

Panduan Analisis Laboratorium Imunoserologi untuk D3 Teknologi Laboratorium Medis



Patricia Gita Naully
Gina Khairinisa

Stikes Jenderal Achmad Yani Cimahi

**Panduan Analisis Laboratorium Imunoserologi
untuk D3 Teknologi Laboratorium Medik**

Penulis:

Patricia Gita Naully
Gina Khairinisa

ISBN:

9786025089312

Editor:

Sri Yuniarti

Penyunting:

Bagus Wisuda

Desain Sampul dan Tata Letak:

Wikan Mahargyani

Penerbit:

Stikes Achmad Yani

Redaksi:

Stikes Jenderal Achmad Yani
Jalan Terusan Jenderal Sudirman
CImahi 40533
Tel: 022-6631622
Fax: 022-6631624
Email: info@stikesayani.ac.id

Distributor Tunggal:

Stikes Jenderal Achmad Yani
Jalan Terusan Jenderal Sudirman
CImahi 40533
Tel: 022-6631622
Fax: 022-6631624
Email: info@stikesayani.ac.id

Cetakan Pertama: April 2018

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan cara apapun tanpa ijin
tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Ahli Teknologi Laboratorium Medik adalah orang yang minimal telah lulus pendidikan D3 Teknologi Laboratorium Medik (TLM). Salah satu kompetensi yang harus dimiliki oleh mahasiswa TLM adalah dapat melakukan pemeriksaan laboratorium medik di bidang Imunologiserologi. Imunologiserologi merupakan ilmu yang mempelajari respon imun berupa antibodi yang dihasilkan akibat adanya benda asing atau antigen yang masuk ke dalam tubuh. Pemeriksaan Imunologiserologi merupakan salah satu pemeriksaan yang paling sering dilakukan di Rumah Sakit atau laboratorium klinis. Namun hingga saat ini belum ada buku yang memberikan pedoman pada mahasiswa TLM untuk melakukan berbagai macam pemeriksaan Imunologiserologi mulai dari tahap pra analitik, analitik, hingga paska analitik.

Buku ini berisikan panduan dan tata cara pemeriksaan laboratorium Imunoserologi yang terdiri dari tahap persiapan spesimen hingga penanganan limbah infeksius untuk mendeteksi berbagai macam penyakit yang disebabkan bakteri, virus, dan parasit. Teknik deteksi antigen-antibodi yang dijabarkan dalam buku ini menggunakan metode aglutinasi, imunokromatografi dan Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Selain itu, buku ini dilengkapi dengan teori dan prinsip dasar dari setiap pemeriksaan untuk menunjang pengetahuan mahasiswa.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan buku ini masih terdapat banyak kekurangan. Maka dari itu diharapkan kritik dan saran yang membangun kepada penulis demi kesempurnaan buku dimasa yang akan datang. Buku ini diharapkan dapat meningkatkan kompetensi mahasiswa TLM dalam pemeriksaan Imunoserologi yang menggunakan metode aglutinasi, imunokromatografi dan ELISA.

Cimahi, April 2018

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
DESKRIPSI MATA KULIAH	vi
PETUNJUK PENGGUNAAN.....	xi
MODUL 1	1
KONSEP DASAR IMUNOSEROLOGI	1
KEGIATAN BELAJAR 1	2
PRINSIP DASAR IMUNOLOGI	2
KEGIATAN BELAJAR 2	9
METODE PEMERIKSAAN IMUNOSEROLOGI	9
MODUL 2	40
PEMERIKSAAN KEHAMILAN	40
KEGIATAN 1	42
PEMERIKSAAN <i>HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN</i> (HCG)	
METODE AGLUTINASI.....	42
KEGIATAN 2	48
PEMERIKSAAN <i>HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN</i> (HCG)	
METODE IMUNOKROMATOGRAFI	48
MODUL 3	55
PEMERIKSAAN DEMAM TIFOID.....	55
KEGIATAN BELAJAR 1	57
PEMERIKSAAN WIDAL	57
KEGIATAN BELAJAR 2	65
PEMERIKSAAN <i>IMMUNO MAGNETIC BEADS INHIBITION</i>	65
MODUL 4	72
PEMERIKSAAN PENYAKIT TROPIS.....	72
KEGIATAN 1	74
PEMERIKSAAN NS1 DENGUE.....	74
KEGIATAN 2	82
PEMERIKSAAN IgG / IgM DENGUE.....	82
KEGIATAN 3	91
PEMERIKSAAN MALARIA.....	91
MODUL 5	98
PEMERIKSAAN INFEKSI MENULAR SEKSUAL	98
KEGIATAN 1	100

PEMERIKSAAN <i>RAPID PLASMA REAGIN</i> (RPR)	100
KEGIATAN 2	106
PEMERIKSAAN <i>TREPONEMA PALLIDUM HEMAGGLUTINATION</i> (TPHA).....	106
KEGIATAN 3	113
PEMERIKSAAN Anti – <i>TREPONEMA PALLIDUM</i> METODE IMUNOKROMATOGRAFI	113
KEGIATAN 4	120
PEMERIKSAAN HEPATITIS B VIRUS (HBV)	120
KEGIATAN 5	128
PEMERIKSAAN ANTIBODI ANTI - HBs	128
KEGIATAN 6	139
PEMERIKSAAN ANTIBODI ANTI-HCV (HEPATITIS C VIRUS)	139
KEGIATAN 7	146
PEMERIKSAAN <i>HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS</i> (HIV).....	146
MODUL 6	158
DETEKSI PROTEIN SPESIFIK-ANTIGEN-ANTIBODI YANG DISEBABKAN BAKTERI	158
KEGIATAN 1	160
PEMERIKSAAN C-REACTIVE PROTEIN (CRP)	160
KEGIATAN 2	166
PEMERIKSAAN ANTI-STREPTOLYSIN O (ASO).....	166
KEGIATAN 3	172
PEMERIKSAAN ANTIGEN MPT64 dari Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	172
MODUL 7	179
PEMERIKSAAN PENYAKIT AUTOIMUN.....	179
KEGIATAN 1	181
PEMERIKSAAN <i>RHEUMATOID FACTOR</i> (RF).....	181
MODUL 8	187
PEMERIKSAAN PENANDA TUMOR.....	187
KEGIATAN 1	189
PEMERIKSAAN <i>FAECAL OCCULT BLOOD</i> (FOB)	189
KEGIATAN 2	196
PEMERIKSAAN <i>PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN</i> (PSA).....	196
KEGIATAN 3	202
PEMERIKSAAN <i>ALPHA-FETOPROTEIN</i> (AFP)	202

KEGIATAN 4	208
PEMERIKSAAN <i>CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN</i> (CEA)	208
DAFTAR PUSTAKA	214
KUNCI JAWABAN	220

DESKRIPSI MATA KULIAH

Mata kuliah imunologiserologi membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium bidang imunologi menggunakan metode agutisasi, imunokromatografi, dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) mulai dari konsep dasar, prinsip reaksi, preparasi dan penyimpanan spesimen, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi, dan dokumentasi hasil pemeriksaan. Melalui mata kuliah ini, mahasiswa diharapkan mampu memahami konsep dan prinsip reaksi aglutinasi, imunokromatografi, serta ELISA untuk beberapa jenis diagnosis infeksi, mampu memahami *kit insert* pemeriksaan, melaksanakan pemeriksaan laboratorium, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi, serta dokumentasi hasil pemeriksaan menggunakan ketiga metode tersebut.

Modul Praktikum Imunologiserologi ini terdiri dari enam modul dengan ruang lingkup bahasan sebagai berikut:

Modul 1. Membahas topik “Konsep Dasar Imunoserologi”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat menjelaskan konsep dasar, prinsip kerja dan cara penggunaan berbagai metode pemeriksaan imunoserologi. Modul ini terdiri dari dua kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan pengertian, konsep dasar, prinsip dasar imunologi secara umum.
2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan pengertian, prinsip kerja, keunggulan dan kelemahan, cara penggunaan, serta interpretasi hasil pada metode pemeriksaan imunoserologi secara umum.

Modul 2. Membahas topik “Pemeriksaan Kehamilan”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami *kit insert*, menjelaskan prinsip kerja, menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan HCG. Modul ini terdiri dari satu kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan HCG menggunakan metode aglutinasi.

2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan HCG menggunakan metode imunokromatografi.

Modul 3. Membahas topik “Pemeriksaan Demam Tifoid”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami *kit insert*, menjelaskan prinsip kerja, menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan Widal dan *Immuno Magnetic Beads Inhibition*.

Modul ini terdiri dari dua kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan widal menggunakan metode aglutinasi.
2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan *Immuno Magnetic Beads Inhibition* menggunakan metode aglutinasi.

Modul 4. Membahas topik “Pemeriksaan Penyakit Tropis”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami *kit insert*, menjelaskan prinsip kerja, menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan NS1, IgG/IgM Dengue serta Malaria.

Modul ini terdiri dari tiga kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antigen NS1 menggunakan imunokromatografi.
2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antibodi IgG/IgM Dengue menggunakan imunokromatografi.
3. Kegiatan Belajar 3: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antibodi anti-malaria menggunakan imunokromatografi

Modul 5. Membahas topik “Pemeriksaan Infeksi Menular Seksual (IMS)”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami *kit insert*, menjelaskan prinsip kerja, menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan Sifilis (*Rapid Plasma Reagin* dan *Treponema Pallidum Hemagglutination Assay*), Hepatitis B (HBsAg dan anti-HBs), Hepatitis C, dan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV).

Modul ini terdiri dari lima kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan *Rapid Plasma Reagin* (RPR) menggunakan metode aglutinasi.
2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan *Treponema Pallidum Hemagglutination Assay* (TPHA) menggunakan metode aglutinasi.
3. Kegiatan Belajar 3: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antigen permukaan Virus Hepatitis B (HBsAg) menggunakan imunokromatografi.
4. Kegiatan Belajar 4: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antibodi anti-HBs menggunakan imunokromatografi.
5. Kegiatan Belajar 5: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antibodi anti-HCV menggunakan imunokromatografi.
6. Kegiatan Belajar 6: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antibodi anti-HIV menggunakan imunokromatografi.

Modul 6. Membahas topik “Deteksi Protein Spesifik – Antigen – Antibodi yang disebabkan Bakteri”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami *kit insert*, menjelaskan prinsip kerja,

menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan CRP, ASO dan MPT64.

Modul ini terdiri dari tiga kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan *C-Reactive Protein* (CRP) menggunakan metode aglutinasi.
2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan Anti Streptolysin O (ASO) menggunakan metode aglutinasi.
3. Kegiatan Belajar 3: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan antigen MPT64 dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan imunokromatografi.

Modul 7. Membahas topik “Pemeriksaan Penyakit Autoimun”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami kit insert, menjelaskan prinsip kerja, menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan *Rheumatoid Factor* (RF).

Modul ini terdiri dari satu kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan RF menggunakan metode aglutinasi.

Modul 8. Membahas topik “Pemeriksaan Penanda Tumor”. Setelah mempelajari materi ini mahasiswa diharapkan dapat memahami kit insert, menjelaskan prinsip kerja, menyiapkan spesimen, melaksanakan pemeriksaan, menginterpretasikan hasil, dan mengevaluasi hasil pemeriksaan *Faecal Occult Blood* (FOB), *Prostate-specific Antigen* (PSA), *Alpha-Fetoprotein* (AFP) dan *Carcinoembryonic Antigen* (CEA).

Modul ini terdiri dari empat kegiatan belajar yaitu:

1. Kegiatan Belajar 1: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan FOB menggunakan metode imunokromatografi.
2. Kegiatan Belajar 2: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan PSA menggunakan metode imunokromatografi.
3. Kegiatan Belajar 3: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan AFP menggunakan metode imunokromatografi.
4. Kegiatan Belajar 4: menerangkan isi *kit insert*, prinsip kerja, cara penyiapan spesimen, langkah kerja, dan keterbatasan pemeriksaan CEA menggunakan metode imunokromatografi.

PETUNJUK PENGGUNAAN

1. Modul ini dibuat untuk membantu mahasiswa dalam memahami materi dan melaksanakan praktikum pada mata kuliah Immunologiserologi.
2. Diperuntukkan bagi mahasiswa Program Studi D-3 Teknik Laboratorium Medis.
3. Hanya dapat digunakan oleh mahasiswa yang sedang menjalani perkuliahan di semester tiga dan telah memahami konsep dasar pemeriksaan imunologi di laboratorium (*immunoassay*).
4. Berisikan materi pemeriksaan imunologi di laboratorium yang memanfaatkan metode imunokromatografi.
5. Mahasiswa harus menulis nama dan NPM pada sampul modul
6. Mahasiswa menuliskan nama dan usia pasien, nomor laboratorium, dan waktu pengambilan spesimen di bagian yang sudah disediakan.
7. Mahasiswa mencatat data dengan pena bertinta, bukan pensil. Bila terjadi kesalahan, coretlah bagian yang salah jangan menggunakan penghapus atau menutup catatan yang salah.
8. Mahasiswa tidak diperkenankan untuk merobek modul praktikum.
9. Mahasiswa harus menandatangani setiap lembar kerja yang memiliki data.
10. Mahasiswa harus melaporkan semua hasil pemeriksaan kepada dosen dan meminta tanda tangan dari dosen yang bersangkutan.
11. Modul ini dapat digunakan pada perkuliahan Immunologiserologi baik saat kegiatan responsi di kelas maupun praktikum di laboratorium.
12. Modul ini juga dapat dijadikan referensi belajar untuk menghadapi ujian praktikum pasif dan aktif.

MODUL 1

KONSEP DASAR IMUNOSEROLOGI

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup konsep dasar imunoserologi mulai dari konsep dasar, prinsip dasar, pengertian dan aplikasi imunoserologi di laboratorium.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip dasar imunoserologi untuk beberapa jenis diagnosa infeksi dan metode pemeriksaan imunoserologi.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami Konsep dasar imunologi
- b. Memahami Prinsip dasar imunologi
- c. Memahami Metode pemeriksaan imunoserologi

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami Konsep dasar imunologi
- b. Memahami Prinsip dasar imunologi
- c. Memahami Metode pemeriksaan imunoserologi

5. Materi Pokok

- a. Review Konsep Dasar Imunologi
- b. Review Prinsip Dasar Imunologi
- c. Review Metode pemeriksaan imunoserologi

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi

KEGIATAN BELAJAR 1

PRINSIP DASAR IMUNOLOGI

Imunologi dapat didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari sel dan molekul yang terlibat dalam mekanisme pertahanan inang serta proses terganggunya mekanisme tersebut hingga menyebabkan penyakit (Nankervis et al, 2012). Ilmu ini dijadikan dasar berbagai pemeriksaan di laboratorium. Sebelum memahami berbagai metode pemeriksaan yang berbasis imunologi diperlukan pemahaman mengenai antigen dan antibodi.

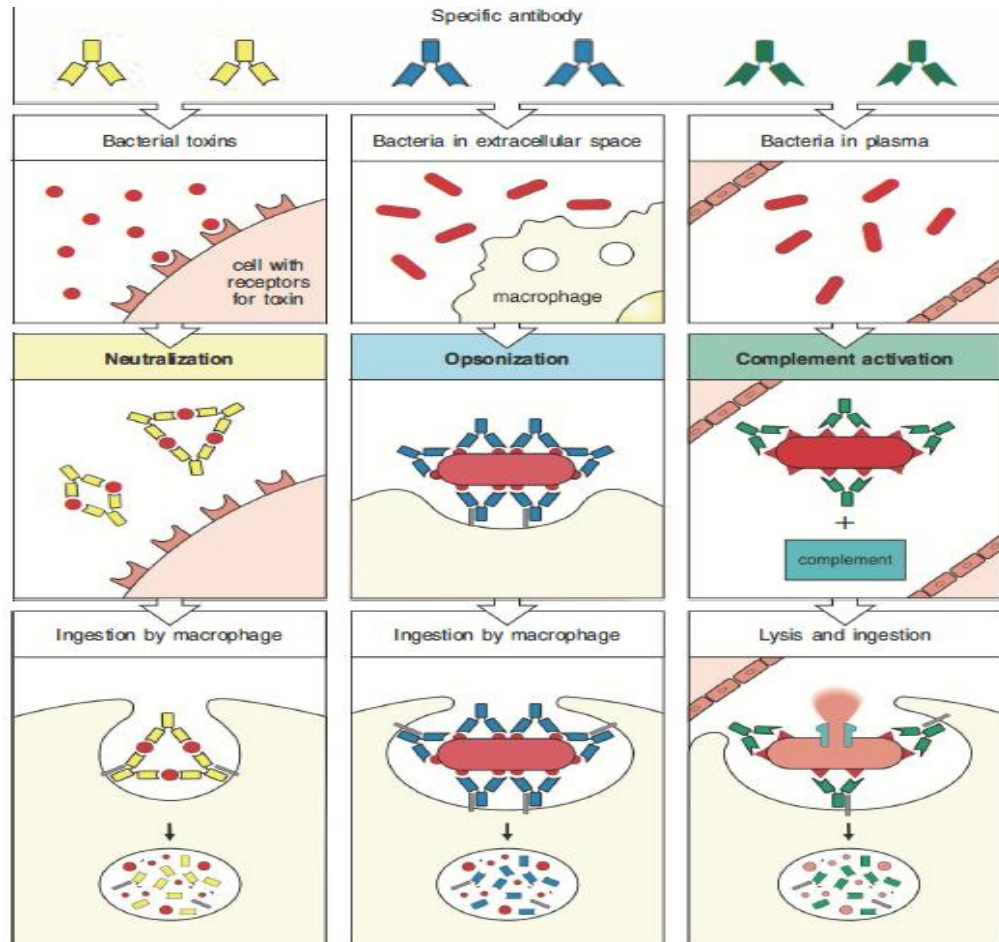
A. Antigen dan Antibodi

Antigen merupakan substansi yang dapat menginduksi respon imun. Substansi tersebut dapat berupa lipopolisakarida (LPS) yang dimiliki oleh bakteri Gram negatif, *lipoteichoic acid* (LTA) yang dimiliki oleh bakteri Gram positif, flagella, DNA, toksin, dan lain-lain (Madigan *et al*, 2009). Bagian antigen yang dapat berinteraksi dengan antibodi disebut epitop atau *antigen determinant*. Berikut bahan yang dapat dianalisis sebagai antigen dalam *immunoassay* (Murphy, 2012):

- Mikroba patogen dan toksin mikroba
- Toksin tanaman dan hewan
- Protein spesifik atau senyawa lain yang berstruktur spesifik
- Senyawa obat (narkotik, psikotropik)
- Senyawa pestisida

Antibodi atau imunoglobulin adalah protein terlarut yang diproduksi oleh sel B sebagai respon terhadap antigen (Madigan *et al*, 2009). Setiap antibodi dapat terikat secara spesifik pada antigen tunggal. Di dalam tubuh antibodi memiliki tiga fungsi, yaitu netralisasi, opsonisasi, dan aktivasi komplemen (Gambar 1.1) (Murphy, 2012). Antibodi dapat melakukan netralisasi dengan cara mengenali antigen pada patogen secara spesifik sehingga mencegah patogen berikatan atau menempel pada sel inang. Antibodi juga dapat menyelimuti tubuh patogen dengan cara mengenali antigen yang berada di permukaan patogen secara spesifik sehingga mempermudah proses fagositosis. Peristiwa tersebut dikenal dengan

sebutan opsonisasi. Selain itu, antibodi dapat mengaktivasi kumpulan protein yang disebut dengan komplemen. Komplemen tersebut dapat meningkatkan proses inflamasi, opsonisasi, dan pelisisan sel.



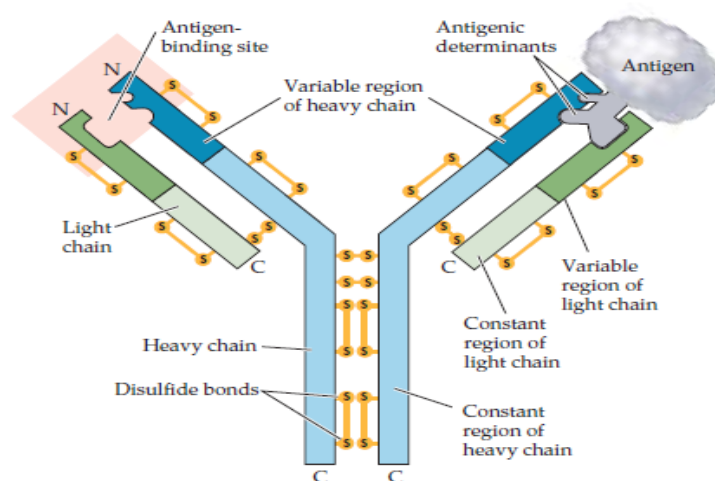
Gambar 1.1. Fungsi Antibodi (Murphy, 2012)

Berdasarkan perbedaan lokasi dan fungsinya imunoglobulin dibagi menjadi 5 kelas, yaitu IgA, IgD, IgE, IgG, dan IgM (Gambar 1.2). Dari kelima jenis tersebut, IgG dan IgM merupakan antibodi yang paling banyak ditemukan. IgM merupakan antibodi yang diproduksi tubuh sebagai respon awal (primer) terhadap kehadiran antigen sedangkan IgG merupakan antibodi yang diproduksi tubuh sebagai respon sekunder. Jika dibandingkan dengan IgM, IgG memiliki kekuatan pengikatan atau afinitas yang lebih kuat terhadap antigen (Madigan *et al*, 2009).

CLASS	GENERAL STRUCTURE	LOCATION	FUNCTION
IgG	Monomer	Free in plasma; about 80 percent of circulating antibodies	Most abundant antibody in primary and secondary responses; crosses placenta and provides passive immunization to fetus
IgM	Pentamer	Surface of B cell; free in plasma	Antigen receptor on B cell membrane; first class of antibodies released by B cells during primary response
IgD	Monomer	Surface of B cell	Cell surface receptor of mature B cell; important in B cell activation
IgA	Dimer	Monomer found in plasma; polymers in saliva, tears, milk, and other body secretions	Protects mucosal surfaces; prevents attachment of pathogens to epithelial cells
IgE	Monomer	Secreted by plasma cells in skin and tissues lining gastrointestinal and respiratory tracts	Found on mast cells and basophils; when bound to antigens, triggers release of histamine from mast cell or basophil that contributes to inflammation and some allergic responses

Gambar 1.2. Lima Jenis Immunoglobulin (Madigan *et al*, 2009)

IgG terdiri dari empat polipeptida, yaitu dua rantai berat (*heavy chain*) dan dua rantai ringan (*light chain*) (Gambar 1.3). *Heavy chain* merupakan protein yang memiliki ukuran sekitar 65 kDa sedangkan *light chain* memiliki ukuran sekitar 25 kDa (Murphy, 2012). Berdasarkan variasi dan fungsinya IgG terdiri dari dua bagian, yaitu *variable region* (Fab) dan *constant region* (Fc) (Murphy, 2012). Fab merupakan daerah yang bersifat variatif (berbeda-beda pada setiap antibodi) dan berfungsi untuk mengenali antigen (tepatnya pada bagian epitop) secara spesifik sedangkan Fc merupakan daerah yang bersifat konstan (sama pada setiap antibodi) dan dapat dikenali oleh fagosit.

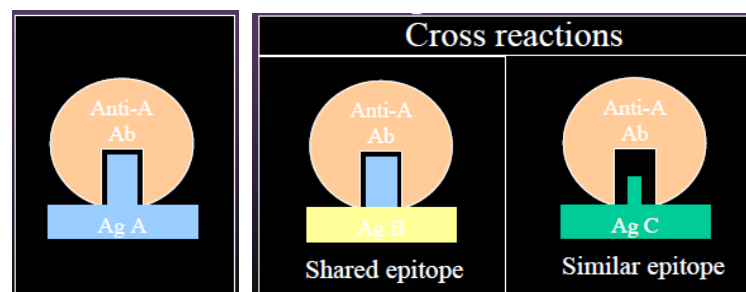


Gambar 1. 3. Struktur IgG (Murphy, 2012)

B. Interaksi Antigen-Antibodi

Semua metode *immunoassay* berdasarkan pada reaksi spesifik dan sensitif antara antigen dan antibodi. Pengikatan antara antibodi dan antigen tergantung pada interaksi non kovalen yang bersifat *reversible* (Darwish, 2006). Terdapat lima jenis interaksi yang terlibat pada pengikatan antigen dan antibodi, yaitu ikatan hidrogen, gaya elektrostatik, Van der Waals, dan ikatan hidrofobik (Koivunen and Krogsrud, 2006). Perubahan kecil pada struktur antigen dapat mempengaruhi kekuatan interaksi antibodi dengan antigen.

Terdapat tiga faktor yang mempengaruhi interaksi antigen dengan antibodi, yaitu afinitas, aviditas, dan reaksi silang (*cross reactivity*) (Koivunen and Krogsrud, 2006). Afinitas merupakan pengukuran kekuatan ikatan antara antigen dan antibodi. *Avidity* ditentukan oleh afinitas antibodi terhadap epitop, jumlah sisi pengikatan per molekul antibodi, dan pengaturan geometrik komponen yang berinteraksi. Reaksi silang merupakan interaksi pengikatan yang terjadi antara antibodi dengan epitop yang sama pada molekul yang berbeda (Gambar 1.4).



Gambar 1.4. Reaksi silang (*cross reactivity*) (Reddy, 2013)

RANGKUMAN

1. Antigen adalah segala jenis protein, polisakarida, lipid, atau senyawa yang dapat merangsang pembentukan antibodi.
2. Antibodi adalah protein globular yang diproduksi oleh sel B sebagai respon terhadap antigen. Antibodi yang disebut juga imunoglobulin terdiri dari lima kelas, yaitu IgG, IgM, IgD, IgA, dan IgE.
3. Antibodi terdiri dari dua rantai, yaitu rantai berat dan ringan serta terbagi menjadi dua daerah yaitu daerah bervariasi (Fab) dan daerah konstan (Fc).
4. Antibodi berada terlarut di dalam darah dan memiliki tiga fungsi, yaitu netralisasi, opsonisasi, dan aktivasi komplemen.
5. Bagian dari antigen yang dapat dikenali oleh antibodi disebut dengan epitop. Terdapat tiga faktor yang dapat mempengaruhi interaksi keduanya, yaitu afinitas, afiditas, dan reaksi silang.

LATIHAN SOAL

1. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya disebut respon imun. Peningkatan fagositosis oleh lapisan partikel asing dengan protein serum disebut ?
 - a. Oponisasi
 - b. Aglutinasi
 - c. Solubilisasi
 - d. Kemotaksis
 - e. Presipitasi

2. Berbagai patogen seperti bakteri, virus, jamur atau parasit mengandung berbagai bahan yang disebut imunogen atau antigen dan dapat menginduksi sejumlah respon imun. Manakah dari berikut ini yang dapat dikaitkan dengan antigen yang di rangsang sel T ?
 - a. Respon Humoral
 - b. Sel Plasma
 - c. Sel Mast
 - d. Sitokin
 - e. Antibodi

3. Antibodi adalah bahan glikoprotein yang diproduksi sel B sebagai respons terhadap rangsangan imunogen. Fragmen Antigen Binding (Fab) terdiri dari ?
 - a. Dua Heavy chains.
 - b. Dua Light chains.
 - c. Satu Light chains dan setengah Heavy chain.
 - d. Satu Light chains dan keseluruhan Heavy chains
 - e. Satu Heavy chains dan setengah Light chains

4. Di dalam tubuh antibodi memiliki tiga fungsi, yaitu netralisasi, opsonisasi, dan aktivasi komplemen. Berdasarkan perbedaan lokasi dan fungsinya imunoglobulin dibagi menjadi 5 kelas, yaitu IgA, IgD, IgE, IgG, dan IgM. Semua yang dibawah ini termasuk benar tentang IgE kecuali ?
- a. Memacu pelepasan histamin
 - b. Ditemukan di permukaan sel B
 - c. Menempel pada sel mast jaringan
 - d. Ditemukan di Basofil
 - e. Ditemukan dalam serum orang yang alergi
5. Komplemen merupakan sistem yang terdiri atas sejumlah protein yang berperan dalam pertahanan host baik dalam sistem imun non spesifik maupun spesifik. Aktivasi komplemen dapat terjadi melalui jalur klasik, jalur alternatif, atau jalur lektin yang diakhiri dengan lisisnya suatu sel. Jalur aktivasi komplemen diaktivasi oleh ?
- a. Sebagian besar virus
 - b. Kompleks antigen–antibodi
 - c. Sebagian besar bakteri
 - d. Dinding Sel jamur
 - e. Semua Benar

KEGIATAN BELAJAR 2

METODE PEMERIKSAAN IMUNOSEROLOGI

A. *Immunoassay*

Immunoassay berasal dari dua suku kata, yaitu *immuno* dan *assay*. Kata *immuno* memiliki arti respon imun yang menyebabkan tubuh menghasilkan antibodi sedangkan kata *assay* artinya metode pengujian. Berdasarkan gabungan dua kata tersebut maka *immunoassay* diartikan sebagai metode pengujian keberadaan antigen atau antibodi yang memanfaatkan interaksi antara antibodi dengan antigen (Murphy, 2012). *Immunoassay* terdiri dari banyak jenis, seperti RIA, IFA, fiksasi komplemen, presipitasi, aglutinasi, imunokromatografi, ELISA, dan lain-lain.

B. Jenis-Jenis *Immunoassay*

Berdasarkan jenis reaksi yang terjadi *immunoassay* terbagi menjadi dua, yaitu reaksi primer dan sekunder. Berikut jenis-jenis *immunoassay* yang termasuk dalam reaksi primer:

- *Radioimmunoassay* (RIA)

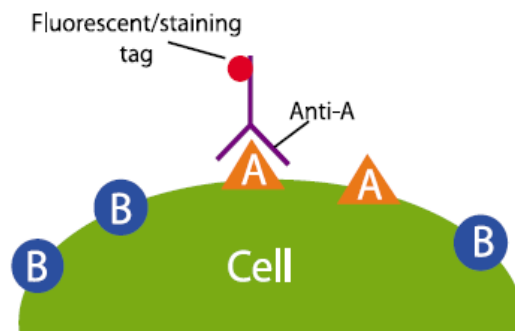
Pengujian antibodi atau antigen yang memanfaatkan pengikatan secara langsung. RIA menggunakan label berupa senyawa radioaktif, biasanya ¹²⁵I. Pada RIA, antigen dalam sampel akan terikat pada permukaan *microplate* dan akan dikenali oleh antibodi berlabel (Darwish, 2006). *Immunoassay* jenis ini sudah jarang digunakan karena berbahaya.

- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi yang terimobilisasi dalam sumur menggunakan antigen atau antibodi spesifik yang terkonjugasi dengan enzim (Darwish, 2006). Pengikatan antigen dengan antibodi dideteksi melalui perubahan warna substrat menjadi produk. ELISA terbagi menjadi empat jenis, yaitu langsung (*direct*), tidak langsung (*indirect*), kompetitif, dan *sandwich*. Hasil ELISA dapat dideteksi menggunakan spektrofotometer.

- *Immunofluorescence Assays (IFA)* (Gambar 1.5)

Pada IFA, antibodi spesifik yang digunakan harus dikonjugasikan dengan pewarna fluorescent (Koivunen and Krogsrud, 2006). IFA dapat divisualisasi menggunakan mikroskop fluorescent, fluorometer, fluorescence scanner, atau flow cytometer.

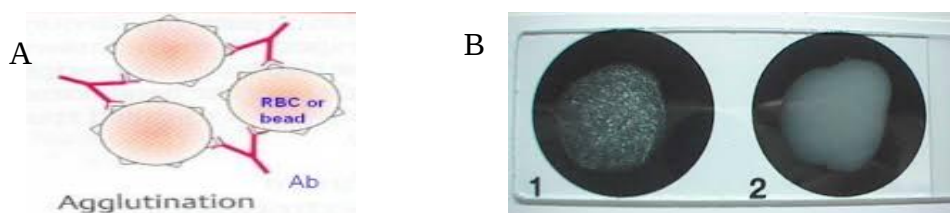


Gambar 1.5. *Immunofluorescence Assays* (Koivunen and Krogsrud, 2006)

Berikut jenis-jenis *immunoassay* yang termasuk dalam reaksi sekunder:

- Aglutinasi

Reaksi aglutinasi dapat terjadi antara antigen yang terlarut (*soluble*) dengan antibodi yang tidak terlarut (*insoluble*) atau sebaliknya. Antigen atau antibodi dapat dibuat menjadi tidak terlarut dengan cara mengikatkannya pada permukaan carier seperti partikel latex (Koivunen and Krogsrud, 2006). Penggumpalan terjadi jika molekul antigen memiliki berbagai macam epitop yang menyebabkan ikatan silang (Gambar 1.6).



Gambar 1.6. Metode Aglutinasi. A. Reaksi Aglutinasi B. Visualisasi Aglutinasi (Murphy, 2012)

- Presipitasi

Reaksi presipitasi dapat terjadi antara antigen yang terlarut dengan antibodi yang terlarut juga (Gambar 1.7). Ketika sejumlah antibodi terlarut dicampurkan dengan antigen terlarut maka akan terjadi interaksi antibodi-antigen yang menyebabkan pengendapan (Koivunen and Krogsrud, 2006). Reaksi presipitat dipengaruhi oleh jumlah epitop yang dimiliki antigen dan jumlah antibodi yang dapat terikat pada antigen tersebut.



Gambar 1.7. Reaksi Presipitasi (Koivunen and Krogsrud, 2006)

- Fiksasi Komplemen

Keberadaan antibodi spesifik pada serum pasien dideteksi menggunakan antigen, komplemen, dan sel darah merah (Koivunen and Krogsrud, 2006). Jika di dalam serum terdapat antibodi maka akan terjadi reaksi pengikatan antara antibodi dengan antigen dalam reagen secara spesifik. Penambahan komplemen yang terikat pada kompleks antigen-antibodi akan membentuk sistem yang memungkinkan sel darah merah menjadi *pellet* (Murphy, 2012). Jika kompleks antigen-antibodi tidak terbentuk maka penambahan komplemen akan melisiskan sel darah merah. Jenis *immunoassay* ini jarang digunakan.

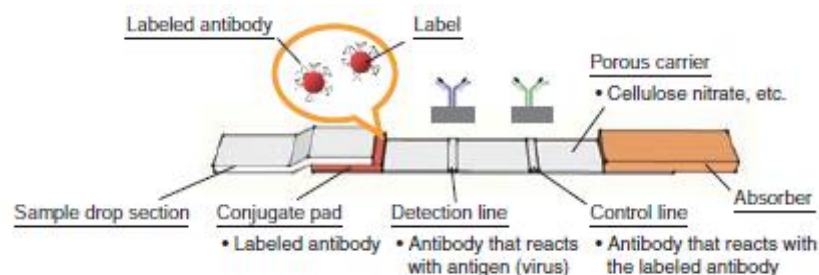
C. Imunokromatografi

Imunokromatografi atau yang dikenal dengan sebutan uji strip pertama kali dikembangkan pada akhir tahun 1960-an terutama untuk mendeteksi protein serum (El-Moamly, 2014). Dalam dekade terakhir imunokromatografi banyak digunakan untuk diagnosis berbagai penyakit menular. Sekarang ini imunokromatografi yang menggunakan prinsip sistem aliran lateral cukup populer karena memiliki banyak keunggulan dibandingkan *immunoassay* yang lain.

Imunokromatografi membutuhkan waktu analisis yang lebih singkat dibandingkan dengan ELISA, dapat dilakukan dengan mudah, dan dapat menganalisis analit tunggal baik di laboratorium klinik maupun di rumah (Koivunen and Krogsrud, 2006). Selain itu, imunokromatografi menyediakan cara interpretasi hasil dan kontrol kualitas yang mudah. Imunokromatografi ada yang berbentuk kaset atau strip. Imunokromatografi dapat menghasilkan produk akhir berwarna yang diinterpretasikan sebagai hasil positif atau negatif.

Imunokromatografi terdiri dari beberapa bagian (Gambar 1.8), yaitu sebagai berikut (Mori *et al.*, 2012):

- *Sample drop section* (bantalan sampel) merupakan tempat sampel akan meresap, biasanya tersusun dari membran *fiber glass*.
- *Conjugate pad* (bantalan konjugat) merupakan tempat diendapkannya antibodi deteksi (monoklonal) yang terkonjugasi dengan koloid emas atau mikropartikel berwarna. Bantalan ini biasanya tersusun dari membran nitroselulosa.
- *Detection Line* (garis deteksi / garis tes) merupakan tempat diikatkannya antibodi *capture* (monoklonal) yang berfungsi menangkap kompleks antigen-antibodi.
- *Control Line* (garis kontrol) merupakan tempat diikatkannya antibodi poliklonal yang dapat menangkap kompleks antigen-antibodi yang tidak terikat pada *detection line* atau antibodi konjugat bebas.
- *Absorber* berfungsi sebagai penyerap.

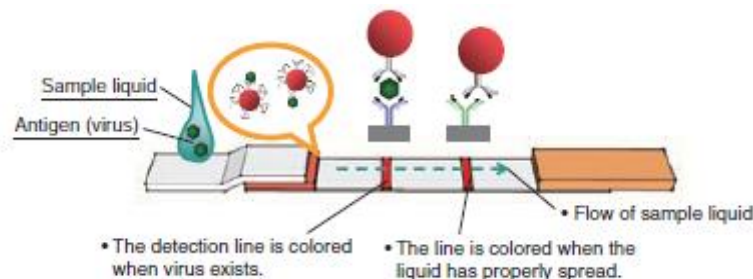


Gambar 1.8. Bagian Imunokromatografi (Mori *et al.*, 2012)

Imunokromatografi mempunyai dua jenis prinsip yang berbeda, yaitu sebagai berikut:

- Reaksi langsung (*Double Antibody Sandwich*) (Gambar 1.9)

Metode ini biasanya dipakai untuk mengukur susbtrat yang besar dan memiliki lebih dari satu epitop (El-Moamly, 2014). Bila sampel ditambahkan pada bantalan sampel, maka sampel tersebut secara cepat akan membasahi dan melewati bantalan konjugat serta melarutkan konjugat. Pada saat tersebut terjadi reaksi antara antigen dengan antibodi konjugat. Selanjutnya kompleks antigen-antibodi tersebut akan bergerak mengikuti aliran dari sampel sepanjang strip membran, sampai mencapai daerah tes. Pada daerah ini, kompleks antigen-antibodi akan terikat dengan antibod penangkap dan akan membentuk garis berwarna. Kompleks antigen-antibodi yang berlebih dan tidak terikat pada daerah tes akan terus bergerak sampai mencapai daerah kontrol. Pada daerah ini kompleks antigen-antibodi atau antibodi konjugat akan terikat dengan antibodi poliklonal dan membentuk garis berwarna.



Gambar 1.9. Reaksi Langsung (Mori *et al.*, 2012)

- Reaksi kompetitif (*Competitive inhibition*)

Sering dipakai untuk melacak molekul kecil dengan epitop tunggal yang tak dapat mengikat dua antibodi sekaligus (El-Moamly, 2014). Reagen deteksi yang digunakan adalah analit yang terikat pada koloid emas atau mikropartikel berwarna. Apabila sampel dan reagen melewati daerah dimana reagen penangkap diimobilisasi, sebagian dari substrat dan reagen pendeteksi akan terikat pada daerah tes. Makin banyak substrat

yang terdapat di dalam sampel, makin efektif daya kompetisinya dengan reagen pendeteksi.

