

# Deteksi Antigen Virus Rabies pada Preparat Ulas Otak dengan *direct Rapid Immunohistochemistry Test*

Damayanti R<sup>1</sup>, Rahmadani I<sup>2</sup>, Fitria Y<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

E-mail: agusrini@indo.net.id

<sup>2</sup>Balai Veteriner Bukittinggi, Jl. Raya Bukittinggi-Payakumbuh Km. 14, Bukittinggi

(Diterima 19 Desember 2013 ; disetujui 10 Maret 2014)

## ABSTRACT

Damayanti R, Rahmadani I, Fitria Y. 2013. Antigen detection of rabies virus in brain smear using direct Rapid Immunohistochemistry Test. JITV 19(1): 52-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i1.994>

Rabies is zoonotic disease caused by a fatal, neurotropic virus. Rabies virus is classified into the Genus of *Lyssavirus* under the yang family of *Rhabdoviridae*. Rabies affecting hot-blooded animals, as well as human. Dogs, cats, monkeys are the vectors or reservoirs for rabies and the virus was transmitted through the saliva after infected animal's bites. The aim of this study was to conduct rapid diagnosis to detect rabies viral antigen in brain smear using immunohistochemical (IHC) method namely direct Rapid Immunohistochemical Test (dRIT). A total number of 119 brain samples were achieved from Bukittinggi Veterinary Laboratory, West Sumatra. Standardisation and validation of the method were compared to Fluorescent Antibody Test (FAT) as a golden standard for rabies diagnosis. Results show that dRIT was a very good method, it can be performed within two hours without the need of fluorescent microscope. The samples were tested using FAT and from 119 samples tested, 80 (67.23%) samples were positive for rabies and 39 (32.77%) samples were negative for rabies whereas using dRIT showed that 78 (65.54%) samples were positive for rabies and 41 (34.45%) samples were negative for rabies. The dRIT results were validated by comparing them with FAT results as a golden standard for rabies. The relative sensitivity of dRIT to FAT was 97.5% and the relative specificity to FAT was 100% (with Kappa value of 0.976, stated as excellent). The achievement showed that dRIT is very potential diagnostic tool and is highly recommended to be used widely as a rapid diagnosis tool for rabies.

**Key Words:** Rabies, Antigen Detection, Immunohistochemistry, Direct Rapid Immunohistochemical Test (dRIT)

## ABSTRAK

Damayanti R, Rahmadani I, Fitria Y. 2013. Deteksi antigen virus rabies pada preparat ulas otak dengan metode *direct Rapid Immunohistochemistry Test*. JITV 19(1): 52-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i1.994>

Rabies merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus neurotropik yang bersifat fatal. Virus rabies tergolong pada genus *Lyssavirus* yang termasuk ke dalam family *Rhabdoviridae*. Penyakit rabies menyerang hewan berdarah panas dan manusia, dengan vektor atau reservoir meliputi anjing, kucing dan kerbau. Virus rabies ditularkan melalui gigitan hewan yang positif rabies melalui salivanya. Penelitian ini bertujuan untuk mengaplikasikan metode diagnosis cepat untuk mendeteksi virus rabies baik pada organ otak dengan metode imunohistokimia (IHK) yang disebut dengan *direct Rapid Immunohistochemical Test* (dRIT) pada preparat ulas/ sentuh. Sebanyak 119 organ otak telah diperoleh dari Balai Veteriner Bukittinggi, Sumatera Barat, yang dipakai pada standarisasi dan validasi metode dRIT pada penelitian ini. Hasil yang dicapai sangat memuaskan, pewarnaan dapat dilakukan dalam 2 jam dan hasil dapat dibaca tanpa menggunakan mikroskop fluoresent. Dari ke 119 sampel yang diuji, dengan *Fluorescent Antibody Test* (FAT) menunjukkan 80 (67,23%) sampel positif rabies dan 39 (32,77%) sampel negatif rabies. Hasil dRIT menunjukkan 78 (65,54%) sampel positif rabies dan 41 (34,45%) sampel negatif rabies. Hasil pemeriksaan dengan dRIT ini divalidasi dan dibandingkan dengan hasil menggunakan golden standard untuk diagnosis rabies yaitu FAT sehingga sensitivitas dan spesifisitas untuk FAT masing-masing dianggap bernilai 100%. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa dRIT sensitivitas relatifnya terhadap FAT yaitu sebesar 97,5% dan spesifisitas relatifnya terhadap FAT mencapai 100% (dengan nilai Kappa 0,976 yang tergolong istimewa). Hasil tersebut menandakan bahwa dRIT sangat potensial untuk direkomendasikan sebagai uji diagnosa cepat untuk rabies.

