    |
| 20.       | L1            | 1                | 29    |
| Rata-rata |               | 1,8              | 29,35 |

**Uji Reaksi Silang**

Hasil uji reaksi silang *Anigen® rapid test kit rabies Ag* menunjukkan kit tidak beraksi silang dengan *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, dan *canine parvovirus* (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan Kang *et al.* (2007) yang melaporkan tidak ada reaksi silang kit deteksi cepat produksi *Anigen* dengan *canine distemper virus* (CDV), *pseudorabies virus*, *infectious bovine rhinotracheitis* (IBR), *porcine encephalomyocarditis virus*, *Japanese encephalitis virus*, *porcine respiratory and reproductive syndrome* (PRRS), *bovine viral diarrhoea* (BVD), serta *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella suis*.

**Tabel 2.** Hasil uji reaksi silang dengan *canine parvovirus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella sp.*

| Nomor rapid test | <i>canine parvovirus</i> (*) | <i>Escherichia coli</i> (**) | <i>Salmonella sp</i> (**) |
|------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |
| 2                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |
| 3                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |
| 4                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |
| 5                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |
| 6                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |
| 7                | Negatif                      | Negatif                      | Negatif                   |

(\*): Virus vaksin *canine parvovirus* produksi Merial, distribusi oleh PT. Romindo. (\*\*): Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* koleksi laboratorium Mikrobiologi, FKH UGM.

**Uji Sensitivitas dan Spesifisitas**

Sampel uji yang digunakan untuk uji *Anigen® rapid test kit Rabies Ag* berupa gerusan otak yang berasal dari BPPH Lampung dan BBV Wates, Kulon Progo, D.I. Yogyakarta, yang telah dikonfirmasi positif dengan uji FAT. Berdasarkan data uji *Anigen® rapid test kit rabies Ag* dibandingkan dengan uji RT-PCR menunjukkan hasil seperti tertera pada Tabel 3.

**Tabel 3.** *Anigen® rapid test kit rabies Ag* vs RT-PCR (sebagai pembandingan)

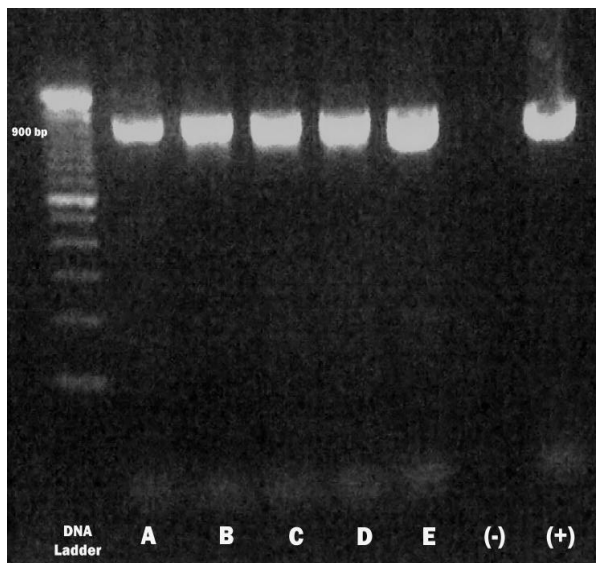
|               | RT-PCR positif | RT-PCR negatif | Total |
|---------------|----------------|----------------|-------|
| Rapid positif | 12             | 1              | 13    |
| Rapid negatif | 1              | 47             | 48    |
| Total         | 13             | 48             | 61    |

Perhitungan sensitivitas  $(12 \times 100\%) / 13 = 92,3\%$ , sedangkan spesifisitas adalah  $47 / 48 = 97,9\%$ . Perhitungan akurasi hasil uji tersebut  $(12 + 47) / 61 \times 100\% = 96,7\%$ . Hasil pengujian *Anigen® rapid test kit rabies Ag* dalam penelitian ini dibandingkan dengan metode RT-PCR menunjukkan sensitivitas 92,3% dan spesifisitas 97,9%, akurasi uji *Anigen® rapid test kit rabies Ag* 96,7%. Hasil uji kappa menunjukkan kesesuaian uji *Anigen® rapid test kit rabies Ag* dengan RT-PCR sangat tinggi, yaitu 0,9. Satu dari 13 sampel otak yang teridentifikasi positif menggunakan RT-PCR, terdeteksi negatif dengan *Anigen® rapid test kit rabies Ag*. Hasil uji *false negative* tersebut kemungkinan disebabkan oleh jumlah virus yang