Interpretasi hasil pemeriksaan menggunakan imunokromatografi tergolong mudah. Hasil pemeriksaan dinyatakan positif jika terbentuk dua garis berwarna, yaitu pada daerah tes dan daerah kontrol. Hasil dinyatakan negatif jika hanya ada satu garis berwarna yang terbentuk, yaitu pada daerah kontrol. Garis pada daerah kontrol harus selalu terbentuk untuk menunjukkan bahwa proses pemeriksaan berjalan dengan baik. Jika garis kontrol tidak terbentuk maka proses pemeriksaan harus diulang kembali menggunakan imunokromatografi yang baru.

D. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

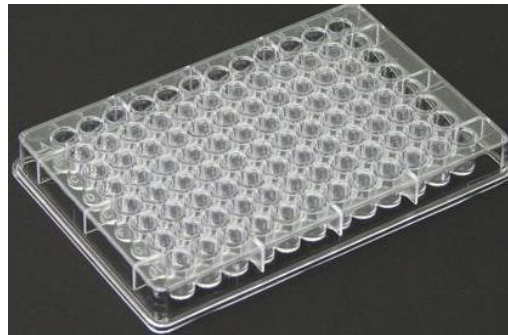
1. Prinsip ELISA

ELISA merupakan teknik biokimia yang biasa digunakan dalam imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam sampel. ELISA diperkenalkan pertama kali oleh Engvall dan Pearlmann pada tahun 1971 (Engvall and Pearlmann, 1971). ELISA merupakan *immunoassay* yang menggunakan enzim sebagai label. Prinsip *immunoassay* ini adalah mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi yang terimobilisasi dalam sumur menggunakan antigen atau antibodi spesifik yang terkonjugasi dengan enzim (Murphy, 2012). Kehadiran antigen atau antibodi target ditandai dengan terjadinya reaksi enzimatik. Jika kompleks antigen dan antibodi terbentuk maka substrat yang ditambahkan ke dalam sumur akan diubah menjadi produk. Proses enzimatik tersebut akan mengakibatkan terjadinya perubahan warna. Perubahan warna tersebut yang akan dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer atau *ELISA reader* (Gambar 1.10).



Gambar 1.10. *ELISA Reader* (Das, 2016)

ELISA dikerjakan pada alat yang disebut *microplate* (Gambar 1.11). *Microplate* terdiri dari 96 sumur dan terbuat dari plastik dimana protein dapat teradsorpsi atau terikat dengan mudah. Jenis plastik yang digunakan sebagai bahan pembuatan *microplate* adalah polystyrene, polypropylene, polycarbonate (Thermo Scientific, 2010). ELISA dapat digunakan untuk berbagai macam kebutuhan, seperti menghitung tingkat antibodi, mendeteksi virus, mendeteksi perubahan hormon, dan mendeteksi sirkulasi penanda inflamasi (Murphy, 2012).



Gambar 1.11. *Microplate* (Banks, 2009)

2. Keunggulan dan Kelemahan ELISA

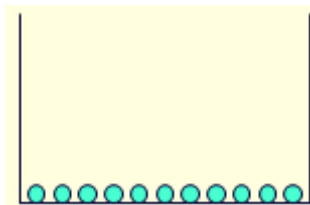
Jika dibandingkan dengan *immunoassay* yang lain, ELISA memiliki banyak keunggulan. ELISA merupakan *immunoassay* yang sangat sensitif karena dapat mendeteksi analit hingga konsentrasi pikogram per mililiter (pg/ml) (Thermo Scientific, 2010). Selain itu, ELISA merupakan salah satu jenis *immunoassay* yang bersifat kuantitatif. Dengan menggunakan ELISA kita bukan hanya dapat mengetahui keberadaan antigen atau antibodi dalam sampel namun dapat mengetahui konsentrasi antibodi atau antigen tersebut secara tepat (Thompson, 2010). ELISA ini juga bersifat *reproducible* sehingga hasil yang didapatkan pada waktu dan tempat yang berbeda akan tetap sama. Berdasarkan kelebihan tersebut, ELISA banyak digunakan baik dalam bidang klinis maupun riset. Oleh karena itu sudah banyak pula orang membuat kit yang berbasis ELISA. Keberadaan kit tersebut sangat mempermudah proses analisis menggunakan ELISA.

Jika dilihat dari harga pemeriksaan, ELISA masih tergolong mahal karena selain menggunakan antibodi spesifik, ELISA juga membutuhkan enzim khusus yang dikonjugasikan pada antibodi. Selain itu, waktu analisa yang dibutuhkan juga cukup lama, dari mulai sekitar dua jam hingga dua hari (Thermo Scientific, 2010). Pengerjaan ELISA baik yang manual maupun kit cukup rumit, oleh karena itu dibutuhkan tenaga ahli dalam pengerjaannya. Berbeda dengan aglutinasi dan imunokromatografi yang sederhana dan bisa dilakukan siapa saja.

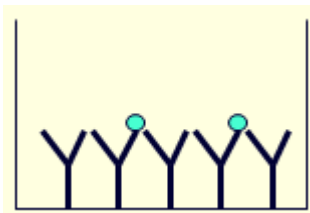
3. Tahapan dan Komponen ELISA

a. *Coating* atau *Capture*

Pada tahap ini antigen atau antibodi target diimobilisasi pada permukaan sumur *microplate*. Proses imobilisasi ini dapat dilakukan secara langsung maupun tidak langsung. Pada proses imobilisasi secara langsung (*coating*), antigen atau antibodi target langsung terikat pada permukaan sumur *microplate* (Thermo Scientific, 2010). Reagen yang dibutuhkan pada tahap ini adalah *coating buffer*. *Coating buffer* biasanya mengandung 0.2 M sodium carbonat atau bicarbonat dengan pH 9.4 (eBioscience, 2010). Ketika antigen atau antibodi target dicampurkan dengan *coating buffer*, antigen atau antibodi tersebut akan bermuatan negatif sehingga dapat berikatan dengan permukaan sumur *microplate* yang bermuatan positif. Antigen atau antibodi target dapat menempel pada permukaan sumur *microplate* karena adanya interaksi hidrofobik dan ionik (Thermo Scientific, 2010). Kebanyakan protein dapat terikat pada permukaan sumur *microplate* dalam kondisi basa, tetapi tidak semua protein. Jika antigen atau antibodi yang akan dianalisis hanya berada dalam jumlah sedikit maka proses imobilisasi akan sulit terjadi. Untuk mengatasi hal tersebut bisa dilakukan proses imobilisasi tidak langsung.



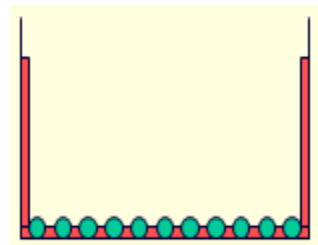
Pada proses imobilisasi secara tidak langsung (*capture*), antigen atau antibodi target dapat terikat pada permukaan sumur *microplate* dengan bantuan antigen atau antibodi lain (Thermo Scientific, 2010).



Diperlukan waktu inkubasi yang cukup lama sekitar dua jam pada suhu ruang hingga semalaman pada suhu 4°C untuk memastikan protein target terikat pada permukaan sumur *microplate*. Setelah proses coating selesai maka perlu dilakukan pencucian menggunakan *wash buffer* yang terdiri dari 0.1 M phosphate atau tris base, 0.15 M sodium chloride dengan pH 7.2 (Thompson, 2010). *Wash buffer* juga mengandung 0.05% Tween 20 yang berfungsi sebagai detergen. Pencucian ini berfungsi untuk membuang kelebihan protein atau molekul lain dari sumur *microplate*.

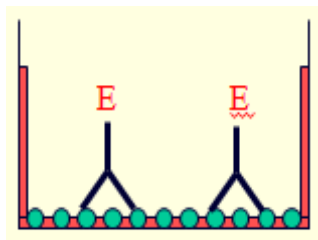
b. Plate blocking

Tahap ini dilakukan dengan tujuan untuk mencegah penempelan protein non target pada permukaan sumur *microplate*. Oleh karena itu, pada tahap ini protein pembatas ditambahkan untuk menutupi permukaan sumur *microplate* yang belum terikat protein target (Murphy, 2012). Reagen yang biasa digunakan pada tahap ini adalah *blocking buffer*. *Blocking buffer* mengandung 2% BSA yang dilarutkan pada *wash buffer* (Thermo Scientific, 2010). *Blocking buffer* yang digunakan tidak boleh mengandung komponen yang dapat bereaksi dengan antibodi atau antigen target. Diperlukan waktu inkubasi sekitar satu jam pada suhu ruang atau semalaman pada suhu 4°C untuk memastikan semua permukaan *microplate* tertutup. Setelah masa inkubasi selesai perlu dilakukan pencucian menggunakan *wash buffer* untuk memastikan semua *blocking buffer* terbuang dari sumur *microplate*. Proses pencucian diulang tiga sampai lima kali.



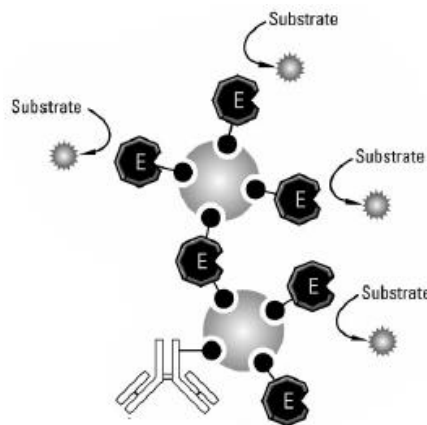
c. Probing atau Detection

Pada tahap ini dilakukan penambahan antigen atau antibodi spesifik yang telah terkonjugasi dengan enzim sehingga dapat mengenali antigen atau antibodi dalam sampel (Thompson, 2010). Terdapat dua jenis enzim yang biasa dikonjugasikan dengan antibodi,



yaitu *Alkaline Phosphatase* (AP) dan *Horseradish Peroxidase* (HRP). Enzim AP memiliki berat molekul sebesar 140 kDa sehingga sulit dikonjugasikan dalam jumlah banyak (Thermo Scientific, 2010). Enzim ini juga memiliki masalah stabilitas sehingga harus disimpan dan ditangani secara tepat. Enzim HRP memiliki berat molekul yang lebih kecil yaitu 40 kDa sehingga mudah dikonjugasikan dalam jumlah banyak dan menjadi lebih sensitif (Thermo Scientific, 2010). Pemilihan jenis enzim akan mempengaruhi sinyal yang dihasilkan.

Sinyal deteksi sebenarnya dapat diamplifikasi dengan cara memodifikasi antibodi deteksi, misalnya dengan menggunakan avidin atau streptavidin yang dikombinasikan dengan biotin (Gambar 1.12). Avidin dan streptavidin merupakan protein yang dapat terikat kuat dengan biotin. Biotin adalah vitamin yang dapat berikatan dengan protein, antibodi, dan biomolekul lain (Thermo Scientific, 2010). Karena biotin memiliki ukuran yang kecil maka sebuah avidin atau streptavidin dapat mengikat lebih dari satu biotin. Kemudian biotin tersebut dikonjugasikan dengan enzim. Hal tersebut menyebabkan satu antibodi dapat dikonjugasikan dengan lebih dari satu enzim.



Gambar 1.12. Amplifikasi Sinyal Biotin-Avidin/Streptavidin (Thermo Scientific, 2010)

Jumlah antibodi deteksi (enzim konjugat) harus tepat karena akan mempengaruhi sinyal yang dihasilkan. Semakin sedikit enzim konjugat yang digunakan maka sinyal akan semakin lemah. Semakin banyak enzim konjugat yang digunakan maka sinyal akan semakin kuat tetapi dapat juga meningkatkan

background dari ELISA (Thermo Scientific, 2010). Oleh karena itu, disarankan melakukan tahapan optimasi jumlah enzim konjugat yang akan digunakan. Diperlukan waktu inkubasi sekitar satu jam pada suhu ruang atau semalaman pada suhu 4°C untuk memastikan antibodi deteksi berikatan dengan antigen target. Setelah masa inkubasi selesai perlu dilakukan pencucian menggunakan wash buffer untuk membuang kelebihan antibodi deteksi. Proses pencucian diulang tiga sampai lima kali.

d. Signal Measurement

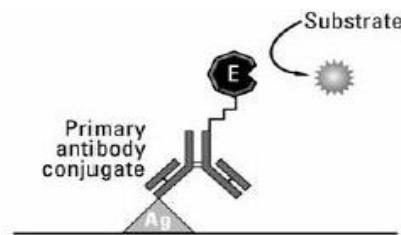
Tahap ini diawali dengan penambahan substrat ke dalam sumur *microplate*. Substrat yang digunakan berupa senyawa kromogenik. Penggunaan senyawa kromogenik sebagai substrat memiliki keunggulan antara lain: perubahan warna yang kuat; pengikatan antara enzim dan substrat kuat; dan memiliki hubungan linier antara intensitas dan enzim (Koivunen and Krogsrud, 2006). Substrat tersebut harus disesuaikan dengan enzim yang dikonjugasikan dengan antibodi. Jika enzim yang digunakan adalah AP maka substrat yang bisa digunakan adalah p-nitrophenyl phosphate (PNPP) atau 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate atau nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (Thompson, 2010). Jika enzim yang digunakan adalah HRP maka bisa menggunakan substrat 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD), atau 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Thermo Scientific, 2010). Ketika substrat ditambahkan akan terjadi reaksi enzimatik yang menyebabkan perubahan warna. Sebelum sinyal diukur, reaksi enzimatik perlu dihentikan terlebih dahulu menggunakan *stop solution* yang mengandung 1M H_3PO_4 atau 2N H_2SO_4 (Thermo Scientific, 2010). Perubahan warna tersebut diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

4. Jenis-Jenis ELISA

Semenjak pertama kali dikenalkan pada abad ke 20, sudah ada empat jenis ELISA yang berhasil dikembangkan, yaitu jenis langsung (*direct*), tidak langsung (*indirect*), *sandwich*, dan kompetitif.

a. ELISA *direct*

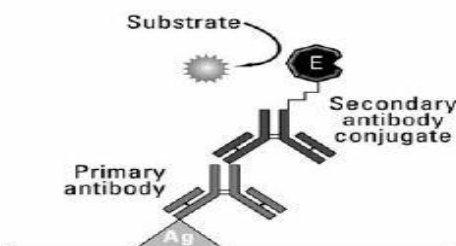
ELISA jenis ini merupakan ELISA yang paling sederhana. Antigen target diimobilisasi pada permukaan sumur *microplate* secara langsung. ELISA *direct* hanya menggunakan satu jenis antibodi deteksi yang terkonjugasi dengan enzim (Gambar 1.13). ELISA *direct* memiliki beberapa keunggulan yaitu sederhana, cepat, relatif lebih murah, dan mengurangi kemungkinan *cross reactivity* (Thompson, 2010). Kekurangan ELISA jenis ini yaitu tidak dapat mengamplifikasi sinyal sehingga kurang sensitif.



Gambar 1.13. ELISA *direct* (Thermo Scientific, 2010)

b. ELISA *indirect*

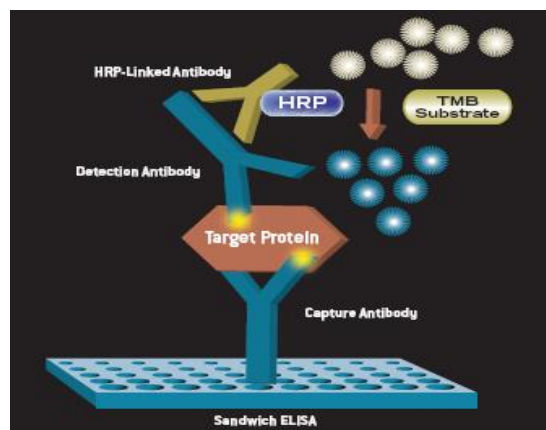
ELISA jenis indirect merupakan hasil pengembangan ELISA *direct*. Pada ELISA jenis ini sinyal dapat diamplifikasi. Sama seperti ELISA *direct*, antigen target pada ELISA ini diimobilisasi pada permukaan sumur *microplate* secara langsung. Namun ELISA *indirect* menggunakan dua jenis antibodi, yaitu antibodi deteksi yang tidak terkonjugasi dengan enzim (antibodi primer) dan antibodi yang terkonjugasi dengan enzim (antibodi sekunder) (Gambar 1.14). Jenis antibodi primer yang biasanya digunakan adalah antibodi monoklonal sedangkan jenis antibodi sekundernya adalah antibodi poliklonal (Murphy, 2012). Kekurangan ELISA jenis ini yaitu adanya kemungkinan *cross reactivity* antara antibodi primer dan sekunder.



Gambar 1.14. ELISA *indirect* (Thermo Scientific, 2010)

c. ELISA sandwich

ELISA *sandwich* merupakan jenis ELISA yang paling sering digunakan dalam bidang klinis maupun riset. Berbeda dengan dua jenis ELISA sebelumnya, ELISA jenis ini diawali dengan tahap *capture*. Antigen target diimobilisasi dengan bantuan antibodi lain yang disebut antibodi *capture*. Oleh karena itu, ELISA *sandwich* membutuhkan dua antibodi atau lebih (Gambar 1.15). Antibodi yang bertugas untuk membantu proses imobilisasi antigen disebut antibodi *capture* sedangkan antibodi yang berfungsi untuk mendeteksi kehadiran antigen disebut antibodi deteksi. Kedua antibodi tersebut harus dapat mengenali epitop yang berbeda (Thermo Scientific, 2010). ELISA *sandwich* memiliki keunggulan dibanding dua jenis sebelumnya, yaitu lebih spesifik dan dapat mengamplifikasi sinyal. Kekurangan jenis ini adalah lebih mahal, lebih lama, dan adanya kemungkinan *cross reactivity*.

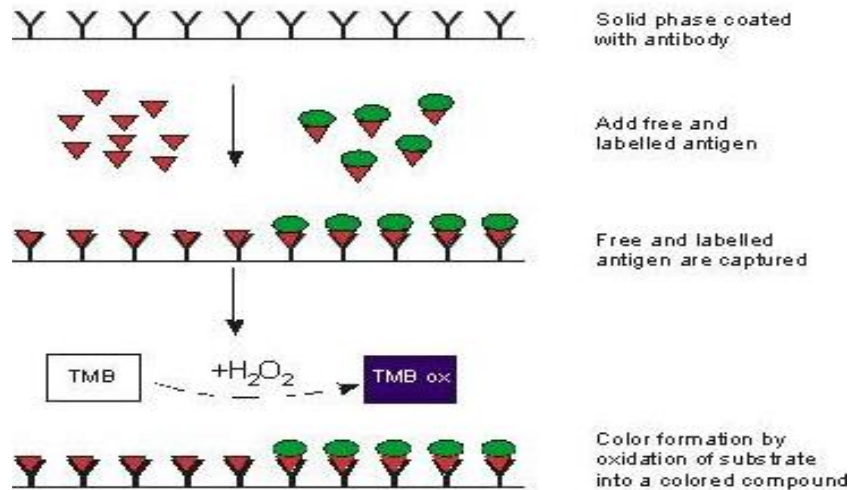


Gambar 1.15. ELISA *sandwich* (Pestka Biomedical Laboratories, 2015)

d. ELISA kompetitif

Pada ELISA jenis ini, antigen yang berlabel akan berkompetisi dengan antigen yang tidak berlabel untuk berikatan dengan antibodi primer (Gambar 1.16). Pengukuran sinyal pada ELISA jenis ini berbeda dengan ketiga jenis sebelumnya. Jika pada ketiga jenis lain semakin banyak antigen dalam sampel maka sinyalnya akan semakin kuat. Namun, pada ELISA ini semakin banyak

antigen dalam sampel, semakin sedikit antigen berlabel yang terikat pada sumur dan sinyalnya akan semakin lemah (Thompson, 2010).



Gambar 1.16. ELISA kompetitif (Held, 2006)

5. Kuantifikasi ELISA

Proses kuantifikasi ELISA diawali dengan pembuatan kurva standar. Kurva standar menghubungkan antara absorbansi dengan konsentrasi antigen atau antibodi target sehingga dapat mempermudah proses kuantifikasi hasil ELISA. Kurva standar dibuat dengan cara melakukan pengenceran bertahap untuk mendapatkan konsentrasi tertentu. Kurva standar harus terdiri dari minimal lima data (duplo) dan memiliki nilai R lebih besar dari 0.9 (Thermo Scientific, 2010).

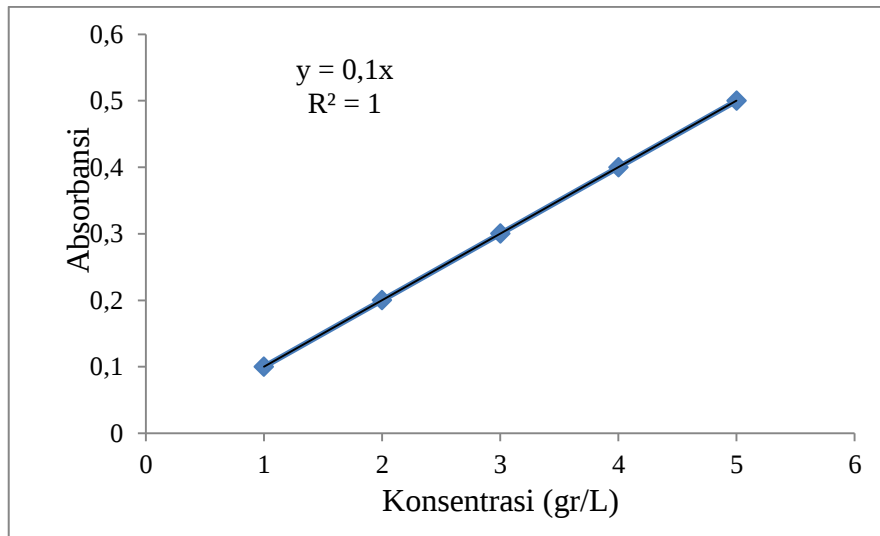
Berikut tahapan pembuatan kurva standar:

1. Sampel diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi tertentu
2. Lakukan tahapan pengerjaan ELISA seperti yang telah dijelaskan
3. Ukur sinyal menggunakan ELISA *reader*
4. Buat tabel absorbansi dan konsentrasi di Ms. Excel, contoh:

Absorbansi	Konsentrasi (g/L)
0.1	1
0.2	2
0.3	3
0.4	4
0.5	5

5. Buat kurva standar dengan cara :

Klik *insert* → pilih *XY scatter* pada menu *charts* → klik kanan pada grafik yang telah muncul → klik *select data* → masukkan data konsentrasi pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y → klik ok → klik garis yang terbentuk → klik kanan → pilih *add trendline* → klik *display equation on chart* dan *display R-squared value on chart*.



6. Masukkan data sampel uji ke dalam persamaan $y=0.1 x$. Hitunglah nilai x untuk mendapatkan konsentrasi antigen atau antibodi target.
7. Interpretasi hasil dilakukan dengan cara membandingkan nilai absorbansi sampel dengan nilai *cut-off*. Nilai *cut-off* didapatkan melalui perhitungan sebagai berikut: (Ridge and Vizard, 1993)

$Cut-off = \text{Rata-rata kontrol negatif} + (3 \times \text{Standar Deviasi kontrol negatif})$

Sampel yang memiliki absorbansi diatas nilai *cut-off* dinyatakan positif sedangkan sampel yang memiliki absorbansi dibawah atau sama dengan nilai *cut-off* dinyatakan negatif.

6. *Troubleshooting* ELISA

Beberapa hal yang dapat mempengaruhi sinyal ELISA terangkum dalam tabel dibawah ini (Thermo Scientific, 2010):

Table 1. Factors that affect ELISA signal generation.

<u>Factor</u>	<u>Variable Characteristic</u>
Assay Plate	material, well shape, pre-activation
Coupling Buffer	composition, pH
Capture Antibody	specificity, titer, affinity, incubation time and temperature
Blocking Buffer	composition, concentration, cross-reactivity
Target Antigen	conformation, stability, available epitope(s), matrix effects
Detection Antibody	specificity, titer, affinity, incubation time & temperature, cross-reactivity
Enzyme Conjugate	type of enzyme, type of conjugate, activity, concentration, cross-reactivity
Washes	buffer composition, volume, duration, frequency
Substrate	sensitivity, manufacturer lot, age
Signal Detection	filters, imaging instrument, exposure time

Beberapa hal yang perlu dioptimasi sebelum melakukan analisis sampel menggunakan ELISA:

- Konsentrasi Antibodi Capture
- Blocking Buffer
- Pengenceran Standar
- Konsentrasi Sampel
- Konsentrasi Antibodi Deteksi

Berikut masalah yang sering dihadapi dalam ELISA:

- Sinyal deteksi lemah
Bisa disebabkan oleh kontaminasi, konsentrasi antibodi, atau jumlah substrat yang terlalu sedikit.
- *Background* Tinggi
Biasanya terjadi karena ada kesalahan pada tahap *washing* atau *blocking*. Bisa juga disebabkan jumlah antibodi deteksi (enzim konjugat) yang terlalu banyak.

- Kurva Standar dengan R kurang dari 0,9

Hal ini bisa disebabkan ketidakakuratan proses pemipetan dan teknik pengenceran berseri.

E. Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA)

1. Prinsip ELFA

ELFA merupakan hasil perkembangan ELISA. Prinsip ELFA sama dengan ELISA yaitu mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi menggunakan antigen atau antibodi yang terkonjugasi dengan enzim. Alat dan reagen yang digunakannya pun sama dengan ELISA. Perbedaan kedua *immunoassay* tersebut terletak pada jenis substrat yang digunakan. ELFA menggunakan substrat berupa senyawa fluorogenik. Keberadaan kompleks antigen dan antibodi akan menyebabkan pendaran warna (*fluorescence*) yang dapat diukur menggunakan fluorometer dengan filter eksitasi dan emisi yang tepat pada panjang gelombang tertentu (Koivunen and Krogsrud, 2006). *Fluorescence* adalah emisi cahaya dari substansi yang telah menyerap cahaya atau radiasi elektromagnetik lain. *Fluorescence* juga terbentuk ketika molekul tereksitasi ke tahap elektronik yang lebih tinggi disebabkan tembakan energi elektron (Abdalla and Abdealla, 2015). Pelabelan *fluorescence* merupakan proses penempelan *fluorophore* ke molekul lain (seperti protein atau asam nukleat) secara kovalen. Molekul yang biasanya dilabeli antara lain antibodi, protein, asam amino, dan peptida yang kemudian digunakan sebagai penanda spesifik untuk mendeteksi target partikular (Abdalla and Abdealla, 2015).

2. Keunggulan dan Kelemahan ELFA

Jika dibandingkan dengan ELISA, ELFA memiliki keunggulan yaitu lebih terpercaya dan lebih sensitif. Bahkan menurut Numazaki *et al* (1985), ELFA 100 kali lebih sensitif dari ELISA atau RIA. Dalam penelitiannya, Numazaki membuktikan bahwa ELISA merupakan metode yang memberikan reaksi positif non spesifik dengan persentase tinggi, sedangkan hasil ELFA lebih mendekati hasil PCR. Berdasarkan *cost-effectiveness*, kebutuhan spesialis, dan waktu

pengulangan, ELFA telah terbukti merupakan metode yang baik untuk mendeteksi EBV (Kocoglu *et al.*, 2014). ELFA hanya membutuhkan waktu deteksi selama 40 menit sedangkan ELISA membutuhkan waktu 130 menit. Selain itu, ELFA membutuhkan konsentrasi enzim lebih sedikit dibandingkan dengan ELISA. ELFA hanya membutuhkan enzim HRP sebanyak 25-50 ng/ml sedangkan ELISA membutuhkan 20-200 ng/ml. Namun berdasarkan penelitian yang dilakukan Abdalla dan Abdealla (2015), ELFA terbukti tidak terlalu akurat untuk mendeteksi konsentrasi TSH yang sangat rendah dan sangat tinggi.

3. Tahapan dan Komponen ELFA

Berikut metode kerja ELFA yang dikutip dari penelitian Numazaki *et al* (1985):

Wells of a polyvinyl microtitration plate (B plate; Dynatech Laboratories Inc) were coated with reticulate body and elementary body antigens as described above. After incubation overnight at 4°C, the plate was washed once with PBST. The wells were then filled with 100 µl of 1.0% BSA in PBS and left at room temperature for 4 h. After this the wells were washed once with PBST and 100 µl of diluted serum was added to each well. The plate was then incubated for 2 h at 37°C and washed five times with PBST. To each well was added 100 µl of a 1/10 000 dilution in PBST of β-galactosidase labelled goat antihuman IgG (Zymed Laboratories Inc, South San Francisco, California). After further incubation for 2 h at 37°C, the conjugate was removed by aspiration and each well was again washed five times with PBST. Substrate containing 0.0025% 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside (Koch-Light Laboratories, Colnbrook Bucks) in 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) was added to a volume of 100 µl/well. The enzyme was allowed to act for 20 min and then stopped with 100 µl of 0.1 M glycine-NaOH buffer. The fluorescence unit (FU) of each well was determined with a Dynatech MicroFluor reader (1 fluorescence unit = 0.5×10^{-12} M methylumbelliferone).

a. Coating atau Capture

ELFA memiliki jenis yang sama dengan ELISA, yaitu *direct*, *indirect*, *sandwich*, dan kompetitif. Oleh sebab itu, tahap imobilisasi antigen atau antibodi target dapat dilakukan dengan cara *coating* (ELFA *direct* atau *indirect*) atau

capture (ELFA *sandwich*). Reagen yang digunakan pada tahap ini sama dengan ELISA.

- *Blocking*

Proses *blocking* dikerjakan dengan larutan yang sama dengan ELISA, yaitu BSA atau skim milk.

- *Detection*

Antibodi yang digunakan pada tahap ini bisa dikonjugasikan dengan enzim AP, HRP, atau β -galactosidase. Jumlah antibodi deteksi yang digunakan disesuaikan dengan jenis ELFA, satu antibodi deteksi untuk ELFA jenis *direct* dan dua antibodi untuk jenis *indirect*.

- *Signal Measurement*

Substrat yang digunakan berupa senyawa florogenik dan harus disesuaikan dengan enzim yang digunakan. Berikut pasangan enzim dan substrat yang dapat digunakan pada ELFA (Numazaki *et al.*, 1985):

Enzim	Substrat
AP	4-methylumbelliferyl phosphate
HRP	• 4-Methyl umbelliferyl phosphate (MUP) • p-hydroxyphenylacetic acid (PHPA)
β -galactosidase	4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyramoside

Pendeteksian *fluorescent* membutuhkan *microplate* buram berwarna hitam atau putih. *Fluorometric plate reader* melakukan pengukuran dari atas atau bawah plate. Oleh karena itu, ELFA harus dikerjakan pada *microplate* dengan bagian bawah yang bersih. Untuk mendapatkan hasil ELFA yang lebih bagus disarankan menggunakan plate hitam agar menghasilkan *background* yang lebih rendah (Thermo Scientific, 2010).

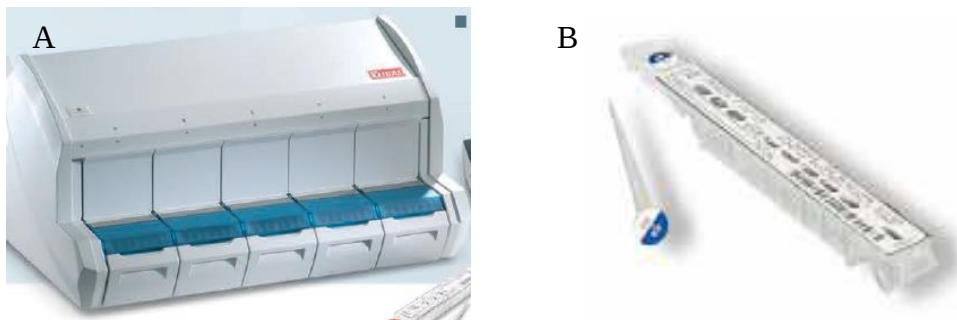
4. Troubleshooting ELFA

Proses pemaparan berlebih (*overexposure*) reagen *fluorescent* pada cahaya yang kuat dapat menyebabkan pemutihan foto yang disebabkan dekomposisi *fluorophore* (Thermo Scientific, 2010). Perlindungan *fluorophore* dari cahaya kuat merupakan hal penting untuk menghasilkan sinyal yang efektif. Selain itu, hal yang dapat menyebabkan sinyal rendah adalah *photo-quenching* yang dikarakterisasi dengan kehadiran *fluorophore* di dekat yang lain sehingga menyebabkan dispersi energi (Thermo Scientific, 2010). Untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan pelabelan ulang (mengganti *fluorophore* tipe lain).

5. Instrumen Berbasis ELFA

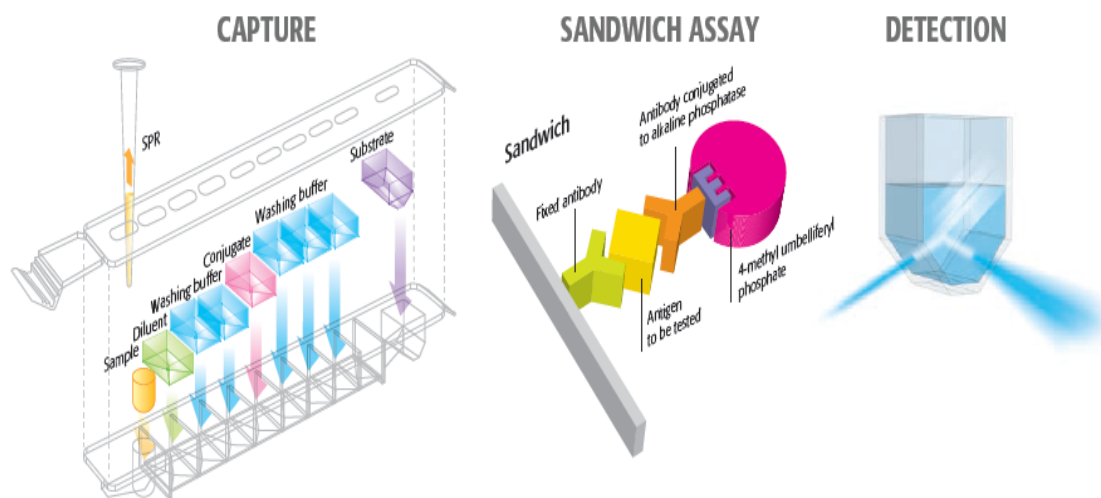
Semakin berkembangnya era teknologi para peneliti juga mulai mengembangkan suatu alat otomatis yang berlandaskan prinsip kerja ELFA. Alat otomatis tersebut adalah VIDAS (Gambar 1.17. A). Alat ini sudah banyak digunakan di lembaga penelitian dan laboratorium klinis. VIDAS biasa digunakan untuk mendeteksi *Salmonella* sp., *Listeria* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Campylobacter* sp., dan *Staphylococcal enterotoxins* (Biomerieux, 2012). Berikut keunggulan alat VIDAS:

- Waktu deteksi yang cepat sehingga dapat melakukan 1-60 uji per jam
- Reagen dan protokol sudah tersedia dan teroptimasi
- Waktu inkubasi yang fleksibel
- Memungkinkan untuk melakukan uji dengan beberapa parameter secara bersamaan
- Sedikit pipetan dan proses dapat dilacak



Gambar 1.17. A. Alat VIDAS B. Pipet dan Strip (Biomerieux, 2012)

Prinsip alat ini sama dengan ELFA jenis *sandwich*. Alat ini menggunakan pipet otomatis dan seperangkat strip (Gambar 1.17. B) yang didalamnya sudah berisi semua reagen yang dibutuhkan (diluent, *washing buffer*, antibodi, dan substrat) (Gambar 1.18). Berbeda dengan ELFA yang dikerjakan secara manual, proses imobilisasi antigen pada VIDAS tidak terjadi pada sumur *microplate* melainkan pada pipet otomatis yang telah ditemplei antibodi *capture* (Biomerieux, 2012).



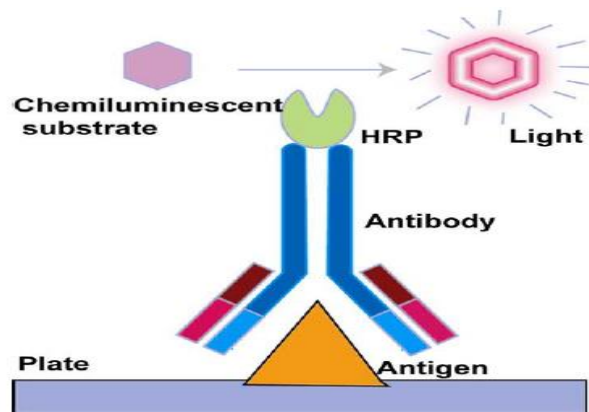
Gambar 1.18. Prinsip Kerja Alat VIDAS (Biomerieux, 2012)

F. *Chemiluminescence Enzyme Immunoassay (CLIA)*

Sejak dilaporkan oleh Woodhead pada tahun 1985, CLIA telah diterapkan secara luas untuk diagnosis klinis dan analisis lingkungan. Dalam beberapa tahun terakhir, CLIA telah mendapatkan perhatian yang cukup tinggi di berbagai bidang, termasuk ilmu kehidupan, diagnosis klinis, pemantauan lingkungan, keamanan pangan dan analisis farmasi karena memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas reaksi imunologis yang tinggi (Zhang *et al.*, 2012). CLIA dapat digunakan untuk pengukuran antigen dalam lisat sel, plasma, urin, saliva, jaringan, dan sampel medium kultur secara kuantitatif.

1. Prinsip CLIA

Pada tahap awal, CLIA menggunakan antibodi yang diberi label senyawa *chemiluminescent* seperti luminol, isoluminol, acridinium ester dan sebagainya (Thermo Scientific, 2010). Namun pelabelan antibodi dengan senyawa *chemiluminescent* dibatasi oleh durasi keluaran cahaya yang relatif singkat. Oleh karena itu, dikembangkanlah CLIA yang menggunakan label berupa enzim dan menggunakan substrat berupa senyawa *chemiluminescent* (Gambar 1.19). Dengan cara ini, CLIA dapat meningkatkan durasi keluaran cahaya. Enzim mengkonversi substrat menjadi produk yang mengemisi foton cahaya sehingga menghasilkan warna. *Luminescence* merupakan emisi cahaya dari suatu substansi akibat loncatan elektron ke tahap atau tingkat lebih rendah (Novateinbio, 2015).



Gambar 1.19. Prinsip Kerja CLIA (Novateinbio, 2015)

2. Keunggulan dan Kelemahan CLIA

Immunoassay ini dapat digunakan sebagai solusi untuk dua masalah ELISA. Ketika konsentrasi protein lebih tinggi dari kisaran deteksi ELISA maka sampel harus diencerkan terlebih dahulu tetapi masalah kedua dapat muncul ketika sampel dengan konsentrasi rendah tidak akan terdeteksi setelah pengenceran. Misalnya, protein CRP yang memiliki konsentrasi bervariasi tiap fase inflamasi. CLIA dapat digunakan dalam mendeteksi CRP dari sampel yang berbeda dan konsentrasi yang berbeda dengan pengenceran yang sama (Chen *et al.*, 2012). CLIA juga memiliki sensitivitas yang tinggi seperti dapat mendeteksi

HCG hingga konsentrasi 2.35 pg/ml. Dalam penelitiannya, Chen *et al* (2012), melaporkan bahwa CLIA menjadi metode yang lebih sensitif dan spesifik dibandingkan ELISA untuk diagnosis infeksi mononucleosis. Walaupun CLIA memiliki banyak keunggulan dibandingkan ELISA, namun untuk melakukan *immunoassay* ini dibutuhkan biaya yang lebih mahal.