**Kata Kunci:** Rabies, Deteksi Antigen, Imunohistokimia, *Direct Rapid Immunohistochemical Test* (dRIT)

## PENDAHULUAN

Rabies merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus neurotropik dari genus *Lyssavirus* yang termasuk family *Rhabdoviridae*. Materi genetik virus tersusun atas RNA yang terdiri dari 6 serotipe

*Lyssavirus*. Virus rabies termasuk dalam serotipe 1, *Lagos bat virus* termasuk dalam serotipe 2, *Makola rhabdovirus* termasuk serotipe 3, *Duvenhage rhabdovirus* termasuk serotipe 4, *European bat Lyssavirus* (EBL) dibagi dalam 2 biotipe yaitu EBL 1

dan EBL 2, juga termasuk dalam genus *Lyssavirus*, akan tetapi tidak jelas termasuk dalam serotipe yang mana (OIE 2008).

Penyakit rabies menyerang hewan berdarah panas termasuk manusia dan sebagai vektor atau reservoir adalah anjing, kucing dan kerbau. Hewan yang terserang rabies ditandai dengan 3 bentuk gejala klinis yaitu bentuk tenang, galak (*furious*) dan tidak khas (Jackson 2002).

Virus rabies ditularkan melalui gigitan hewan positif rabies melalui salivanya dan diteruskan ke ujung saraf terluka melalui luka gigitan atau jilatan pada kulit yang luka, dan melalui akson hingga ke susunan syaraf pusat (SSP) sehingga menimbulkan ensefalo-mielitis akut. Peradangan ini terjadi di seluruh otak dan sumsum tulang belakang. Virus tidak saja terdapat di SSP, tetapi juga di kelenjar liur, kelenjar air mata, glandula suprarenalis dan pankreas, namun dalam penularan rabies, hanya kelenjar ludah memegang peranan yang sangat penting (Jackson 2002).

Menurut data *World Health Organization* (WHO 1996), rabies terjadi di 92 negara dan bahkan bersifat endemik di 72 negara. Rabies masih dianggap penyakit penting di Indonesia karena bersifat fatal dan dapat menimbulkan kematian serta berdampak psikologis bagi orang yang terpapar.

Sampai tahun 2005 daerah bebas Rabies di Indonesia hanya meliputi Jawa, Bali, NTB dan Papua. Namun kemudian pada tahun 2005 sampai sekarang Jawa Barat kemudian terjadi wabah sporadis di beberapa kota dan berdasarkan KepMentan Nomor 1637.1, 1 Desember 2008 Bali dinyatakan terjangkit wabah rabies dan KepMentan Nomor 1696, tanggal 12 Desember 2008 menetapkan Propinsi Bali sebagai Kawasan Karantina Penyakit anjing gila/rabies (Kepmentan 2008). Diantara 33 propinsi di Indonesia hanya sembilan propinsi yang masih dinyatakan bebas yaitu DKI Jakarta, Jateng, Jatim, DIY, Papua, Papua Barat, Bangka Belitung, Kepulauan Riau dan Nusa Tenggara Barat (Soegiarto 2010).

Diagnosa rabies berdasarkan gejala klinis saja memiliki beberapa kelemahan, oleh karena itu diperlukan pemeriksaan laboratorium untuk memperoleh diagnosa yang tepat. Beberapa diagnosa laboratorium yang rutin dilakukan untuk pemeriksaan rabies antara lain *Fluorescence Antibody*

*Test* (FAT) merupakan *gold standard* untuk diagnosa rabies yang ditetapkan oleh OIE (2008) karena sensitifitas FAT mencapai 97-99%. Apabila sampel yang diuji menunjukkan hasil negatif rabies dengan FAT (biasanya setelah pengulangan 3 kali), maka akan dilakukan *Mouse Inoculation Test* yang merupakan uji biologis pada mencit.

Selain FAT, pewarnaan Seller's juga sering dilakukan untuk mendeteksi antigen rabies. Pada

prinsipnya preparat sentuh otak diwarnai dengan pewarna Seller's kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya untuk menentukan ada tidaknya *Negri bodies* rabies (Atanasiu et al. 1996).

