

MODUL PRAKTIKUM IMUNOSEROLOGI LANJUT



Disusun Oleh:

Sri Wahyuni, S.ST, M.Imun

Fransisca Probo Setyoningrum, S.Tr.A.K, M.Kes

Titi Purnama, S.Si, M.Kes

Renowati, S.Si.T, M.Biomed

Norma Farizah Fahmi, S.ST, M.Imun

Nazula Rahma Shafriani, S.Si, M.Biomed

Siti Sakdiah, SKM, M.Biomed

Retno Martini, M.Biomed

Reviewer:

Drs. Chairlan, M.Biomed



KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan kebaikannya, Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut dapat diselesaikan dengan baik. Imunoserologi adalah pengembangan dari mata kuliah dasar imunoserologi yang berfokus pada pendalaman teori imunologi dan aplikasi teknik serologi tingkat lanjut dalam diagnosis penyakit. Modul ini dirancang berdasarkan perkembangan imunologi dan meningkatnya kebutuhan akan pemahaman mendalam tentang aplikasi prinsip-prinsip imunologi dalam diagnosis penyakit. Berbagai teknik imunodiagnostik terkini telah membuka cakrawala baru dalam deteksi berbagai kondisi patologis, dari penyakit infeksi hingga gangguan autoimun dengan berbagai macam prinsip pemeriksaan imunoserologi lanjutan dengan peralatan yang lebih *advance* yang mendorong kami untuk menyusun referensi komprehensif ini.

Imunologi sebagai ilmu yang mempelajari sistem pertahanan tubuh telah berkembang pesat dalam beberapa dekade terakhir. Penemuan-penemuan mutakhir tentang mekanisme molekuler respons imun, interaksi antigen-antibodi, dan pengembangan metode imunodiagnostik presisi tinggi telah mengubah paradigma dalam praktik laboratorium medis. Melalui buku ini, kami berupaya menghadirkan materi yang tidak hanya kaya akan konsep teoritis tetapi juga kental dengan aplikasi praktis di laboratorium. Setiap bab disusun secara sistematis dengan pendekatan yang mengintegrasikan dasar imunologi dengan penerapan teknologi terkini, sehingga pembaca dapat memahami tidak hanya "bagaimana" melakukan suatu prosedur, tetapi juga "mengapa" prosedur tersebut dilakukan.

Kami menyadari bahwa penyusunan buku ini tidak akan terwujud tanpa kontribusi dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada para pakar imunologi dan teknologi laboratorium medis yang telah memberikan masukan berharga, serta institusi-institusi kesehatan yang telah memfasilitasi penelitian-penelitian yang menjadi dasar dalam penulisan buku ini. Kepada para mahasiswa dan praktisi laboratorium medis, kami berharap buku ini dapat menjadi pendamping yang bermanfaat dalam perjalanan profesional Anda. Kami juga mengundang kritik dan saran konstruktif dari para pembaca untuk penyempurnaan buku ini di masa mendatang, sehingga dapat terus berkontribusi pada kemajuan bidang imunologi laboratorium di tanah air.

Jakarta, Oktober 2025

Ketua Umum AIPTLMI

Prof. Dr. Budi Santosa, M.Si.Med



TIM PENYUSUN

TIM PENYUSUN MODUL PRAKTIKUM IMUNOSEROLOGI LANJUT

Penulis :

1. Sri Wahyuni, S.ST, M.Imun
2. Fransisca Probo Setyoningrum, S.Tr.A.K, M.Kes
3. Nazula Rahma Shafriani, S.Si, M.Biomed
4. Norma Farizah Fahmi, S.ST, M.Imun
5. Renowati, SIT, M.Biomed
6. Siti Sakdiah, SKM, M.Biomed
7. Titi Purnama, S.Si, M.Kes
8. Retno Martini Widyasih, S.Si., M.Biomed

Reviewer :