Berikut perbandingan CLIA dengan ELISA (Cloud-Clone corp, 2013):

Characteristic	CLIA Kit	ELISA Kit
High sensitivity	Minimum detection range levels at 10 ⁻¹⁸ mol/L, important implication for early diagnosis of diseases	Minimum detection range levels at 10 ⁻⁹ mol/L
linear range	RLU values show a linear relationship within 4-6 orders of magnitude	Optical density(OD) values show a linear relationship within 2 orders of magnitude
Sample dilution	Sample with high concentration could be detected with stock sample to avoid the deviation in dilution	Sample with high concentration should be diluted before detection, and this might cause some deviation
Dilution fold of standard curve	3-4 fold dilutions series, the range of standard curve is quite wide, and the highest detectable concentration is 10000 times higher than the lowest detectable concentration	2 fold dilutions series, and the highest detectable concentration is 128 times higher than the lowest detectable concentration
Sample volume	50 ul of sample was utilized in some CLIA Kit	100 ul of sample was utilized in regular sandwich ELISA Kit

3. Tahapan dan Komponen CLIA

Berikut metode kerja CLIA yang dikutip dari Cloud-Clone Crop (2013):

The assay processes of CLIA Kit is listed below: at first, test samples are added into black opaque microplates which were coated with antibodies; secondly, horseradish peroxidase complex conjugates with specific antibody was added, and then, the un-reacted ingredients were washed away. Thirdly, Luminol chemiluminescent substrate will be added into the microwells, and then relative luminosity values (RLU) will be scanned by photon counter reader,

CLIA dikerjakan di dalam sumur *microplate* buram berwarna hitam. Enzim yang bisa digunakan dalam *immunoassay* ini adalah AP dan HRP. HRP dapat digunakan untuk deteksi yang diperpanjang sehingga dapat digunakan bersama *microplate* dengan berbagai macam ukuran. Substrat yang bisa digunakan antara lain: luminol; isoluminol; luciferin; acridinium ester; dan

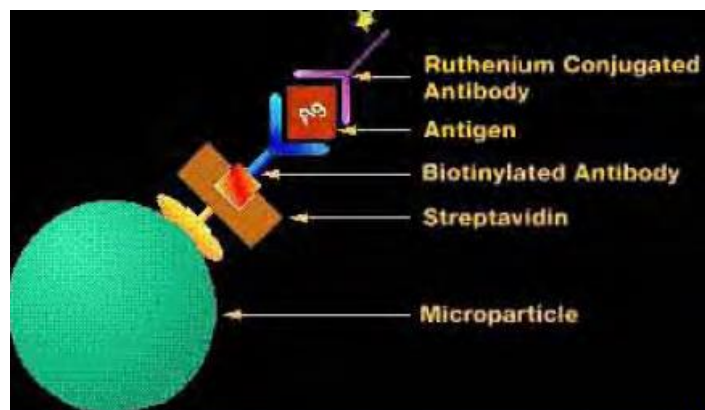
polyphenols (pyrogallol, purpurogallin, gallic acid, and umbelliferone) (Thermo Scientific, 2010). Jika menggunakan isoluminol biasanya harus menggunakan enhancer (phenols, naphthols, aromatic amines, or benzothiazoles) yang berperan sebagai pelindung enzim dan memungkinkan reaksi terjadi selama beberapa menit. Reaksi *luminescent* diukur dalam *relative light units* (RLU) menggunakan alat luminometer pada panjang gelombang 425 nm (Chen *et al.*, 2012).

G. *Electrochemiluminescence Immunoassay* (ECLIA)

Chemiluminescence adalah emisi atau pancaran cahaya oleh produk yang distimulus oleh suatu reaksi kimia atau suatu kompleks cahaya (Cloud-Clone corp, 2013). ECLIA adalah suatu metode untuk mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi dengan memanfaatkan reaksi antara antigen dengan antibodi yang menghasilkan cahaya.

1. Prinsip ECLIA

Cahaya yang dihasilkan merupakan hasil dari reaksi kimia yang distimulasi oleh molekul bermuatan listrik. Berbeda dengan ELISA, ECLIA menggunakan kompleks ruthenium sebagai label dan *tripropylamine* (TPA) sebagai pendonor elektron pada ruthenium (Gambar 1.20) (Cloud-Clone corp, 2013). Reaksi *chemiluminescence* untuk mendeteksi kompleks reaksi diinisiasi dengan memberikan arus listrik ke larutan sampel. Cahaya hasil reaksi akan diukur pada panjang gelombang 620 nm.



Gambar 1.20. Skema ECLIA (Cloud-Clone corp, 2013)

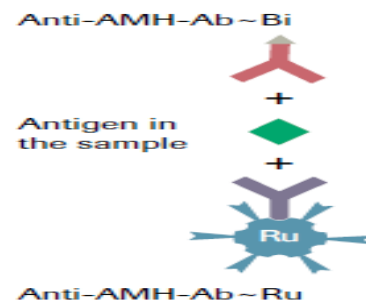
2. Keunggulan dan Kelemahan ECLIA

ECLIA menggunakan teknologi tinggi yang memberi banyak keuntungan dibandingkan dengan metode lain. ECLIA memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi sehingga dapat mendeteksi sampel konsentrasi rendah seperti mendeteksi HCG hingga konsentrasi 2.35 pg/ml (Chen *et al.*, 2012). *Immunoassay* ini juga memiliki rentang deteksi yang luas sehingga dapat mendeteksi analit yang konsentrasinya sangat bervariasi tiap tahapnya. Volume sampel yang dibutuhkan pun hanya sedikit, sekitar 50µl. ECLIA tidak membutuhkan waktu inkubasi yang lama, tidak memerlukan *stop solution*, dan tidak ada bahaya radioaktif. Kelemahan metode ini adalah biaya pengerjaan dan reagenya yang cukup mahal.

3. Tahapan dan Komponen ECLIA

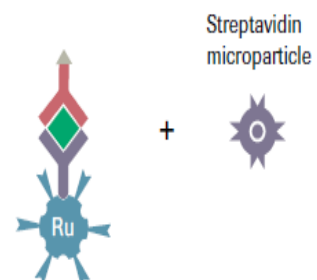
a. Pembentukan Kompleks Imun

Berbeda dengan ELISA, tahap pertama pada ECLIA bukanlah *coating*. Tahap pertama ECLIA adalah pembentukan kompleks antigen dan antibodi (Cobas, 2013). Pada tahap ini, sampel diinkubasi bersama dua jenis antibodi. Antibodi pertama adalah antibodi yang terikat dengan biotin sedangkan antibodi kedua adalah antibodi yang diberi label kompleks rhutenium. Kedua antibodi tersebut harus dapat mengenali epitop yang berbeda (sama seperti ELISA jenis *sandwich*). Tahap ini dapat dilakukan di dalam *microtube*. Diperlukan inkubasi selama sembilan menit untuk memastikan antigen target diikat atau dikenali oleh kedua antibodi yang digunakan (Cobas, 2013).



b. Interaksi Biotin-Streptavidin

Pada tahap ini dilakukan penambahan mikropartikel yang dilapisi oleh streptavidin. Diperlukan waktu inkubasi selama sembilan menit untuk memastikan terjadinya interaksi antara biotin dengan streptavidin.



c. Imobilisasi

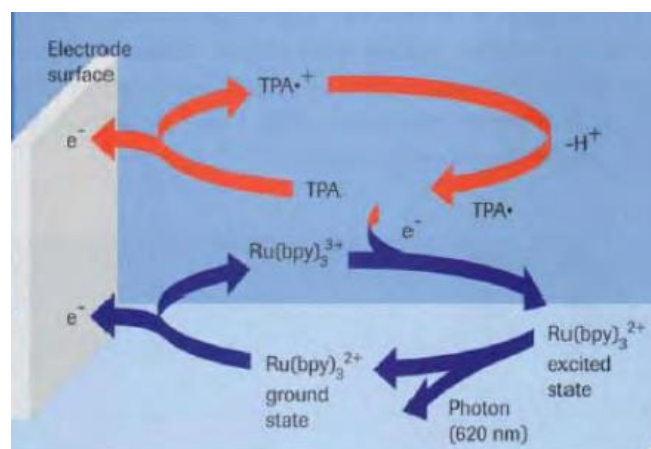
Gabungan reaksi diatas dimasukkan ke dalam sel pengukur elektrokimia (*measuring flowcell*) yang memiliki medan magnet. Di dalam *measuring flowcell* kompleks



imun yang terbentuk (antigen-antibodi-biotin-streptavidin) ditangkap secara magnetis sedangkan substansi yang tidak terikat akan dicuci dan kemudian dipindahkan oleh buffer ProCell (Cobas, 2010).

d. Pengukuran Sinyal

Pada tahap ini, dilakukan penambahan TPA ke dalam *measuring flowcell* dan proses transfer elektron pun terjadi (Gambar 1.21). Pertama TPA melepas ion H^+ lalu mendonorkan elektron pada rhutenium. Hal tersebut menyebabkan terjadi perubahan bilangan oksidasi pada rhutenium (Ru^{3+} menjadi Ru^{2+}). Kondisi tersebut bukanlah kondisi yang stabil bagi rhutenium. Oleh sebab itu, rhutenium melepas elektron untuk mencapai bilangan oksidasi 2^+ . Peristiwa pelepasan elektron tersebut yang menyebabkan terlepasnya photon. *Chemiluminescence* yang terbentuk diukur menggunakan *photomultiplier* pada panjang gelombang 620 nm (Chen *et al.*, 2012).



Gambar 1.21. Mekanisme Transfer Elektron pada ECLIA (Chen *et al.*, 2012)

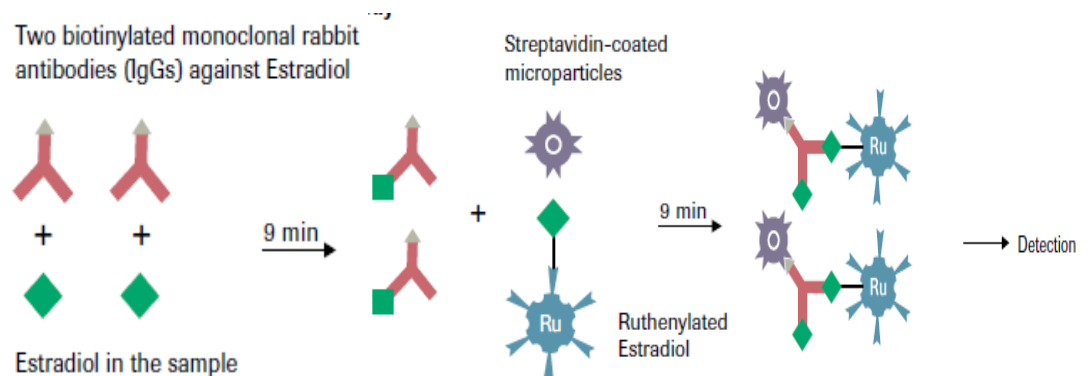
Hasilnya ditentukan melalui kurva kalibrasi yang digenerasikan secara spesifik dengan instrumen dengan cara kalibrasi 2 titik terhadap kurva master yang tersedia melalui *barcode* reagensia. Jumlah cahaya yang dihasilkan berbanding lurus dengan kadar analit dalam sampel.

4. Jenis-Jenis ECLIA

Berbeda dengan ELISA, ECLIA hanya terdiri dari dua jenis, yaitu *sandwich* dan kompetitif. ECLIA *sandwich* digunakan untuk menganalisis analit dengan berat molekul yang besar seperti prolaktin, LH, dan testosteron. ECLIA kompetitif dipakai untuk menganalisis analit yang mempunyai berat molekul kecil seperti estradiol dan progesteron (Cobas, 2010). Tahapan kerja dan komponen ECLIA *sandwich* sudah dijelaskan pada bagian C sedangkan pada ECLIA kompetitif ada komponen yang berbeda.

Berikut tahapan ECLIA kompetitif (Gambar 1.22) (Cobas, 2014):

- Antigen dalam sampel (contohnya estradiol) diinkubasi selama sembilan menit bersama satu jenis antibodi monoklonal yang terbiotinilasi.
- Kompleks imun tersebut diinkubasi kembali selama sembilan menit bersama antigen (estradiol) berlabel kompleks rhutenium dan mikropartikel yang telah dilapisi streptavidin.
- Kompleks antigen-antibodi-biotin-streptavidin dimasukkan ke dalam *measuring flowcell*, dilakukan penambahan TPA, dan dilakukan pendeteksian sinyal.



Gambar 1.22. Tahapan ECLIA kompetitif (Cobas, 2014)

5. Instrumen Berbasis ECLIA

Selain VIDAS, para peneliti juga sudah mengembangkan alat otomatis yang berbasis ECLIA. Alat tersebut adalah COBAS (Gambar 1.23). COBAS dapat menganalisis sampel berupa serum, plasma, dan urin (Cobas, 2010). Jumlah sampel dalam sekali uji adalah 88 sampel. Volume sampel yang dibutuhkan berkisar 10-50 μl . COBAS dapat melakukan analisis menggunakan tiga metode uji, yaitu *sandwich*, kompetitif, dan titrasi (Cobas, 2010).



Gambar 1.23. Alat COBAS (Cobas, 2010)

Berikut keunggulan alat COBAS (Cobas, 2010):

- Mudah dioperasikan
- Menggunakan sistem *barcode*
- Sangat sensitif mendeteksi antigen pada tingkat yang sangat rendah
- Rentang pengukuran yang luas
 - Estradiol 5- 4300 pg/ml
 - Progesteron 0-60 ng/ml
 - PSA Total 0-100 ng/ml
- Efisiensi waktu
- Volume sampel sedikit

RANGKUMAN

1. *Immunoassay* adalah metode pengujian keberadaan antigen atau antibodi yang melibatkan interaksi antar keduanya.
2. Prinsip metode RIA adalah mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang berlabel senyawa radioaktif.
3. IFA adalah *immunoassay* yang menggunakan label berupa senyawa fluoresens. Hasil pemeriksaan menggunakan metode ini dapat divisualisasi menggunakan mikroskop fluorescent atau fluorometer.
4. Imunokromatografi merupakan *immunoassay* yang menggunakan penanda berupa koloid emas. Keberadaan antigen atau antibodi yang ingin dideteksi ditandai dengan terbentuknya sebuah garis pada daerah uji.
5. ELISA, ELFA, dan CLIA merupakan metode deteksi antigen atau antibodi yang menggunakan label berupa enzim. Pengikatan antigen-antibodi dideteksi melalui reaksi perubahan substrat menjadi produk. Namun ketiga metode tersebut memiliki perbedaan pada jenis substrat yang digunakan. ELISA menggunakan substrat berupa senyawa kromogenik, ELFA menggunakan senyawa fluoresens, dan CLIA menggunakan senyawa chemiluminescence.
6. ECLIA adalah metode yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi menggunakan label berupa kompleks rutenium dan TPA sebagai pendonor elektron.
7. Aglutinasi adalah metode pemeriksaan yang melibatkan antigen atau antibodi yang terikat pada permukaan carier seperti partikel latex. Prinsip metode ini adalah mereaksikan antigen yang terlarut dengan antibodi yang tidak terlarut atau sebaliknya. Reaksi antigen-antibodi yang terjadi akan membentuk gumpalan.
8. Prinsip metode presipitasi adalah mendeteksi antigen menggunakan antibodi yang ditandai dengan terbentuknya endapan. Antigen dan antibodi yang digunakan berada dalam bentuk terlarut.
9. Metode fiksasi komplemen mendeteksi keberadaan antibodi spesifik pada serum pasien menggunakan tiga komponen, yaitu antigen, komplemen, dan sel darah merah.

LATIHAN SOAL

1. Interaksi antigen dengan antibodi terdapat pada immunoassai dalam bentuk afinitas, aviditas, spesifisitas, sensitivitas. Semua hal berikut merupakan karakteristik antibodi yang diinginkan untuk digunakan dalam immunoassai kecuali
 - a. Afinitas tinggi
 - b. Aviditas tinggi
 - c. Spesifisitas tinggi
 - d. Reaksi silang tinggi
 - e. Tidak ditemukan dalam sampel pasien

2. Pada suatu hasil pemeriksaan aglutinasi didapatkan hasil negatif palsu. Di zona manakah antibodi pada suatu pemeriksaan kemungkinan dapat menghasilkan negatif palsu?
 - a. Prozone
 - b. Zona ekuivalen
 - c. Postzone
 - d. Prezone
 - e. Semuanya salah

3. Salah satu jenis metode pemeriksaan imunoserologi adalah metode aglutinasi yang menggunakan partikel lateks. Yang mana dibawah ini yang paling tepat menggambarkan metode aglutinasi ?
 - a. Kombinasi antigen terlarut dengan antibodi terlarut
 - b. Kombinasi antigen tidak terlarut dengan antibodi terlarut atau sebaliknya
 - c. Reaksi yang membutuhkan antigen, komplemen untuk mendeteksi antibodi spesifik
 - d. Reaksi yang tidak menghasilkan titik akhir yang terlihat
 - e. Reaksi yang membutuhkan bantuan instrumentasi untuk dibaca

4. ELISA merupakan salah satu metode immunoassai yang menggunakan label berupa enzim dan substrat agar bisa dideteksi, jika pada kontrol negatif menunjukkan adanya warna, kemungkinan apa yang bisa terjadi ?
 - a. Terkontaminasi dengan reagen kontrol positif
 - b. Tahapan pencucian tidak lengkap
 - c. Stop Solution tidak diberikan
 - d. Enzim tidak aktif
 - e. Substrat tidak ditambahkan

5. Pada suatu pemeriksaan di Laboratorium terdiri dari tahapan pre-analitik, analitik dan post-analitik. Berikut semua hal dibawah ini merupakan tahapan quality control yang baik dalam suatu pemeriksaan, kecuali
 - a. Menyimpan reagen dengan benar.
 - b. Standarisasi suhu reaksi.
 - c. Membiarkan reaksi berjalan selama mungkin.
 - d. Melakukan tahapan pemeriksaan dengan waktu sesuai prosedur
 - e. Menggunakan antibodi monoklonal untuk menghindari reaktivitas silang

MODUL 2

PEMERIKSAAN KEHAMILAN

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan kehamilan bidang imunologi/*immunoassay* menggunakan metode aglutinasi dan imunokromatografi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip reaksi aglutinasi juga imunokromatografi untuk pemeriksaan kehamilan, mampu memahami *kit insert* pemeriksaan kehamilan metode aglutinasi dan aglutinasi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan kehamilan berupa *immunoassay* metode aglutinasi dan imunokromatografi menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami *kit insert immunoassay* metode aglutinasi dan imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel untuk pemeriksaan kehamilan
- c. Melakukan pemeriksaan *immunoassay* metode aglutinasi dan imunokromatografi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami *kit insert immunoassay* metode aglutinasi dan imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi sampel
- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa
- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji aglutinasi dan imunokromatografi
- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji aglutinasi dan imunokromatografi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Pemeriksaan kehamilan
- b. Pemeriksaan HCG metode aglutinasi
- c. Pemeriksaan HCG metode imunokromatografi

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN 1
PEMERIKSAAN *HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN* (HCG)
METODE AGLUTINASI

Human Chorionic Gonadotrophin (HCG) adalah hormon glikoprotein yang disekresikan oleh plasenta yang sedang berkembang tidak lama setelah fertilisasi (Burtis *et al.*, 1999). Pada saat periode menstruasi pertama terlewatkan, konsentrasi HCG dalam serum dan urin sekitar 100 mIU/ml. Konsentrasi tersebut akan meningkat dua kali lipat setiap dua hari. Tingkat konsentrasi HCG tertinggi (sekitar 100.000 mIU/ml) terlihat di akhir trimester pertama kehamilan (Burtis *et al.*, 1999). Kehadiran awal HCG dalam urin telah membuat HCG dipilih menjadi penanda untuk deteksi kehamilan. Pada pemeriksaan kehamilan, sampel urin harus disimpan pada wadah yang bersih, kering, bebas dari detergen dan bahan pengawet. Urin pertama pada pagi hari lebih sering dijadikan sampel karena mengandung konsentrasi HCG tertinggi, tetapi pengambilan sampel urin pada waktu lain masih dapat digunakan. Urin yang keruh harus disentrifugasi terlebih dahulu sebelum diuji.

Pemeriksaan HCG ini berdasarkan reaksi aglutinasi yang terjadi antara partikel lateks yang dilapisi antibodi anti-HCG dengan HCG yang terkandung dalam sampel (Batzner, 1980). Kehadiran HCG dalam sampel akan menunjukkan pembentukan matriks aglutinasi yang secara visual dapat dibedakan dengan mudah dari kontrol negatif. Dibutuhkan konsentrasi HCG urin yang lebih tinggi dari 200 mIU/ml untuk mendapatkan hasil positif (Burtis *et al.*, 1999). Hasil pemeriksaan dinyatakan positif jika aglutinasi terbentuk selama dua menit, tetapi jika aglutinasi tidak terbentuk selama dua menit maka hasil dinyatakan negatif.

Sejumlah kondisi selain kehamilan, termasuk penyakit *trophoblastic*, *chorionic epithelioma*, *hydatid mole* dan *non-trophoblastic neoplasma* dapat meningkatkan tingkat HCG urin sehingga menyebabkan hasil *false positive* (positif palsu) (Catt *et al.*, 1975). Ekskresi HCG sering menurun pada kasus kehamilan rahim tambahan, kehamilan toxemia, atau terancam aborsi. Hasil pemeriksaan ini dapat diterima jika didukung dengan bukti klinis.

I. Cara Kerja

Reagen Lateks HCG, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- ditetaskan kontrol negatif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ditetaskan kontrol positif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ditetaskan sampel sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ditetaskan reagen lateks HCG sebanyak 1 tetes pada papan aglutinasi (ujung pipet reagen tidak boleh menyentuh kontrol maupun sampel)

Campuran reagen dan kontrol / sampel

- dihomogenkan menggunakan ujung pipet (ujung pipet yang digunakan untuk menghomogenkan tiap kontrol dan sampel harus berbeda)
- dirotasi atau digoyang selama 2 menit

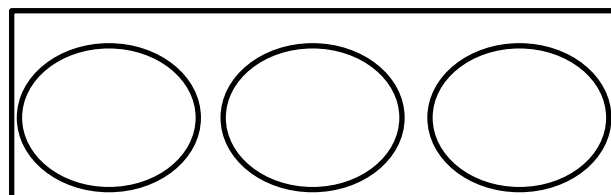
Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien : Nomor Lab :

Usia Pasien : Jam Pengambilan :

Sampel	Kontrol positif	Kontrol negatif
--------	-----------------	-----------------



III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

RANGKUMAN

1. Ketika fertilisasi terjadi, plasenta akan mulai terbentuk dengan tujuan untuk melindungi sel telur yang telah dibuahi. Ketika proses tersebut terjadi, plasenta mensekresikan hormon yang disebut HCG. Hormon ini mencapai konsentrasi tertinggi pada trisemester pertama.
2. Keberadaan hormon HCG dalam tubuh dapat diuji menggunakan metode aglutinasi. Hormon HCG dideteksi menggunakan antibodi anti-HCG yang terikat pada partikel lateks. Hasil positif akan ditandai dengan terbentuknya gumpalan.
3. Spesimen yang digunakan dalam pemeriksaan HCG adalah urin pagi hari karena pada kadar HCG tertinggi ada pada pagi hari. Spesimen harus ditampung di wadah plastik yang bersih, kering, dan terbebas dari detergen serta bahan pengawet.
4. Ada beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil positif palsu pada pemeriksaan HCG, yaitu penyakit *trophoblastic*, *chorionic epithelioma*, *hydatid mole* dan *non-trophoblastic neoplasma*. Selain itu, kesalahan teknis seperti melakukan rotasi lebih dari dua menit atau sampel telah terkontaminasi oleh kontrol positif.
5. Ada beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil negatif palsu pada pemeriksaan HCG, yaitu kondisi reagen atau sampel yang sudah rusak atau kadaluarsa dan melakukan rotasi kurang dari dua menit.

LATIHAN SOAL

1. HCG adalah hormon yang diproduksi oleh jaringan trofoblas pada hari ke 8-9 setelah ovulasi. Pada usia kehamilan berapa bulan hormon HCG mencapai konsentrasi tertinggi ?
 - a. 1 bulan
 - b. 2 bulan
 - c. 3 bulan
 - d. 4 bulan
 - e. 5 bulan
2. Selain kehamilan, kondisi apa yang dapat menyebabkan konsentrasi HCG dalam tubuh meningkat ?
 - a. Ancaman terjadinya keguguran
 - b. Penyakit trofoblastik
 - c. Kanker payudara
 - d. Toksemia gravidarum
 - e. Infeksi oleh virus
3. Seorang ATLM mendapatkan spesimen untuk pemeriksaan kehamilan dari seorang wanita. ATLM mencampurkan spesimen dengan reagensia yang mengandung partikel lateks selama 2 menit. Apa komponen dalam spesimen yang ingin dideteksi pada pemeriksaan tersebut ?
 - a. Anti Streptolisin O
 - b. C Reactive Protein
 - c. Human Chorionic Gonadotrophin
 - d. Rheumatoid Factor
 - e. Veneral Disease Research Laboratory
4. Seorang ATLM mendapat permintaan pemeriksaan kehamilan. Reagen yang tersedia di rumah sakit adalah reagen yang mengandung partikel lateks. Apa jenis spesimen urin yang tepat untuk pemeriksaan tersebut ?

- a. Malam hari
 - b. 24 jam
 - c. Pagi hari
 - d. 12 jam
 - e. Sewaktu
5. Seorang ATLM mendapatkan spesimen untuk pemeriksaan kehamilan dari seorang wanita. ATLM mencampurkan spesimen dengan reagensia yang mengandung partikel lateks. Setelah 2 menit didapatkan hasil seperti pada gambar.



Keterangan: 1. Kontrol negatif
2. Spesimen

Berapa konsentrasi HCG dalam spesimen tersebut?

- a. >100 mIU/ml
- b. >200 mIU/ml
- c. >300 mIU/ml
- d. >400mIU/ml
- e. >500 mIU/ml

KEGIATAN 2

PEMERIKSAAN *HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN* (HCG)

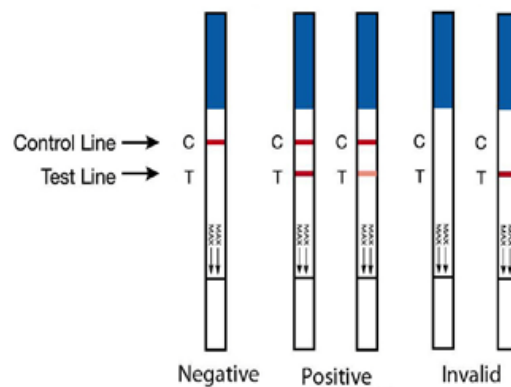
METODE IMUNOKROMATOGRAFI

HCG adalah hormon yang diproduksi oleh jaringan trofoblas dan muncul di sekitar hari ke 8-9 setelah ovulasi, atau sekitar 4 hari setelah pembuahan. Dalam siklus 28 hari dengan ovulasi terjadi pada hari ke 14, HCG dapat dideteksi dalam urin atau serum sekitar hari ke 23, atau 5 hari sebelum menstruasi (Artron, 2010). Konsentrasi HCG akan meningkat dua kali lipat kira-kira setiap 2 hari dan mencapai puncak antara 7-12 minggu setelah hari pertama menstruasi terakhir. Pada subjek normal, HCG dalam urine memberikan indikasi awal kehamilan. Tingkat HCG yang meningkat dapat berhubungan dengan penyakit trofoblas dan neoplasma nontrophoblastic tertentu (Burtis *et al.*, 1999). Dengan demikian, kemungkinan penyakit lain harus dihilangkan sebelum diagnosis kehamilan dapat dibuat. HCG terdiri dari dua subunit, alpha dan beta (Humapreg, 2004). Subunit alpha dari berbagai hormon glikoprotein secara struktural sangat mirip, tetapi subunit beta berbeda dalam sekuens asam amino. Perbedaan-perbedaan ini bertanggung jawab untuk spesifisitas biologis dan imunologis mereka.

Pemeriksaan HCG biasanya menggunakan sampel berupa urin. Sampel urin pertama di pagi hari adalah yang paling optimal karena konsentrasi tertinggi HCG ada pada saat itu (Burtis *et al.*, 1999). Sampel urin dapat dikumpulkan dalam wadah plastik atau kaca kontainer yang bersih dan kering. Jika sampel tidak dapat segera diuji maka dapat disimpan pada 2-8°C hingga 48 jam sebelum pengujian. Sampel harus disesuaikan dengan suhu kamar sebelum pengujian. Selain urin, keberadaan HCG dapat dideteksi melalui serum atau plasma. Untuk sampel serum, darah dikumpulkan dalam tabung tanpa antikoagulan sedangkan untuk sampel plasma, darah dikumpulkan dalam tabung yang berisi antikoagulan (Humapreg, 2004). Pengujian harus dilakukan segera setelah sampel telah dikumpulkan. Jangan biarkan sampel pada suhu kamar selama periode berkepanjangan.

Keberadaan HCG dalam urin atau serum dapat dideteksi dengan berbagai jenis *immunoassay* seperti aglutinasi dan imunokromatografi. Imunokromatografi

menyediakan tes kualitatif yang lebih sederhana untuk dilakukan. Pada bantalan perangkat tes imukromatografi berisi antibodi monoklonal anti-beta-HCG yang telah dikonjugasikan dengan koloid emas (Artron, 2010). Membran daerah tes (T) dilapisi antibodi monoklonal anti-alpha-HCG sedangkan membran daerah kontrol (C) dilapisi IgG anti-*goat* (Artron, 2010). Ketika bantalan penyerap direndam dengan urin, urin akan bermigrasi melalui kapiler menuju daerah T dan C. Jika HCG hadir dalam urin maka akan bereaksi dengan antibodi anti-beta-HCG yang terkonjugasi koloid emas. Kompleks imun tersebut akan bergerak dan ditangkap oleh antibodi anti-alpha-HCG untuk membentuk garis berwarna di daerah T (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Interpretasi Hasil Pemeriksaan HCG (Artron, 2010)

Garis kontrol tidak dipengaruhi oleh ada atau tidak adanya HCG dalam sampel. Garis pada kontrol harus hadir di semua reaksi. Tidak adanya garis berwarna pada daerah kontrol merupakan indikasi dari hasil yang tidak valid. Batas deteksi untuk HCG adalah 20 mIU/ml. Sampel urin yang mengandung HCG sama atau lebih besar dari 20 mIU/ml akan menginduksi tes positif (Burtis *et al.*, 1999). Sampel yang mengandung HCG kurang dari 20 mIU/ml juga dapat menghasilkan garis positif yang sangat samar.

I. Cara Kerja

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- dicelupkan ke dalam urin, serum atau plasma secara vertikal dengan panah menunjuk ke arah sampel
- ditunggu selama 10 detik, jangan sampai melebihi batas garis maksimum
- ditunggu hingga muncul garis merah, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil setelah 30 menit

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

RANGKUMAN

1. HCG adalah hormon yang disekresikan oleh plasenta. Hormon ini terdiri dari dua subunit, yaitu subunit α dan β .
2. Keberadaan hormon HCG dalam tubuh dapat diuji menggunakan metode imunokromatografi. Hormon HCG dideteksi menggunakan dua jenis antibodi yaitu antibodi anti β -HCG yang terkonjugasi kolid emas dan antibodi anti α -HCG. Hasil positif akan ditandai dengan terbentuknya garis pada daerah kontrol dan tes.
3. Spesimen yang digunakan dalam pemeriksaan HCG adalah urin pagi hari karena pada kadar HCG tertinggi ada pada pagi hari. Spesimen dapat disimpan pada suhu 2-8°C dalam 1-2 hari.
4. Ada beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil positif palsu pada pemeriksaan HCG, yaitu penyakit *trophoblastic*, *chorionic epithelioma*, *hydatid mole* dan *non-trophoblastic neoplasma*. Selain itu, kesalahan teknis seperti sampel telah terkontaminasi oleh kontrol positif.
5. Ada beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil negatif palsu pada pemeriksaan HCG, yaitu konsentrasi HCG dalam sampel masih dibawah rentang deteksi imunokromatografi, kondisi reagen atau sampel yang sudah rusak atau kadaluarsa, sampel kurang meresap pada bantalan sampel, dan interpretasi hasil kurang dari 15 menit.

LATIHAN SOAL

1. Pemeriksaan kehamilan dilakukan terhadap dua sampel urin. Hasil pemeriksaan salah satu sampel positif dan satu sampel lagi negatif. Tetapi ada kesalahan fatal yang dilakukan, yaitu kedua sampel tersebut tertukar pada saat memasukkan sampel sehingga membuat dia ragu siapa pemilik sampel tersebut. Bagaimanakah sikap efektif yang seharusnya dilakukan untuk mengatasi hal tersebut ?
 - a. Berusaha mengingat kembali pemilik masing-masing sampel tersebut
 - b. Meminta kembali sampel salah satu pasien dan dilakukan pemeriksaan
 - c. Melaporkan kesalahan tersebut kepada penanggung jawab laboratorium
 - d. Membuat hasil pemeriksaan setelah benar-benar yakin siapa pemiliknya
 - e. Menginfokan kembali kepada kedua pasien untuk mengambil sampel ulang
2. Seorang wanita usia 27 tahun datang dengan rujukan pemeriksaan HCG. Spesimen diperiksa menggunakan imunokromatografi. Setelah 3 menit, terbentuk 2 garis berwarna pada daerah tes dan kontrol. Komponen apa yang telah diendapkan pada daerah tes ?
 - a. Antigen HCG
 - b. Anti- β HCG
 - c. Koloid emas
 - d. IgG anti *mouse*
 - e. Anti- α HCG
3. Berapa kemungkinan konsentrasi HCG yang terkandung dalam urin wanita tersebut ?
 - a. <25 mIU/ml
 - b. >20 mIU/ml
 - c. >35 mIU/ml
 - d. <10 mIU/ml
 - e. >250 mIU/ml

4. Perhatikan kutipan kit insert berikut ini: *“Depending on the concentration of hCG in the test specimen, positive results may be observed in as soon as 40 seconds. However, to confirm negative results, the complete reaction time of 5 minutes is required. It is important that the background is clear before the result is read. Do not read results after more than 30 minutes”*. Berapa lama waktu pembacaan hasil yang dibutuhkan untuk mendapatkan hasil yang akurat?
- 15 menit
 - 5 menit
 - 3 menit
 - 40 detik
 - 30 menit
5. Seorang wanita datang ke laboratorium untuk melakukan pemeriksaan kehamilan. Seorang ATLM memberi instruksi pada wanita tersebut untuk menampung urin pagi hari. Setelah spesimen didapatkan pemeriksaan dilakukan dengan aglutinasi. Apa alasan ATLM memberikan instruksi tersebut ?
- Karena urin pagi hari mengandung kadar HCG tertinggi
 - Untuk mendapat spesimen yang masih segar
 - Supaya pemeriksaan cepat dilakukan
 - Agar tidak perlu disimpan di dalam lemari pendingin
 - Untuk mengurangi resiko kontaminasi

MODUL 3

PEMERIKSAAN DEMAM TIFOID

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium demam tifoid menggunakan metode aglutinasi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep aglutinasi dan prinsip reaksi aglutinasi untuk pemeriksaan demam tifoid, mampu memahami kit insert pemeriksaan demam tifoid metode aglutinasi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan laboratorium berupa immunoassay metode aglutinasi, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami kit insert pemeriksaan demam tifoid metode aglutinasi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel
- c. Melakukan pemeriksaan demam tifoid metode aglutinasi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami kit insert pemeriksaan demam tifoid metode aglutinasi
- b. Melakukan identifikasi sampel
- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa
- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji aglutinasi

- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji aglutinasi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Pemeriksaan Demam Tifoid
- b. Pemeriksaan Widal
- c. Pemeriksaan *Immuno Magnetic Beads Inhibition*

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN BELAJAR 1

PEMERIKSAAN WIDAL

Uji Widal adalah prosedur uji serologi untuk mendeteksi bakteri yang mengakibatkan penyakit Tifoid. Uji ini akan memperlihatkan reaksi antibodi bakteri *Salmonella typhi* terhadap antigen somatik “O” dan flagella “H” di dalam darah (Madigan *et al.*, 2009). Reagen pemeriksaan ini terbagi menjadi 2 jenis, yaitu reagen yang mengandung antigen somatik “O” dan mengandung antigen flagella “H”. Reagen yang mengandung antigen O diberi pewarna biru sedangkan reagen yang mengandung antigen H diberi pewarna merah.

Pada pemeriksaan widal dikenal beberapa antigen yang dipakai sebagai parameter penilaian hasil uji Widal. Berikut ini penjelasan macam antigen tersebut (Madigan *et al.*, 2009):

- **Antigen O**

Antigen O merupakan somatik yang terletak di lapisan luar tubuh bakteri. Struktur kimianya terdiri dari lipopolisakarida. Antigen ini tahan terhadap pemanasan 100°C selama 2–5 jam, alkohol dan asam yang encer.

- **Antigen H**

Antigen H merupakan antigen yang terletak di flagela, fimbriae atau fili *S. typhi*. *S. typhi* mempunyai antigen H phase-1 tunggal yang juga dimiliki beberapa Salmonella lain. Antigen ini tidak aktif pada pemanasan di atas suhu 60°C dan pada pemberian alkohol atau asam.

- **Antigen Vi**

Antigen Vi terletak di lapisan terluar *S. typhi* (kapsul) yang melindungi bakteri dari fagositosis dengan struktur kimia glikolipid, akan rusak bila dipanaskan selama 1 jam pada suhu 60°C, dengan pemberian asam dan fenol. Antigen ini digunakan untuk mengetahui adanya karier.

- **Outer Membrane Protein (OMP)**

Antigen OMP *S. typhi* merupakan bagian dinding sel yang terletak di luar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya. Sifatnya resisten terhadap proteolisis dan denaturasi pada suhu 85–100°C.

Prinsip pemeriksaan ini adalah reaksi aglutinasi yang terjadi bila serum penderita dicampur dengan suspensi antigen *S. typhi* (Olopoenia and King, 2000). Pemeriksaan yang positif ialah bila terjadi reaksi aglutinasi antara antigen dan antibodi. Dengan cara mengencerkan serum, maka titer antibodi dalam serum dapat ditentukan. Pengenceran tertinggi yang masih menimbulkan reaksi aglutinasi menunjukkan titer antibodi dalam serum. Hasil *false negative* (negatif palsu) dapat ditemui pada tahap awal penyakit sama seperti pada kasus *immunounresponsiveness* dan pengobatan dengan antibiotik. Hasil negatif palsu pada antigen O juga dapat ditemui pada pasien tifoid yang telah menggunakan antibiotik kloramfenikol (Olopoenia and King, 2000).

Salah satu kelemahan yang amat penting dari penggunaan uji widal sebagai sarana penunjang diagnosis demam tifoid yaitu spesifitas yang agak rendah dan kesukaran untuk menginterpretasikan hasil tersebut, sebab banyak faktor yang mempengaruhi kenaikan titer (Olopoenia and King, 2000). Selain itu antibodi terhadap antigen H bahkan mungkin dijumpai dengan titer yang lebih tinggi, yang disebabkan adanya reaktifitas silang yang luas sehingga sukar untuk diinterpretasikan. Dengan alasan ini maka pada daerah endemis tidak dianjurkan pemeriksaan antibodi H *S.typhi*, cukup pemeriksaan titer terhadap antibodi O *S.typhi*.