Menurut Rahmadani (2012) beberapa teknik diagnosa yang lain telah dikenal meskipun tidak secara rutin digunakan, yakni histopatologi, imunohistokimia pada blok paraffin, kultur sel untuk isolasi virus, *nucleic acid probes* atau *polymerase chain reaction* (PCR) diikuti sekuensing DNA. Uji serologik untuk mendeteksi keberadaan antibodi dapat dilakukan dengan menggunakan *virus neutralization test* (VNT), *indirect enzyme linked immunosorbent assay* (i-ELISA), *rapid fluorescence focus inhibition test* (RFFIT), *passive haemagglutination test* (PHA) dan *fluorescence inhibition micro test* (FIMT).

Penelitian ini bertujuan untuk mengaplikasikan metode diagnosis cepat untuk mendeteksi virus rabies baik pada organ otak dengan metode imunohistokimia (IHK) yang disebut dengan *direct Rapid Immunohistochemistry Test* (dRIT) pada preparat ulas/sentuh. Metode ini diperkenalkan oleh Lembo et al (2006) dan dikembangkan pemanfaatannya di negara yang sedang berkembang oleh Duur et al. (2008). Selain itu pada pertemuan '*OIE-Global Conference on Rabies Control-Towards Sustainable Prevention at the Source*' yang diadakan di Incheon, Republic of Korea, 7-9 September 2011, dRIT juga direkomendasikan sebagai alternatif diagnosis untuk Rabies (Fooks 2011). Pewarnaan IHK pada organ otak yang dibuat pada preparat sentuh otak dengan dRIT dapat dipakai sebagai salah satu alternatif uji diagnosis cepat (2 jam) untuk rabies tanpa menggunakan mikroskop *fluorescent*.

Pada penelitian ini hasil pemeriksaan dengan dRIT ini akan dibandingkan dengan hasil dari *golden standard* untuk diagnosis rabies yaitu FAT. Jika uji tersebut sudah dapat diaplikasikan dengan mantap maka diharapkan uji ini dapat diaplikasikan di setiap laboratorium veteriner di Indonesia.

## MATERI DAN METODE

### Kegiatan pengambilan sampel

Koleksi sampel dilakukan di Balai Veteriner Bukittinggi, Sumatra Barat pada tanggal 20-26 Mei 2012 dan 8-13 Juli 2012. Pengujian terhadap FAT dan pewarnaan Seller's sepenuhnya dilakukan di Balai Veteriner Bukittinggi, oleh staf di laboratorium tersebut. Selanjutnya kedua data tersebut nantinya akan dibandingkan dengan hasil pengujian dRIT. Apabila hasil pengujian FAT negatif maka dilakukan pengulangan 3 kali dan jika tetap negatif maka dilanjutkan dengan uji biologis pada mencit.

## Jenis sampel

Sampel yang dikoleksi berupa organ otak segar, beku dan otak segar yang sudah difiksasi dalam larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) ber pH 7.4 dan gliserol 50%.

## Pengujian Fluorescent Antibody Test (FAT)

*Fluorescent Antibody Test* merupakan uji *gold standard* untuk diagnose rabies. Prinsip dari FAT adalah apabila pada preparat sentuh yang berasal dari otak hewan bagian *hipocampus* atau *medula oblongata* asal hewan yang diduga rabies difiksasi dengan aseton 30 menit pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ , kemudian direaksikan dengan antibodi yang dikonjugasi dengan substrat *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) dan diamati pada mikroskop *fluorescence*. Hasil positif didapatkan akibat dari reaksi antigen-antibodi kompleks (WHO 1996) yang berwarna hijau *fluorescence* dengan ukuran bervariasi. Hasil negatif jika tidak memberikan warna *fluorescence* (Dean et al. 1996)

Pada penelitian ini FAT dikerjakan sepenuhnya oleh staf Balai Veteriner Bukittinggi.

## Pewarnaan Seller's

Preparat sentuh yang diwarnai dengan pewarnaan Seller's akan memberikan gambaran badan inklusi berwarna merah magenta dengan *inner granule* berwarna biru atau violet (WHO 1996). Menurut OIE (2008) metode ini hanya baik jika dilakukan pada spesimen yang segar karena tidak memberikan sensitifitas yang baik pada spesimen yang telah diawetkan dalam PBS/gliserin. Uji ini dikerjakan sepenuhnya oleh staf Balai Veteriner Bukittinggi.