terdapat dalam sampel sangat sedikit sehingga melampaui batas kemampuan deteksi. Kang *et al.* (2007) melaporkan bahwa batas deteksi oleh RIDT kit adalah  $10^{1.7} LD_{50} / 0,03$  ml, sedangkan batas deteksi untuk RT-PCR adalah  $10^{0.5} LD_{50} / 0,03$  ml. Persentase *false negative* sampel menggunakan *Anigen® rapid test kit rabies Ag* dibandingkan dengan RT-PCR dalam penelitian ini adalah sebesar 1/13 (7,69%). Kang *et al.* (2007) melaporkan persentase *false negative* menggunakan RIDT produksi *Anigen* mendekati hasil sama, yaitu sebesar 8,3%. Penelitian lain yang membandingkan berbagai metode deteksi, yaitu isolasi virus, FAT, RT-PCR, dan RIDT menunjukkan hasil yang cukup memuaskan. Sensitivitas dan spesifisitas isolasi virus, FAT, dan RT-PCR dalam mendeteksi virus rabies dari sampel lapangan, masing-masing 100%, sedangkan RIDT mempunyai sensitivitas 95% dan spesifisitas 98,9% (Yang *et al.*, 2012).

Berdasarkan data penelitian ini, menunjukkan bahwa *Anigen® rapid test kit rabies Ag* dapat diaplikasikan pada kondisi lapangan (suhu kamar), mudah dilakukan, tanpa diperlukan alat laboratorium, dapat digunakan pada sampel otak yang sudah disimpan lama, cepat memperoleh hasil, mempunyai sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Keunggulan tersebut memungkinkan kit deteksi yang diuji dapat digunakan dan disertakan sebagai sarana/alat deteksi tambahan di lapangan dalam rangka surveilans rabies, terutama untuk daerah terpencil yang sarana laboratorium diagnostiknya sangat terbatas atau daerah yang terdapat hambatan transportasi sampel ke laboratorium diagnostik. Namun demikian untuk kepentingan interpretasi hasil pada kasus rabies di lapangan, meskipun persentase *false negative* RIDT relatif kecil, perlu dilakukan konfirmasi dengan metode uji yang lain, seperti histopatologi dengan diketemukannya *negri bodies* bernilai diagnostik (Teierkel dan Atanasu, 1996), uji FAT (OIE, 2009), maupun deteksi pada tingkat genom yang dilakukan dengan metode RT-PCR. Pada umumnya metode RT-PCR mempunyai target amplifikasi fragmen gen N (Schaefer *et al.*, 2005; Nishizono *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2012; Dibia *et al.*, 2014) dan gen G (Sacramento *et al.*, 1992; Susetya *et al.*, 2005), yang dewasa ini telah banyak dikembangkan dan digunakan untuk diagnosis rabies, terutama jika metode konvensional gagal atau spesimen rusak. Keunggulan utama metode RT-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus rabies dalam sampel yang telah rusak atau mengalami dekomposisi. Hal tersebut tidak dapat dilakukan dengan uji konfirmasi FAT (Beltran *et al.*, 2014). Amplifikasi gen G dengan primer spesifik yang didesain oleh Sacramento *et al.* (1992) dalam penelitian ini menghasilkan produk amplifikasi 900 bp, sesuai dengan target amplifikasi (Gambar 2). Meskipun metode RT-PCR dapat digunakan dalam konfirmasi kasus rabies dengan hasil yang sangat dapat dipercaya (Dibia *et al.* 2014), tetapi deteksi rabies dengan RT-PCR tersebut tidak disarankan

untuk pengujian rutin, karena sensitivitasnya terlalu tinggi, sehingga kadang menghasilkan *false positive* (OIE, 2009).