I. Cara Kerja

A. Uji Kualitatif

Reagen WIDAL dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- ditetaskan sampel sebanyak 20 µl pada 8 lingkaran papan aglutinasi (kode O, AO, BO, CO, H, AH, BH, dan CH)
- ditetaskan reagen WIDAL kode O, AO, BO, CO, H, AH, BH, dan CH masing- masing 1 tetes pada papan aglutinasi yang telah ditetesi sampel (ujung pipet reagen tidak boleh menyentuh kontrol maupun sampel)

Campuran reagen dan kontrol / sampel

- dihomogenkan menggunakan ujung pipet (ujung pipet yang digunakan untuk menghomogenkan tiap kontrol dan sampel harus berbeda)
- ↓
- dirotasi atau digoyang selama 2 menit

Interpretasi Hasil

B. Uji Semi Kuantitatif

Reagen WIDAL dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- dilakukan pengenceran sampel seperti pada tabel berikut:

Volume sampel	Pengenceran
80 µl	1: 20
40 µl	1: 40
20 µl	1: 80
10 µl	1: 160
5 µl	1: 320
2.5 µl	1: 640

- ↓
- ditetaskan reagen WIDAL yang menunjukkan hasil positif pada uji kualitatif.

Campuran reagen dan kontrol / sampel

- dihomogenkan menggunakan ujung pipet (ujung pipet yang digunakan untuk menghomogenkan tiap kontrol dan sampel harus berbeda)
- ↓
- dirotasi atau digoyang selama 2 menit
- ↓
- dilihat pengenceran tertinggi yang masih terjadi aglutinasi

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Foto pengamatan:	Keterangan:

III. Pembahasan

--

--

IV. Kesimpulan

--

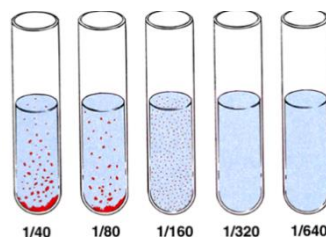
Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Demam tifoid adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *S. typhi* sedangkan paratifoid disebabkan oleh bakteri *S. paratyphi*. Bakteri tersebut termasuk bakteri Gram negatif yang memiliki tiga antigen, yaitu antigen somatik, flagella, dan kapsula.
2. Widal merupakan pemeriksaan berbasis imunologi yang bertujuan untuk mendeteksi kehadiran antibodi anti – *S. typhi* dan antibodi anti – *S. paratyphi* di dalam tubuh seseorang. Jenis antibodi yang dapat dideteksi melalui metode ini adalah IgM dan IgG.
3. Antibodi anti - *S. typhi* atau anti - *S. paratyphi* dideteksi menggunakan 2 jenis antigen, yaitu antigen somatik yang terikat pada partikel berwarna biru dan flagella yang terikat pada partikel berwarna merah.
4. Reagen yang digunakan terdiri dari 8 jenis yaitu sebagai berikut:
 - a. O : somatik *S. typhi*
 - b. AO : somatik *S. paratyphi* tipe A
 - c. BO : somatik *S. paratyphi* tipe B
 - d. CO : somatik *S. paratyphi* tipe C
 - e. H : flagella *S. typhi*
 - f. AH : flagella *S. paratyphi* tipe A
 - g. BH : flagella *S. paratyphi* tipe B
 - h. CH : flagella *S. paratyphi* tipe C
5. Spesimen yang digunakan untuk pemeriksaan ini berupa serum. Spesimen dapat disimpan pada suhu 2-8°C selama 1-7 hari atau pada -20°C jika lebih dari seminggu.
6. Titer antibodi dapat ditentukan pada pengenceran spesimen tertinggi yang masih menghasilkan aglutinasi.
7. Hasil pemeriksaan yang negatif palsu dapat terjadi pada pasien yang sudah mengkonsumsi antibiotik atau masih dalam tahap awal infeksi.
8. Hasil pemeriksaan yang positif palsu sering terjadi pada daerah endemik sehingga penentuan titer antibodi sangat diperlukan.

LATIHAN SOAL

1. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan widal. Hasil pengamatan menunjukkan pada pengenceran 1/640 tidak nampak adanya aglutinasi, namun pada pengenceran sebelumnya terbentuk. Berapa titer yang harus dilaporkan?
 - a. 1/640
 - b. 1/320
 - c. 1/160
 - d. 1/80
 - e. 1/40
2. Sampel darah diterima oleh ATLM untuk dilakukan uji widal. Serum telah dipisahkan dari sel darah dengan sentrifugasi. Saat akan diperiksa ternyata reagen yang akan digunakan telah habis masa berlaku kadaluarsanya. Stok reagen akan datang pada keesokan harinya. Oleh karena itu sampel serum akan disimpan. Suhu berapa yang digunakan untuk meletakkan serum tersebut?
 - a. -0°C
 - b. 0°C
 - c. 4°C
 - d. 25°C
 - e. 37°C
3. Pada pemeriksaan widal untuk monitoring demam tifoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi antigen somatic (O) dan antigen flagel (H). Hasil uji widal dengan metode tabung dengan pereaksi antigen somatic (O) menunjukkan hasil sebagai berikut :



Sumber: <http://www.microbiologyinfo.com/widal-test-introduction>

Berapa titer hasil pemeriksaan widal pada kasus tersebut?

- a. 1/40
- b. 1/80
- c. 1/160
- d. 1/320
- e. 1/640

4. Pada pemeriksaan semi kuantitatif widal metode tabung, spesimen serum diencerkan dengan larutan sodium klorida fisiologi. Hasil pengenceran serum selanjutnya ditambahkan dengan reagen antigen somatic (O) dan antigen flagel (H). Berapa gram/L sodium klorida yang diperlukan dalam pemeriksaan tersebut?

- a. 0,085
- b. 0,85
- c. 8,5
- d. 85
- e. 850

5. Seorang pasien yang mengalami demam tinggi dan diare selama 3 hari datang untuk melakukan pemeriksaan widal. Sebelum melakukan pengambilan spesimen seorang ATLM bertanya pada pasien kapan terakhir kali mengkonsumsi antibiotik. Mengapa ATLM perlu mengajukan pertanyaan tersebut?

- a. Karena antibiotik dapat merusak spesimen
- b. Untuk mengurangi resiko kontaminasi
- c. Agar ATLM tahu obat apa yang harus diberikan
- d. Supaya pemeriksaan cepat dilakukan
- e. Karena antibiotik menyebabkan negatif palsu

KEGIATAN BELAJAR 2

PEMERIKSAAN IMMUNO MAGNETIC BEADS INHIBITION

Immuno Magnetic Beads Inhibition atau yang dikenal dengan sebutan Tubex adalah pemeriksaan yang khusus mendeteksi antibodi IgM terhadap antigen lipopolisakarida *S. typhi* O9. Antigen ini sangat spesifik untuk *S. typhi* dan bakteri *Salmonella* serogrup D lain dengan gula yang sangat langka (α -D-tyvelose) (Tam *et al.*, 2003). Antibodi IgM anti-O9 biasanya tidak hadir pada orang sehat. Meskipun Tubex khusus mendeteksi antibodi fase akut (IgM), tubex juga dapat mendeteksi antibodi fase penyembuhan (IgG). Tubex tidak mendeteksi kasus di mana antibodi IgM yang hadir jumlahnya sangat rendah, seperti pada awal infeksi ketika sistem kekebalan tubuh belum cukup dirangsang (Rahman *et al.*, 2007). Hasil pemeriksaan ini harus disesuaikan dengan semua informasi klinis yang tersedia.

Tubex berfungsi untuk mendeteksi adanya antibodi anti-O9 dalam serum pasien dengan menilai kemampuan antibodi tersebut untuk menghambat reaksi antara antigen yang dilapisi pewarna coklat dan antibodi yang dilapisi pewarna biru (Tam *et al.*, 2003). Tingkat inhibisi sebanding dengan konsentrasi antibodi anti-O9 dalam sampel. Pemisahan diaktifkan oleh gaya magnet. Hasil dibaca secara visual terhadap skala warna. Baca dan skor hasil dengan membandingkan warna setiap supernatan ke TUBEX *Color Scale* (Gambar 3.1). Proses pembacaan harus dilakukan pada kondisi cahaya yang baik dalam waktu 30 menit setelah pemisahan, meskipun hasilnya stabil selama berjam-jam jika tidak terganggu. Skor berkisar dari 0 (merah muda) ke 10 (biru). Untuk menunjukkan kinerja kit yang benar kit, kontrol negatif harus memiliki skor ≤ 2 dan kontrol positif harus memiliki skor ≥ 8 .



Gambar 3.1. TUBEX Color Scale (IDL Biotech, 2008)

I. Cara Kerja

Reagen TUBEX, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- dimasukkan 45 µl *TUBEX Brown Reagent* ke masing-masing sumur *TUBEX Reaction Well* yang akan digunakan
- ditambahkan 45 µl kontrol positif ke sumur nomor 1, diresuspensi kurang lebih sebanyak 10 kali secara hati-hati agar tidak membentuk gelembung
- ditambahkan 45 µl kontrol negatif ke sumur nomor 2 dan diresuspensi
- ↓ - ditambahkan 45 µl sampel ke sumur nomor 3 dan diresuspensi

Campuran *TUBEX Brown Reagent* dan kontrol / sampel

- diinkubasi selama 2 menit
- ditambahkan 90 µl *TUBEX Blue Reagent* ke masing-masing sumur yang digunakan
- ↓

TUBEX Reaction Well

- ditutup dengan *TUBEX Sealing Tape* sampai rapat
- ditekan dengan jari dan dirotasi 90° selama 2 menit
- ↓ - diletakkan diatas *TUBEX Color Scale*, ditunggu selama 5 menit hingga terbentuk sepernatan yang jernih.

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Foto pengamatan:	Keterangan:

III. Pembahasan

--

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Selain widal, kehadiran antibodi anti – *S. typhi* juga dapat dideteksi menggunakan metode *Immuno Magnetic Beads Inhibition* (TUBEX). Namun pemeriksaan tersebut hanya dapat mendeteksi antibodi anti *S. typhi* jensi IgG.
2. Cara kerja pemeriksaan widal dan TUBEX cukup berbeda. Reagen yang digunakan pada TUBEX lebih sedikit dibandingkan widal. Alat yang dibutuhkan pun berbeda.
3. Kehadiran antibodi anti - *S. typhi* 09 dalam serum dideteksi menilai kemampuan antibodi tersebut untuk menghambat reaksi antara antigen yang dilapisi pewarna coklat dan antibodi yang dilapisi pewarna biru
4. Waktu pemeriksaan yang dibutuhkan pada pemeriksaan TUBEX lebih lama dibandingkan dengan widal. Pemeriksaan ini hanya bersifat kualitatif.
5. Hasil pemeriksaan diinterpretasikan dengan bantuan alat pembanding warna yang disebut *color scale*. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru pada sumur.

LATIHAN SOAL

1. Perawat ruangan membawa darah pasien rawat inap ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan Tubex-TF, setelah dilakukan sentrifugasi serumnya ikterik. Apakah tindakan yang seharusnya dilakukan pada kasus diatas?
 - a. Diputar kembali
 - b. Mengambil bahan ulang
 - c. Mencuci serum menggunakan larutan wash
 - d. Meminta perawat untuk mengambil darah pada keesokan harinya
 - e. Sampel didiamkan selama ± 30 menit lalu diputar lagi di alat sentrifugasi

2. Selain dengan pemeriksaan widal, penyakit tifus dapat didiagnosis dengan metode *immuno magnetic beads inhibition*. Reagensia yang digunakan dalam pemeriksaan tersebut ada yang berwarna coklat dan biru. Hasil diinterpretasikan dengan bantuan skala warna. Apa kandungan reagensia yang berwarna biru?
 - a. Antigen O dari *S. typhi*
 - b. Antibodi anti-*S. paratyphi*
 - c. Antigen H dari *S. paratyphi*
 - d. Antigen H dari *S. typhimurium*
 - e. Antibodi anti-*S. typhi*

3. ATLM mendapatkan spesimen dari seorang anak yang mengalami demam selama 3 hari. Anak tersebut diduga terkena demam tifoid. Ketika dilakukan pemeriksaan menggunakan metode *immuno magnetic beads inhibition* hasil dinyatakan positif, namun ketika dilakukan pemeriksaan widal hasil dinyatakan negatif. Apa yang menyebabkan hal tersebut dapat terjadi?
 - a. Jumlah antigen H dari *S. typhi* dalam spesimen terlalu banyak
 - b. Volume reagen yang digunakan tidak tepat
 - c. Reagen yang digunakan terkontaminasi
 - d. Anak tersebut terinfeksi *S. paratyphi*
 - e. Spesimen hanya mengandung IgM anti-*S. typhi*

4. Seorang ATLM sedang melakukan suatu pemeriksaan terhadap spesimen serum menggunakan 2 jenis reagen yang berwarna coklat dan biru. Hasil dinyatakan positif dengan nilai 8-10. Pemeriksaan apa yang dilakukan oleh analis tersebut?
 - a. RF
 - b. RPR
 - c. TPHA
 - d. Widal
 - e. Tubex

5. Jenis antigen *Salmonella typhi* yang digunakan dalam reagen pemeriksaan tubex adalah
 - a. Peptidoglikan
 - b. Lipopolisakarida
 - c. LTA
 - d. Kapsula
 - e. Flagella

MODUL 4

PEMERIKSAAN PENYAKIT TROPIS

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium bidang imunologi/immunoassay pemeriksaan penyakit tropis menggunakan metode imunokromatografi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip reaksi imunokromatografi untuk pemeriksaan penyakit tropis, mampu memahami kit insert pemeriksaan metode imunokromatografi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan laboratorium berupa immunoassay metode imunokromatografi, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami kit insert immunoassay metode imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel
- c. Melakukan pemeriksaan penyakit tropis metode imunokromatografi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami kit insert immunoassay metode imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi sampel untuk pemeriksaan penyakit tropis

- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa
- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji imunokromatografi
- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji imunokromatografi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Pemeriksaan penyakit tropis
- b. Pemeriksaan NS1 Dengue
- c. Pemeriksaan IgG/ IgM Dengue
- d. Pemeriksaan Malaria

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN 1

PEMERIKSAAN NS1 DENGUE

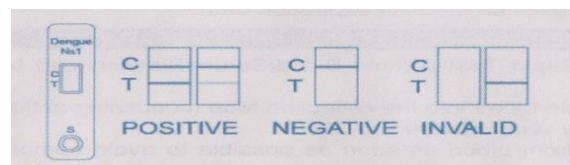
Virus Dengue merupakan flavivirus yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Halstead, 1984). Virus ini tersebar luas di daerah beriklim tropis dan subtropis di seluruh dunia. Terdapat 4 serotipe yang diketahui yaitu virus Dengue 1, 2, 3, dan 4 (Halstead, 1988). Pada anak-anak, infeksi sering bersifat subklinis atau menyebabkan demam yang berhenti dengan sendirinya. Meskipun demikian, jika pasien terinfeksi virus beberapa kali oleh virus dengan serotipe yang berbeda, bisa menyebabkan terjangkitnya penyakit yang lebih berat seperti Dengue *hemorrhagic fever* (DHF) atau Dengue *shock syndrome* (DSS). Infeksi Dengue dianggap sebagai penyakit virus terpenting yang ditularkan oleh arthropoda karena penyakit dan kematian yang disebabkan.

Virus Dengue mempunyai tiga protein struktural dan tujuh protein non struktural (Halstead, 1984). Salah satu dari ketujuh protein non struktural adalah NS1. NS1 merupakan glikoprotein yang sangat *conserve* (lestari) yang ada dalam serum pasien terinfeksi virus Dengue dengan konsentrasi tinggi pada awal fase klinis penyakit (Yamada *et al.*, 2003). Antigen NS1 Dengue ditemukan dari hari pertama mulainya demam hingga hari ke-9 dalam sampel pasien yang terinfeksi virus Dengue baik infeksi primer maupun sekunder (Lam, 1995). Respon imun berupa antibodi IgM diproduksi pada hari ke-3 sampai ke-5 dari mulai infeksi dan menetap selama 30 hingga 60 hari. Antibodi IgG muncul mendekati hari ke-14 dan menetap seumur hidup (Yamada *et al.*, 2003). Infeksi sekunder sering menyebabkan demam yang tinggi dan dalam banyak kasus disertai keadaan hemorrhagic serta gangguan sirkulasi. Infeksi sekunder menunjukkan peningkatan kadar IgG dalam 1-2 hari setelah adanya gejala dan baru menginduksi adanya respon IgM setelah 20 hari terjadinya infeksi (Lam, 1995).

Pemeriksaan cepat antigen NS1 Dengue merupakan pemeriksaan imunologi kualitatif berbasis membran untuk mendeteksi antigen NS1 virus Dengue dalam darah lengkap, serum, atau plasma (Yamada *et al.*, 2003). Dalam prosedur ini, antibodi (anti-NS1 Dengue) diimobilisasi di daerah tes pada perangkat. Setelah sampel ditempatkan pada sumur, antigen NS1 Dengue akan bereaksi dengan partikel yang dilapisi antibodi (anti-NS1 Dengue) yang terdapat

pada bantalan sampel. Campuran ini bermigrasi secara kromatografi disepanjang tes strip dan berinteraksi dengan antibodi (anti-NS1 Dengue) yang diimobilisasi. Jika sampel mengandung antigen NS1 virus Dengue, garis berwarna muncul pada daerah tes dan menandakan hasil positif. Jika sampel tidak mengandung antigen NS1 virus Dengue garis berwarna tidak akan muncul di daerah tes dan menandakan hasil negatif. Sebagai kontrol prosedur, garis berwarna akan selalu muncul di daerah kontrol dan menandakan bahwa volume sampel benar dan membran berfungsi dengan baik. Daerah kontrol mengandung antibodi IgG anti-*mouse*.

Hasil pemeriksaan dinyatakan positif jika terbentuk dua garis. Satu garis harus selalu muncul di daerah control (C), dan satu garis berwarna lainnya muncul di daerah tes (T). Hasil dinyatakan negatif jika satu garis berwarna muncul di daerah C. Tidak terdapat garis di daerah T. Hasil dinyatakan invalid jika garis kontrol tidak muncul. Volume sampel yang tidak tepat, atau prosedur yang tidak benar bisa menjadi penyebab hasil invalid. Coba ulangi pemeriksaan dengan menggunakan perangkat yang baru. Interpretasi hasil dapat dilihat pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Interpretasi Hasil Pemeriksaan Antigen NS1 (Kit Insert, 2015)

Tes ini boleh menggunakan darah lengkap, serum atau plasma. Berikut cara penanganan sampel darah lengkap: masukkan darah lengkap kedalam tabung berisi antikoagulan (heparin, EDTA, Na Citrat). Segera pindahkan serum atau plasma dari bekuan untuk menghindari terjadinya hemolisis. Hanya gunakan sampel yang jernih dan tidak hemolisis. Tes harus segera dikerjakan setelah mendapatkan sampel, jangan biarkan sampel pada suhu ruang dalam waktu yang lama. Serum atau plasma boleh disimpan pada suhu 2-8°C selama 3 hari, bila dibekukan pada suhu -20°C masa simpan bisa lebih lama, namun harus dihindari proses *thaw* and *freeze* pada sampel lebih dari tiga kali. Bila akan menambahkan pengawet boleh digunakan Sodium Azide 0,1% tanpa mempengaruhi hasil

pemeriksaan. Darah lengkap dari vena boleh disimpan pada suhu 2-8°C bila akan diperiksa dalam 2 hari setelah pengambilan, darah lengkap tidak boleh disimpan dalam *freezer*. Darah lengkap dari jari harus segera diperiksa. Sampel dari *freezer* harus dibiarkan mencair dengan sempurna sebelum pemeriksaan.

I. Cara Kerja (Gambar 5)

Perangkat Imunokromatografi

- ↓
 - dibiarkan mencapai suhu kamar
 - dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ↓
 - ditempatkan pada permukaan yang bersih

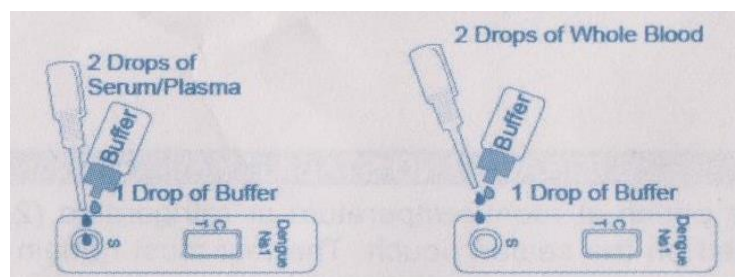
Untuk sampel berupa serum atau plasma

- ↓
 - dipegang dropper secara vertikal
 - ditambahkan 2 tetes sampel serum atau plasma (sekitar 60 µl) ke dalam *sumur* sampel (S)
- ↓
 - ditambahkan 1 tetes *buffer* (sekitar 40 µl) lalu timer dinyalakan.

Untuk sampel darah lengkap :

- ↓
 - dipegang dropper secara vertikal
 - ditambahkan 2 tetes darah lengkap (sekitar 60 µl) ke dalam *sumur* sampel (S)
- ↓
 - ditambahkan 1 tetes *buffer* (sekitar 40 µl) lalu timer dinyalakan
 - ditunggu hingga garis berwarna muncul, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil melebihi 20 menit.

Interpretasi Hasil



Gambar 4.2. Bagan Kerja Pemeriksaan Antigen NS1 (Kit Insert, 2015)

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

--

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Penyakit demam berdarah disebabkan oleh Virus Dengue dengan vektor berupa nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*.
2. Virus dengue memiliki 4 serotipe dan 7 protein non struktural. Protein NS1 dapat dijadikan penanda infeksi Virus Dengue karena merupakan glikoprotein *conserve* yang ada dalam serum pasien terinfeksi virus Dengue dan ditemukan dari hari pertama mulainya demam.
3. Demam berdarah dapat diperiksa menggunakan beberapa metode, seperti *Rumple Leed*, jumlah hemoglobin dan trombosit, kultur virus, ELISA, dan PCR. Namun seluruh metode tersebut membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang cukup tinggi. Oleh karena itu, untuk kebutuhan skrining biasa digunakan metode imunokromatografi.
4. Spesimen yang dapat digunakan untuk pemeriksaan ini adalah serum atau plasma. Spesimen dapat disimpan pada suhu 2-8°C selama seminggu atau -20°C jika masa penyimpanan lebih lama.
5. Kehadiran antigen NS1 dideteksi menggunakan antibodi anti –NS1 yang terkonjugasi koloid emas. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya garis berwarna pada daerah tes dan daerah kontrol setelah 15 menit masa inkubasi.

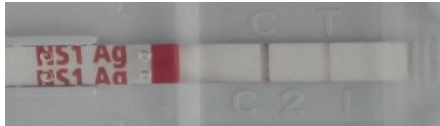
LATIHAN SOAL

1. Demam berdarah adalah penyakit yang disebabkan oleh Virus Dengue. Virus Dengue dapat ditularkan ke manusia melalui nyamuk. Salah satu metode pemeriksaan penyakit tersebut adalah deteksi antigen NS1. Apa alasan antigen NS1 dijadikan penanda penyakit demam berdarah ?
 - a. Protein struktural
 - b. Diproduksi berlebih di hati
 - c. Glikoprotein lestari
 - d. Disekresikan ke darah
 - e. Berukuran besar

2. Apa nama organisme yang berperan sebagai vektor virus dengue ?
 - a. *A. niger*
 - b. *A. albopictus*
 - c. *T. pallidum*
 - d. *H. pylori*
 - e. *R. oryzae*

3. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan NS1 menggunakan metode imunokromatografi sesuai SOP. Pada saat pembacaan hasil, tidak ada garis berwarna yang terbentuk. Apa tindakan yang harus dilakukan ATLM tersebut?
 - a. Mengambil darah ulang
 - b. Pasien diminta untuk datang kembali
 - c. Meneteskan serum lagi pada kolom S
 - d. Periksa ulang menggunakan kaset yang baru
 - e. Mengulang pemeriksaan menggunakan merk lain

4. Seorang pasien usia 17 tahun datang dengan rujukan pemeriksaan Dengue. Spesimen diambil, disiapkan, lalu dilakukan pemeriksaan menggunakan imunokromatografi. Setelah 15 menit didapatkan hasil seperti pada gambar:



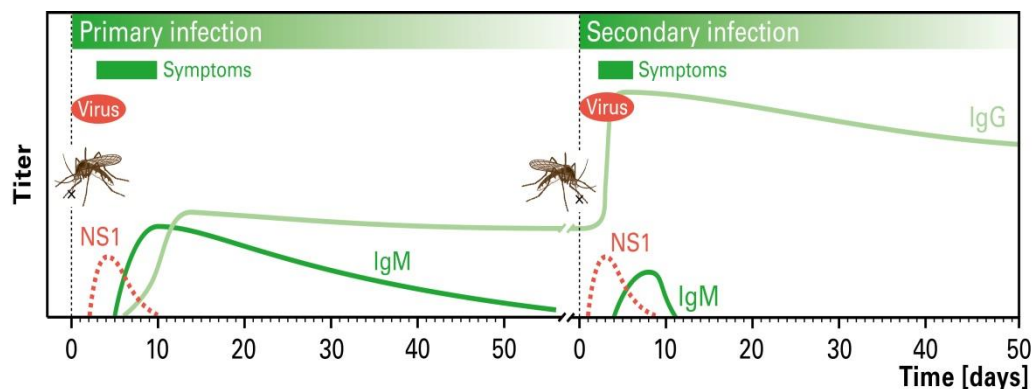
Komponen apa yang terdapat dalam serum pasien tersebut?

- a. Anti-mouse
 - b. Anti-NS1
 - c. Anti-Human IgG
 - d. Antigen NS1
 - e. Anti-Human IgM
5. Komponen apa yang dapat memberikan warna pada daerah tes (T) dan kontrol (C)?
- a. Enzim
 - b. IgG
 - c. IgM
 - d. Partikel lateks
 - e. Koloid emas

KEGIATAN 2

PEMERIKSAAN IgG / IgM DENGUE

Dengue merupakan flavivirus yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Halstead, 1984). Virus ini tersebar luas di daerah beriklim tropis dan subtropis di seluruh dunia serta menyebabkan hingga 100 juta infeksi setiap tahun. Infeksi Dengue klasik ditandai oleh adanya demam mendadak, sakit kepala yang hebat, myalgia, arthralgia, dan bintik kemerahan (Halstead, 1988). Infeksi primer virus Dengue menyebabkan terbentuknya antibodi IgM yang meningkat hingga kadar yang dapat dideteksi dalam waktu 3 sampai 5 hari sejak adanya demam. Antibodi IgM pada umumnya menetap selama 30 hingga 90 hari (Yamada *et al.*, 2003). Kebanyakan pasien penderita infeksi Dengue di daerah endemik mengalami infeksi sekunder, sehingga memiliki antibodi IgG spesifik dengan kadar yang tinggi sebelum atau bersamaan dengan adanya respon berupa antibodi IgM. Oleh karena itu deteksi antibodi anti-Dengue spesifik berupa IgM dan IgG dapat membantu membedakan infeksi primer dari infeksi sekunder (Gambar 4.3).



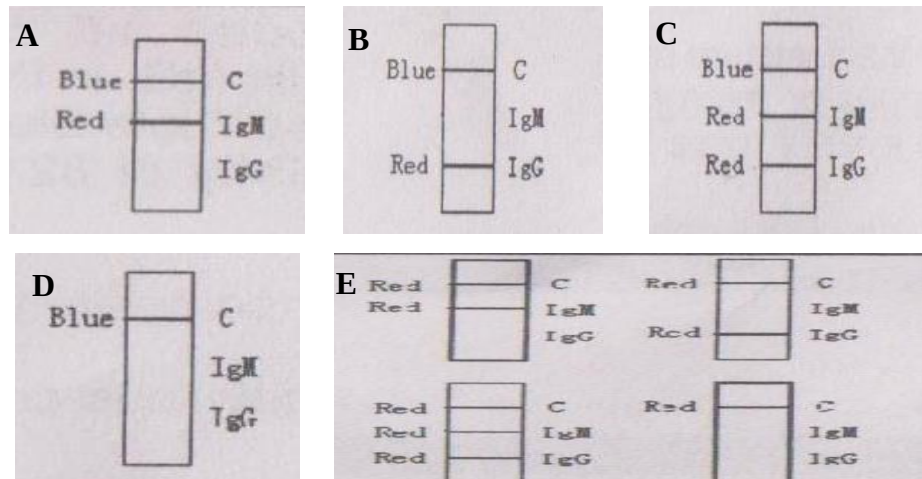
Gambar 4.3 Perbedaan Infeksi Primer dan Sekunder (Stiba, 2015)

Perangkat tes cepat IgM/IgG anti-Dengue merupakan tes yang menggunakan kombinasi partikel berwarna yang dilapisi antigen Dengue untuk mendeteksi antibodi IgM dan IgG dalam darah lengkap manusia, serum atau plasma. Tes ini terdiri atas dua komponen yaitu komponen IgM dan komponen IgG. Pada komponen IgM, antibodi berupa anti-IgM manusia dilekatkan di daerah

garis tes 1 (IgM). Selama pengujian, jika antibodi IgM Dengue ada dalam sampel, maka akan bereaksi dengan partikel yang dilapisi antigen Dengue pada strip tes, kompleks ini selanjutnya akan ditangkap oleh anti-IgM manusia, membentuk garis berwarna pada daerah tes 1 (IgM). Pada komponen IgG, antibodi berupa anti-IgG manusia dilekatkan di daerah garis tes 2 (IgG). Selama pengujian, sampel akan bereaksi dengan partikel yang dilapisi antigen Dengue pada strip tes. Campuran kemudian bermigrasi pada membran secara kromatografi dengan daya kapiler, lalu bereaksi dengan antibodi anti-IgG manusia di daerah garis tes 2 (IgG). Jika sampel mengandung antibodi IgG terhadap virus Dengue, maka akan terbentuk garis berwarna di daerah garis tes 2 (IgG). Oleh karena itu, jika sampel mengandung antibodi IgM anti-Dengue, garis berwarna tampak di daerah tes 1 (IgM). Jika sampel mengandung antibodi IgG anti-Dengue, garis berwarna tampak di daerah tes 2 (IgG). Jika sampel tidak mengandung antibodi anti-Dengue, tidak akan terbentuk garis berwarna di kedua daerah tes dan menandakan hasilnya negatif. Sebagai kontrol pemeriksaan, garis berwarna selalu berubah dari merah menjadi biru pada daerah kontrol, hal ini menandakan bahwa volume sampel sudah benar dan terjadi migrasi sampel pada membran.

Hasil pemeriksaan IgM dinyatakan positif jika terbentuk garis berwarna pada daerah kontrol (C) berubah dari merah ke biru, dan garis berwarna muncul di daerah tes 1 (IgM) (Gambar 4.4 A). Hasil positif untuk IgM spesifik terhadap virus Dengue bisa mengindikasikan terjadinya infeksi primer virus Dengue. Hasil pemeriksaan IgG dinyatakan positif jika terbentuk garis berwarna pada daerah kontrol (C) berubah dari merah ke biru, dan garis berwarna muncul di daerah tes 2 (IgG) (Gambar 4.4 B). Hasil positif untuk IgG spesifik terhadap virus Dengue bisa mengindikasikan terjadinya infeksi sekunder virus Dengue. Hasil pemeriksaan IgM dan IgG dinyatakan positif jika terbentuk garis berwarna pada daerah kontrol (C) berubah dari merah ke biru, dan dua garis berwarna muncul di daerah tes 1 dan 2 (IgM dan IgG) intensitas warna keduanya tidak harus sama (Gambar 4.4 C). Hasil positif untuk antibodi IgM dan IgG spesifik terhadap virus Dengue bisa mengindikasikan terjadinya infeksi sekunder virus Dengue. Hasil pemeriksaan dinyatakan negatif apabila tampak garis berwarna yang berubah dari merah menjadi biru di daerah kontrol (C), tetapi tidak terbentuk garis di daerah tes

1 atau tes 2 (Gambar 4.4 D). Hasil dinyatakan invalid jika garis di daerah kontrol masih berwarna merah dan tidak berubah menjadi biru (Gambar 4.4 E).



Gambar 4.4. Interpretasi Hasil Pemeriksaan IgM/IgG anti-Dengue (Kit Insert, 2015)

Tes ini boleh menggunakan darah lengkap, serum atau plasma. Berikut cara untuk mendapatkan sampel darah lengkap dari jari: Cuci tangan pasien dan biarkan mengering, urut jari kemudian tusuk dengan lancet steril lalu hapus tetesan darah pertama. Tambahkan darah kedalam perlengkapan tes sekitar 10 μ l atau satu tetes menggunakan dropper. Segera pindahkan serum atau plasma dari bekuan untuk menghindari terjadinya hemolisis. Hanya gunakan sampel yang jernih dan tidak hemolisis. Tes harus segera dikerjakan setelah mendapatkan sampel, jangan biarkan sampel pada suhu ruang dalam waktu yang lama. Serum atau plasma boleh disimpan pada suhu 2-8°C selama 3 hari, bila dibekukan pada suhu -20°C masa simpan bisa lebih lama, namun harus dihindari proses *thaw* and *freeze* pada sampel lebih dari tiga kali. Bila akan menambahkan pengawet boleh digunakan Sodium Azide 0,1% tanpa mempengaruhi hasil pemeriksaan. Darah lengkap dari vena boleh disimpan pada suhu 2-8°C bila akan diperiksa dalam 2 hari setelah pengambilan, darah lengkap tidak boleh disimpan dalam *freezer*. Darah lengkap dari jari harus segera diperiksa. Sampel dari *freezer* harus dibiarkan mencair dengan sempurna sebelum pemeriksaan.

I. Cara Kerja

Perangkat Imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ▼ - ditempatkan pada permukaan yang bersih

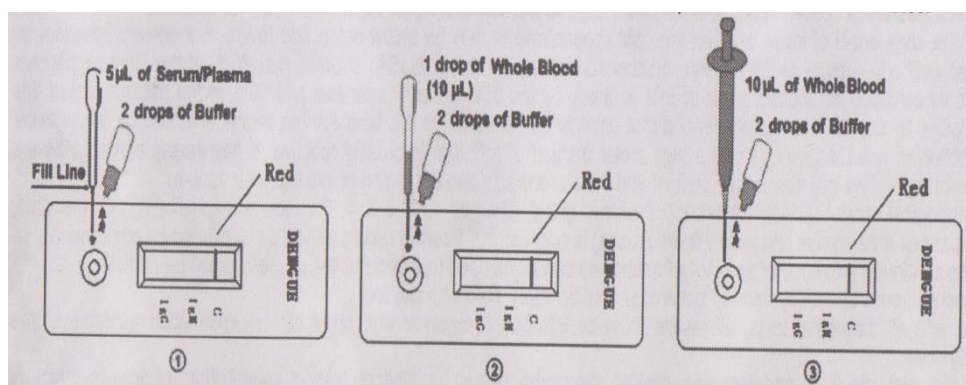
Untuk sampel berupa serum atau plasma

- dipegang dropper secara vertikal
- ditambahkan sampel sekitar 5 μ l ke dalam *sumur* sampel (S) yang terdapat
- ▼ - ditambahkan 2 tetes *buffer* (sekitar 80 μ l) lalu timer dinyalakan. Hindari terbentuknya gelembung udara pada sumur sampel (S).

Untuk sampel darah lengkap :

- dipegang dropper secara vertikal
- ditambahkan sampel 1 tetes darah lengkap (sekitar 10 μ l) ke dalam sumur sampel (S) pada perangkat
- ditambahkan 2 tetes buffer (sekitar 80 μ l) lalu timer dinyalakan. Prosedur tersebut boleh menggunakan micropipet.
- ditunggu hingga garis berwarna muncul, hasil dibaca dalam waktu 10 menit, jangan interpretasikan hasil melebihi 15 menit.
- ▼

Interpretasi Hasil



Gambar 4.5 Bagan Kerja Pemeriksaan IgM/IgG anti-Dengue (Kit Insert, 2015)

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

--

IV. Kesimpulan

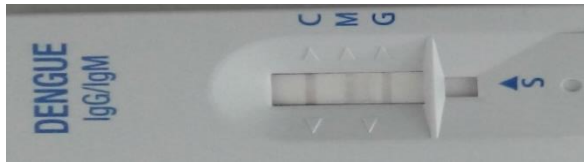
Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Pemeriksaan IgG/IgM Dengue bertujuan untuk membedakan jenis infeksi Virus Dengue yang terjadi. Jenis infeksi tersebut dapat dibagi menjadi dua, yaitu infeksi primer dan infeksi sekunder. Infeksi primer adalah infeksi yang terjadi pertama kali sedangkan infeksi sekunder terjadi setelah infeksi primer.
2. Pemeriksaan jenis infeksi Virus Dengue sebenarnya dapat dilakukan dengan metode *Haemagglutination Inhibition*, namun pemeriksaan tersebut membutuhkan spesimen pada saat terinfeksi dan setelah sembuh sehingga membutuhkan waktu yang lama. Oleh karena itu lebih banyak yang memilih metode imunokromatografi.
3. Keberadaan IgG/IgM Dengue dideteksi menggunakan antibodi anti – IgG manusia dan anti – IgM manusia yang terkonjugasi kolid emas.
4. Keberadaan IgM didalam serum atau plasma menunjukkan bahwa pasien mengalami infeksi primer karena IgM merupakan antibodi yang pertama kali terbentuk ketika terjadi infeksi dan bertahan hanya dalam jangka waktu tertentu.
5. Kehadiran IgG dalam spesimen menandakan infeksi sekunder karena IgG muncul setelah terbentuknya IgM dan bertahan di dalam tubuh dalam jangka waktu yang lebih lama. Selain itu, pada infeksi sekunder titer IgG akan lebih cepat meningkat dibandingkan dengan IgM karena adanya sel B memori.

LATIHAN SOAL

1. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan Dengue menggunakan metode imunokromatografi. Hasilnya terlihat sebagai gambar berikut:



Sumber : Koleksi Pribadi

Apa komponen yang menimbulkan warna pada setiap garis dalam tes tersebut?

- a. IgG
 - b. IgM
 - c. Buffer
 - d. Koloid emas
 - e. Anti-rabbit-IgG
2. Pemeriksaan antibodi dengue dilakukan dari spesimen yang berasal dari pasien yang mengalami demam hari ke-5. Metode yang digunakan adalah rapid. Apakah jenis Imunoglobulin yang dapat terdeteksi pada kasus tersebut?
 - a. Ig A
 - b. Ig D
 - c. Ig E
 - d. Ig G
 - e. Ig M
 3. Seorang pasien anak perempuan diantar oleh ayahnya ke laboratorium dengan membawa formulir permintaan pemeriksaan dari dokter untuk dilakukan pemeriksaan trombosit dan dengue blot. Hasil hitung trombosit 60.000 sel/mm³ dan hasil dengue IgM dan IgG negatif. Apa tindakan seharusnya yang dilakukan seorang analis untuk kasus diatas?
 - a. Melakukan pemeriksaan NS1
 - b. Memberikan hasil pada pasien

- c. Melaporkan ke dokter yang bersangkutan
 - d. Meminta pasien untuk kembali keesokan harinya
 - e. Mengulang pemeriksaan dengan spesimen yang sama
4. Indonesia merupakan daerah endemik demam berdarah sehingga memungkinkan terjadinya infeksi sekunder. Pemeriksaan apa yang dapat membedakan infeksi dengue primer dan sekunder dengan cara membandingkan sera akut dan kovalesen ?
- a. Hemaglutinasi inhibisi
 - b. Deteksi NS1
 - c. PCR
 - d. Dengue IgM/IgG
 - e. Rumpel Leede
5. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan Dengue menggunakan metode imunokromatografi. Hasilnya terlihat sebagai gambar berikut:



Komponen apa yang terikat pada daerah kontrol sehingga menimbulkan garis berwarna?