## Uji biologis

Uji biologis dilakukan jika uji FAT hasilnya negatif setelah diulang tiga kali. Uji ini dilakukan dengan cara mensuspensikan otak hewan yang diduga rabies ke dalam 10% NaCl fisiologis kemudian disuntikkan pada 6 ekor mencit dengan dosis masing-masing 0,03 ml. Dilakukan observasi selama 3-4 minggu jika didapatkan mencit yang mati segera dilakukan uji FAT untuk memastikan penyebab kematian mencit karena virus (Koprowski 1996; OIE 2011).

Uji ini dikerjakan sepenuhnya oleh staf Balai Veteriner Bukittinggi.

## Pewarnaan imunohistokimia (IHK) dengan metode *direct Rapid Immunohistochemistry Test* (dRIT)

Pada mulanya, pewarnaan IHK dilakukan pada blok paraffin yang didasari oleh reaksi antigen antibodi

kompleks sehingga apabila pada jaringan organ mengandung antigen virus rabies direaksikan dengan antibodi monoklonal terhadap rabies maka antigen tersebut dapat dideteksi dan divisualisasikan dengan substrat (pewarna/*chromagen*) tertentu, misalnya 3,3 diamino benzidine tetrahydrochloride (DAB) atau 3-amino 9-ethyl carbazole (AEC) (Hsu et al. 1981; Van Noorden 1986). Imunohistokimia yang diacu berdasarkan metode *polymer labeling two-step method* (Ramos-Vara & Miller 2006) yang telah dimodifikasi, dengan menggunakan reagen kit *polyvalent* (universal) *detection system* Real™ Envision™ (K5007 DAKO®, Denmark).

Dalam perkembangannya kemudian metode ini dirancang untuk dapat mendeteksi antigen virus rabies pada preparat sentuh dari organ otak dengan metode *direct Rapid Immunohistochemical Test* yang hanya memerlukan 1,5-2 jam pengujian tanpa menggunakan mikroskop *fluorescent* (CDC 2006). Hal ini dilakukan karena metode pewarnaan konvensional H & E dan pewarnaan Seller's partikel virus yang biasa disebut dengan *Negri body*, relatif sulit untuk dideteksi dan memerlukan keahlian dan ketelitian yang tinggi.

Sampel yang berupa preparat sentuh dari organ otak dapat diperoleh dari sampel otak segar, potongan organ beku ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) atau organ otak yang difiksasi dalam larutan PBS yang berisi gliserol 50%. Preparat dikeringkan di udara selama 5 menit, kemudian difiksasi dengan larutan formalin 10% yang sudah dibuffer (BNF) selama 10 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS-Tween 3 x 5 menit dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% ditambahkan selama 20 menit untuk memblokir peroksidase endogen. Antibodi monoklonal terhadap rabies (JenoBiotech, Korea) yang konsentrasinya sudah distandarisasi melalui *checkerboard titration* (dalam hal ini dipakai 1:100) ditambahkan dan diinkubasikan selama 15 menit. Tahap berikutnya preparat dicuci dengan PBS 3 x 5 menit, diberi Envision™ (DAKO, Denmark) yang diinkubasikan selama 15 menit dan dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. Visualisasi antigen dapat dilakukan dengan penambahan substrat DAB (DAKO, Denmark) dan preparat lalu *dicounterstain* dengan hematoxilin dan preparat diberi perekat DPX dan diberi *coverslips*. Prosedur detail diadopsi dari *Center Disease Control* (CDC), Atlanta, USA (2006) dengan beberapa modifikasi sebagai berikut : proses perendaman preparat dalam BNF, PBS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan akuades (CDC 2006) pada penelitian ini dimodifikasi dengan cara preparat diteteskan dengan reagen tersebut (efisiensi biaya)

## Pembacaan hasil

Hasil pewarnaan dievaluasi di bawah mikroskop dengan pembesaran 20 kali atau 40 kali dengan hasil sebagai berikut:

Positif	=	Ditemukan <i>Negri bodies</i> pada lokasi intrasitoplasmik di dalam neuron
Badan inklusi (Negri body)	=	Berwarna merah (AEC) atau coklat (DAB) pada area intrasitoplasmik sel neuron dan pada jaringan interstitial otak
Sitoplasma	=	Berwarna biru muda
Inti sel neuron	=	Berwarna biru tua

dimana  $P_a - P_c$  menunjukkan derajat persetujuan yang diharapkan dan  $1 - P_c$  menunjukkan derajat persetujuan yang sesungguhnya (Viera & Garret 2005). Fleis (1981) dalam Widhiarso (2013) mengklasifikasi tingkat reliabilitas antar *rater* sebagai berikut:

Kappa < 0,4	=	Buruk ( <i>bad</i> )
Kappa 0,4-0,60	=	Cukup ( <i>fair</i> )
Kappa 0,60-0,75	=	Memuaskan ( <i>good</i> )
Kappa > 0,75	=	Istimewa ( <i>excellent</i> )

### Penentuan spesifisitas, sensitifitas dan nilai Kappa

Spesifisitas merupakan proporsi dari hewan sehat dalam suatu populasi yang dinyatakan dengan hasil uji negatif sedangkan sensitifitas yaitu proporsi dari hewan sakit dalam suatu populasi yang dinyatakan dengan hasil uji positif (OIE 2008). Angka (%) spesifisitas dan sensitifitas dapat diketahui dengan perhitungan menurut OIE (2011) sebagai berikut:

$$\text{Sensitifitas} = \frac{T_{\text{positive}}}{T_{\text{positive}} + F_{\text{negative}}}$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{T_{\text{negative}}}{T_{\text{negative}} + F_{\text{positive}}}$$

- $T_{\text{positive}}$  : Jumlah hewan **sakit** yang memberikan hasil **positif** dengan suatu metode uji
- $F_{\text{positive}}$  : Jumlah hewan **sehat** yang memberikan hasil **positif** dengan suatu metode uji
- $F_{\text{negative}}$  : Jumlah hewan **sakit** yang menghasilkan hasil uji **negatif** dengan suatu metode uji
- $T_{\text{negative}}$  : Jumlah hewan **sehat** yang menghasilkan hasil uji **negatif** dengan suatu metode uji

Di dalam penelitian ini pengujian dRIT dibandingkan sensitivitas dan spesifisitasnya dengan pengujian FAT, yang merupakan *golden standard* untuk diagnosis rabies (OIE 2011) sehingga diperoleh angka sensitifitas dan spesifisitas relatif untuk IHK terhadap FAT. Nilai Kappa pada penelitian ini ditentukan berdasarkan metode yang ditulis oleh Widhiarso (2013). Untuk menghitung nilai Kappa, diperlukan tabel 2 x 2 yang menunjukkan jumlah atau proporsi persetujuan antar *rater*. Nilai Kappa ( $\kappa$ ) didapatkan melalui rumus:

$$P_a = \frac{(A + D)}{(A+B+C+D)}$$

$$P_c = \frac{(A + B) + (A + C) + (C + D) + (B + D)}{(A+B+C+D)^2}$$

$$K = \frac{P_a - P_c}{1 - P_c}$$

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 1 dapat dilihat hasil pengujian rabies untuk metode FAT, metode pewarnaan Seller's, metode dRIT dan uji biologis (inokulasi pada mencit) pada ke 119 sampel. Uji biologis hanya dilakukan apabila sampel yang diuji menunjukkan hasil negatif dengan FAT. *Fluorescent Antibody Test* merupakan *golden standard* untuk uji rabies yang sensitivitas dan spesifisitasnya dianggap 100% (OIE 2011). Jika dengan uji FAT menunjukkan hasil meragukan atau negatif maka dilakukan uji berupa *mouse inoculation test* yaitu dengan menginfeksi mencit secara *intra-cereblar* dengan suspensi organ otak dari sampel yang diuji. Mencit diamati klinisnya dan jika mati dalam 5-28 hari dengan gejala syaraf maka uji dinyatakan positif rabies (OIE 2011).

Pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1 bahwa sebanyak 39 sampel yang FAT nya negatif ternyata setelah dilakukan uji biologis pada mencit juga menghasilkan uji negatif. Rangkuman hasil dari ke-119 sampel yang diuji dengan FAT, pewarnaan Seller's dan imunohistokimia-dRIT dapat dilihat pada Tabel 2. Dari ke 119 sampel yang diuji, dengan *Fluorescent Antibody Test* (FAT) menunjukkan 80 (67,23%) sampel positif rabies dan 39 (32,77%) sampel negatif rabies sedangkan hasil dRIT menunjukkan 78 (65,54%) sampel positif rabies dan 41 (34,45 %) sampel negatif rabies.

Tabel 3 menunjukkan bahwa pewarnaan Seller's mempunyai sensitifitas relatifnya terhadap FAT yaitu sebesar 51,2 % dan spesifisitas relatifnya terhadap FAT mencapai 100% dengan nilai Kappa 0.666 yang tergolong memuaskan (Widhiarso 2013). Pewarnaan Seller's ini sudah tidak direkomendasikan oleh OIE sebagai metode standar untuk diagnosa rabies karena sensitifitasnya sangat rendah (OIE 2011).