**Gambar 2.** Foto contoh hasil amplifikasi gen G virus rabies teramati pita DNA sebesar 900 bp. Kode A sampai E adalah sampel yang diperiksa, (-): kontrol negatif, (+) kontrol positif

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji lapangan ini dapat ditarik kesimpulan bahwa *Anigen<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag* mempunyai kemampuan mendeteksi virus rabies yang diinaktivasi sampai dengan titer  $0,5 \times \log 10^{6,5}/0,03\text{ml}$  dan menunjukkan stabilitas cukup tinggi. Uji kecepatan reaksi kit menunjukkan rata-rata garis pada indikator tes muncul setelah 1,8 menit 29,35 detik. Hasil uji reaksi silang menunjukkan bahwa *Anigen<sup>®</sup> rapid test kit rabies Ag* tidak beraksi silang dengan *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, dan *canine parvovirus*, serta mempunyai sensitivitas 92,3%, dan spesifisitas 97,9%.

## UCAPAN TERIMA KASIH.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Direktur Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian, Kepala Balai Besar Veteriner Wates, D.I. Yogyakarta, Kepala BPPH. Lampung dan Kepala Pusvetma Surabaya, atas izin dan perkenannya menggunakan sampel uji dan virus rabies standar serta segala fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung. Terima kasih disampaikan kepada drh. M. Munawaroh, MM. dan direktur serta seluruh jajaran pimpinan PT. Mega Medika Mandiri yang telah memberikan kepercayaan dan mendukung dana untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2000. Petunjuk Pemberantasan Rabies di Indonesia. Departemen Kesehatan RI, Direktorat Jendral PPM dan PPL. [www.depkes.go.id/downloads/rabies.pdf](http://www.depkes.go.id/downloads/rabies.pdf).
- Assenberg, R., O. Delmas, B. Morin, S.C. Graham, X.D. Lamballarie, C. Laubert, B. Coutard, J.M. Grimes, J. Neyts, R.J. Owens, B.W. Brandt, A. Gorbalenya, P. Tucker, D.I. Stuart, B. Canard, and H. Bourhy. 2010. Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. *Antiviral Res.* 87(2):149-161.
- Beltran, F.J., F.G. Dohmen, H.D. Pietro, and D.M. Cisterna. 2014. Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in adequate condition. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8(8):1016-1021.
- Clifton, M. 2010. How not to fight a rabies epidemic: A history in Bali. *Asian Biomedic.* 4:1-8.
- Dibia I.N., B. Sumiarto, H. Susetya A.A.G.P. Putra, I.G.N.K. Mahardika, H. Scott-orr. 2014. Diagnosis and molecular marker analysis of Bali's rabies virus isolates. *J. Vet.* 15(3):288-297.
- Fooks, A.R., N. Johnson, C.M. Freuling, P.R. Wakeley, A.C. Banyard, L.M. McElhinney, D.A. Marston, A. Dastjerdi, E. Wright, R.A. Weiss, and T. Muller. 2009. Emerging technology for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21<sup>st</sup> century. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3(9):e530 doi:10.1371/journal.pndt.0000530.
- Kang, B., J. Oh, C. Lee, B. Park, Y. Park, K. Hong, K. Lee, B. Cho, and D. Song. 2007. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. *J. Vir. Method.* 145:30-36.
- Knobel, D.L., S. Cleaveland, P.G. Coleman, and E.M. Fevere. 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.* 83:1-11.
- Lembo, T., M. Niezgod, A. Velasco-Villa, S. Cleaveland, E. Ernest, and C.E. Rupprecht. 2006. Evaluation of direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg. Infect. Dis.* 12:310-313.
- Markotter W., D. York, C.T. Sabeta, W. Shumba, G. Zulu, K.L. Roux, and L.H. Nel. 2009. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for detection of African Lyssaviruses from brain material. *Onderstepoort J. Vet. Research.* 76:257-262.
- Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek, and M.J. Studdert. 2000. *Veterinary Virology*. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, United State of America.
- Nishizono, A., P. Khawplod, K. Ahmed, K. Goto, S. Shiota, K. Mifune, T. Yasui, K. Takayama, Y. Kobayashi, K. Mannen, V. Tepsumethanon, C. Mitmoonpitak, S. Inoue, and K. Morimoto. 2008. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol. Immunol.* 52(4):243-249.
- OIE. 2009. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine. Office International des Epizooties. [http://www.oie.int/fi.../df/2.01.13\\_RABIES.pdf](http://www.oie.int/fi.../df/2.01.13_RABIES.pdf).
- Reta, T., S. Teshale, A. Deresa, A. Ali, G. Getahun, M.P.O. Baumann, T. Muller, and C.M. Freuling. 2013. Evaluation of rapid immunodiagnostic test for rabies diagnosis using clinical brain samples in Ethiopia. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.* 2(3):1-3.
- Sacramento, D., H. Badrane, H. Bourhy, and N. Tordo. 1992. Molecular epidemiology of rabies virus in France: Comparison with Vaccine Strains. *J. Gen. Virol.* 73:1149-1158.
- Schaefer, R., H.B.R. Batista, A.C. Franco, F.A.M. Rijsewijk, and P.M. Roeche. 2005. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Vet. Microbiol.* 107:161-170.
- Scott-or, H., J. Bingham, G. Saunder, I.N. Dibia, A.A.G. Putra, and M. Geong. 2008. Potential eradication of rabies from Flores in Indonesia. [www.sciquest.org.nz/.../T3-2.3.6](http://www.sciquest.org.nz/.../T3-2.3.6).
- Servat, A., E.P. Meyer, E. Robardet, Z. Muzniece, K. Must, and F. Cliquet. 2012. Evaluation of a rapid immunochromatographic diagnostic test for the detection of rabies from brain material of European mammals. *J. Biologicals.* 40:61-68.
- Stevenson, M. 2005. *An Introduction to Veterinary Epidemiology*. Epicerter, IVABS, Massey University, Private Bag 11-222, Palmerstone North, New Zealand.
- Suparta, I.K.E., G. Setiaji, K. Wirata, D.H. Hartawan, A.A.G. Putra, D.M.N. Dharma, Soegiharto, dan E.H. Djusa. 2009. Kasus rabies pertama kali di Propinsi Bali. *Buletin Veteriner.* 21(74):7-12.
- Susetya, H., I. Naoto, M. Sugiyama, and N. Minamoto. 2005. Genetic analysis of glycoprotein gene of Indonesia virus rabies. *Indo. J. Biotech.* 10(1):795-800.
- Susilawathi N.M., A.E. Darwinata, I.B.N.P. Dwija, N.S. Budayanti, G.A.K. Wirasandhi, K. Subrata, N.K. Susilarini, R.A.A. Sudewi, F.S. Widnall, and G.N.K. Mahardika. 2012. Epidemiological and clinical features of human rabies cases in Bali 2008 – 2010. *BMC Infect. Dis.* 12(81):1-8.