- a. IgG terkonjugasi koloid emas
- b. Anti *rabbit*
- c. Antigen NS1 terkonjugasi koloid emas
- d. IgM poliklonal
- e. Anti *mouse* monoklonal

KEGIATAN 3

PEMERIKSAAN MALARIA

Terdapat empat spesies parasit Plasmodium yang bertanggung jawab terhadap infeksi malaria di manusia, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, dan *P. malariae*. *P. falciparum* dan *P. vivax* dianggap sebagai dua spesies yang paling berbahaya karena adanya insiden malaria serebral, resistensi obat-obatan terkait malaria *P. falciparum*, tingkat infektivitas yang tinggi, dan tingkat kekambuhan yang terkait *P. vivax*. Pengobatan malaria harus disesuaikan dengan jenis plasmodium penyebabnya, diferensiasi antara *P. falciparum* dan *P. vivax* sangat penting untuk manajemen pasien dan pemulihan yang cepat.

Bahan yang sering digunakan sebagai penanda infeksi malaria akibat *P. falciparum* adalah Pf. HRP-2. Pf. HRP-2 adalah protein yang sangat spesifik untuk *P. falciparum* dan kaya akan histidin. Protein tersebut merupakan protein yang larut dalam air dan dilepaskan oleh sel darah merah (eritrosit) dari individu yang terinfeksi. Untuk mendeteksi malaria akibat *P. vivax* biasanya digunakan protein pLDH yang spesifik terhadap *P. vivax* sebagai penanda. Spesimen yang digunakan untuk pemeriksaan malaria adalah serum atau whole blood. Antikoagulan yang bisa digunakan antara lain EDTA, CPDA, Heparin, Oksalat, atau Tri-natrium sitrat. Spesimen harus dikumpulkan dalam gelas bersih atau wadah plastik. Spesimen dapat disimpan pada suhu 2°C - 8°C selama 72 jam.

Pada bagian bantalan kojugat imunokromatografi pendeteksi infeksi malaria terdapat antibodi monoklonal anti-Pf.HRP-2 (IgG), antibodi monoklonal anti-pLDH spesifik *P. vivax*, dan antibodi kelinci. Ketiga antibodi tersebut terkonjugasi koloid emas. Ketika sampel mengandung Pf.HRP-2 atau pLDH maka protein tersebut akan berikatan dengan antibodi yang spesifik. Kemudian kompleks imun yang terbentuk akan mengalir ke daerah tes (T). Daerah tes pada imunokromatografi ini dibagi menjadi 2, yaitu daerah tes *P. falciparum* yang didalamnya sudah diendapkan antibodi monoklonal anti-Pf. HRP-2 (IgM) dan daerah tes *P. vivax* yang didalamnya sudah diendapkan antibodi monoklonal anti-pLDH spesifik Pan. Jika spesimen mengandung salah satu protein tersebut maka akan terbentuk garis berwarna pada daerah tes. Selanjutnya, bahan yang tidak

terikat pada daerah tes akan terus mengalir ke daerah kontrol. Ada daerah kontrol sudah diendapkan antibodi anti-globulin rabbit dan menimbulkan warna pada daerah kontrol. Hasil positif infeksi malaria oleh *P. falciparum* ditandai dengan terbentuknya 2 garis berwarna pada daerah tes (*P. falciparum*) dan kontrol, begitu pula untuk hasil positif infeksi malaria oleh *P. vivax*. Jika hasil menunjukkan 3 garis berwarna berarti positif terinfeksi malaria oleh kedua parasit tersebut. Hasil dinyatakan invalid dan harus diulangi jika tidak terbentuk garis pada daerah kontrol atau tidak ada garis apapun yang terbentuk.

Pemeriksaan malaria dapat ditunjang dengan pemeriksaan mikroskopis. Interpretasi hasil pemeriksaan dapat terganggu dengan adanya antibodi heterophile pada sampel pasien. Hasil yang negatif tidak bisa mengesampingkan kemungkinan infeksi malaria oleh *P. ovale* dan *P. malariae*. Imunokromatografi ini dapat digunakan untuk mendeteksi adanya infeksi malaria dan memantau keberhasilan terapi anti-malaria. Tes ulang perlu dilakukan setelah 5-10 hari pengobatan. Jika intensitas pita masih tetap sama maka ada kemungkinan terjadi kasus resistensi.

I. Cara Kerja

1. Imunokromatografi Strip

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung aluminium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- dicelupkan ke dalam serum atau plasma secara vertikal dengan panah menunjuk ke arah sampel
- ditunggu selama 10-15 detik, jangan sampai melebihi batas garis maksimum
- ditunggu hingga muncul garis merah, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil setelah 20 menit

Interpretasi Hasil

2. Imunokromatografi Kaset

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- ditetesi sampel sebanyak 1 tetes (10 µl)
- ditetesi diluent sebanyak 2 tetes
- ▼ - ditunggu selama 15 menit

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit Plasmodium dengan vektor berupa nyamuk Anopheles betina. Ada empat jenis Plasmodium yang ada di Indonesia, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, dan *P. malariae*. Diantara empat jenis tersebut, yang paling berbahaya adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*
2. Plasmodium dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk Anopheles pada malam hari. Parasit tersebut berkembangbiak di dalam organ hati dan menyerang sel darah merah. Selain itu, dapat juga menyebar melalui transfusi darah dan dari ibu ke bayi.
3. Kehadiran *P. falciparum* ditandai dengan adanya protein pf HRP-2 dalam darah sedangkan *P. vivax* ditandai dengan adanya protein pLDH.
4. Keberadaan antigen tersebut dideteksi menggunakan antibodi spesifik yang terkonjugasi koloid emas.
5. Hasil positif palsu dapat terjadi jika adanya antibodi heterophile di dalam spesimen.

LATIHAN SOAL

1. Malaria merupakan penyakit yang endemik di daerah Indonesia bagian timur. Penderita malaria mengalami gejala klinis seperti demam tinggi, anemia, dan lemas. Apa penyebab penyakit tersebut?
 - a. Salmonella
 - b. *Aedes aegypti*
 - c. *E. coli*
 - d. Plasmodium
 - e. *T. pallidum*
2. Dari 5 jenis patogen yang dikenal dapat menyebabkan malaria, terdapat 2 jenis yang sangat berbahaya. Mengapa 2 jenis tersebut dianggap berbahaya?
 - a. Resistensi terhadap obat-obatan
 - b. Menyerang respon imun
 - c. Menyerang organ vital
 - d. Berkembang biak di sel hati
 - e. Menyebabkan eritrosit lisis
3. Seorang ATLM mendapatkan sampel dengan rujukan pemeriksaan malaria. ATLM tersebut melakukan pemeriksaan dengan imunokromatografi. Setelah mendapatkan hasil, ATLM diminta oleh kepala lab untuk melakukan pemeriksaan penunjang. Apa pemeriksaan penunjang yang perlu dilakukan ATLM tersebut?
 - a. Endoskopi
 - b. Hematologi
 - c. PCR
 - d. Kultur Sel
 - e. Mikroskopis
4. Ketika hendak melakukan pemeriksaan Malaria, seorang ATLM membaca kit insert reagensia yang dia gunakan. Di dalam kit insert tertulis: *Non disposable apparatus must be sterilised after use by an appropriate method. Disposable*

apparatus must be treated as biohazardous waste and autoclaved or incinerated. Berdasarkan pernyataan pada kit insert tersebut, bagaimana cara memperlakukan bahan sekali pakai?

- a. Dibuang ke tempat sampah
 - b. Dimasukkan ke dalam plastic
 - c. Disterilkan dengan autoklaf
 - d. Dicuci dengan air mengalir
 - e. Dimasukkan ke dalam larutan desinfektan
5. Seorang ATLM mendapatkan spesimen berupa serum untuk pemeriksaan malaria. Setelah dilakukan pemeriksaan menggunakan imunokromatografi, terbentuk garis berwarna pada daerah tes *P. vivax* dan kontrol. Komponen apa yang dapat telah diendapkan pada daerah tes tersebut?
- a. Anti - Pf. HRP-2
 - b. Anti - pLDH
 - c. Antigen Pf. HRP2
 - d. Antigen pLDH
 - e. Anti – IgG manusia

MODUL 5

PEMERIKSAAN INFEKSI MENULAR SEKSUAL

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium bidang imunologi/immunoassay pemeriksaan Infeksi Menular Seksual menggunakan metode imunokromatografi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip reaksi imunokromatografi untuk pemeriksaan Infeksi Menular Seksual, mampu memahami kit insert pemeriksaan metode imunokromatografi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan laboratorium berupa immunoassay metode imunokromatografi, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami kit insert immunoassay metode imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel
- c. Melakukan pemeriksaan penyakit Infeksi Menular Seksual metode imunokromatografi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami kit insert immunoassay metode imunokromatografi

- b. Melakukan identifikasi sampel
- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa
- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji imunokromatografi
- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji imunokromatografi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Immunoassai pemeriksaan Infeksi Menular Seksual
- b. Pemeriksaan *Rapid Plasma Reagin* (RPR)
- c. Pemeriksaan Sifilis menggunakan metode *Treponema pallidum Hemagglutination* (TPHA) dan Imunokromatografi anti – TP
- d. Pemeriksaan Hepatitis B Virus (HBV)
- e. Pemeriksaan Hepatitis C Virus (HCV)

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN 1

PEMERIKSAAN *RAPID PLASMA REAGIN* (RPR)

Sifilis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram Negatif *Treponema pallidum* (Larse *et al.*, 1990). Mikroorganisme ini dapat menyebabkan kerusakan pada hati dan jantung serta dapat melepaskan beberapa fragmen jaringan. Kerusakan tersebut menyebabkan sistem imun tubuh menghasilkan reagin. Reagin adalah kelompok antibodi yang dapat mengenali beberapa komponen jaringan rusak dari pasien yang terinfeksi oleh *T. pallidum* (Schimid, 1994).

Uji RPR adalah uji aglutinasi non treponema untuk mendeteksi keberadaan reagin dalam serum manusia. Pemeriksaan ini berdasarkan pada reaksi aglutinasi yang terjadi antara partikel karbon yang dilapisi kompleks lipid dengan reagin yang berada dalam sampel pasien yang terkena sifilis (Larse *et al.*, 1990). Uji RPR ini merupakan uji yang non spesifik untuk sifilis. Semua sampel yang reaktif harus diuji kembali dengan metode TPHA dan FTA-ABS untuk mengkonfirmasi hasil. Hasil *strong reactive* (reaktif kuat) ditandai dengan terbentuknya aglutinasi dalam jumlah yang sangat banyak sedangkan hasil *weak reactive* (reaktif lemah) ditandai dengan terbentuknya aglutinasi pada permukaan papan aglutinasi dengan jumlah yang sangat sedikit.

Hasil *false positive* (positif palsu) ditemu pada penyakit seperti infeksi mononukleosis, pneumonia, toksoplamosis, kehamilan, dan autoimun. Haemoglobin (10 g/L), bilirubin (20 mg/dL), dan lipid (10 g/L) tidak akan mengganggu pemeriksaan. *Rheumatoid factor* dengan konsentrasi 300 IU/ml dapat mengganggu pemeriksaan. Hasil yang baik didapatkan dengan menggabungkan data laboratorium dan gejala klinis.

I. Cara Kerja

Reagen Karbon RPR, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Sifilis adalah penyakit kelamin yang disebabkan oleh bakteri *T. pallidum*. Bakteri ini berbentuk spiral dan belum bisa dikulturkan. Oleh karena itu, infeksi oleh bakteri ini hanya dapat dideteksi menggunakan metode pemeriksaan berbasis imunologi.
2. Pemeriksaan sifilis terbagi menjadi dua tahap, yaitu pemeriksaan non treponemal dan treponemal. Pemeriksaan non treponemal merupakan tahap skrining. Metode yang biasanya digunakan adalah RPR.
3. Pemeriksaan RPR bertujuan untuk mendeteksi adanya kerusakan jaringan yang ditandai dengan adanya Reagin. Reagin merupakan antibodi yang dapat mengenali fragmen jaringan yang terlepas.
4. Kehadiran reagin dideteksi menggunakan kardiolipin yang terikat pada partikel karbon. Hasil reaktif ditandai dengan terbentuknya gumpalan setelah delapan menit dilakukan rotasi.
5. Hasil pemeriksaan positif paslu dapat terjadi karena beberapa hal, antara lain:
 - a. Infeksi mononukleosis
 - b. Pneumonia
 - c. Toksoplamosis
 - d. Kehamilan
 - e. Autoimun
 - f. *Rheumatoid Factor* konsentrasi 300 IU/ml

LATIHAN SOAL

1. Seorang ATLM mendapatkan rujukan pemeriksaan RPR. ATLM mereaksikan 1 tetes spesimen dengan 1 tetes reagen. Setelah beberapa saat terbentuk gumpalan berwarna hitam pada papan aglutinasi. Apa komponen dalam reagensia yang menimbulkan warna hitam pada gumpalan?
 - a. Antibodi treponemal
 - b. Partikel lateks
 - c. Reagin
 - d. Eritrosit ungags
 - e. Partikel karbon

2. Ketika hendak melakukan pemeriksaan RPR, seorang ATLM membaca kit onsert reagensia yang dia gunakan. Di dalam kit insert tertulis: *Non disposable apparatus must be sterilised after use by an appropriate method. Disposable apparatus must be treated as biohazardous waste and autoclaved or incinerated.* Berdasarkan pernyataan pada kit insert tersebut, bagaimana cara memperlakukan bahan sekali pakai?
 - a. Dibuang ke tempat sampah
 - b. Dimasukkan ke dalam plastic
 - c. Disterilkan dengan autoklaf
 - d. Dicuci dengan air mengalir
 - e. Dimasukkan ke dalam larutan desinfektan

3. Seorang ATLM mendapatkan rujukan pemeriksaan RPR. ATLM mereaksikan 1 tetes spesimen dengan 1 tetes reagen. Setelah beberapa saat terbentuk gumpalan berwarna hitam pada papan aglutinasi. Berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk menginterpretasikan hasil pemeriksaan tersebut?
 - a. 2 menit
 - b. 8 menit
 - c. 15 menit
 - d. 45 menit

- e. 60 menit
4. Atas permintaan dokter, seorang ATLM melakukan pemeriksaan terhadap spesimen yang berasal dari seorang pria dengan ruam pada bagian kelamin. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa dalam spesimen tersebut terdapat antibodi non treponemal. Apa nama lain dari antibodi yang terdapat dalam spesimen tersebut?
- a. Rheumatoid Factor
 - b. Antibodi treponemal
 - c. Anti-*S. Typhi* 09
 - d. Reagin
 - e. Immunoglobulin G
5. Apa komponen dalam reagensia yang digunakan dalam pemeriksaan tersebut?
- a. Reagin
 - b. Antibodi *T. pallidum*
 - c. Partikel lateks
 - d. Kardiolipin
 - e. Eritrosit unggas

KEGIATAN 2

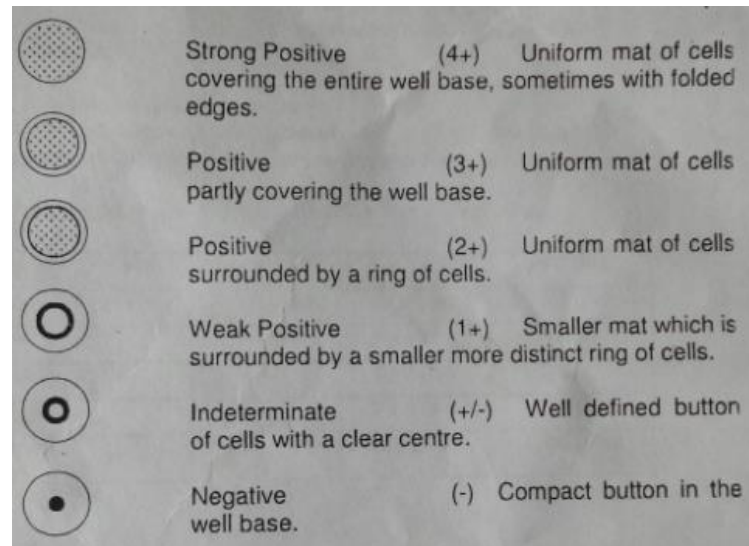
PEMERIKSAAN *TREPONEMA PALLIDUM* HEMAGGLUTINATION (TPHA)

Sifilis adalah penyakit yang disebabkan oleh *T. pallidum*. Penyakit ini dapat menyerang semua organ yang ada dalam tubuh manusia terutama kardiovaskuler, otak, dan susunan saraf (Rathlev, 1967). Infeksi pada manusia biasanya disebabkan oleh kontak seksual, tetapi bisa juga ditularkan melalui transfusi darah yang terinfeksi dan infeksi intrauterin. Penyakit ini juga dapat ditularkan kepada bayi di dalam kandungan, menyebabkan keguguran, kelahiran premature, dan kecacatan (Rathlev, 1965). Sifilis yang tidak diterapi dapat menjadi sifilis lanjut yaitu sifilis tersier (gumma), sifilis kardiovaskuler, dan neurosifilis.

T. pallidum termasuk kelompok bakteri yang tidak dapat ditumbuhkan pada media buatan (Rathlev, 1965). Oleh karena itu, diagnosis infeksi biasanya tergantung pada kehadiran antibodi dalam darah yang muncul segera setelah infeksi awal. Tes untuk sifilis terbagi menjadi empat kategori, yaitu: pemeriksaan mikroskopis langsung; tes antibodi non treponemal; tes antibodi treponemal; dan tes antigen langsung (Larsen and Hambie, 1981). TPI dan FTA-ABS merupakan tes yang memanfaatkan patogen *T. pallidum* sebagai antigen tetapi tes ini memiliki beberapa kesulitan jika digunakan sebagai serodiagnosis rutin. Tes TPI membutuhkan patogen *T. pallidum* hidup dan tes FTA-ABS membutuhkan mikroskop fluorescence (Larsen and Hambie, 1981). Kedua tes tersebut memerlukan tingkat keahlian tinggi. Tes TPHA telah terbukti lebih mudah, memiliki spesifisitas mirip dengan tes TPI dan sensitivitas sebanding dengan tes FTA-ABS.

TPHA merupakan tes antibodi treponemal. Tes ini berdasarkan pada reaksi aglutinasi yang terjadi antara eritrosit burung yang telah dilapisi dengan antigen *T. pallidum* (Nichols strain) dengan antibodi anti *T. pallidum* dalam serum pasien atau plasma (Rathlev, 1967). Reaksi positif ditunjukkan oleh aglutinasi dari sel-sel yang menyebar, sedangkan reaksi negatif ditunjukkan oleh pengendapan sel yang membentuk tombol atau cincin kecil (Gambar 5.1). Reaksi non-spesifik dapat

dideteksi menggunakan sel kontrol. Sel kontrol adalah eritrosit burung yang tidak dilapisi dengan antigen *T. pallidum*.



Gambar 5.1. Interpretasi Hasil TPHA (Oxoid, 2014)

I. Cara Kerja

Uji Kualitatif :

Reagen TPHA, kontrol, dan sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- dimasukkan 190 µl pengenceran ke sumur 1 *U-microplate*
- ditambahkan 10 µl sampel ke sumur 1 dan dicampurkan
- dipindahkan 25 µl dari sumur 1 ke sumur 2 & 3
- ditambahkan 75 µl sel kontrol ke sumur 2
- ditambahkan 75 µl sel uji ke sumur 3
- dipukul-pukul piringan dengan hati-hati agar tercampur sepenuhnya
- ditutup dan diinkubasi selama 45-60 menit atau semalaman dari tempat yang jauh dari panas, sinar matahari dan getaran.

↓
Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Foto pengamatan:	Keterangan:

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Spesimen yang dinyatakan reaktif pada pemeriksaan RPR perlu diperiksa lebih lanjut menggunakan metode TPHA. TPHA merupakan pemeriksaan antibodi anti – *T. pallidum*.
2. Pada pemeriksaan TPHA digunakan eritrosit unggas untuk membuat antigen *T. pallidum* berada dalam keadaan tidak terlarut. Pemeriksaan ini dilakukan pada alat U- microplate dan menggunakan 2 jenis reagen, yaitu sel kontrol dan sel uji.
3. Keberadaan antibodi anti – *T. pallidum* ditandai dengan terbentuknya gumpalan yang menyebar dipermukaan plate setelah dilakukan inkubasi selama 45-60 menit.
4. Spesimen yang digunakan pada pemeriksaan ini harus dipanaskan pada suhu 56°C selama 5 menit untuk menginaktivasi komplemen yang dapat mengganggu pemeriksaan.
5. Titer antibodi dapat ditentukan dengan cara melakukan pengenceran sampel dan mengamati gumpalan yang terbentuk pada pengenceran tertinggi.

LATIHAN SOAL

1. Seorang ATLM sedang bertugas melakukan surveilen IMS di salah satu area lokalisasi. Pada saat melakukan plebotomi secara tidak sengaja dia tertusuk jarum. Apa tindakan yang harus segera dilakukan ?
 - a. Meminum obat
 - b. Pergi ke dokter UGD
 - c. Memeriksa diri ke laboratorium
 - d. Melaporkan kasus ke penanganan infeksi
 - e. Membasuh luka tusukan jarum dengan alkohol

2. Seorang pria berusia 35 tahun mendatangi laboratorium dengan rujukan pemeriksaan VDRL. Hasil menunjukkan positif, oleh karena itu dilakukan tes lanjutan. Serum dicampurkan dengan reagen TPHA, dan setelah 45 menit terlihat hasil sebagai berikut:



Keterangan:

1. Kontrol positif
2. Spesimen
3. Kontrol negatif

Sumber: Koleksi pribadi

Apa yang berinteraksi dengan eritrosit unggas pada sumuran nomor 2 ?

- a. Reagin
 - b. Pengencer
 - c. Kardiolid
 - d. Antibodi Treponemal
 - e. Antigen *Treponema palidum*
3. Parameter pemeriksaan syphilis akan dilakukan pada sampel serum. Pemeriksaan tersebut akan dirujuk ke laboratorium lain. Salah satu syarat sampel untuk pemeriksaan tersebut adalah tidak boleh hemolisis. Bagaimanakah cara pengiriman sampel yang benar untuk mencegah masalah tersebut?
 - a. Pengambilan darah harus steril

- b. Darah dikirim pada suhu 2 – 80 C
 - c. Dilakukan penundaan pengiriman sampel
 - d. Bahan harus diinaktivasi sebelum pengiriman
 - e. Jenis sampel yang dikirim adalah serum, tidak boleh darah
4. Seorang pasien usia 30 tahun datang dengan rujukan pemeriksaan sifilis. ATLM menyiapkan spesimen dengan cara dipanaskan pada suhu 56°C selama 30 menit. Spesimen diencerkan dan direaksikan dengan TPHA test cell. Berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk menginterpretasikan hasil pemeriksaan tersebut?
- a. 25 menit
 - b. 30 menit
 - c. 35 menit
 - d. 40 menit
 - e. 45 menit
5. Perawat ruangan membawa darah pasien rawat inap ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan TPHA, setelah dilakukan sentrifugasi serumnya ikterik. Apakah tindakan yang seharusnya dilakukan pada kasus diatas?
- a. Diputar kembali
 - b. Mengambil bahan ulang
 - c. Mencuci serum menggunakan larutan wash
 - d. Meminta perawat untuk mengambil darah pada keesokan harinya
 - e. Sampel didiamkan selama $\pm$ 30 menit lalu diputar lagi di alat sentrifugasi

KEGIATAN 3

PEMERIKSAAN Anti – *TREPONEMA PALLIDUM* METODE IMUNOKROMATOGRAFI

Sifilis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri spirocheta *T. pallidum*. Masalah diagnostik klinis yang terkait dengan sifilis adalah deteksi antibodi sifilis dalam darah manusia dengan *immunoassay*. Terdapat beberapa metode imunologi untuk mengkonfirmasi infeksi *T. pallidum* seperti *T. pallidum Hemagglutination Assay* (TPHA) dan analisis *immunostaining* oleh *Fluorescent Treponemal Antibody Adsorption Test* (FTA-ABS) (Vista, 2014). Sekarang ini sudah tersedia metode pendeteksian antibodi *T. pallidum* yang baru, yaitu ELISA dan imunokromatografi. Beberapa waktu yang lalu, antigen pendeteksi yang digunakan dalam *immunoassay* adalah antigen asli dari *T. pallidum*. Ternyata antigen tersebut masih dicemari sejumlah bahan seperti flagela. Antigen *T. pallidum* yang asli dapat menyebabkan reaksi non-spesifik dan dapat menyebabkan rendahnya tingkat sensitivitas dan reproduktifitas (Vista, 2014). Untuk menghindari masalah-masalah potensial dalam *immunoassays*, para peneliti telah merekayasa gen *T. pallidum* sehingga dapat diekspresikan oleh bakteri seperti *E. coli* sebagai protein rekombinan. Protein rekombinan yang diproduksi adalah protein membran *T. pallidum* yang sudah terbukti imunogenik. Antigen pada protein membran yang telah terbukti bersifat imunoreaktif memiliki berat molekul sekitar 47, 42, 17, dan 15 kDa (Cypress, 2008).

Imunokromatografi pendeteksi *T. pallidum* menggunakan antigen rekombinan *T. pallidum* yang berukuran 17 dan 15 kDa (Cypress, 2008). Pada awalnya antibodi anti- *T. pallidum* yang berada dalam sampel akan berikatan dengan antigen pertama yang terkonjugasi koloid emas. Kemudian kompleks imun tersebut akan bergerak menuju daerah tes (T). Pada daerah tersebut akan terjadi interaksi antara kompleks imun dengan antigen kedua dan membentuk garis berwarna. Oleh karena itu, pembentukan garis pada daerah T menunjukkan hasil positif untuk deteksi antibodi spesifik *T. pallidum* (IgG, IgA, IgM) (Cypress, 2008). Kompleks imun yang tidak terikat akan terus bergerak menuju daerah

kontrol (C). Garis pada daerah kontrol harus selalu muncul sebagai kontrol prosedural.

Pemeriksaan ini bisa menggunakan sampel berupa serum, plasma, atau darah lengkap. Jika menggunakan sampel berupa darah lengkap maka harus ditampung ke dalam tabung yang berisi antikoagulan umum dan pengawet (misalnya EDTA, heparin atau natrium sitrat). Sampel darah lengkap dapat disimpan pada 2-8°C selama 3 hari. Untuk darah jari, bersihkan area yang akan ditusuk dengan kapas beralkohol dan biarkan kering secara menyeluruh. Jari ditusuk dengan lancet steril. Darah sebanyak 20 ml segera dimasukkan ke sumur sampel. Jika sampel berupa serum atau plasma maka harus ditampung dalam tempat bersih tanpa antikoagulan.

I. Cara Kerja

1. Imunokromatografi Strip

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- dicelupkan ke dalam serum atau plasma secara vertikal dengan panah menunjuk ke arah sampel
- ditunggu selama 10-15 detik, jangan sampai melebihi batas garis maksimum
- ↓
- ditunggu hingga muncul garis merah, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil setelah 20 menit

Interpretasi Hasil

2. Imunokromatografi Kaset

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ↓
- ditempatkan pada permukaan yang bersih

- ditetesi sampel berupa serum atau plasma sebanyak 10 µl (jika sampel berupa seluruh darah ditetesi sebanyak 20 µl)
- ditetesi diluent sebanyak 3-4 tetes (110 µl)
- ditunggu selama 15 menit (jika sampel berupa seluruh darah ditunggu selama 10 menit)

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Selain menggunakan metode TPHA, infeksi *T. pallidum* juga dapat dideteksi menggunakan metode imunokromatografi.
2. Metode ini memiliki keunggulan jika dibanding TPHA, antara lain lebih cepat dan sederhana sehingga seringkali digunakan untuk tujuan skrining. Namun, hasil pemeriksaan metode ini hanya bersifat kualitatif.
3. Keberadaan antibodi anti – TP dapat dideteksi menggunakan antigen TP yang terkonjugasi koloid emas.
4. Jenis antibodi yang dapat terdeteksi menggunakan imunokromatografi adalah IgG, IgM, dan IgA.

LATIHAN SOAL

1. Perhatikan kutipan kit insert berikut ini: “*No test provides complete assurance that a sample does not contain low levels of antibodies to Treponema pallidum such as those present in very early stages of infection. A negative result at any time does not preclude the possibility of infection with syphilis*”. Pernyataan mana dibawah ini yang sesuai dengan keterangan kit?
 - a. Hasil negatif tidak menutup kemungkinan adanya infeksi sifilis
 - b. Kit tersebut tidak dapat mendeteksi antibodi Anti-*T. pallidum* dalam jumlah banyak
 - c. Hasil positif palsu dapat dipengaruhi tingkat antibodi Anti-*T. pallidum*
 - d. Hasil negatif menunjukkan tidak adanya infeksi sifilis
 - e. Kit tersebut memiliki tingkat spesifisitas yang rendah
2. Sifilis merupakan penyakit akibat infeksi *T. pallidum*. Penyakit tersebut dapat ditularkan melalui kontak seksual. Pemeriksaan apa yang biasa dilakukan untuk skrining penyakit tersebut?
 - a. VDRL
 - b. FTA-ABS
 - c. TPHA
 - d. ELISA
 - e. Imunokromatografi Anti *T. pallidum*
3. Seorang pasien berusia 32 tahun datang ke laboratorium dengan rujukan pemeriksaan anti *T. pallidum*. Spesimen diambil dan dilakukan preparasi. Kemudian ATLM meneteskan spesimen dan buffer ke dalam sebuah alat. Setelah dilakukan inkubasi selama 15 menit terbentuk 2 garis berwarna pada daerah tes dan kontrol. Apa metode deteksi antigen-antibodi yang digunakan?
 - a. Hemaglutinasi
 - b. Imunokromatografi
 - c. Presipitasi
 - d. ELISA
 - e. Flokulasi

4. Apa jenis antibodi yang dapat terdeteksi pada pemeriksaan tersebut?
 - a. IgM
 - b. IgA
 - c. IgG
 - d. IgE
 - e. A, B, dan C benar

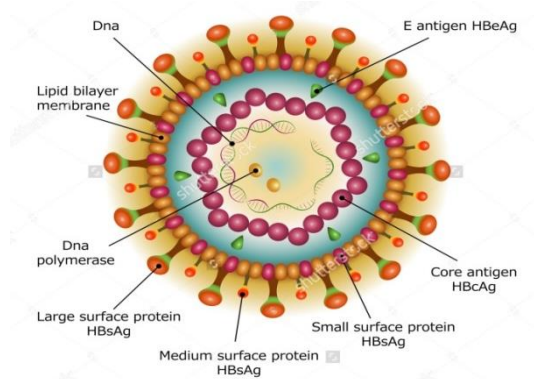
5. Apa kekurangan pemeriksaan metode diatas jika dibandingkan dengan pemeriksaan TPHA?
 - a. Titer antibodi tidak dapat dikuantifikasi
 - b. Waktu pemeriksaan lebih lama
 - c. Harga lebih mahal
 - d. Membutuhkan tenaga ahli
 - e. Spesimen yang dibutuhkan lebih banyak

KEGIATAN 4

PEMERIKSAAN HEPATITIS B VIRUS (HBV)

Hepatitis adalah penyakit sistemik yang diawali dari hati. Kebanyakan kasus hepatitis akut disebabkan oleh Virus Hepatitis A, Hepatitis B, atau Hepatitis C. Hepatitis B adalah peradangan hati yang terjadi karena adanya infeksi dari Virus Hepatitis B (HBV). Hepatitis B umumnya menular dari ibu ke anak saat proses kelahiran atau pada anak usia dini (Selamoglu, 2009). Hepatitis B dapat juga ditularkan melalui pemaparan mukosa terhadap darah atau cairan tubuh lain yang terinfeksi termasuk cairan semen dan vaginal. Gejala hepatitis B adalah urin yang gelap, penyakit kuning, kelelahan yang berlebihan, mual, muntah, dan nyeri perut (WHO, 2013). Berdasarkan hasil RISKESDAS 2007, Indonesia tergolong negara dengan endemisitas tinggi, sehingga Indonesia merupakan negara dengan pengidap hepatitis terbesar nomor 2 diantara negara-negara ASEAN.

HBV adalah virus yang termasuk dalam keluarga *Hepadnaviridae*. Partikel HBV berbentuk bulat dengan diameter 42 nm (Selamoglu, 2009). Virus ini memiliki selubung dan nukleokapsid yang berbentuk ikosahedral. Nukleokapsid pada HBV berfungsi untuk melindungi material genetik berupa rcDNA (*relaxed circular DNA*) dan DNA Polimerase. HBV memiliki tiga antigen yang dapat dikenali oleh sistem imun tubuh, yaitu HBcAg, HBeAg, dan HBsAg (Gambar 5.2) (Selamoglu, 2009). *Core* (HBcAg) merupakan antigen yang berada di bagian inti HBV, *Pre core* (HBeAg) merupakan partikel yang disekresikan oleh sel inang dan merupakan partikel yang infeksius, sedangkan HBsAg adalah antigen yang terletak pada permukaan selubung HBV (Lunsdorf *et al.*, 2011).



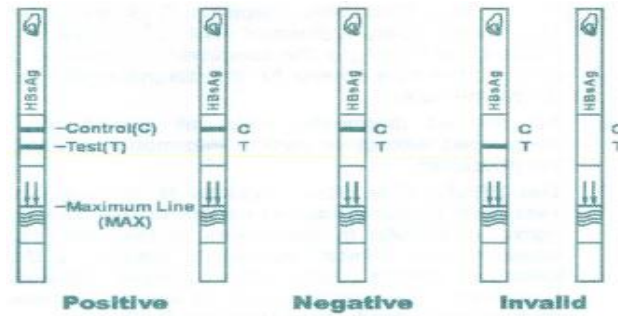
Gambar 5.2. Struktur Virus Hepatitis B (Selamoglu, 2009)

Pada pasien yang terinfeksi HBV, protein permukaan virus (HBsAg) akan diproduksi secara berlebihan di sel hati bahkan melebihi jumlah yang dibutuhkan untuk merakit virus baru. Protein permukaan ini kemudian disekresikan sebagai campuran partikel berbentuk bola dan tubular (*Virus Like Particle*) ke dalam darah. Dengan demikian, pada serum pasien yang terinfeksi HBV ditemukan virus utuh tetapi ada juga partikel bola kosong dan partikel tubular yang terdiri dari protein permukaan (Lunsdorf *et al.*, 2011). Kehadiran HBsAg dalam serum atau plasma mengindikasikan adanya infeksi aktif dari Hepatitis B, bisa infeksi akut ataupun kronik. Pada infeksi Hepatitis B, HBsAg akan terdeteksi pada 2 sampai 4 minggu sebelum tingkat ALT menjadi abnormal dan 3 sampai 5 minggu sebelum timbul gejala klinis. HBsAg memiliki 4 subtipe, yaitu adw, ayw, adr, ayr (Kramvis *et al.*, 2005).

Keberadaan HBsAg dalam serum atau plasma manusia dapat dites secara cepat dengan metode imunokromatografi. HBsAg dengan konsentrasi 5 ng/ml dapat dideteksi dalam waktu 10 menit dan bila kadarnya 1 ng/ml diperlukan waktu 15 menit (Diaspot, 2002). Hasil kualitatif dapat diamati secara visual. Tes ini menggunakan antibodi monoklonal dan dikenal sebagai *solid phase sandwich immunoassay* sebagaimana telah dilaporkan oleh Wisdom, Wolters dkk, serta Wei dkk.

Tes HBsAg ini merupakan pemeriksaan imunologi yang ditingkatkan sensitifitasnya dengan penggunaan koloid emas untuk mendeteksi *Hepatitis B surface antigen* dalam serum atau plasma manusia (Diaspot, 2002). Sampel awalnya bereaksi dengan konjugat berupa pasangan koloid emas dan antibodi monoklonal (anti-HBsAg) yang terdapat pada bantalan sampel. Campuran tersebut kemudian bermigrasi di sepanjang membran dengan daya kapiler kemudian bereaksi dengan anti-HBsAg pada daerah tes (Diaspot, 2002). Jika sampel mengandung HBsAg maka terbentuk garis di membran pada daerah tersebut. Jika antigen HBsAg tidak ada dalam sampel maka tidak akan terbentuk garis dan menandakan bahwa hasilnya negatif. Campuran selanjutnya terus mengalir menuju daerah kontrol pada membran, pada daerah ini campuran akan membentuk garis sebagai tanda bahwa hasil pengujiannya bersifat valid (layak

dipercaya). Hasil dinyatakan positif jika terlihat adanya dua garis merah. satu garis pada daerah tes (T) dan satu garis pada daerah kontrol (C) (Gambar 5.3). Hasil dinyatakan negatif jika tidak terlihatnya garis merah pada daerah T. Hasil dinyatakan invalid apabila tidak terlihat adanya garis merah pada daerah C.



Gambar 5.3. Interpretasi Hasil Pemeriksaan HBsAg (Diaspot, 2002)

Tes ini boleh menggunakan serum atau plasma, antikoagulan tidak mengganggu tes ini. Segera pindahkan serum atau plasma dari bekuan untuk menghindari terjadinya hemolisis. Sampel yang hemolisis atau mengandung lemak yang tebal tidak cocok digunakan pada tes ini. Sampel yang mengandung partikel (keruh) bisa memberikan hasil inkonsisten sehingga harus dijernihkan sebelum pengujian. Serum atau plasma boleh disimpan pada suhu 2-8°C selama 3 hari, bila dibekukan pada suhu -20°C masa simpan bisa lebih lama, namun harus dihindari proses thaw and freeze pada sampel lebih dari tiga kali. Bila akan menambahkan pengawet boleh digunakan Sodium Azide 0,1% tanpa mempengaruhi hasil pemeriksaan.

I. Cara Kerja

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- dicelupkan ke dalam serum atau plasma secara vertikal dengan panah menunjuk ke arah sampel
- ditunggu selama 10-15 detik, jangan sampai melebihi batas garis maksimum

- ditunggu hingga muncul garis merah, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil setelah 20 menit

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

RANGKUMAN

1. Hepatitis B adalah peradangan hati yang disebabkan oleh HBV. Penyakit ini dapat ditularkan melalui hubungan seksual, transfusi darah, penggunaan jarum yang tidak steril, dan dari ibu ke anak.
2. HBsAg dijadikan penanda terjadinya infeksi HBV karena protein ini merupakan protein permukaan HBV yang disekresikan ke aliran darah dalam jumlah banyak, dapat dideteksi dari awal infeksi, dan menandakan infeksi aktif.
3. Kehadiran HBsAg dalam spesimen berupa serum atau *whole blood* dapat dideteksi menggunakan antibodi anti – HBs yang terkonjugasi koloid emas.
4. Hasil yang positif ditandai dengan terbentuknya garis berwarna pada daerah kontrol dan daerah uji sedangkan hasil negatif ditandai dengan terbentuknya garis berwarna hanya pada daerah kontrol.
5. Dalam pemeriksaan ada kemungkinan didapatkan hasil negatif palsu jika kadar HBsAg dalam spesimen masih berada dibawah rentang deteksi kit yang digunakan atau terjadi kerusakan pada spesimen yang digunakan.