Hasil pemeriksaan dengan dRIT ini divalidasi dan dibandingkan dengan hasil menggunakan *golden standard* untuk diagnosis rabies yaitu FAT sehingga sensititas dan spesifisitas untuk FAT masing masing dianggap bernilai 100%. Hasil pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4 yang menunjukkan bahwa dRIT sensitifitas relatifnya terhadap FAT yaitu sebesar 97,5% dan spesifisitas relatifnya terhadap FAT mencapai 100% dengan nilai Kappa 0,976 yang tergolong istimewa (Widhiarso 2013).

Dari hasil tersebut menandakan bahwa dRIT sangat potensial untuk direkomendasikan sebagai uji diagnosa cepat untuk rabies dengan biaya lebih murah dari FAT karena tidak diperlukan mikroskop fluorescent. Gambar 1 memperlihatkan hasil pewarnaan imunohistokimia dengan metode dRIT: A: kontrol negatif, dimana terlihat preparat ulas dengan sel glia otak berwarna biru

dan tidak terdapat *Negri body*. B: preparat ulas tipis dengan latar belakang sel sel glia berwarna biru dan *Negri body* berwarna coklat pada intra sitoplasma sel neuron dan C menunjukkan preparat ulas tebal dimana *Negri bodies* sangat banyak tersebar pada sitoplasma sel neuron.

**Tabel 1.** Data hasil pemeriksaan rabies tahun 2011-2012 dengan Seller's, FAT, uji biologi dan dRIT

Identifikasi hewan		Hasil pemeriksaan (+)			
Spesies	N	Seller's	FAT	Biologi	dRIT
Anjing	92	37 (40,2%)	70 (76,1%)	0 (0%)	68 (73,9%)
Kucing	14	1 (1,1%)	4 (4,3%)	0 (0%)	5 (5,4%)
Kambing	1	0 (0,0%)	1 (1,1%)	0 (0%)	1 (1,1%)
Kera/Monyet	4	0 (0,0%)	1 (1,1%)	0 (0%)	1 (1,1%)
Kerbau	1	1 (1,1%)	1 (1,1%)	0 (0%)	1 (1,1%)
Sapi	5	1 (1,1%)	3 (3,3%)	0 (0%)	3 (3,3%)
Musang	2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0%)	0 (0,0%)

Uji Biologi hanya dilakukan jika hasil FAT dinyatakan negatif (untuk mengkonfirmasi bahwa sampel benar benar negatif)

**Tabel 2.** Ringkasan hasil pengujian sampel dengan FAT, dRIT dan Seller's

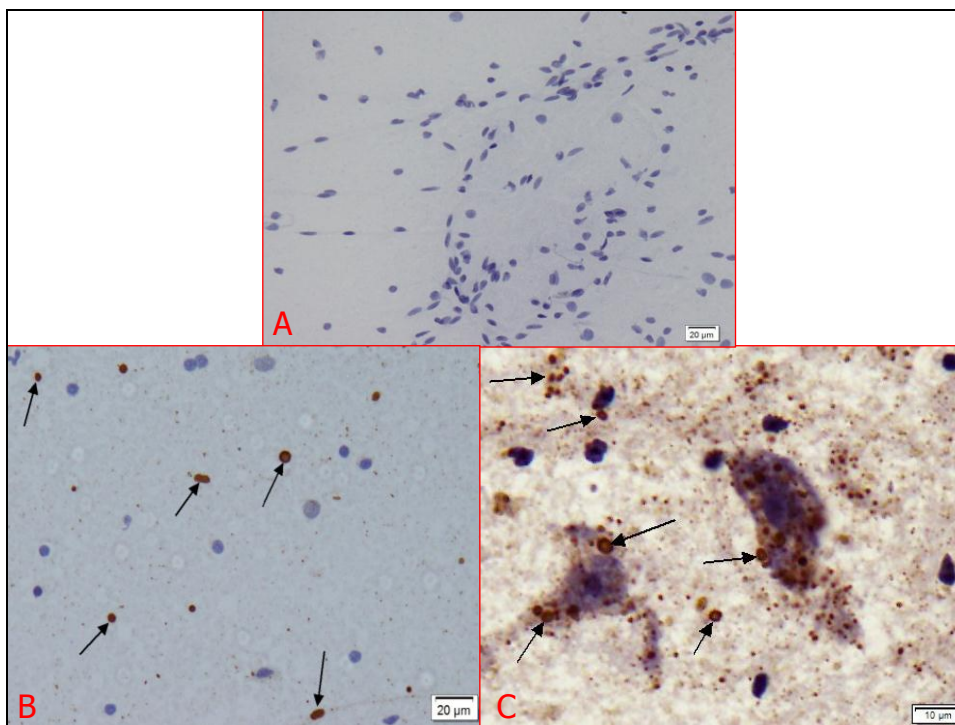
Jenis Uji	Jumlah sampel	Positif	Negatif
FAT	119	80 (67,23%)	39 (32,77%)
dRIT	119	78 (65,54%)	41 (34,45%)
Seller's	119	41(34,45%)	78 (65,54%)