- Teierkel, E.S. and P. Atanasiu. 1996. Rapid Microscopic Examination for Negri Bodies and Preparation of Specimen for Biological Test. In **Laboratory Techniques in Rabies**. Meslin, F.X., M.M. Kaplan, and H. Koprowski (Eds.). 4<sup>th</sup> ed. World Health Organization. New York.
- Tordo, N. 1996. Characteristic and Molecular Biology of The Rabies Virus. In **Laboratory Techniques in Rabies**. Meslin, F.X., M.M. Kaplan, and H. Koprowski (Eds.). 4<sup>th</sup> ed. World Health Organization. New York.
- Windyaningsih C., H. Wilde, F.X. Meslin, T. Suroso, and H.S. Widarso. 2004. The rabies epidemic on Flores Island, Indonesia (1998-2003). **J. Med. Assoc. Thai.** 87:1389-1393.
- Yang D.K., E.K. Shin, Y.I. Oh, C.S. Lee, S. Y. Kim, J.A. Lee, and J.Y. Song. 2012. Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. **J. Vet. Sci.** 13(1):43-48.
- Yousaf, M.Z., M. Qasin, S. Zia, R.M. Khan, U.A. Ashfaq, and S. Khan. 2012. Rabies: Molecular biology, diagnosis, prevention, and treatment. **Virol. J.** 9:(50): 1-5.