LATIHAN SOAL

1. Hepatitis B adalah penyakit yang disebabkan infeksi Virus Hepatitis B (HBV). Apa gejala penyakit tersebut ?
 - a. Batuk berdarah
 - b. Penyakit kuning
 - c. Anemia
 - d. Kejang-kejang
 - e. Sakit kepala
2. HBV termasuk dalam kelas hepadnaviridae. Virus tersebut memiliki 3 jenis antigen, salah satunya adalah HBsAg. Apa alasan HBsAg dijadikan penanda penyakit Hepatitis B ?
 - a. Dapat dijadikan bahan vaksin
 - b. Dapat memicu respon imun
 - c. Diproduksi berlebih di hati dan disekresikan ke darah
 - d. Ukurannya besar
 - e. Merupakan protein lestari
3. Apa nama enzim yang diproduksi oleh tubuh sebagai penanda kerusakan organ hati akibat HBV ?
 - a. Alanin Aminotransferase
 - b. Alanin dan Leusin Transferase
 - c. Karboksidas
 - d. Katalase
 - e. Superoksida Dismutase
4. Seorang pasien usia 38 tahun datang dengan rujukan pemeriksaan Hepatitis B. Reagen yang tersedia di laboratorium adalah imunokromatografi. Setelah dilakukan pemeriksaan, didapatkan hasil seperti pada gambar:



Komponen apa yang terdapat dalam serum pasien tersebut ?

- a. Anti-HBs
 - b. HBcAg
 - c. Anti-HBc
 - d. HbeAg
 - e. HBsAg
5. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan HBsAg menggunakan metode imunokromatografi sesuai SOP. Pada saat pembacaan hasil, tidak ada garis berwarna yang terbentuk. Apa tindakan yang harus dilakukan ATLM tersebut?
- a. Mengambil darah ulang
 - b. Meneteskan serum lagi pada kolom S
 - c. Pasien diminta untuk datang kembali
 - d. Periksa ulang menggunakan kaset yang baru
 - e. Mengulang pemeriksaan menggunakan merk lain

KEGIATAN 5

PEMERIKSAAN ANTIBODI ANTI - HBs

A. Pemeriksaan Antibodi Anti-HBs (Kualitatif) metode Imunokromatografi

Metode imunokromatografi anti-HBs dapat mendeteksi antibodi (anti-HBs) terhadap antigen permukaan virus hepatitis B (HBsAg) dalam serum atau plasma manusia secara kualitatif untuk tujuan klinis dan menilai respon antibodi terhadap vaksin HBsAg. Virus hepatitis B (VHB) merupakan keluarga *Hepadnaviridae*, memiliki *envelope*, memiliki material genetik berupa DNA untai ganda, dan diakui sebagai penyebab utama penularan hepatitis bersama-sama dengan virus hepatitis C (VHC). Infeksi VHB menginduksi manifestasi klinis mulai dari penyakit tanpa gejala ringan sampai hepatitis fulminan, penyakit hati kronis yang parah, yang dalam beberapa kasus dapat menyebabkan sirosis dan karsinoma hati. Klasifikasi infeksi hepatitis B memerlukan identifikasi beberapa tanda serologi yang diekspresikan selama tiga fase (inkubasi, akut dan konvalesen) dari infeksi. Sekarang beberapa tes diagnostik digunakan untuk skrining, diagnosis klinis dan penatalaksanaan penyakit.

Antigen permukaan virus Hepatitis B (HBsAg) merupakan protein *envelope* virus yang muncul tak lama setelah infeksi dan merupakan penanda serologi kunci untuk deteksi dan diagnosis VHB. Selama pengobatan, 90% pasien menunjukkan pemulihan dan pengembangan antibodi (anti-HBs). Karena pengenalan program vaksinasi hepatitis B, deteksi anti-HBs telah menjadi metode penting untuk pemantauan penerima pada vaksinasi HBsAg sintetis dan alami. Tidak adanya anti-HBs menunjukkan kerentanan terhadap infeksi VHB. Oleh karena itu, skrining untuk anti-HBs pada populasi berisiko tinggi direkomendasikan untuk mengidentifikasi individu yang dapat mengambil manfaat dari vaksinasi.

Prinsip pemeriksaan anti-HBs sama dengan pemeriksaan HBsAg, yaitu menggunakan sistem *sandwich*. Ketika strip imunokromatografi direndam dalam sampel, antibodi anti-HBs akan terikat dengan antigen pertama yang terkonjugasi koloid emas. Kompleks imun tersebut terus bergerak hingga terikat dengan

antigen kedua dan menyebabkan terbentuknya garis berwarna pada daerah tes (T). Kompleks imun yang tidak terikat akan bergerak terus hingga daerah kontrol (C) dan menyebabkan terbentuknya garis berwarna. Hasil pemeriksaan dinyatakan valid jika terbentuk garis berwarna pada daerah kontrol.

I. Cara Kerja

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- dicelupkan ke dalam serum atau plasma secara vertikal dengan panah menunjuk ke arah sampel
- ditunggu selama 10-15 detik, jangan sampai melebihi batas garis maksimum
- ditunggu hingga muncul garis merah, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil setelah 20 menit

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab : _____

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

B. Pemeriksaan Antibodi Anti-HBs (Kuantitatif) metode ELISA

Kit ELISA anti-HBs dapat mendeteksi antibodi terhadap antigen permukaan virus hepatitis B (anti-HBs) dalam serum atau plasma manusia secara kuantitatif untuk tujuan klinis dan menilai tingkat respon antibodi terhadap vaksin HBsAg. Virus hepatitis B (VHB) merupakan keluarga *Hepadnaviridae*, memiliki *envelope*, memiliki material genetik berupa DNA untai ganda, dan diakui sebagai penyebab utama penularan hepatitis bersama-sama dengan virus hepatitis C (VHC). Infeksi VHB menginduksi manifestasi klinis mulai dari penyakit tanpa gejala ringan sampai hepatitis fulminan, penyakit hati kronis yang parah, yang dalam beberapa kasus dapat menyebabkan sirosis dan karsinoma hati. Klasifikasi infeksi hepatitis B memerlukan identifikasi beberapa tanda serologi yang diekspresikan selama tiga fase (inkubasi, akut dan konvalesen) dari infeksi. Sekarang beberapa tes diagnostik digunakan untuk skrining, diagnosis klinis dan penatalaksanaan penyakit.

Antigen permukaan Hepatitis B (HBsAg) merupakan protein *envelope* virus yang muncul tak lama setelah infeksi dan merupakan penanda serologi kunci untuk deteksi dan diagnosis VHB. Selama pengobatan, 90% pasien menunjukkan pemulihan dan pengembangan antibodi (anti-HBs). Karena pengenalan program vaksinasi hepatitis B, deteksi anti-HBs telah menjadi metode penting untuk pemantauan penerima pada vaksinasi HBsAg sintetis dan alami. Tidak adanya anti-HBs menunjukkan kerentanan terhadap infeksi VHB. Oleh karena itu, skrining untuk anti-HBs pada populasi berisiko tinggi direkomendasikan untuk mengidentifikasi individu yang dapat mengambil manfaat dari vaksinasi.

Untuk deteksi anti-HBs, kit ini menggunakan ELISA jenis *sandwich*. Kit ini menggunakan *strip microwell polystyrene* yang telah dilapisi dengan HBsAg rekombinan pertama. Serum atau plasma pasien ditambahkan ke *microwell* bersama-sama dengan HBsAg rekombinan kedua yang telah dikonjugasikan dengan *Horse Radish Peroxidase* (HRP-konjugat). HBsAg pertama akan menangkap anti-HBs dalam sampel, kemudian kompleks imun tersebut akan mengikat HBsAg kedua (HRP-konjugat). Pencucian dimaksudkan untuk menghilangkan sampel dan HRP konjugat yang tidak terikat. Kemudian, larutan kromogen yang mengandung Tetramethylbenzidine (TMB) dan urea peroksida

ditambahkan ke sumur. Kromogen yang tidak berwarna akan dihidrolisis oleh HRP konjugat sehingga menghasilkan produk berwarna biru. Warna biru berubah menjadi kuning setelah reaksi dihentikan dengan asam sulfat. Jumlah intensitas warna dapat diukur dan sebanding dengan jumlah antibodi ditangkap di sumur.

I. Cara Kerja

Reagen ELISA, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna, jika ada bagian yang mengkristal maka harus dipanaskan pada suhu 37°C hingga terlarut
- disiapkan *wash buffer* konsentrasi 1X dengan mengencerkan *wash buffer stock* 20X



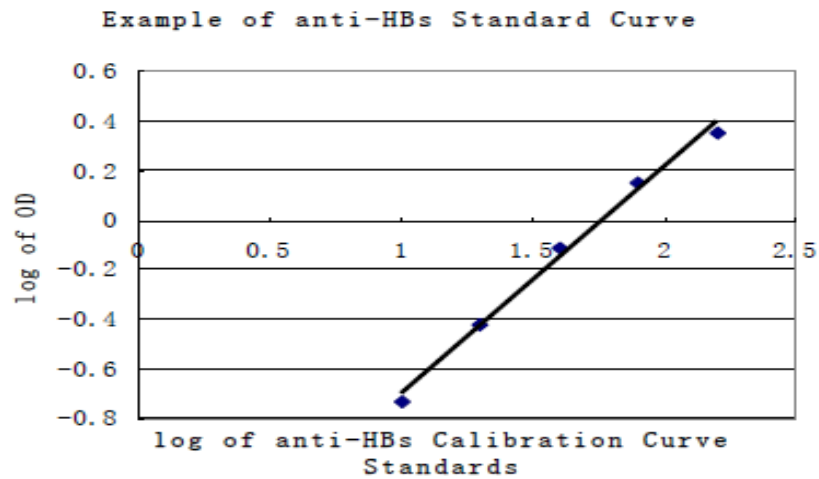
Microplate

- ditandai sumur yang berisi blanko, sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif.
- ditambahkan 50 µl standar dan 50 µl sampel, **kecuali** pada sumur blanko
- ditambahkan 50 µl konjugat HRP (**kecuali** blanko)
- ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C
- dibuang larutan terdahulu, ditambahkan 400 µl *wash buffer* (**kecuali** blanko). Pencucian dilakukan sebanyak 5 kali selama 30-60 detik
- ditambahkan 50 µl kromogen A dan 50 µl kromogen B (**termasuk** blanko)
- ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C
- ditambahkan 50 µl *Stop Solution* (**termasuk** blanko)
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm
- dibuat kurva standar seperti Gambar 5.4



Interpretasi Hasil

Standards	log mIU/ml	Mean OD	log OD
10mIU/ml	1	0.186	-0.728
20mIU/ml	1.30103	0.380	-0.4202
40mIU/ml	1.60206	0.770	-0.1135
80mIU/ml	1.90309	1.427	0.1544
160mIU/ml	2.20412	2.249	0.3521



Gambar 5.4. Kurva Standar Anti-HBs (Wantai, 2014)

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Foto Pengamatan	Keterangan

--	--

III. Pembahasan

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Anti – HBs adalah antibodi yang dapat mengenali HBsAg. Antibodi ini dapat terbentuk secara alami ataupun buatan. Seseorang yang sedang atau terinfeksi HBV akan membentuk antibodi tersebut sebagai respon perlawanan terhadap virus. Orang yang telah melakukan vaksinasi juga akan membentuk anti – HBs.
2. Pemeriksaan anti – HBs sering dilakukan untuk menguji keberhasilan proses vaksinasi. Proses vaksinasi Hepatitis B dinyatakan berhasil atau protektif jika titer anti – HBs di dalam tubuh lebih dari 10 IU/ml. Pemeriksaan ini juga sering dilakukan sebelum seseorang diperbolehkan mendapatkan vaksinasi.
3. Keberadaan anti – HBs dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu imunokromatografi dan ELISA. Hasil pemeriksaan menggunakan imunokromatografi bersifat kualitatif sedangkan ELISA bersifat kuantitatif.
4. Imunokromatografi biasanya digunakan pada tahap skrining sebelum seseorang diperbolehkan melakukan vaksinasi. Tujuannya hanya untuk mendeteksi keberadaan anti – HBs dalam tubuh tanpa mengetahui titer antibodi yang tepat.
5. Kehadiran anti – HBs dideteksi menggunakan antigen HBsAg rekombinan yang telah terkonjugasi koloid emas. Pemeriksaan bisa menggunakan spesimen berupa serum atau *whole blood* dengan waktu interpretasi hasil selama 15 menit.
6. Metode ELISA digunakan untuk menentukan titer anti – HBs di dalam tubuh. Jenis ELISA yang biasanya digunakan adalah jenis *sandwich*. Keberadaan anti – HBs dideteksi menggunakan antibodi anti – HBs manusia yang terkonjugasi dengan enzim. Enzim yang digunakan umumnya adalah HRP dengan substrat berupa senyawa kromogenik seperti TMB.
7. Secara kualitatif, hasil pemeriksaan ELISA ditentukan dengan membandingkan absorbansi sampel dengan nilai cut off.
8. Titer anti – HBs ditentukan dengan cara melakukan pembuatan kurva standar.

LATIHAN SOAL

1. Berdasarkan lama infeksi dan jenis antibodi yang terbentuk, penyakit hepatitis B dibagi menjadi 2, yaitu Hep B akut dan kronik. Apa ciri-ciri penyakit Hepatitis B akut?
 - a. Positif HBsAg lebih dari 6 bulan
 - b. IgM Anti-HBs negatif
 - c. IgM Anti-HBc positif
 - d. Infeksi tidak selesai
 - e. IgG Anti-HBe positif

2. Komponen apa yang tersedia dibantalan kojugat imunokromatografi tersebut ?



- a. HBcAg
 - b. HBsAg
 - c. HBeAg
 - d. Anti-HBs
 - e. Anti-HBc
3. Seorang ATLM mendapatkan spesimen berupa serum. ATLM tersebut diminta untuk melakukan pemeriksaan HBsAg, anti – HBs, dan anti – HBc. Dari ketiga pemeriksaan tersebut, didapatkan hasil positif hanya pada pemeriksaan anti – HBs. Apa yang dapat disimpulkan dari hasil tersebut ?
 - a. Sudah pernah vaksinasi
 - b. Tidak pernah terinfeksi
 - c. Terjadi infeksi aktif
 - d. Sudah sembuh dari infeksi
 - e. Sudah dapat menularkan ke orang lain

4. Penyakit Hepatitis B dapat dicegah menggunakan vaksin yang mengandung HBsAg rekombinan. Berapa titer anti-HBs yang dibutuhkan seseorang agar tidak terjangkit Hepatitis B?
- a. >10 IU/ml
 - b. >25 IU/ml
 - c. <10 IU/ml
 - d. <1 mg/L
 - e. >5 mg/L
5. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan Anti-HBs menggunakan imunokromatografi. Setelah 15 menit, didapatkan hasil sebagai berikut :



Apa fungsi pemeriksaan Anti-HBs?

- a. Mendeteksi infeksi HBV
- b. Menentukan titer Anti-HBs
- c. Mencegah penyakit Hepatitis B
- d. Membedakan infeksi akut dan kronik
- e. Mengetahui keberadaan Anti-HBs

KEGIATAN 6

PEMERIKSAAN ANTIBODI ANTI-HCV (HEPATITIS C VIRUS)

Virus hepatitis C (HCV) adalah virus RNA beruntai tunggal dari keluarga Flaviviridae (Adeyemi *et al.*, 2013). HCV memiliki ukuran lebih besar dari HBV yaitu sekitar 50 nm. HCV dapat ditularkan melalui darah dan hubungan seksual. HCV sekarang dikenal sebagai agen penyebab sebagian besar penyakit hepatitis, selain virus Hepatitis A dan B. Di dalam serum individu yang terinfeksi HCV akan terbentuk antibodi terhadap antigen HCV.

Metode umum untuk mendeteksi infeksi HCV adalah mengamati adanya antibodi terhadap virus dengan metode EIA diikuti konfirmasi Western Blot. Metode tersebut memerlukan banyak reagen dan waktu yang cukup lama (Cypress, 2010). Sekarang telah dikembangkan metode yang lebih cepat dan sederhana, yaitu dengan imunokromatografi. Tes tersebut merupakan tes kualitatif visual sederhana yang mendeteksi antibodi dalam serum atau plasma manusia. Tes ini dapat memberikan hasil dalam waktu 15 menit (Cypress, 2010). Untuk mendeteksi keberadaan antibodi anti HCV, imunokromatografi menggunakan antigen berupa protein rekombinan daerah inti, NS3, NS4, dan NS5 dari genom HCV (Core, 2005). Kombinasi protein ini dalam sistem *sandwich* antigen ganda tidak hanya memberi deteksi antibodi untuk lebih banyak epitop yang dikodekan HCV tetapi deteksi awal serokonversi setelah infeksi HCV.

Perangkat imunokromatografi pendeteksi HCV menggunakan prinsip imunokromatografi aliran lateral dengan sistem *sandwich* antigen ganda pada membran. Sampel akan mengalir melalui membran perangkat tes, jika di dalam sampel terdapat anti HCV maka antibodi tersebut akan terikat dengan antigen pertama yang terkonjugasi koloid emas (Core, 2005). Kompleks tersebut akan bergerak lebih lanjut ke membran daerah tes (T). Pada daerah T, kompleks imun tersebut akan terikat dengan antigen kedua. Hal tersebut menyebabkan terbentuknya garis berwarna pada daerah T. Garis berwarna pada daerah T menegaskan hasil tes positif. Tidak adanya garis berwarna ini di daerah tes menunjukkan hasil tes negatif. Jika antibodi anti HCV dalam sampel tidak ada maka antigen terkonjugasi koloid emas akan bergerak sendiri menuju daerah

kontrol (C). Di daerah C antigen tersebut akan berikatan dengan antibodi anti-*rabbit* sehingga membentuk garis berwarna. Garis kontrol ini berfungsi untuk memvalidasi reagen dan kinerja pemeriksaan.

Terdapat dua bentuk imunokromatografi yang dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi anti HCV, yaitu bentuk kaset dan strip. Keduanya menggunakan prinsip yang sama walaupun terdapat sedikit perbedaan dalam cara kerja. Proses pemeriksaan menggunakan imunokromatografi strip dan kaset tidak akan terganggu oleh obat umum seperti acetaminophen, aspirin dan penisilin dan bahan kimia endogen seperti trigliserida, asam urat dan bilirubin.

I. Cara Kerja

1. Imunokromatografi Strip

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- dicelupkan ke dalam serum atau plasma secara vertikal dengan panah menunjuk ke arah sampel
- ditunggu selama 10-15 detik, jangan sampai melebihi batas garis maksimum
- ditunggu hingga muncul garis merah, hasil dibaca dalam waktu 15 menit, jangan interpretasikan hasil setelah 20 menit

Interpretasi Hasil

2. Imunokromatografi Kaset

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- ditetesi sampel sebanyak 1 tetes (10 µl)
- ditetesi diluent sebanyak 2 tetes
- ditunggu selama 15 menit

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. HCV adalah penyebab penyakit hepatitis C. Penyakit ini hampir sama dengan hepatitis B. Keduanya memiliki jalur transmisi yang sama dan menyerang organ hati. Perbedaan kedua penyakit tersebut adalah material genetik dan cara replikasi virusnya.
2. Berbeda dengan HBV, infeksi HCV ditentukan dari keberadaan antibodi anti – HCV di dalam tubuh. Hingga saat ini jarang metode yang mendeteksi keberadaan antigen HCV di dalam spesimen.
3. Keberadaan anti – HCV dapat dideteksi menggunakan antigen HCV rekombinan yang dikonjugasikan dengan koloid emas. Waktu pemeriksaan yang diperlukan adalah 15 menit.
4. Hasil negatif palsu dapat terjadi jika kadar anti – HCV dalam tubuh masih rendah. Hal ini disebabkan adanya *window periode* yaitu waktu yang dibutuhkan tubuh untuk memproduksi anti – HCV sebagai respon terhadap kehadiran HCV.
5. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan ketika melakukan pemeriksaan anti – HCV menggunakan metode imunokromatografi, yaitu persiapan spesimen, suhu penyimpanan spesimen, kualitas, sensitifitas, dan spesifisitas reagen.

LATIHAN SOAL

1. Penyakit Hepatitis C merupakan penyakit yang disebabkan infeksi Virus Hepatitis C. Apa organ manusia yang diserang virus tersebut ?
 - a. Jantung
 - b. Liver
 - c. Lambung
 - d. Paru-Paru
 - e. Usus

2. Bagaimana cara penularan virus tersebut ?
 - a. Makanan yang terkontaminasi
 - b. Menggunakan handuk penderita HCV
 - c. Udara yang tercemar
 - d. Penggunaan jarum suntik terkontaminasi
 - e. Pemakaian sisir bersamaan

3. Perhatikan kutipan kit insert berikut ini: *“Test Device: membrane assembly comprising of HCV specific recombinant antigen-colloidal gold conjugate co-dispensed with rabbit IgG colloidal gold conjugate; pre dispensed with HCV specific recombinant antigen at region “T”, and anti rabbit antiserum pre dispensed at the region “C”.* Komponen apa saja yang telah diendapkan pada bantalan konjugat ?
 - a. Antigen HCV dan koloid emas
 - b. Anti-HCV dan Antigen HCV
 - c. Antigen HCV dan IgG kelinci
 - d. Anti-HCV dan Anti-kelinci
 - e. Anti-HCV dan koloid emas

4. Komponen apa yang akan terikat pada daerah tes untuk menandakan berjalannya reaksi ?
 - a. Antigen HCV terkonjugasi koloid emas

- b. Antiserum kelinci
 - c. Antigen HCV rekombinan
 - d. Anti-HCV
 - e. IgG kelinci terkonjugasi koloid emas
5. Seorang ATLM sedang melakukan skrining HCV di salah satu area lokalisasi. Skrining tersebut dilakukan dengan 2 metode, yaitu imunokromatografi dan ELISA. Semua reagen yang digunakan tidak kadaluarsa. Dari 100 spesimen, 2 diantaranya mendapatkan hasil sebagai berikut:

No Sampel	Imunokromatografi	ELISA
1	Negatif	Positif (0.5 mg/L)
2	Negatif	Positif (0.7 mg/L)

Apa yang dapat menyebabkan hal tersebut ?

- a. ATLM membaca hasil imunokromatografi lebih dari 15 menit
- b. Kedua orang tersebut tidak terinfeksi HCV
- c. Anti-HCV pada kedua orang tersebut belum terbentuk secara sempurna
- d. Terjadi kesalahan preparasi sampel
- e. Titer anti-HCV pada sampel tersebut masih dibawah rentang deteksi imunokromatografi

KEGIATAN 7

PEMERIKSAAN *HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS* (HIV)

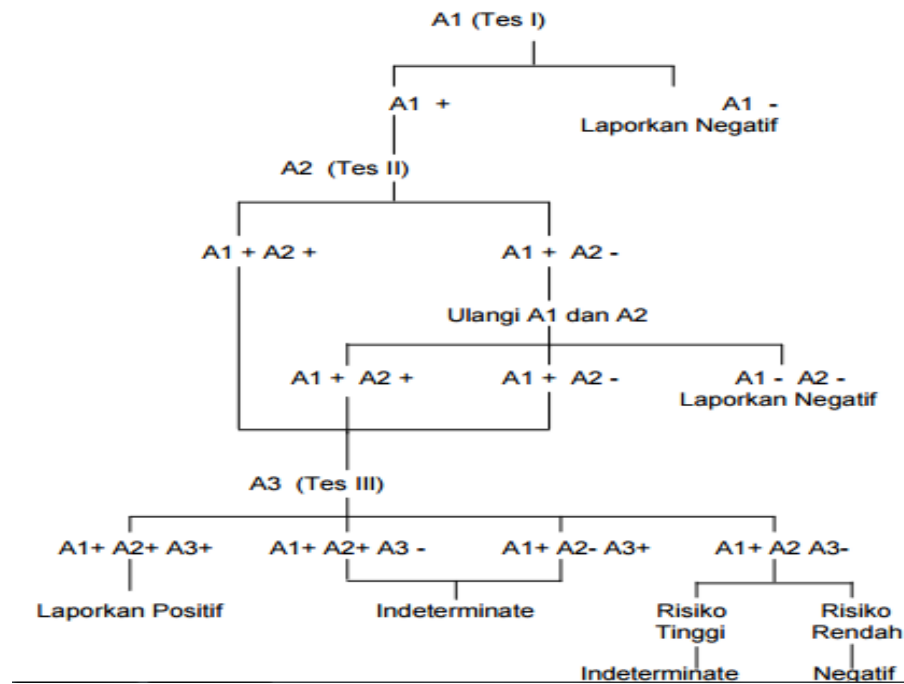
A. Pemeriksaan Antibodi Anti-HIV 1+2 (Kualitatif) metode Imunokromatografi

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) dapat diartikan sebagai kumpulan gejala atau penyakit yang disebabkan oleh menurunnya kekebalan tubuh akibat infeksi oleh virus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). HIV termasuk retroviridae yaitu virus RNA yang tergantung pada enzim *reverse transcriptase* untuk dapat menginfeksi sel mamalia, termasuk manusia, dan menimbulkan kelainan patologi secara lambat (Kementerian Kesehatan, 2013). Virus ini terdiri dari 2 grup, yaitu HIV-1 dan HIV-2. Masing-masing grup mempunyai lagi berbagai sub tipe, dan masing-masing sub tipe secara evolusi yang cepat mengalami mutasi. Diantara kedua grup tersebut, yang paling banyak menimbulkan kelainan dan lebih ganas di seluruh dunia adalah grup HIV-1 (Kementerian Kesehatan, 2013).

Terdapat beberapa pemeriksaan laboratorium untuk menentukan adanya infeksi HIV. Salah satu cara penentuan serologi HIV yang dianjurkan adalah ELISA. Pemeriksaan serologi HIV sebaiknya dilakukan dengan 3 metode berbeda dan dapat dilanjutkan dengan pemeriksaan yang lebih spesifik seperti Western Blot (WB). Melalui WB dapat ditentukan antibodi terhadap komponen protein HIV yang meliputi inti (p17, p24, p55), polimerase (p31, p51, p66), dan selubung (*envelope*) HIV (gp41, gp120, gp160) (Kementerian Kesehatan, 2013).

Tes HIV terdiri dari 3 strategi. Apabila tes yang pertama memberi hasil nonreaktif atau negatif, maka tes antibodi akan dilaporkan negatif. Apabila hasil tes pertama menunjukkan reaktif, maka perlu dilakukan tes HIV kedua pada sampel yang sama dengan menggunakan antigen dan/atau dasar tes yang berbeda dari yang pertama (Kementerian Kesehatan, 2013). Hasil tes kedua yang menunjukkan reaktif kembali maka di daerah atau di kelompok populasi dengan prevalensi HIV 10% atau lebih dapat dianggap sebagai hasil yang positif. Di daerah atau kelompok prevalensi rendah yang cenderung memberikan hasil positif palsu, maka perlu dilanjutkan dengan tes HIV ketiga (Gambar 5.5). WHO,

UNAIDS dan Pedoman Nasional menganjurkan untuk selalu menggunakan alur serial tersebut karena lebih murah dan tes kedua hanya diperlukan bila tes pertama memberi hasil reaktif saja (Kementerian Kesehatan, 2013). Indonesia dengan prevalensi HIV dibawah 10% menggunakan strategi III dengan tiga jenis reagen yang berbeda sensitifitas dan spesifitas-nya.



Gambar 5.5. Pemeriksaan HIV Strategi 3 (Kementerian Kesehatan, 2013)

Diagnosa cepat infeksi HIV 1&2 sangatlah penting untuk penanganan pasien dan penyakit tersebut. Pengembangan tes cepat (5-30 menit) imunokromatografi merupakan penyaringan awal untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap HIV tipe 1, HIV tipe 2, dan subtipe O di dalam serum/ plasma dan darah pasien. Tes ini meliputi deteksi antibodi HIV-1, HIV-2, dan subtipe O dalam darah, serum, plasma oleh protein *immunodominant* pada virus HIV yang sudah dilumpuhkan dalam membran (Oncoprobe, 2005). Daerah tes T1 telah dilapisi dengan antigen HIV-1 dan subtipe O sedangkan daerah tes T2 telah dilapisi antigen HIV 2. Antigen pengikatnya adalah protein rekombinan dari HIV-1 pada daerah gp120, gp41, p24 sedangkan untuk HIV-2 termasuk rekombinan gp36 (Oncoprobe, 2005). Adanya antibodi positif dapat dibaca dengan

terbentuknya garis ungu kemerahan pada membran. Garis kontrol tambahan diletakkan pada membran untuk memeriksa reaktivitas kit.

Hasil dinyatakan positif jika terbentuk dua atau tiga garis berwarna, satu pada daerah T1 atau T2 (atau 1 dan 2) dan satu pada daerah kontrol (Gambar 5.6). Hal ini berarti pada serum, plasma, dan darah terdapat antibodi HIV-1 atau 2. Garis warna pada daerah T1 menandakan infeksi HIV-1 sedangkan garis warna pada daerah T2 menandakan infeksi HIV-2. Intensitas warna yang timbul pada daerah T1 dan T2 tidak berhubungan dengan banyaknya kadar antibodi dalam sampel (Oncoprobe, 2005). Hasil dinyatakan negatif jika terbentuk satu garis pada daerah kontrol saja. Ini berarti serum, plasma, dan darah tidak mengandung antibodi HIV. Hasil dinyatakan invalid apabila tidak timbul garis berwarna pada zona kontrol.



Gambar 5.6. Interpretasi Hasil Pemeriksaan Antibodi Anti HIV1&2 (Oncoprobe, 2005)

Hasil negatif tidak mengesampingkan kemungkinan terinfeksi HIV-1/2. False negatif dapat diperoleh dalam beberapa keadaan sebagai berikut (Oncoprobe, 2005):

- Tingkat antibodi dibawah batas minimum deteksi. Contohnya sampel yang terkumpul pada masa awal serokonversi dimana pada *window periode* ini pasien hanya dapat membentuk antibodi spesifik HIV-1/2 dalam jumlah sedikit.
- Infeksi oleh virus tertentu yang kurang dapat dideteksi oleh kit
- Antibodi HIV yang diproduksi tubuh pasien tidak beraksi spesifik dengan antigen yang digunakan kit

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

B. Pemeriksaan Antibodi Anti-HIV 1+2 (Kualitatif) metode ELISA

AidTM anti-HIV 1+2 ELISA adalah ELISA yang dimaksudkan untuk mendeteksi antibodi terhadap *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) tipe 1 (kelompok M - O) atau tipe 2 dalam serum atau plasma manusia secara kualitatif. Pengujian ini dapat dimanfaatkan untuk skrining donor darah dan/atau sebagai bantuan dalam diagnosis klinis kondisi yang berkaitan dengan infeksi HIV-1 dan/atau HIV-2 agen etiologi dari *Acquired Immunodeficiency Sindrom* (AIDS).

Bukti serologis infeksi HIV dapat diperoleh dengan menguji keberadaan antigen atau antibodi anti HIV pada serum orang yang dicurigai terinfeksi HIV. Antigen HIV umumnya dapat dideteksi selama fase akut dan fase gejala AIDS saja. Antibodi anti HIV-1 dan/atau HIV-2 dapat dideteksi di sepanjang periode infeksi, yang dimulai pada atau setelah fase akut dan sampai tahap akhir AIDS. Oleh karena itu, penggunaan tes antibodi yang sangat sensitif adalah pendekatan utama dalam serodiagnosis infeksi HIV. Terlepas dari transmisi seksual, rute utama infeksi HIV adalah transfusi darah. HIV dapat hadir baik di sel dan fraksi darah manusia. Oleh karena itu, semua sumbangan darah atau plasma harus diuji karena risiko penularan HIV melalui darah yang terkontaminasi. Hal ini dapat secara efektif dicapai dengan pengujian untuk antibodi terhadap HIV-1 dan HIV-2 dengan menggunakan tes ELISA yang sangat sensitif.

AiDTM anti-HIV 1 + 2 ELISA adalah kit ELISA jenis *sandwich*. Kit ini menggunakan *strip microwell polystyrene* yang telah dilapisi dengan antigen HIV rekombinan. Antigen tersebut diekspresikan oleh *E.coli* (rekombinan HIV-1 gp41, gp120, dan HIV rekombinan 2 gp-36). Pada tahap inkubasi pertama, jika ada antibodi anti HIV1 atau 2 yang terkandung dalam serum atau plasma pasien akan ditangkap oleh antigen rekombinan pertama dalam sumur. *Microwell* kemudian dicuci untuk menghilangkan protein serum yang tidak terikat. Pada tahap inkubasi kedua, antigen rekombinan kedua ditambahkan dan akan ditangkap oleh antibodi anti HIV. Antigen rekombinan kedua telah dikonjugasikan dengan enzim *Horse Radish Peroxidase* dan mengekspresikan epitop yang sama dengan antigen pertama. *Microwell* dicuci kembali untuk menghilangkan konjugat yang tidak terikat. Pada tahap terakhir, substrat kromogen ditambahkan ke dalam sumur. Kromogen yang tidak berwarna akan dihidrolisis oleh konjugat HRP sehingga

membentuk produk berwarna biru. Warna biru berubah menjadi kuning setelah reaksi dihentikan dengan asam sulfat. Jumlah intensitas warna dapat diukur dan sebanding dengan jumlah antibodi ditangkap di sumur. Sumur yang berisi sampel negatif untuk anti-HIV 1/2 tidak akan berwarna.

Hasilnya ELISA ini dihitung dengan mnghubungkan setiap nilai absorbansi (A) sampel dengan nilai *Cut-off* (C.O.) dari *plate*. Jika pembacaan C.O. didasarkan pada pembaca *plate* dengan filter tunggal, maka hasil harus dihitung dengan mengurangi nilai absorbansi blanko dari nilai absorbansi sampel dan kontrol. Jika pembacaan didasarkan pada pembaca *plate* yang menggunakan filter ganda maka tidak perlu dilakukan pengurangan. Berikut perhitungan nilai *Cut-off*:

$$C.O. = N_c + 0,12.$$

(N_c = nilai absorbansi rata-rata untuk tiga kontrol negatif).

Hasil ELISA ini dinyatakan valid jika memenuhi persyaratan berikut:

- Nilai A blanko < 0.080 pada 450 nm
- Nilai A kontrol positif harus ≥ 0.800 di 450/630nm
- Nilai A kontrol negatif harus ≤ 0.100 di 450/630nm

Jika salah satu nilai A kontrol negatif tidak memenuhi kriteria diatas maka harus dibuang dan nilai rata-rata kontrol negatif dihitung ulang menggunakan dua nilai sisa. Jika lebih dari satu nilai A kontrol negatif tidak memenuhi kriteria maka tes tidak valid dan harus diulang. Hasil pemeriksaan dinyatakan positif jika nilai $A/C.O. \geq 1$; negatif jika nilai $A/C.O. < 1$; dan borderline jika nilai $A/C.O. = 0.9-1.1$. Hasil borderline harus diulang untuk memastikan hasilnya.

I. Cara Kerja

Reagen ELISA, Kontrol, dan Sampel

- ↓

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
 - dihomogenkan hingga terlarut sempurna, jika ada bagian yang mengkristal maka harus dipanaskan pada suhu 37°C hingga terlarut
 - disiapkan *wash buffer* konsentrasi 1X dengan mengencerkan *wash buffer stock* 20X

Microplate

- ditandai sumur yang berisi blanko, sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif.
- ditambahkan 100 µl sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif, **kecuali** pada sumur blanko
- ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C
- dibuang larutan terdahulu, ditambahkan 400 µl *wash buffer* (**kecuali** blanko). Pencucian dilakukan sebanyak 5 kali selama 30-60 detik
- ditambahkan 100 µl konjugat HRP (**kecuali** blanko)
- ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C
- dibuang larutan terdahulu, ditambahkan 400 µl *wash buffer* (**kecuali** blanko). Pencucian dilakukan sebanyak 5 kali selama 30-60 detik
- ditambahkan 50 µl kromogen A dan 50 µl kromogen B (**termasuk** blanko)
- ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C
- ditambahkan 50 µl *Stop Solution* (**termasuk** blanko)
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien	:	Nomor Lab	:
Usia Pasien	:	Jam Pengambilan	:

Foto Pengamatan	

III. Pembahasan

III. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. HIV adalah virus yang menyerang sistem kekebalan tubuh, khususnya sel T. Infeksi HIV dapat menyebabkan AIDS. Seseorang yang telah menderita AIDS dapat mengalami kasus koinfeksi dan infeksi oportunistik.
2. HIV merupakan virus kelompok retroviridae dengan material genetik berupa RNA. Namun virus ini dapat melakukan transkripsi balik untuk membentuk DNA sehingga material genetiknya dapat terintegrasi dengan material genetik manusia. HIV terdiri dari dua serotipe, yaitu HIV 1 dan HIV 2. Keduanya memiliki protein penanda yang berbeda.
3. Prosedur pemeriksaan HIV harus sesuai dengan Peraturan Menteri Kesehatan No. 15 Tahun 2015. Terdapat tiga strategi yang dapat dilakukan untuk melakukan pemeriksaan HIV.
4. Strategi pertama dapat menggunakan imunokromatografi atau ELISA dengan reagen yang memiliki sensitifitas >98%. Spesimen yang menunjukkan hasil reaktif perlu diuji menggunakan strategi kedua, yaitu menggunakan metode yang sama dengan strategi pertama namun dengan reagen yang memiliki spesifisitas >99%. Jika hasil pemeriksaan reaktif dilanjutkan sampai strategi ketiga yaitu menggunakan reagen yang sensitivitas dan spesifisitasnya >99% atau lebih tinggi dari reagen yang digunakan pada strategi kedua.
5. Untuk spesimen yang menunjukkan hasil non reaktif perlu dilakukan pengujian ulang setelah 1-3 bulan untuk mengantisipasi kemungkinan negatif palsu akibat *window periode*.
6. Strategi pertama dan kedua digunakan untuk tujuan skrining sedangkan strategi ketiga dilakukan untuk diagnosis penyakit.
7. Keberadaan anti – HIV 1 dan 2 dapat dideteksi menggunakan metode imunokromatografi dan ELISA. Pada imunokromatografi digunakan label berupa kolid emas sedangkan pada ELISA digunakan enzim. Pemeriksaan menggunakan imunokromatografi memang lebih murah dan cepat namun hasilnya hanya bersifat kualitatif sedangkan ELISA menawarkan pemeriksaan yang lebih sensitif dan hasilnya bersifat kuantitatif.