**Tabel 3.** Hasil validasi pengujian Seller's terhadap FAT

	Seler's		Jumlah	%		Nilai Kappa ( $\kappa$ )
	+	-		Sensitifitas	Spesifisitas	
FAT	41	39	80	51,20	100,00	0,666
	0	39	39			
Jumlah	41	78	119			

**Tabel 4.** Hasil validasi pengujian dRIT terhadap FAT

	dRIT		Jumlah	%		Nilai Kappa ( $\kappa$ )
	+	-		Sensitifitas	Spesifisitas	
FAT	78	2	80	97,50	100,00	0,976
	0	39	39			
Jumlah	78	41	119			



**Gambar 1.** Hasil pewarnaan dRIT: A. Kontrol negatif, dRIT, B. dRIT positif, preparat ulas tipis, C. dRIT preparat ulas tebal

Hasil yang dicapai pada penelitian ini menunjukkan bahwa sensitivitas dRIT terhadap FAT mencapai 97,5% kemungkinan karena dua buah sampel yang diuji yaitu sampel nomor 11-26 dan sampel nomor 12-167 uji FAT nya dilakukan tepat pada hari dimana sampel diterima oleh Balai Veteriner Bukittinggi, sedangkan dRIT nya dilakukan jauh setelah itu yaitu pada bulan September 2012 sehingga ada kemungkinan sampel sudah rusak sehingga virus rabies tidak dapat dideteksi dengan dRIT.

Metode ini diperkenalkan oleh Lembo et al (2006) dan dikembangkan pemanfaatannya di negara yang sedang berkembang oleh Duur et al (2008). Selain itu pada pertemuan ‘OIE-Global Conference on Rabies Control-Towards Sustainable Prevention at the Source’ yang diadakan di Incheon, Republic of Korea, 7-9 September 2011, dRIT juga direkomendasikan sebagai alternatif diagnosis untuk rabies (Fooks 2011). Menurut penelitian Lembo et al (2006) sensitivitas dan spesifisitas dRIT keduanya mencapai angka 100% dan sampel dalam fiksatif PBS-gliserol dapat diwarnai setelah disimpan selama 15 bulan atau dalam keadaan beku (*minus* 20°C) selama 24 bulan.

Studi untuk mendeteksi antigen rabies secara imunohistokimia (IHK) konvensional yang dilakukan pada preparat yang berasal dari potongan organ dari

blok parafin menunjukkan bahwa pewarnaan IHK tersebut jika dibandingkan dengan metode standar untuk rabies yaitu *Fluorescent Antibody Technique* (FAT) maka sensitivitas dan spesifisitas relatif untuk IHK yaitu 66,7% dan 77,8% (Damayanti et al, 2009). Jadi metode IHK dRIT yang diterapkan pada penelitian ini sensitivitas dan spesifisitasnya jauh melebihi metode IHK konvensional pada preparat yang berasal dari blok parafin. Selain itu dRIT hanya memerlukan waktu 2 jam sedangkan IHK memerlukan waktu 5 jam dalam pengerjaannya.