LATIHAN SOAL

1. Seorang ATLM menerima permintaan tes HIV atas nama XX yang tinggal satu wilayah dengannya dan datang bersama konselor. Keluarga pasien ingin mengetahui hasil pemeriksaanya. Apa sikap saudara terhadap kasus tersebut ?
 - a. Memberitahukan hasilnya
 - b. Meminta izin terhadap konselor
 - c. Mengalihkan alur pembicaraan
 - d. Menyarankan keluarga menemui dokter
 - e. Tetap diam walaupun setiap saat ditanyakan

2. Pemeriksaan HIV / AIDS dilakukan pada dua sampel. Satu sampel skrining dilakukan pada pasien yang diduga terinfeksi HIV, sedangkan sampel kedua untuk pemeriksaan konfirmasi pada pasien yang sudah positif pada pemeriksaan skrining. Metode apakah yang dilakukan pada kedua sampel tersebut?
 - a. NAT dan Viral load
 - b. Rapid dan Hitung CD4
 - c. Kromatografi dan ELISA
 - d. PCR dan Imunofluoresens
 - e. Carik celup dan Western blot

3. Seorang pria datang ke laboratorium dengan rujukan pemeriksaan HIV. ATLM mengambil dan menyiapkan spesimen. Setelah 15 menit, terbentuk 2 garis berwarna pada imunokromatografi. Apa yang perlu dilakukan oleh ATLM tersebut?
 - a. Meminta spesimen baru pada pasien
 - b. Mengganti reagen pemeriksaan menjadi yang lebih sensitif
 - c. Menyampaikan hasil positif HIV pada pasien
 - d. Melanjutkan pemeriksaan menggunakan reagen yang lebih spesifik
 - e. Menuliskan hasil reaktif pada formulir pemeriksaan

4. Seorang ATLM diminta untuk mengambil spesimen dari seorang pasien. Dalam formulir pemeriksaan tertulis kode B-20. Reagensia yang tersedia di laboratorium adalah imunokromatografi. Setelah 15 menit terbentuk garis berwarna pada daerah tes dan kontrol. Apa yang harus dilakukan ATLM tersebut ketika melakukan pengambilan spesimen?
- Menggunakan alat pelindung diri yang lengkap
 - Meminta bantuan ATLM senior
 - Mendatangi UGD
 - Memberitahu pasien bahwa dirinya kemungkinan terinfeksi HIV
 - Mengambil spesimen berupa darah kapiler
5. Seorang ATLM diminta untuk mengambil spesimen dari seorang pasien. Dalam formulir pemeriksaan tertulis kode B-20. Pada saat melakukan plebotomi secara tidak sengaja dia tertusuk jarum. Apa tindakan yang harus segera dilakukan?
- Melaporkan kasus ke penanganan infeksi
 - Meminum obat
 - Pergi ke dokter UGD
 - Membasuh luka tusukan jarum dengan alcohol
 - Memeriksa diri ke laboratorium

MODUL 6

DETEKSI PROTEIN SPESIFIK-ANTIGEN-ANTIBODI YANG DISEBABKAN BAKTERI

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium bidang imunologi/immunoassay menggunakan metode aglutinasi dan imunokromatografi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip reaksi aglutinasi dan imunokromatografi untuk deteksi Protein Spesifik Antigen-Antibodi yang disebabkan bakteri, mampu memahami kit insert pemeriksaan metode aglutinasi dan imunokromatografi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan laboratorium berupa immunoassay metode aglutinasi dan imunokromatografi, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami kit insert immunoassay metode aglutinasi dan imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel
- c. Melakukan pemeriksaan deteksi Protein Spesifik Antigen-Antibodi yang disebabkan bakteri metode aglutinasi dan imunokromatografi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami kit insert immunoassay metode aglutinasi dan imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi sampel
- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa
- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji aglutinasi dan imunokromatografi
- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji aglutinasi dan imunokromatografi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Immunoassai Deteksi Protein Spesifik Antigen-Antibodi
- b. Pemeriksaan CRP
- c. Pemeriksaan ASO
- d. Pemeriksaan Antigen MPT64

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN 1

PEMERIKSAAN C-REACTIVE PROTEIN (CRP)

C-Reactive Protein (CRP) adalah protein fase akut yang ada dalam serum normal. Protein tersebut akan meningkat secara signifikan jika terjadi kerusakan jaringan, infeksi bakteri dan virus, inflamasi, dan *malignant neoplasia* (Vaishnavi, 1996). Konsentrasi CRP pada serum normal biasanya kurang dari 12 mg/L, sedangkan tingkat CRP yang dapat menunjukkan hasil positif biasanya setara atau lebih tinggi dari 330 mg/L (Lars-Olof Hanson, 1997). Konsentrasi CRP dapat meningkat menjadi 300 mg/L dalam 12-24 jam jika dalam tubuh terjadi nekrosis jaringan dan inflamasi yang disebabkan oleh infeksi mikroba (Vaishnavi, 1996). CRP juga dapat dideteksi pada pasien yang mengalami transfusi darah, operasi bedah, luka bakar, dan *pemphigus vulgaris*. Pemantauan rutin kadar CRP sering digunakan sebagai sarana untuk menilai aktivitas penyakit dan penuntun terapi.

Pada pemeriksaan ini serum yang digunakan merupakan hasil sentrifugasi gumpalan darah yang baru dan bersih. Sampel disimpan pada suhu 2-8°C selama 48 jam. Untuk jangka waktu yang lebih lama harus disimpan pada kondisi beku. Serum haematic, lipaemic, atau terkontaminasi harus dibuang. Pemeriksaan CRP dilakukan dengan menguji suspensi partikel lateks yang dilapisi antibodi anti-CRP manusia melawan serum yang tidak diketahui (Yamamoto, 1993). Kehadiran aglutinasi mengindikasikan adanya peningkatan kadar CRP ke tingkat klinis yang signifikan. Reagen latex CRP sudah distandardisasi untuk mendeteksi CRP serum diatas atau setara dengan 6 µg/ml yang dianggap konsentrasi terendah signifikansi klinis. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk aglutinasi selama dua menit. Kehadiran aglutinasi mengindikasi tingkat CRP dalam sampel lebih dari atau sama dengan 6 mg/L sedangkan tidak adanya aglutinasi mengindikasi tingkat CRP kurang dari 6 mg/L (Lars-Olof Hanson, 1997).

Konsentrasi CRP yang tinggi dalam sampel dapat memberikan hasil negatif (*prozone effect*). Sampel perlu diuji ulang menggunakan tetesan sampel sekitar 20µl. Haemoglobin (10 g/L), bilirubin (20 mg/dL), dan lipemia (10 g/L) tidak akan mengganggu pemeriksaan. *Rheumatoid factor* yang lebih besar dari 100 IU/ml dapat mengganggu pemeriksaan. Hasil pemeriksaan ini harus didukung dengan kondisi klinis.

I. Cara Kerja

Reagen Lateks CRP, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- ditetaskan kontrol negatif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ditetaskan kontrol positif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ditetaskan sampel sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ditetaskan reagen lateks CRP sebanyak 1 tetes pada papan aglutinasi (ujung pipet reagen tidak boleh menyentuh kontrol maupun sampel)

Campuran reagen dan kontrol / sampel

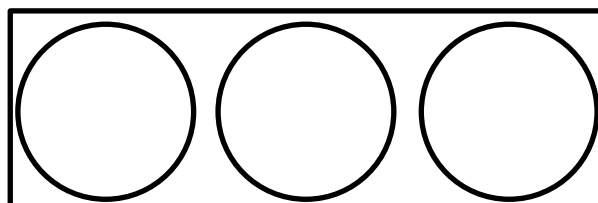
- dihomogenkan menggunakan ujung pipet (ujung pipet yang digunakan untuk menghomogenkan tiap kontrol dan sampel harus berbeda)
- dirotasi atau digoyang selama 2 menit

Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien : Nomor Lab :
Usia Pasien : Jam Pengambilan :

Sampel	Kontrol positif	Kontrol negatif
--------	-----------------	-----------------



III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

RANGKUMAN

1. CRP adalah protein yang menandakan terjadinya inflamasi di dalam tubuh. Peningkatan kadar CRP dapat disebabkan beberapa hal, seperti
 - kerusakan jaringan
 - infeksi bakteri dan virus
 - inflamasi
 - transfusi darah
 - operasi bedah
 - luka bakar
 - *pemphigus vulgaris*
2. Prinsip pemeriksaan CRP menggunakan metode aglutinasi adalah mendeteksi antigen CRP menggunakan antibodi anti – CRP yang terikat pada partikel lateks. Kehadiran CRP dalam spesimen ditandai dengan terbentuknya gumpalan setelah dirotasi selama 2 menit.
3. Hasil positif palsu dalam pemeriksaan ini dapat disebabkan oleh kehadiran *Rheumatoid Factor* dengan kadar > 100 IU/ml
4. Hasil negatif palsu dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti kesalahan teknis dan fenomena yang disebut *prozone effect*.
5. *Prozone effect* adalah fenomena dimana kadar CRP dalam spesimen terlalu tinggi sehingga menyebabkan hasil negatif pada pemeriksaan. Hal ini bisa diatasi dengan cara melakukan pengenceran spesimen.

LATIHAN SOAL

1. Parameter pemeriksaan CRP dilakukan pada spesimen yang berasal dari pasien wanita usia 30 tahun dengan penyakit sepsis. Hasil pemeriksaan laboratorium CRP kualitatif adalah positif. Pemeriksaan dilanjutkan dengan tes semi kuantitatif. Pengenceran terakhir yang memperlihatkan aglutinasi adalah pengenceran 1/32. Diketahui sensitivitas reagen yang digunakan adalah 6 mg/dL. Berapakah kadar CRP (mg/dL) pasien tersebut?
 - a. 0
 - b. 6
 - c. 32
 - d. 98
 - e. 192
2. Spesimen diambil dari pasien perempuan usia 45 tahun. Berdasarkan keterangan dokter pasien menderita TBC dan telah melakukan pengobatan selama 5 bulan. Pemeriksaan menggunakan CRP reagen latex metode semikuantitatif. Hasil pemeriksaan menunjukkan titer 1/4. Berapa konsentrasi CRP pada kasus tersebut ?
 - a. 6 mg/L
 - b. 12 mg/L
 - c. 18 mg/L
 - d. 24 mg/L
 - e. 48 mg/L
3. Atas permintaan dokter, seorang ATLM melakukan pemeriksaan CRP pada seorang pasien yang baru saja menjalani operasi. Ketika dilakukan pemeriksaan, tidak ada gumpalan yang terbentuk pada papan aglutinasi. Namun ketika dilakukan pemeriksaan ulang menggunakan spesimen yang diencerkan, gumpalan terbentuk. Apa yang telah terjadi pada pemeriksaan tersebut?
 - a. Fenomena Prozone

- b. Kesalahan teknis
 - c. Reagen terkontaminasi
 - d. Kerusakan spesimen
 - e. Sensitivitas reagen rendah
4. Seorang pasien datang dengan rujukan pemeriksaan CRP. Reagen yang digunakan oleh ATLM memiliki sensitivitas sebesar 200 IU/ml. Karena hasil pemeriksaan secara kualitatif menunjukkan hasil positif, maka ATLM melanjutkannya dengan pemeriksaan semi kuantitatif. Aglutinasi masih terlihat hingga pengenceran ke 6. Berapa titer pada kasus diatas?
- a. 800
 - b. 1600
 - c. 3200
 - d. 6400
 - e. 12800
5. Seorang pasien datang dengan rujukan pemeriksaan C-reactive protein. ATLM melakukan pemeriksaan tersebut dengan metode aglutinasi. Setelah 2 menit terbentuk gumpalan pada papan aglutinasi. Apa komponen reagensia yang digunakan dalam pemeriksaan tersebut?
- a. Kardiolipin
 - b. Anti- CRP
 - c. Anti-*S. typhi*
 - d. Partikel Karbon
 - e. Reagin

KEGIATAN 2

PEMERIKSAAN ANTI-STREPTOLYSIN O (ASO)

Streptolisin O merupakan salah satu eksotoksin hemolitik yang diproduksi oleh bakteri *Streptococcus* β - hemolitik. Streptolisin O memiliki kemampuan untuk melisis sel darah merah dari berbagai spesies (Todd, 1932). Kehadiran Streptolisin O dapat menstimulasi pembentukan antibodi ASO pada serum manusia. Pada pemeriksaan ini, serum yang digunakan merupakan hasil sentrifugasi gumpalan darah yang baru dan bersih. Sampel disimpan pada suhu 2-8°C selama 48 jam. Untuk jangka waktu yang lebih lama harus disimpan pada kondisi beku. Serum haematic, lipaemic, atau terkontaminasi harus dibuang.

Prinsip dari pemeriksaan ini adalah partikel lateks yang dilapisi Streptolisin O akan teraglutinasi ketika dicampurkan dengan sampel yang mengandung ASO. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk aglutinasi selama dua menit. Aglutinasi mengindikasikan tingkat ASO dalam sampel lebih dari atau sama dengan 200 IU/ml sedangkan tidak adanya aglutinasi mengindikasikan tingkat ASO dalam sampel kurang dari 200 IU/ml (Davidson and Henry, 1969).

Hasil *false positive* (positif palsu) dapat ditemui pada kondisi seperti *rheumatoid arthritis*, demam scarlet, tonsilitis, dan beberapa infeksi *streptococcus* (Davidson and Henry, 1969). Infeksi dini dan anak usia enam bulan hingga dua tahun akan menyebabkan positif palsu (Todd, 1932). Pemeriksaan ASO yang dilakukan hanya sekali tidak menghasilkan banyak informasi tentang keadaan penyakit yang sebenarnya. Titrasi pada interval dua mingguan selama empat atau enam minggu dianjurkan untuk mengikuti evolusi penyakit. Hasil pemeriksaan ini harus didukung dengan kondisi klinis.

I. Cara Kerja

Reagen Lateks ASO, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
- dihomogenkan hingga terlarut sempurna
- ditetaskan kontrol negatif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Streptococcus β hemolitic adalah bakteri yang berbentuk rantai bulat dan menghasilkan toksin yang disebut streptolisin O.
2. Streptolisin O adalah eksotoksin yang dapat melisiskan sel darah merah dan menginduksi pembentukan antibodi anti – Streptolisin O (ASO).
3. Spesimen yang dapat digunakan untuk pemeriksaan ini adalah serum. Spesimen yang mengalami Haematic, lipaemic, atau terkontaminasi harus dibuang
4. Keberadaan ASO dideteksi menggunakan antigen streptolisin O yang terikat pada partikel lateks.
5. Pemeriksaan semi kuantitatif dapat dilakukan dengan melakukan pengenceran spesimen.
6. Infeksi dini dan infeksi yang terjadi pada anak kecil dapat menyebabkan hasil negatif palsu. Pada kasus infeksi dini ada kemungkinan titer antibodi masih dibawah rentang deteksi kit yang digunakan. Infeksi pada anak kecil cenderung menyebabkan hasil negatif palsu karena respon imun anak kecil yang masih lambat jika dibandingkan dengan orang dewasa.
7. Hasil positif palsu dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti:
 - *Rheumatoid arthritis*
 - Demam scarlet
 - Tonsilitis
 - Beberapa infeksi *streptococcus*

LATIHAN SOAL

1. Pemeriksaan ASO dilakukan pada spesimen yang berasal dari pasien wanita yang didiagnosis dokter menderita demam rematik akibat infeksi *Streptococcus* β hemolitik. Hasil pemeriksaan ASO kualitatif positif, dan dilanjutkan semikuantitatif. Hasil pengamatan menunjukkan pada pengenceran $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ didapatkan hasil aglutinasi, dan pada pengenceran $\frac{1}{32}$ dan $\frac{1}{64}$ tidak terdapat aglutinasi. Berdasarkan informasi, Sensitivitas ASO adalah 200 IU/mL. Berapakah kadar ASO (IU/mL) dari pasien tersebut?
 - a. 800
 - b. 1600
 - c. 3200
 - d. 6400
 - e. 12800
2. Pasien datang ke laboratorium dengan permintaan pemeriksaan ASTO. Berdasarkan keterangan dokter pasien mengalami demam reumatik. Pemeriksaan dilakukan menggunakan reagen ASTO latex metode semikuantitatif. Hasil pengenceran tertinggi yang menunjukkan positif adalah 1:16. Berapa konsentrasi ASTO pada kasus tersebut?
 - a. 200 IU/mL
 - b. 400 IU/mL
 - c. 800 IU/mL
 - d. 1600 IU/mL
 - e. 3200 IU/mL
3. Seorang ATLM diminta untuk melakukan pemeriksaan ASTO pada suatu spesimen. Ternyata reagen yang biasa digunakan sudah habis sehingga ATLM tersebut harus melakukan pemeriksaan menggunakan reagen baru dengan merk yang berbeda. Apa yang harus dilakukan ATLM tersebut?
 - a. Menanyakan prosedur kerjanya pada ATLM senior
 - b. Tidak jadi melakukan pemeriksaan

- c. Membaca kit insert reagen baru terlebih dahulu
 - d. Langsung melakukan pemeriksaan
 - e. Melaporkan kejadian tersebut kepada kepada laboratorium
4. Seorang ATLM mendapatkan permintaan pemeriksaan terhadap spesimen dari anak usia 10 tahun yang diduga terinfeksi bakteri yang dapat melisiskan sel eritrosit. ATLM mereaksikan spesimen tersebut dengan reagen lateks. Setelah 2 menit tidak terbentuk gumpalan pada papan aglutinasi. Apa komponen dalam reagensia yang digunakan dalam pemeriksaan tersebut?
- a. C Reactive Protein
 - b. Eritrosit Unggas
 - c. Kardiolipin
 - d. Partikel Karbon
 - e. Streptolisin O
5. Seorang pria datang ke laboratorium dengan rujukan pemeriksaan ASTO. Spesimen disiapkan dan pemeriksaan dilakukan dengan metode aglutinasi. Setelah 2 menit terbentuk gumpalan pada papan aglutinasi. Apa hasil yang dapat dilaporkan ATLM tersebut?
- a. Positif
 - b. Positif palsu
 - c. Invalid
 - d. Negatif
 - e. Negatif palsu

KEGIATAN 3

PEMERIKSAAN ANTIGEN MPT64 dari Kultur *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama di seluruh dunia. Ada sekitar 8,7 juta kasus baru TBC dan 1,4 juta kematian per tahun (Kumar and Srinivasa, 2014). TB adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis kompleks* (MTC). Banyak negara-negara berkembang yang terkena TBC. Oleh karena itu, sebuah metode murah, cepat, dan mudah untuk mendeteksi dan membedakan MTC dengan *mycobacteria* yang lain penting untuk pengendalian TB. Metode diagnostik TB yang saat ini umum digunakan adalah deteksi bakteri tahan asam (BTA) dan pengamatan mikroskop secara langsung tetapi memiliki batas deteksi sekitar 5.000 bacilli/ml (Sutantangjai *et al.*, 2014). Selain itu ada juga metode molekuler, seperti PCR yang cepat dan spesifik untuk membedakan MTC. Tetapi metode tersebut rumit, memakan waktu, dan membutuhkan peralatan khusus dan teknisi yang sangat terlatih.

M. tuberculosis telah diketahui dapat mensekresikan 33 protein yang berbeda (Kumar and Srinivasa, 2014). Salah satu protein yang predominan adalah MPT64. MPT64 merupakan salah satu antigen utama dari bakteri *M. tuberculosis*. MPT64 merupakan protein sekretori dengan berat sebesar 24 kDa (Sutantangjai *et al.*, 2014). MPT64 telah terbukti dapat digunakan untuk membedakan *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) dari spesies bakteri lainnya (Sutantangjai *et al.*, 2014). Oleh karena itu, sekarang telah dikembangkan imunokromatografi yang dapat mendeteksi protein MPT4 pada kultur *M. tuberculosis*.

Imunokromatografi yang digunakan biasanya berbentuk kaset. Kaset mengandung bantalan sampel, bantalan konjugat emas, membran nitroselulosa, dan bantalan absorban. Terdapat dua jenis antibodi yang digunakan, yaitu antibodi monoklonal anti-MPT64 sebagai bahan penangkap dan antibodi yang dapat mengenali MPT64 pada epitop yang berbeda telah terkonjugasi dengan partikel emas (Bioline, 2007). Ketika sampel mengandung MPT64 maka MPT64 akan terikat dengan antibodi pertama yang terkonjugasi dengan partikel emas. Kemudian, kompleks antigen-antibodi tersebut akan lanjut bergerak dan akan

terikat dengan antibodi kedua yang dapat mengenali MPT64 pada epitop yang berbeda. Ketika reaksi tersebut terjadi akan menimbulkan garis berwarna pada daerah tes (T). Kompleks antigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bergerak dan akan terikat dengan antibodi anti-*mouse* sehingga menimbulkan garis berwarna pada daerah kontrol (C). Garis pada daerah C harus selalu hadir untuk menunjukkan keberhasilan tes. Hasil pemeriksaan dinyatakan positif jika terbentuk dua garis berwarna pada daerah T dan C. Hasil dinyatakan negatif jika hanya muncul satu garis berwarna pada daerah C. Hasil dinyatakan invalid jika tidak muncul garis berwarna pada daerah C.

I. Metode Kerja

Kultur Padat (Gambar 6.1 A)

- ↓ - diambil 3-4 koloni untuk diresuspensi dalam 100 µl buffer ekstraksi
- ditetaskan 100 µl hasil resuspensi ke dalam sumur sampel
- ▼ - ditunggu selama 15 menit

Interpretasi Hasil

Cairan kondensasi (Gambar 6.1 B)

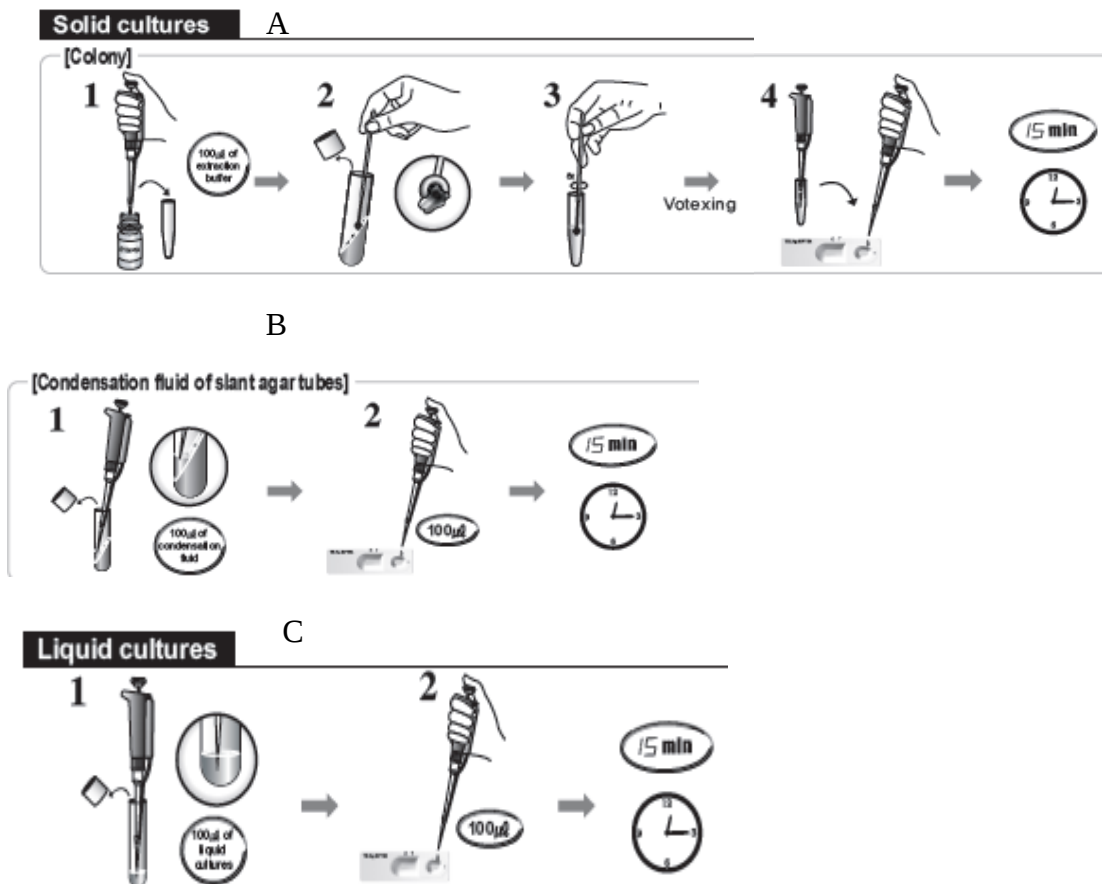
- ↓ - ditetaskan 100 µl cairan kondensasi ke dalam sumur sampel
- ▼ - ditunggu selama 15 menit

Interpretasi Hasil

Kultur Cair (Gambar 6.1 C)

- ↓ - ditetaskan 100 µl kultur cair yang diproses dari sampel sputum ke sumur sampel
- ▼ - ditunggu selama 15 menit

Interpretasi Hasil



Gambar 6.1. Cara Kerja Pemeriksaan Antigen MPT64 (Bioline, 2007)

A. Kultur Padat B. Cairan Kondensasi C. Kultur Cair

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

RANGKUMAN

1. TBC adalah penyakit dengan gejala seperti demam, batuk berkepanjangan, dan sering berkeringat pada malam hari. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *M. tuberculosis* kompleks. Bakteri ini merupakan bakteri aerob dan dapat menyebar melalui udara.
2. Pemeriksaan yang biasa dilakukan untuk mendeteksi penyakit ini adalah pewarnaan Bakteri Tahan Asam (BTA). Namun, sekarang sudah dikembangkan berbagai macam metode yang lebih akurat.
3. Infeksi MTB juga dapat diperiksa menggunakan tes tuberkulin. Tes ini dilakukan dengan cara menginjeksikan antigen MTB ke dalam kulit. Hasil pemeriksaan ditentukan dari ukuran benjolan yang terbentuk.
4. MTB juga bisa dideteksi dengan kultur mGIT. Pertumbuhan MTB dalam kultur tersebut ditandai dengan pendaran cahaya. Namun, pemeriksaan tersebut tidak spesifik karena semua jenis MTB dapat tumbuh dalam medium tersebut.
5. MPT 64 adalah protein yang hanya dihasilkan oleh MTB kompleks penyebab penyakit TBC. Kehadiran antigen ini dapat dideteksi menggunakan imunokromatografi yang didalamnya terdapat antibodi anti – MPT64 terkonjugasi koloid emas.

LATIHAN SOAL

1. Seorang wanita berusia 25 tahun, didiagnosa menderita TB oleh dokter puskesmas berdasarkan pemeriksaan sputum BTA 3 kali (sewaktu, pagi sewaktu) menunjukkan hasil yakni sewaktu (-), pagi (++) dan sewaktu (+). Bakteri *M. tuberculosis* dapat dikenali dan difagositosis oleh sel-sel? Apa pemeriksaan paling tepat yang dilakukan ATLM pada kasus diatas?
 - a. Epitel
 - b. Eosinofil
 - c. Limfosit T
 - d. Makrofag
 - e. Langerhans

2. Seorang ATLM ingin menguji keberadaan *M. tuberculosis* penyebab TBC dalam kultur mGIT menggunakan metode imunokromatografi. Apa nama antigen yang dideteksi?
 - a. HBsAg
 - b. NS1
 - c. CagA
 - d. HbeAg
 - e. MPT64

3. TBC adalah penyakit sistem pernafasan yang disebabkan infeksi *M. tuberculosis* kompleks. Penyakit ini dapat dideteksi dengan cara menginjeksikan antigen MTB ke dalam kulit. Hasil dapat dibaca setelah 48-72 jam dengan cara mengukur diameter benjolan pada kulit. Apa nama pemeriksaan MTB tersebut?
 - a. Pewarnaan BTA
 - b. Kultur Sel
 - c. PCR
 - d. Tes tuberkulin
 - e. Biopsi

4. Seorang pria dengan gejala demam, batuk berkepanjangan, dan sering berkeringat pada malam hari datang ke lab untuk melakukan suatu pemeriksaan. Apa metode yang termasuk Gold Standar untuk mendeteksi penyakit tersebut?
- a. ELISA
 - b. PCR
 - c. Pewarnaan BTA
 - d. Western Blot
 - e. Imunokromatografi
5. Seorang ATLM diminta untuk mendeteksi keberadaan antigen MPT64 dalam kultur mGIT menggunakan imunokromatografi. Setelah 15 menit terbentuk garis berwarna pada daerah tes saja. Apa hasil yang dapat dilaporkan oleh ATLM tersebut?
- a. Negatif
 - b. Invalid
 - c. Positif
 - d. Negatif Palsu
 - e. Positif Palsu

MODUL 7

PEMERIKSAAN PENYAKIT AUTOIMUN

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium bidang imunologi/immunoassay menggunakan metode aglutinasi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip reaksi aglutinasi dan imunokromatografi untuk pemeriksaan penyakit autoimun, mampu memahami kit insert pemeriksaan metode aglutinasi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan laboratorium berupa immunoassay metode aglutinasi, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami kit insert immunoassay metode aglutinasi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel
- c. Melakukan pemeriksaan penyakit autoimun metode aglutinasi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami kit insert immunoassay metode aglutinasi
- b. Melakukan identifikasi sampel
- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa

- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji aglutinasi
- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji aglutinasi dan imunokromatografi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Immunoassai penyakit Autoimun
- b. Pemeriksaan RF

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN 1

PEMERIKSAAN *RHEUMATOID FACTOR* (RF)

Rheumatoid arthritis adalah penyakit sistemik kronis dari etiologi yang tidak diketahui. Diagnosis penyakit ini didasarkan pada gabungan analisis klinis dan radiografi. *Rheumatoid factor* (RF) adalah imunoglobulin yang dapat mengenali IgG manusia pada bagian Fc (*constant region*) (Klein, 1976). Penentuan RF adalah uji laboratorium yang paling umum digunakan tidak hanya untuk diagnosis *rheumatoid arthritis* tetapi juga membantu dalam prognosis penyakit dan dalam pemantauan respon terapi.

Reagen lateks RF adalah suspensi dari partikel polistiren dan IgG manusia. Ketika reagen lateks dicampurkan dengan serum yang mengandung *rheumatoid factor* maka akan terjadi reaksi aglutinasi yang dapat terlihat jelas. Aglutinasi hanya dapat terjadi jika dalam serum terdapat RF dengan konsentrasi lebih dari 10 IU/ml (Klein, 1976). Hasil dinyatakan positif jika terbentuk aglutinasi selama 2 menit, jika tidak terbentuk maka hasil dinyatakan negatif. Pada pemeriksaan ini serum yang digunakan merupakan hasil sentrifugasi gumpalan darah yang baru dan bersih. Sampel disimpan pada suhu 2-8°C selama 48 jam. Untuk jangka waktu yang lebih lama harus disimpan pada kondisi beku. Serum haematic, lipaemic, atau terkontaminasi harus dibuang.

I. Cara Kerja

Reagen Lateks RF, Kontrol, dan Sampel

- disimpan dalam suhu ruang sebelum digunakan
 - dihomogenkan hingga terlarut sempurna
 - ditetaskan kontrol negatif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
 - ditetaskan kontrol positif sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
 - ditetaskan sampel sebanyak 1 tetes pada bagian tengah lingkaran papan aglutinasi
- ↓

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. Rheumatoid Arthritis merupakan salah satu penyakit autoimun yang menyebabkan penderitanya seringkali mengalami nyeri pada daerah persendian. Penyakit ini ditandai dengan kehadiran *Rheumatoid Factor* (RF) dalam tubuh.
2. RF adalah imunoglobulin yang dapat mengenali IgG manusia pada bagian Fc. Hal ini menyebabkan RF seringkali menjadi penyebab hasil positif palsu pada beberapa pemeriksaan.
3. Prinsip pemeriksaan RF menggunakan metode aglutinasi yaitu mendeteksi RF menggunakan IgG manusia yang terikat pada partikel lateks. Hasil positif akan ditandai dengan terbentuknya gumpalan setelah 2 menit.

LATIHAN SOAL

1. Seorang pria berusia 55 tahun datang ke laboratorium dengan rujukan pemeriksaan *Rheumatoid Factor* (RF). Spesimen diambil dan dilakukan preparasi, lalu ATLM mencampurkannya dengan reagen lateks, hingga diperoleh hasil. Apa metode deteksi antigen-antibodi yang digunakan?
 - a. ELISA
 - b. Flokulasi
 - c. Aglutinasi
 - d. Presipitasi
 - e. Fiksasi komplemen

2. Pemeriksaan *rhematoid factor* (RF) dilakukan pada pasien yang diduga menderita arthritis. Hasil pemeriksaan didapatkan positif RF sampai titer 1/16. Berapakah kadar RF tersebut?
 - a. 8 IU/mL
 - b. 16 IU/mL
 - c. 24 IU/mL
 - d. 32 IU/mL
 - e. 48 IU/mL

3. Seorang ATLM melakukan pemeriksaan *Rhematoid factor* (RF) atas permintaan dokter terhadap sampel, hasilnya positif. Sampel diencerkan untuk mengetahui titernya dan pengenceran tersebut dilakukan sebanyak 8 kali. Berapa titer pada kasus diatas
 - a. 8
 - b. 16
 - c. 32
 - d. 64
 - e. 128

4. Atas permintaan dokter, seorang ATLM melakukan pemeriksaan *Rheumatoid Factor* menggunakan metode aglutinasi. Pemeriksaan tersebut dilakukan sesuai SOP di laboratorium. Hasil pemeriksaan yang didapatkan adalah sebagai berikut:

Lingkaran	Keterangan	Hasil
1	Kontrol positif	Ada gumpalan
2	Kontrol negatif	Ada gumpalan
3	Spesimen	Ada gumpalan

Apa penyebab kasus tersebut ?

- a. Spesimen yang digunakan rusak
 - b. Reagensia terkontaminasi
 - c. Spesimen tidak mengandung RF
 - d. Reagensia telah kadaluarsa
 - e. Spesimen sudah disimpan terlalu lama
5. Seorang wanita usia 75 tahun datang dengan keluhan nyeri dibagian persendian. Spesimen disiapkan dan direaksikan dengan reagen lateks. Hasil pemeriksaan menunjukkan hasil positif. Apa nama penyakit yang dialami wanita tersebut?
- a. Antibodi non treponemal
 - b. *Rhematoid Factor*
 - c. Antibodi treponemal
 - d. Rheumatoid Arthritis
 - e. Reagin

MODUL 8

PEMERIKSAAN PENANDA TUMOR

1. Deskripsi Mata Ajaran

Mata Ajaran ini membahas materi yang mencakup pemeriksaan laboratorium bidang imunologi/immunoassay menggunakan metode aglutinasi dan imunokromatografi mulai dari konsep dasar, prinsip, reaksi, persiapan pemeriksaan, preparasi dan penyimpanan sampel, prosedur pemeriksaan, interpretasi hasil, evaluasi dan dokumentasi hasil pemeriksaan.

2. Standar Kompetensi

Mahasiswa mampu memahami konsep dan prinsip reaksi aglutinasi dan imunokromatografi untuk pemeriksaan penanda tumor, mampu memahami kit insert pemeriksaan metode imunokromatografi, serta mampu melaksanakan pemeriksaan laboratorium berupa immunoassay metode imunokromatografi, menginterpretasikan hasil, melakukan evaluasi dan dokumentasi hasil.

3. Kompetensi Dasar

Kompetensi dasar mata ajaran ini, diharapkan peserta didik dapat:

- a. Memahami kit insert immunoassay metode imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi dan preparasi sampel
- c. Melakukan pemeriksaan penanda tumor metode imunokromatografi
- d. Melakukan interpretasi, evaluasi dan dokumentasi hasil
- e. Melaksanakan prosedur keselamatan kerja di laboratorium

4. Indikator

Setelah menyelesaikan seluruh materi perkuliahan diharapkan mahasiswa memiliki kemampuan :

- a. Memahami kit insert immunoassay metode imunokromatografi
- b. Melakukan identifikasi sampel

- c. Menilai kelayakan sampel untuk diperiksa
- d. Melakukan preparasi sampel untuk uji aglutinasi dan imunokromatografi
- e. Melakukan penanganan sisa sampel
- f. Melakukan uji aglutinasi dan imunokromatografi
- g. Melakukan interpretasi dan evaluasi hasil
- h. Melakukan dokumentasi hasil
- i. Mengikuti prosedur keselamatan kerja di laboratorium

5. Materi Pokok

- a. Review Immunoassai penanda tumor
- b. Pemeriksaan FOB
- c. Pemeriksaan PSA
- d. Pemeriksaan AFP
- e. Pemeriksaan CEA

6. Metode Pembelajaran

- a. Ceramah
- b. Diskusi
- c. Presentasi
- d. Praktikum di Laboratorium

KEGIATAN 1

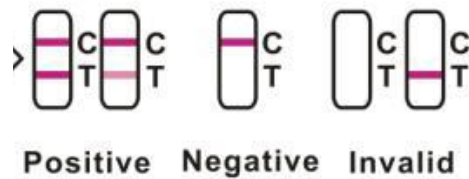
PEMERIKSAAN *FAECAL OCCULT BLOOD* (FOB)

Banyak penyakit yang dapat mengakibatkan timbulnya darah pada feses yang tidak bisa dilihat dengan mata. Hal ini dikenal sebagai *fecal occult blood* (FOB) atau darah samar manusia. Pada tahap awal masalah pencernaan seperti kanker usus, maag, polip, kolitis, dan diverticulitis mungkin tidak terlihat gejala klinis selain darah samar (Canchek, 2013). FOB bisa menjadi gejala klinis awal dari tumor ganas, kanker lambung, kanker kolon, enteron ulcer. 95% pasien kanker enteron positif tes FOB dan sekitar 50% - 80% penderita maag enteron bisa positif tes FOB. Metode benzidine dan guaiac tradisional yang biasanya digunakan untuk pengujian darah samar memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah dan juga membutuhkan pembatasan pola makan sebelum pengujian (Canchek, 2013).

Tes FOB digunakan sebagai alat skrining untuk mendeteksi pendarahan gastrointestinal yang mungkin berhubungan dengan anemia defisiensi besi, ulkus peptikum, kolitis ulserativa, polip, dan kanker kolorektal. Tes FOB direkomendasikan untuk pemeriksaan fisik rutin dan pemantauan pasien pendarahan gastrointestinal di rumah sakit. Tes FOB merupakan tes kualitatif visual sederhana yang mendeteksi hemoglobin manusia dari darah dalam feses. Tes ini menggunakan imunokromatografi dan dapat memberikan hasil dalam waktu 5 menit.

Dalam prosedur tes ini, antibodi anti-hemoglobin diimobilisasi pada daerah tes (T). Setelah sampel ditempatkan pada sumur sampel dengan volume yang tepat, sampel akan bereaksi dengan antibodi anti-hemoglobin yang terkonjugasi partikel berwarna (Biogatelabs, 2014). Campuran tersebut bermigrasi secara kromatografik sepanjang strip uji dan bereaksi dengan antibodi anti-hemoglobin pada daerah T. Selanjutnya campuran yang tidak terikat pada daerah T akan terus bermigrasi hingga mencapai daerah C. Pada daerah C terdapat antibodi poliklonal yang dapat mengikat antibodi konjugat (Biogatelabs, 2014). Jika sampel mengandung antigen hemoglobin maka garis berwarna akan muncul di daerah T untuk menunjukkan hasil yang positif (Gambar 8.1). Jika sampel tidak

mengandung antigen hemoglobin maka tidak akan muncul garis berwarna pada daerah T untuk menunjukkan hasil negatif. Garis berwarna di daerah kontrol (C) harus selalu muncul untuk menunjukkan bahwa sampel dengan volume yang tepat telah ditambahkan dan proses pemeriksaan berjalan dengan baik. Jika garis berwarna pada daerah C tidak muncul maka hasil tes dinyatakan invalid dan harus diulangi.



Gambar 8.1. Interpretasi Hasil Pemeriksaan FOB (Biogatelabs, 2014)

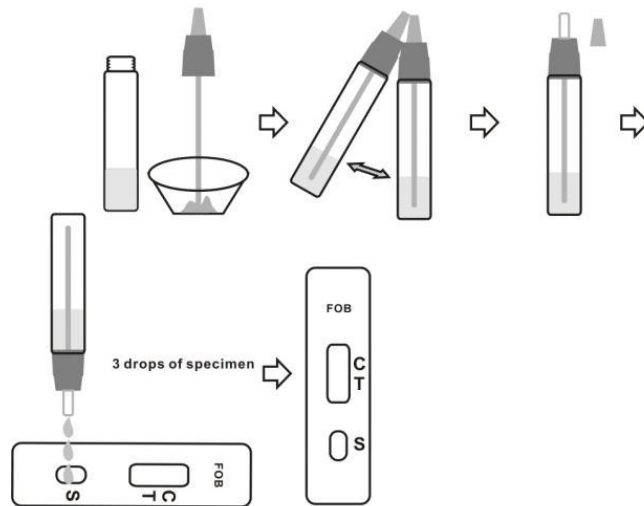
Tes ini menggunakan sampel berupa feses. Feses dikumpulkan sebanyak 1-2 ml atau 1-2 g dalam wadah yang bersih dan kering untuk mendapatkan antigen yang maksimal (jika ada). Hasil terbaik akan diperoleh jika tes dilakukan dalam waktu 6 jam setelah pengumpulan sampel. Sampel dapat disimpan selama 3 hari pada suhu 2-8°C. Untuk penyimpanan jangka panjang, sampel harus disimpan pada suhu di bawah -20°C.

I. Cara Kerja (Gambar 8.2)

- Tabung sampel
 - ↓ - dibuka tutupnya
- Sampel feses
 - ↓ - ditusuk dengan aplikator wadah sampel pada tiga lokasi berbeda untuk mengumpulkan sekitar 50 mg feses
- Tabung Sampel
 - ↓ - diputar dan dikencangkan tutupnya
 - dikocok untuk mencampur sampel dan buffer dilusi
 - ↓ - ditinggalkan selama 2 menit
- Perangkat imunokromatografi
 - ↓ - dibiarkan mencapai suhu kamar
 - ↓ - dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan

- ↓ - ditempatkan pada permukaan yang bersih
- ditetesi sampel sebanyak 3 tetes (100 µl)
- ↓ - ditunggu selama 15 menit

Interpretasi Hasil



Gambar 8.2. Cara Kerja Pemeriksaan FOB (Biogatelabs, 2014)

II. Hasil Pengamatan

III.

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

IV. Pembahasan

V. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa
-------------	--------------------------

RANGKUMAN

1. FOB atau darah samar dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti kanker usus, kanker lambung, kanker kolon, maag, polip, kolitis, dan diverticulitis.
2. Darah samar dapat diteksi menggunakan tes Guaiac dan Benzidine, namun hasil pemeriksaannya kurang sensitif dan dapat dipengaruhi aktivitas peroksidase dari hemoglobin.
3. Pemeriksaan FOB dapat dilakukan menggunakan metode imunokromatografi. Keberadaan darah samar dideteksi menggunakan antibodi anti – hemoglobin manusia yang terkonjugasi koloid emas.
4. Spesimen yang digunakan untuk pemeriksaan ini adalah feses sebanyak 1-2 gram atau 1-2 ml. Spesimen dapat disimpan pada suhu 2-8°C selama tiga hari atau pada -20°C untuk jangka waktu yang lebih lama. Hasil pemeriksaan terbaik akan didapatkan jika dilakukan pemeriksaan setelah 6 jam pengambilan spesimen.
5. Ada beberapa hal yang dapat mengganggu jalannya pemeriksaan FOB menggunakan imunokromatografi, antara lain pendarahan karena menstruasi, pendarahan karena sembelit, pendarahan saluran kencing, penggunaan alkohol, dan pengobatan seperti aspirin.

LATIHAN SOAL

1. Ketika seseorang dengan usia 52 tahun diminta dokter untuk dilakukan pemeriksaan FOB atau darah samar. Gejala apa saja di bawah ini yang merupakan indikasi dilakukannya pemeriksaan FOB, kecuali
 - a. Maag
 - b. Sembelit
 - c. Diare dengan konstipasi lebih dari tiga minggu
 - d. Feses yang dikeluarkan tidak bercampur dengan darah
 - e. Berat badan menurun secara drastis

2. Pemeriksaan FOB dilakukan untuk mengetahui adanya gejala tumor ganas atau kanker usus dimana sampel untuk pemeriksaan ini berupa feses. Syarat pengumpulan sampel untuk pemeriksaan FOB adalah
 - a. Feses 24 jam
 - b. Feses sewaktu
 - c. Feses mempunyai konsistensi agak lunak
 - d. Feses mempunyai konsistensi berbentuk
 - e. Terdapat sedikit lendir pada feses

3. Di laboratorium, ATLM melakukan pemeriksaan FOB metode imunokromatografi menunjukkan hasil yang positif. Hal ini ditandai dengan
 - a. Garis berwarna hanya di daerah control
 - b. Garis berwarna hanya di daerah test
 - c. Garis berwarna di daerah control dan test
 - d. Tidak tampak garis berwarna di daerah control dan test
 - e. Tidak tampak garis berwarna di daerah test hanya garis berwarna di daerah control

4. Sampel feses untuk pemeriksaan FOB jika akan disimpan selama 1 bulan dan tetap ingin memperoleh hasil yang baik harus disimpan pada suhu
 - a. 2-8 °C
 - b. > 2-8°C

- c. -20°C
- d. $> 20^{\circ}\text{C}$
- e. 25°C

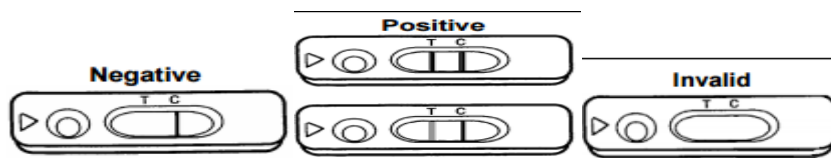
5. Hasil pemeriksaan FOB secara rapid test yang dilakukan ATLM mendapatkan hasil tidak ada garis berwarna di daerah control. Hal ini dikarenakan oleh
- a. Sampel memiliki hasil negatif
 - b. Sampel yang ditambahkan tidak pada volume yang tepat
 - c. Proses pemeriksaan tidak perlu diulang
 - d. Proses pemeriksaan sudah sesuai prosedur
 - e. Hasil bisa dilaporkan untuk diberikan kepada pasien

KEGIATAN 2

PEMERIKSAAN *PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN* (PSA)

PSA adalah glikoprotein yang diproduksi secara eksklusif oleh komponen epitel dari kelenjar prostat. PSA memiliki massa molekul 33 kDa dan merupakan glikoprotein rantai tunggal dengan 237 residu asam amino (Bioline, 2007). PSA disintesis dalam sel epitel sepanjang asinus dan di epitel duktus dari kelenjar prostat. Fungsinya adalah untuk membawa air mani koagulum yang berperan penting dalam kesuburan pria. Kekhususan jaringan PSA membuatnya paling berguna sebagai tumor marker yang tersedia untuk diagnosis dan pengobatan kanker prostat. Selain itu, protein ini sekarang digunakan oleh kedokteran forensik sebagai penanda pilihan untuk mendeteksi serangan seksual. Konsentrasi PSA normal adalah 1-2.6 ng/ml (Bioline, 2007).

Pemeriksaan PSA bisa menggunakan imunokromatografi. Pada imunokromatografi biasanya digunakan tiga jenis antibodi, yaitu antibodi monoklonal anti-PSA yang terkonjugasi pewarna, antibodi monoklonal anti-PSA, dan antibodi poliklonal anti-*mouse* (Bluestar, 2015). Ketika sampel mulai menyerap pada alat imunokromatografi, sampel akan berikatan dengan antibodi monoklonal anti-PSA terkonjugasi pewarna. Kemudian kompleks antigen-antibodi tersebut akan bergerak menuju daerah tes (T) dan berikatan dengan antibodi monoklonal anti-PSA. Reaksi tersebut menyebabkan terbentuknya garis berwarna pada daerah T. Kompleks anigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bergerak menuju daerah kontrol (C) dan berikatan dengan antibodi poliklonal anti-*mouse*. Reaksi tersebut menyebabkan terbentuknya garis berwarna pada daerah C. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk dua garis pada daerah T dan C (Gambar 21). Hasil dinyatakan negatif jika terbentuk satu garis pada daerah C. Garis berwarna pada daerah C harus selalu muncul sebagai kontrol prosedur. Hasil PSA akan positif jika konsentrasi PSA diatas 4 ng/ml (Bluestar, 2015).



Gambar 21. Interpretasi Hasil Pemeriksaan PSA (Bluestar, 2015)

II. Cara Kerja

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- ditetesi sampel 100 µl
- ditunggu selama 20 menit. Jangan interpretasi hasil setelah 30 menit

Interpretasi Hasil

III. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

IV. Pembahasan

V. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. PSA adalah glikoprotein yang diproduksi oleh epitel kelenjar prostat dan berperan penting bagi kesuburan pria.
2. PSA dijadikan penanda tumor atau kanker prostat karena semakin banyak sel epitel kelenjar prostat maka PSA yang diproduksi juga semakin meningkat. Konsentrasi PSA normal adalah 1-2.6 ng/ml.
3. Jenis spesimen yang bisa digunakan adalah serum, plasma, atau whole blood yang tidak boleh mengalami hemolisis, lipemik, menggumpal, atau terkontaminasi.
4. Keberadaan PSA dapat dideteksi menggunakan antibodi anti – PSA yang terkonjugasi koloid emas.
5. Jika konsentrasi PSA diatas 4 ng/ml maka akan terbentuk garis berwarna pada daerah tes dan kontrol.

LATIHAN SOAL

1. Seorang laki-laki berusia 45 tahun ingin melakukan pemeriksaan PSA (Prostate Specific Antigen) di laboratorium klinik. Jenis spesimen apa yang diberikan untuk pemeriksaan PSA metode imunokromatografi ini?
 - a. Urin
 - b. Serum
 - c. Cairan Sperma
 - d. Cairan pleura
 - e. Cairan Perikardium

2. Seorang laki-laki berusia 56 tahun konsultasi dengan dokter urologi di Rumah sakit mengenai hasil pemeriksaan PSA yang menunjukkan hasil terdapat kenaikan kadar PSA. Pada keadaan apa suatu peningkatan kadar PSA dapat menggambarkan diagnosis pasti kanker prostat?
 - a. Hipertropi prostat jinak
 - b. Prostatitis
 - c. *Benign Prostatic Hyperplasia*
 - d. Peradangan Kelenjar Prostat
 - e. Adanya adenokarsinoma pada biopsi prostat

3. Jika pada hasil pemeriksaan PSA metode imunokromatografi terdapat garis berwarna pada daerah control dan test kemungkinan menandakan kadar PSA sebanyak
 - a. > 1 ng/ml
 - b. > 2 ng/ml
 - c. > 3 ng/ml
 - d. > 4 ng/ml
 - e. > 5 ng/ml

4. Seorang ATLM membaca kit insert dahulu sebelum melakukan pemeriksaan PSA metode imunokromatografi. Jenis Antibodi apa saja yang digunakan dalam pemeriksaan PSA metode imunokromatografi ini ?

- a. Antibodi monoklonal anti-PSA yang terkonjugasi pewarna, antibodi monoklonal anti-PSA, dan antibodi poliklonal anti-*mouse*
 - b. Antibodi monoklonal anti-PSA yang terkonjugasi pewarna, antibodi monoklonal anti-PSA, dan antibodi monoklonal anti-*mouse*
 - c. Antibodi monoklonal anti-PSA yang terkonjugasi pewarna, antibodi poliklonal anti-PSA, dan antibodi poliklonal anti-*mouse*
 - d. Antibodi monoklonal anti-PSA yang terkonjugasi enzim, antibodi monoklonal anti-PSA, dan antibodi poliklonal anti-*mouse*
 - e. Antibodi monoklonal anti-PSA yang terkonjugasi substrat, antibodi monoklonal anti-PSA, dan antibodi poliklonal anti-*mouse*
5. Pada pemeriksaan PSA metode imunokromatografi ini terdapat hasil positif yang ditandai dengan adanya garis berwarna pada daerah T dan C. Reaksi apa yang terbentuk
- a. Kompleks Antigen – antibodi terikat menuju daerah C dan tidak berikatan dengan antibodi poliklonal anti-*mouse*
 - b. Kompleks Antigen antibodi terikat menuju daerah C dan tidak berikatan dengan antibodi monoklonal anti PSA
 - c. Kompleks anigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bergerak menuju daerah kontrol (C) dan berikatan dengan antibodi poliklonal anti-*mouse*.
 - d. Kompleks anigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bergerak menuju daerah kontrol (T) dan berikatan dengan antibodi poliklonal anti-*mouse*.
 - e. Kompleks anigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bergerak menuju daerah kontrol (C) dan berikatan dengan antibodi monoklonal anti PSA yang terkonjugasi enzim

KEGIATAN 3

PEMERIKSAAN *ALPHA-FETOPROTEIN* (AFP)

Alpha-fetoprotein pertama kali ditemukan dalam sera janin manusia dengan berat molekul antara 67.000 - 74.000 dalton (Cortez, 2015). Adanya variasi berat molekul karena metode analisis dan derajat glikosilasi protein yang berbeda. AFP adalah protein rantai tunggal yang menunjukkan kedekatan urutan homologi dengan albumin serum (Cortez, 2015). AFP berperan dalam mengangkut asam lemak tak jenuh untuk mengembangkan sel-sel ganas. AFP juga dapat berfungsi sebagai imunoregulator yang bertindak melalui sel T. Sintesis dari AFP di kantung kuning telur manusia berhenti antara minggu kesepuluh dan kedua belas kehamilan. Bagian utama dari protein ini kemudian diproduksi oleh hepatosit janin. AFP mencapai puncaknya pada sekitar 13 minggu kehamilan dan akan menurun secara bertahap (Biosign, 2002). Tingginya kadar AFP serum dapat terkait dengan beberapa penyakit ganas.

AFP pertama kali dijelaskan sebagai protein tumor terkait manusia pada tahun 1964 oleh Tatarinov (Biosign, 2002). Sejak saat itu telah dibuktikan bahwa peningkatan AFP serum di atas nilai normal terjadi pada beberapa penyakit ganas terutama *nonseminomatous testicular cancer primary hepatocellular carcinoma*. Dalam kasus kanker testis nonseminomatous, hubungan langsung antara peningkatan kadar AFP dengan tahap penyakit telah berhasil diamati. Tingginya kadar AFP juga telah diamati pada pasien yang didiagnosis memiliki seminoma dengan unsur-unsur non seminomatous namun belum diamati pada pasien dengan seminoma murni. Lebih dari 70% pasien dengan hepatocellular karsinoma primer telah dilaporkan memiliki peningkatan kadar AFP (Biosign, 2002). Peningkatan kadar AFP kadang-kadang ditemukan dalam kasus kanker saluran cerna dengan dan tanpa metastasis hati. Batas atas untuk sera normal adalah sekitar 9 ng/ml, sedangkan kadar 175 ng/ml sangat dicurigai terkena karsinoma hepatoseluler (Cortez, 2015).

Pemeriksaan AFP yang mudah dilakukan adalah dengan imunokromatografi. Sampel berupa serum akan meresap pada bantalan sampel. Jika di dalam sampel terdapat AFP maka AFP akan berikatan dengan antibodi

monoklonal anti-AFP yang terkonjugasi dengan pewarna. Kompleks antigen-antibodi tersebut kemudian akan bermigrasi hingga ke daerah tes (T) (Cortez, 2015). Pada daerah tersebut akan terjadi reaksi antara kompleks imun dengan antibodi anti-AFP sehingga membentuk garis berwarna. Kompleks antigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bermigrasi ke daerah kontrol (C). Pada daerah tersebut kompleks antigen-antibodi akan bereaksi dengan antibodi poliklonal sehingga membentuk garis berwarna. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk dua garis berwarna pada daerah T dan C. Hasil dinyatakan negatif jika hanya terbentuk satu garis berwarna pada daerah C. Garis pada daerah C harus selalu muncul sebagai kontrol prosedur, jika tidak maka pemeriksaan harus diulang.

I. Cara Kerja

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung aluminium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- ditetesi sampel sebanyak 4 tetes
- ditunggu selama 10 menit

↓
Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

IV. Kesimpulan

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. AFP berperan dalam mengangkut asam lemak tak jenuh, imunoregulator yang bertindak melalui sel T, dan Penanda hepatocellular karsinoma, kanker saluran cerna. AFP mencapai puncaknya pada sekitar 13 minggu kehamilan dan akan menurun secara bertahap.
2. Batas atas normal kadar AFP adalah ± 9 ng/ml. Jika kadarnya mencapai 175 ng/ml, maka kemungkinan besar orang tersebut mengalami hepatocellular karsinoma.
3. Kehadiran AFP dalam tubuh dapat dideteksi menggunakan metode imunokromatografi yang didalamnya terdapat antibodi anti – AFP yang terkonjugasi koloid emas. Cara kerja dan interpretasi hasil pemeriksaan ini sama dengan berbagai pemeriksaan lain yang menggunakan metode imunokromatografi.

LATIHAN SOAL

1. Di sebuah laboratorium klinik terdapat beberapa pemeriksaan untuk penanda tumor sebagai skrining penyakit preklinik, memantau ada atau tidaknya tumor. Yang mana dari penanda tumor berikut yang akan meningkat pada penyakit hati jinak ?
 - a. AFP
 - b. CEA
 - c. CA 15-3
 - d. CA 19-9
 - e. Semua benar

2. Alpha Fetoprotein merupakan suatu plasma protein yang dihasilkan dalam yolk sac, hati dan traktus gastrointestinalis. Baik AFP dan hCG menunjukkan peningkatan serum pada saat keadaan
 - a. Kehamilan
 - b. Karsinoma sel kuman ovarium.
 - c. Kanker testis nonseminomatous.
 - d. Semua benar
 - e. Semua salah

3. Seorang ibu hamil dengan usia kehamilan 20 minggu melakukan pemeriksaan Alpha Fetoprotein di Rumah sakit atas saran dokter obgyn. Manfaat dari pemeriksaan AFP ini untuk ibu hamil tersebut
 - a. Untuk membantu memperkirakan adanya kelainan genetik pada janin
 - b. Untuk membantu memperkirakan adanya kelainan sindrom turner pada janin
 - c. Untuk skrining adanya kelainan perkembangan janin selama kehamilan
 - d. Untuk mendeteksi adanya kelainan atau penyakit pada hati selama kehamilan
 - e. Semua benar

4. Pemeriksaan AFP metode imunokromatografi di periksa oleh ATLM di laboratorium. Hasil pemeriksaan menunjukkan dua garis berwarna . Hal ini menandakan
 - a. Kemungkinan kadar AFP pada pasien 9 ng/ml
 - b. Kemungkinan kadar AFP pada pasien > 175 ng/ml
 - c. Kemungkinan kadar AFP pada pasien < 175 ng/ml
 - d. Pasien dicurigai terkena gestational diabetes
 - e. Pasien dicurigai terkena konstipasi

5. Seorang ATLM mengambil sampel pasien penyakit kanker testis berupa serum untuk dilakukan pemeriksaan AFP. Umumnya pemeriksaan AFP perlu dilengkapi dengan pemeriksaan apa saja
 - a. Pemeriksaan Hormon estriol dan pemeriksaan HCG
 - b. Pemeriksaan Hormon endorfin dan pemeriksaan USG
 - c. Pemeriksaan Hormon insulin dan pemeriksaan HCG
 - d. Pemeriksaan Hormon tiroid dan pemeriksaan USG
 - e. Pemeriksaan Hormon tiroksin dan Hormon kortisol

KEGIATAN 4

PEMERIKSAAN *CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN* (CEA)

Carcinoembryonic antigen (CEA) pertama kali dideskripsikan pada tahun 1965 oleh Gold dan Freeman (Cancheck, 2003). CEA adalah antigen terkait tumor yang dikarakterisasi sebagai glikoprotein onkofetal yang memiliki berat molekul sekitar 200 kDa dengan mobilitas beta elektroforesis. CEA merupakan rantai protein tunggal yang terdiri dari sekitar 800 asam amino dan mengandung 45-55 % karbohidrat (Cortez, 2013). CEA pertama kali hadir sebagai antigen spesifik untuk adenokarsinoma kolon. Beberapa penelitian terbaru telah menunjukkan keberadaan CEA dalam berbagai keganasan, terutama yang melibatkan jaringan ektodermal dari gastrointestinal atau *pulmonary origin*. Pengujian CEA dapat memiliki nilai yang signifikan dalam pemantauan pasien. Peningkatan nilai CEA mungkin berhubungan dengan penyakit ganas yang progresif dan respon terapi yang buruk. Penurunan nilai CEA umumnya menunjukkan prognosis yang menguntungkan dan respon yang baik terhadap pengobatan (Cancheck, 2003). Kadar normal CEA adalah 0-2.5 µg/l. Kadar normal CEA untuk perokok adalah 0-5 µg/l (Cortez, 2013).

Pengembangan *radioimmunoassay* (RIA) pada tahun 1969 oleh Thompson *et al* memungkinkan untuk mendeteksi konsentrasi CEA yang sangat rendah dalam sirkulasi darah, cairan tubuh lainnya, dan jaringan normal ataupun sakit. Dua tahun kemudian, Hansen *et al* mengembangkan RIA modifikasi untuk CEA (Cortez, 2013). Baru-baru ini telah dikembangkan imunokromatografi yang sensitif dan lebih sederhana untuk mendeteksi CEA. Pada imunokromatografi, CEA yang terkandung dalam sampel akan berikatan dengan antibodi monoklonal anti-CEA yang terkonjugasi pewarna. Reaksi tersebut terjadi pada bantalan konjugat. Kompleks antigen-antibodi tersebut akan bermigrasi ke daerah test (T). Pada daerah tersebut akan terjadi reaksi antara kompleks antigen-antibodi dengan antibodi anti-CEA dan membentuk garis berwarna. Kompleks antigen-antibodi yang tidak terikat akan terus bermigrasi hingga daerah kontrol (C). Pada daerah tersebut akan terjadi reaksi antara kompleks antigen-antibodi dengan antibodi poliklonal dan membentuk garis berwarna. Hasil dinyatakan positif jika terbentuk

garis berwarna pada daerah T dan C. Hasil dinyatakan negatif jika terbentuk garis berwarna pada daerah C saja.

I. Cara Kerja

Perangkat imunokromatografi

- dibiarkan mencapai suhu kamar
- dikeluarkan dari kantung alumunium dan segera digunakan
- ditempatkan pada permukaan yang bersih
- ditetesi sampel sebanyak 4 tetes (100 µl)
- ditunggu selama 10-15 menit

↓
Interpretasi Hasil

II. Hasil Pengamatan

Nama Pasien :

Nomor Lab :

Usia Pasien :

Jam Pengambilan :

Gambar	Keterangan

III. Pembahasan

--

--

IV. Kesimpulan

--

Paraf Dosen	Nama dan Paraf Mahasiswa

RANGKUMAN

1. CEA adalah antigen terkait tumor kolon. CEA dapat dijadikan penanda berbagai tipe kanker, seperti kolon, payudara, hati, paru-paru, ovarium, pankreas, dan prostat.
2. Kadar normal CEA adalah 0-2.5 µg/l, namun pada perokok, kadar normalnya adalah 0-5 µg/l.
3. Prinsip pemeriksaan CEA dengan imunokromatografi yaitu mendeteksi antigen CEA menggunakan antibodi anti – CEA yang berlabel koloid emas.

LATIHAN SOAL

1. Seorang perokok melakukan pemeriksaan CEA dimana hasil pemeriksaannya menunjukkan kadar $> 5 \mu\text{g/l}$. Kondisi apa yang menyebabkan perokok tersebut positif CEA
 - a. Adanya respon terapi dan pengobatan yang baik
 - b. Adanya prognosis yang menguntungkan
 - c. Adanya progresif pada penyakit keganasan
 - d. Tidak adanya respon penyakit metastasis
 - e. Tidak adanya respon terapi yang buruk
2. Pemeriksaan CEA dilakukan di laboratorium untuk mengukur konsentrasi carcinoembryonic antigen dalam darah dan menjadi salah satu pemeriksaan penanda tumor. Kegunaan dari pemeriksaan penanda tumor adalah
 - a. Sebagai deteksi dini untuk kanker primer
 - b. Menentukan tingkat keganasan (tumor staging) sebelum dilakukan terapi
 - c. Deteksi adanya kekambuhan & metastase
 - d. Evaluasi dan pemantauan respon terhadap terapi
 - e. Semua benar
3. Seorang ATLM ketika melakukan pemeriksaan CEA didapatkan hasil pemeriksaan yang invalid dimana hanya ada satu garis berwarna di daerah T. Kemungkinan faktor apa yang bisa menyebabkan kesalahan dari ATLM tersebut pada tahap analitik
 - a. Pasien yang diambil darah tidak diperhatikan dulu kondisinya
 - b. Masa waktu antara sampling dengan pemisahan serum
 - c. Reagen yang akan digunakan apakah masih dalam kondisi bagus / baik
 - d. Ketika diteteskan sampel pada cassette terjadi gelembung udara
 - e. Kesalahan membaca hasil pemeriksaan
4. Seorang ATLM menerima sampel serum dari pasien pada penyakit kanker usus besar dengan ciri serum hemolisis dan lipemik untuk dilakukan pemeriksaan CEA. Apa yang selanjutnya dilakukan oleh ATLM tersebut

- a. Mempersiapkan Reagen untuk pemeriksaan CEA
 - b. Mengembalikan sampel ke tempat sampling kembali untuk di ambil ulang
 - c. Memasukan sampel ke kulkas untuk disimpan
 - d. Mempersiapkan alat untuk pemeriksaan CEA
 - e. Mulai membaca petunjuk pemeriksaan CEA di kit insert
5. Adanya kegiatan bakti sosial selama tiga hari di sebuah laboratorium klinik mengenai kegiatan pemeriksaan penanda tumor. Sebaiknya ATLM di laboratorium klinik tersebut menyimpan sampel serum para pasien di suhu
- a. 2 - 8 ⁰C
 - b. – 20 ⁰C
 - c. 25 ⁰C
 - d. 27 ⁰C
 - e. 25-27 ⁰C

DAFTAR PUSTAKA

- Abdalla, B. E and Abdealla, A. M. 2015. Hormonal Immunoassays; comparison using ECL & ELFA. *The Professional Medical Journal* 22(5): 648-655.
- Adeyemi, A. A., Omolade, O. A., Raheem-Ademola, R. R. 2013. Immunochromatographic Testing Method for Hepatitis B, C in Blood Donors. *J Antivir Antiretrovir S3*.
- Artron. 2010. *Human Chorionic Gonadotropin Serum/Urine (HCG S/U) Combo Test Kit*. Canada.
- Banks, P. 2009. *The Microplate Market Past, Present and Future*. Diakses Melalui <http://www.ddw-online.com/enabling-technologies/p92824-the-microplate-market-pastpresent-and-futurespring-09.html> pada 23 Agustus 2016 pukul 10.19
- Batzer, F. R. 1980. *Fertility and Sterility* 34:1.
- Biogatelabs. 2014. *One Step Fecal Occult Blood Rapid Test*. Canada.
- Bioline. 2007. *One Step PSA Test*. Korea.
- Bioline. 2007. *One Step Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex by RAPID Test*. Korea.
- Biomerieux. 2012. *VIDAS Constantly Evolving with You*: France. p 1-9.
- Biosign. 2002. *Immunoassay for the Qualitative Detection of Alpha-fetoprotein (AFP) in Human Serum*. USA.
- Blaser, M.J. 1996. The bacteria behind ulcers. *Sci Amer* 274: 104-107.
- Bluestar. 2015. *Immunochromatographic test for prostate specific antigen detection for use in forensic medicine*. Monaco.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Saunders, W. B. 1999. *Tietz text book of clinical chemistry*. 3rd Ed.
- Cancheck. 2013. *Rapid test for detection of Carcino Embryonic Antigen in human serum/plasma/whole blood*. India.
- Cancheck. 2013. *Rapid test for detection of Faecal Occult Blood in human faeces*. India.
- Catt, K. J., Dufan M. L., Vaitukaitis, J. L. 1975. *J. Clin. Endocrinal Metab.* 40: 537.

- Chen, W., J. W., Chen, W., Jie, X., Xian, J. H. 2012. Chemiluminescent Immunoassay and Its Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40(1): 3-10.
- Cloud-Clone corp. 2013. *Chemiluminescent Immunoassay kits, with features of higher sensitivity, wider dynamic range and lower sample consumption*. Diakses melalui <http://www.cloud-clone.com/topic/201305291459200003.html> pada 3 Agustus 2016 pukul 10.08
- Cobas. 2010. *The immunoassay analyzer cobas e 411 2nd generation platform of ECL technology*: Germany. p 1-12.
- Cobas, 2013. *Electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA) for the in vitro quantitative determination of human calcitonin (hCT) in serum and plasma*. Switzerland. p 1-2.
- Cobas. 2014. *Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) for the in vitro quantitative determination of estradiol in human serum and plasma*. Switzerland. p 1-2.
- Core. 2005. *One Step Immunochromatographic test for HCV antibodies*. United Kingdom.
- Cortez. 2013. *OneStep CEA RapiCard™ InstaTest Serum/ Plasma*. Netherlands.
- Cortez. 2015. *OneStep AFP RapiCard™ InstaTest*. Netherlands.
- Cypress. 2008. *Syphilis Quick Test*. Belgium.
- Cypress. 2010. *Immunochromatographic assay for the detection of hepatitis C antibodies in serum or plasma*. Belgium.
- Das. 2016. *Plate Reader*. Diakses melalui <http://www.dasitaly.com/en/prodotti/Plate%20Reader> pada 23 Agustus 2016 pukul 10.18.
- Darwish, I. A. 2006. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science* 2 (3): 217-235.
- Davidson, I., and Henry, J.B. 1969. *Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 14th. Ed. W.B.Saunders Co: Phila.
- Diaspot. 2002. *One Step Ultra Hepatitis B Surface Antigen Test Strip Kit*.
- eBioscience. 2010. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. p 3-8.

- El-Moamly, A. A. 2014. Immunochromatographic Techniques: Benefits for the Diagnosis of Parasitic Infections. *Austin Chromatogr* 1 (4): 1-8.
- Engvall, E and Perlmann, P. 1971. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(8): 71-875.
- Held, P. 2006. *Histaminanalyse in Weinproben unter Verwendung des Mikroplattenformats*. Diakses melalui <http://www.biotek.de/de/resources/articles/histamine-microplate-format.html> pada 23 Agustus 2016 pukul 10.15.
- Humapreg. 2004. *Immunochromatography 1-Step Test Pregnancy Test Device for the Detection of Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) in Human Urine or Serum*. Germany.
- Halstead, S. B. 1984. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world: XI. *Dengue. Rev. Infect. Dis* 6: 251-264.
- Halstead, S. B. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481.
- IDL Biotech. 2008. *Rapid Typhoid Detection*. Sweden.
- Kementrian Kesehatan. 2013. *Pedoman Nasional Tes dan Konseling HIV dan AIDS*. Diakses dari http://pppl.depkes.go.id/_asset/_download/Pedoman%20KT%20HIV%20kawanua%20des%202013%20-%20rev%20290114%201-5.pdf tanggal 19 Agustus 2016 pukul 14.14.
- Klein, G. C. 1976. *Manual of Clinical Immunology* : 264-273.
- Kocoglu, M. E., Tas, T., Mengeloglu, F. Z., Ozsoy, S., Bucak, O. 2014. Evalutaion of 4 methods for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection using an immunofluorescence assay as the reference method. *Turkish Journal of Medical Sciences* 44: 914-919
- Koivunen, M. E and Krogsrud, R. L. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab Medicine* 37 (8): 490-497.
- Kramvis, A., Kew, M., Francois, G. 2005. Hepatitis B Virus Genotypes. *Vaccine Reviews* 23: 2409 – 2423.
- Kumar, A. J. U. and Srinivasa1, H. 2015. Fast and accurate identification of *M. tuberculosis* complex using an immunochromatographic MPT64 antigen detection test. *Journal of Tuberculosis Research* 3: 149-156.
- Lam, S. K. 1995. Dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Micro.* 6: 39-48.

- Larsen, S. *et al.* 1990. *A manual of Test for Syphilis American Public Health Association* : 1-192.
- Larsen S.A., Hambie E.A. 1981. Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. *J. Clin. Microbiol* 14 : 441 – 445.
- Lars-Olof Hanson. 1997. *Current Opinion in Infectious diseases* 10: 196- 201.
- Lunsdorf, H., Gurramkonda, C., Adnan, A., Khanna, N., Rinas, U. 2011. Virus-like Particle Production with Yeast: Ultrastructural and Immunocytochemical Insights into *Pichia pastoris* Producing High Level of the Hepatitis B Surface Antigen. *Microbial Cell Factories* 10:48.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. 2009. *Biology of Microorganisms, 13th ed.* San Francisco: Benjamin Cummings.
- Mori, M., Katada, J., Chiku, H., Nakamura, K., Oyamada, T. 2012. Development of highly sensitive immunochromatographic detection seasonal influenza virus silver amplification. *Fujifilm Research and Development* 57: 5-10.
- Murphy, K. P. 2012. *Janeway's Immunobiology*. Ed 8. Garland Science, Taylor & Francis Group: New York.
- Nankervis, S., Meredith, G., Vamplew, P., & Fotinatos, N. (2012). Taming The Devil: A Game-based Approach to Teaching Immunology. *Proceedings Ascilite Wellington: Future Challenges, Sustainable Futures*. Wellington, 25-28 November 2012.
- Novateinbio. 2015. *Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)*. Diakses melalui www.NovaTeinBio.com pada 3 Agustus 2016 pukul 9.57
- Numazaki, K., Chiba, S., Moromoshi, T., Kudoh, T., Yamanaka, T., Nakao, T. 1985. Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and enzyme linked fluorescence immunoassay for detection of antibodies against *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Pathol* 38: 345-350
- Olopoenia, L. A. and King, A. L. 2000. Widal agglutination test – 100 years later: still plagued by controversy. *Postgrad Med J* 76: 80-84.
- Oncoprobe. 2005. *HIV 1&2 Antibody Rapid Test 4th Generation kit*.
- Oxoid. 2014. *Oxoid TPHA Test*. UK.
- Pestka Biomedical Laboratories. 2015. *Introduction To ELISA*. Diakses melalui

<https://www.pblsaysci.com/content/introduction-elisa> pada 23 Agustus 2016 pukul 10.13

- Rahman, M. *et al.* 2007. Rapid detection of early typhoid fever in endemic community children by the TUBEX O9-antibody test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 58: 275-281.
- Rathlev, T. 1965. *Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic Treponema pallidum* 77 : 65.
- Rathlev, T. 1967. Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. *Br J Vener Dis* 43 : 181-185.
- Reddy, P. R. 2013. *Antigen – Antibody reactions*. Diakses melalui <http://www.slideshare.net/raghunathp/ag-ab-reactions-raghu> pada 23 Agustus 2016 pukul 10.41.
- Ridge, S. E. and Vizard, A. L. 1993. Determination of the Optimal Cutoff Value for a Serological Assay: an Example Using the John's Absorbed EIA. *Journal of Clinical Microbiology* 31(5): 1256-1261.
- Schimid, G. P. 1994. *Current Opinion in Infectious Diseases* 7: 34-40.
- Selamoglu, H. 2009. High Level Expression of Hepatitis B Surface Antigen in *Pichia pastoris*, It's Purification and Immunological Characterization. *Thesis*, Biotechnology, School of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University.
- Stiba, K. 2015. *Reliably recognizing dengue at any time*. Diakses dari <http://www.euroimmunblog.com/recognizing-dengue/> tanggal 31 Agustus 2016 Pukul 13.37
- Sutantangjai, M., Faskri, K., Chaicumpar, K., Chaimanee, P., Lulitanond, V., Namwat, W. 2014. Evaluation of an immunochromatographic test kit for detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum samples and on solid and in liquid cultures. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 45(2): 357-364.
- Tam, F. C. H *et al.* 2003. The TUBEX typhoid test based on particle-inhibition immunoassay detects IgM but not IgG anti-O9 antibodies. *J Imm Meth* 282: 83-91.
- Thermo Scientific. 2010. *ELISA technical guide and protocols*: USA. p 1-4.
- Thompson, M. 2010. Immunoanalysis – Part 2: Basic Principle of ELISA. *Amc technical briefs* 45: 1-2.
- Todd, E.W. 1931. *J. Exp. Med.* 55:267.

- Vaishnavi, C. 1996. *Immunology and Infectious Diseases* 6: 139 – 144.
- Vista. 2014. *Syphilis Immunochromatographic Assay Rapid Diagnostic Test for Detecting Syphilis Infection*. Kirkland.
- Wantai. 2005. *Anti-HBs (Quantitative) Antibody to Hepatitis B Virus Surface Antigen ELISA*. China.
- Wantai. 2014. *Human Immunodeficiency Virus (HIV) 1+2 Antibody ELISA Kit*. China.
- Williams, M.P. and Pounder, R.E. 1999. *Helicobacter pylori*: from the benign to the malignant. *Am J Gastroenterol* 94 : 11-16.
- WHO. 2013. Hepatitis B. WHO. Geneva.
- Yamada K., *et al.* 2003. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(4): 725-728.
- Yamamoto, S. 1993. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 36: 257 – 264.
- Zhang, Q. Y., Chen, H., Lin, Z., Lin, J. M. 2012. Comparison of Chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic microparticles with traditional colorimetric ELISA for detection of serum a-fetoprotein. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2(2): 130-135.

KUNCI JAWABAN

MODUL 1

Prinsip Dasar Immunologi

1. A
2. D
3. C
4. B
5. B

Metode Pemeriksaan Immunoserologi

1. E
2. A
3. B
4. A
5. C

MODUL 2

Pemeriksaan HCG Metode

Aglutinasi

1. C
2. B
3. C
4. C
5. B

Pemeriksaan HCG Metode

Imunokromatografi

1. E
2. E
3. B
4. B
5. A

MODUL 3

Pemeriksaan Widal

1. B
2. C
3. C
4. B
5. E

Pemeriksaan *Immuno Magnetic Beads Inhibition*

1. D
2. A
3. E
4. E
5. A

MODUL 4

Pemeriksaan Antigen NS1 dari Virus Dengue

1. C
2. B
3. D
4. D
5. E

Pemeriksaan Antibodi IgG/IgM Dengue

1. D
2. E
3. A
4. A
5. C

Pemeriksaan Malaria

1. D
2. E
3. E
4. C
5. B

MODUL 5

Pemeriksaan RPR

1. E
2. C
3. B
4. D
5. D

Pemeriksaan Anti – TP

1. A
2. E
3. B
4. E
5. A

Pemeriksaan Anti – HBs

1. C
2. B
3. A
4. A
5. E

Pemeriksaan HIV

1. D
2. E
3. D
4. A
5. C

Pemeriksaan TPHA

1. B
2. D
3. E
4. D
5. D

Pemeriksaan HBV

1. B
2. C
3. A
4. E
5. D

Pemeriksaan HCV

1. B
2. D
3. C
4. C
5. E

MODUL 6

Pemeriksaan CRP

1. E
2. D
3. A
4. E
5. B

Pemeriksaan ASO

1. C
2. D
3. C
4. E
5. A

Pemeriksaan MPT 64

1. D
2. E
3. D
4. C
5. B

MODUL 7

Pemeriksaan RF

1. C
2. B
3. E
4. B
5. D

MODUL 8

Pemeriksaan FOB

1. D
2. B
3. C
4. C
5. B

Pemeriksaan PSA

1. B
2. E
3. D
4. A
5. C

Pemeriksaan AFP

1. E
2. D
3. E
4. B
5. A

Pemeriksaan CEA

1. C
2. E
3. D
4. B
5. A

ISBN 978-602-50893-1-2