## KESIMPULAN

Hasil pemeriksaan dengan dRIT ini divalidasi dan dibandingkan dengan hasil menggunakan *golden standard* untuk diagnosis rabies yaitu FAT dimana sensitivitas dan spesifisitas untuk FAT masing-masing dianggap bernilai 100%. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa dRIT sensitivitas relatifnya terhadap FAT yaitu sebesar 97,5% dan spesifisitas relatifnya terhadap FAT mencapai 100%. Hasil tersebut menandakan bahwa dRIT sangat potensial untuk direkomendasikan sebagai uji diagnosa cepat untuk rabies dengan biaya lebih murah dari FAT karena tidak diperlukan mikroskop fluorescent.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Atanasiu P, Tierkel ES. 1996. Rapid microscopic examination for negri bodies and preparation of spesiment for biological test. In: Laboratory techniques in rabies. Geneva. 4th ed. p. 55-56.
- [CDC] Centers for Disease Control. 2006. Standard operating procedure for the direct Rapid Immunohistochemistry Test (dRIT) for the detection of rabies virus antigen. [diakses pada 20 Desember 2011]. [http://www.rabies.blueprint.com/IMG/pdf/DRIT\\_SOP.pdf](http://www.rabies.blueprint.com/IMG/pdf/DRIT_SOP.pdf).
- Damayanti R., Alfinus, Rahmadani I, Faisal. 2009. Deteksi antigen virus rabies pada jaringan otak dengan metode imunohistokimia. Sani Y, Nathalia L, Brahmantiyo B, Puastuti W, Sartika T, Nurhayati, Anggraeni A, Matondang RH, Martindah E, Estuningsih SE, penyunting. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor (Indones): Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. hlm. 797-717.
- Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. 1996. The fluorescence antibody test. In: Laboratory techniques in rabies. Geneva. 4th ed. hlm. 88-95.
- Durr S, Naissengar S, Mindekem, R, Diguimbye C, Niezgoda, M, Kuzmin I, Rupprecht CE, Zinsstag J. 2008. Rabies diagnosis for developing countries. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e206. doi:10.1371/journal.pntd.0000206.
- Fooks AR, Johnson N, Freuling CM, Wakeley PR, Banyard AC, McElhinney, LM, Marston, DA, Dastjerdi A, Wright E, Weiss RA, Muller T. 2009. Emerging technologies for the detection of Rabies virus: Challenges and Hopes in the 21st Century. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e530. doi:10.1371/journal.pntd.0000530.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. The use of avidin biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol*. 75:816-821.
- Jackson AC. 2002. Pathogenesis. In: Rabies. Jackson AC, Wunner WH, editor. San Diego (USA): Academic Press. p. 245-282.
- [Kepmentan] Keputusan Menteri Pertanian. 2008. Nomor: 1637.1/Kpts/PD.640/12/2008. [diakses pada 9 Desember 2013]. <http://www.bkpmataram.org/files/download/peraturan/keputusan-kementan/1637.1tahun2008.pdf>.
- Lembo T, Niezgoda M, Villa AV, Cleaveland, S, Ernest E, Rupprecht CE. 2006. Evaluation of a direct Rapid Immunohistochemical Test for rabies diagnosis. *Emerg Infect Dis*. 12:310-314.
- [OIE] Office International des Epizootics. 2008. Rabies. Manual standard for diagnostic tests and vaccines. Volume 1. OIE. Paris. p. 304-322.
- [OIE] Office International des Epizootics. 2011. Terrestrial manual. Rabies. [diakses pada 12 Juli 2013]. [http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/healthstandards/tahm/2.01.13\\_rabies.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/healthstandards/tahm/2.01.13_rabies.pdf).
- Rahmadani I. 2012. Infeksi alami virus rabies pada anjing: studi morfopatologi dan imunohistokimia (tesis S2). [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.
- Ramos-Vara JA, Miller MA. 2006. Comparison of two polymer-based Immunohistochemical detection systems: ENVISION<sup>TM</sup> and ImmPRESS<sup>TM</sup>. *J Microcopy*. 224:135-139.
- Soegiarto. 2010. Epidemiology of Rabies in Indonesia. Di dalam: New strategies for the control and prevention of zoonotic diseases. Prosiding Seminar Internasional. Surabaya (Indones): Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
- Viera AJ, Garret JM. 2005. Understanding interobserver agreement: The Kappa Statistic. *Family Medicine*. 37:360-363.
- Van Noorden, S. 1986. Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. In: Immunocytochemistry- modern methods and application. 2nd ed. Polak JM, Van Noorden S, editors. Wright. Bristol. p. 26-53.
- Widhiarso, W. 2013. Bab 2. Mengestimasi reliabilitas. Dalam: SPSS untuk Psikologi. [diakses pada 22 Agustus 2013]. [http://widhiarso.staff.ugm.ac.id/files/bab\\_2\\_estimasi\\_reliabilitas\\_via\\_spss.pdf](http://widhiarso.staff.ugm.ac.id/files/bab_2_estimasi_reliabilitas_via_spss.pdf).
- [WHO] World Health Organization. 1996. Laboratory techniques in Rabies. 4th ed. FX Meslin, MM Kaplan Koprowski H, editor.