Drs. Chairlan, M.Biomed



DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	4
MODUL 1 PENGANTAR PRAKTIKUM IMUNOSEROLOGI LANJUT	11
TUJUAN PEMBELAJARAN	11
PENDAHULUAN	11
1. Prinsip Immunoassay	11
A. Komponen utama dalam immunoassay antara lain.....	12
B. Keunggulan dan Kelemahan Immunoassay	12
C. Parameter Kinerja Immunoassay	13
D. Simpulan	13
1. Prinsip Fiksasi Complement	14
2. Prinsip ELISA	15
JENIS-JENIS ELISA	16
3. Prinsip ECLIA	23
4. Prinsip ELFA	27
5. Prinsip ICT	28
6. Prinsip Western Blotting	29
1. Ekstraksi Protein Seluler	30
2. Kuantifikasi dan Elektroforesis	30
3. Transfer ke Membran.....	30
4. Pemblokiran Membran.....	31
5. Deteksi Antigen	31
6. Inkubasi dengan Antibodi Sekunder	31
7. Pengembangan dan Deteksi Sinyal	31
8. Kuantifikasi dengan Densitometri	31
7. Prinsip RIA	32
8. Prinsip CMIA	33
9. Prinsip <i>Viral load</i>	34
A. Prinsip Dasar <i>Viral load</i>	34
B. Aplikasi Metode <i>Viral load</i>	35
EVALUASI	36
MODUL 2 PEMERIKSAAN MARKER HEPATITIS	44

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

TUJUAN PEMBELAJARAN	44
PRAKTIKUM	46
1. Pemeriksaan Antigen HbSag Metode ELISA Kualitatif	46
A. Pra Analitik	46
B. Analitik	47
C. Post Analitik	48
D. Jurnal Laporan/laporan Sementara	48
2. Pemeriksaan Anti-HBS Metode ELISA Kuantitatif	50
A. Pra Analitik	50
B. Analitik	51
C. Post Analitik	52
D. Jurnal laporan/Laporan sementara.....	53
EVALUASI	56
RINGKASAN	59
DAFTAR PUSTAKA	60
MODUL 3 PEMERIKSAAN TUMOR MARKER	62
TUJUAN PEMBELAJARAN	62
PENDAHULUAN	62
1. Pemeriksaan Carcinoembryonic antigen (CEA)	65
A. Pra Analitik	65
B. Analitik	67
C. Post Analitik	68
D. Jurnal laporan/Laporan sementara.....	69
2. Pemeriksaan Prostate Specific Antigen (PSA)	72
A. Pra Analitik	72
B. Analitik	73
C. Post Analitik	75
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	76
EVALUASI	79
RINGKASAN	82
GLOSARIUM	83
DAFTAR PUSTAKA	83
MODUL 4 PEMERIKSAAN TYPHOID	84
TUJUAN PEMBELAJARAN	84
PRAKTIKUM	85
METODE INHIBITION MAGNETIC IMMUNOASSAY (IMBI)	85
A. Pra analitik	85
B. Analitik	86

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

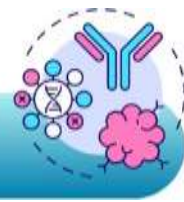
C. Post Analitik	86
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	88
METODE TYPHIDOT IgG/IgM.....	91
A. Pra Analitik.....	91
B. Analitik	92
C. Post Analitik	92
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	93
EVALUASI	96
RINGKASAN.....	99
GLOSARIUM.....	99
DAFTAR PUSTAKA.....	99
MODUL 5 PEMERIKSAAN MALARIA	101
TUJUAN PEMBELAJARAN	101
PENDAHULUAN	101
PRAKTIKUM.....	101
Metode Rapid test Malaria Pv/Pf	101
A. Pra analitik	101
B. Analitik	102
C. Post Analitik	103
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	103
EVALUASI	106
GLOSARIUM.....	109
MODUL 6 PEMERIKSAAN TUBERCULOSIS (TBC)	110
TUJUAN PEMBELAJARAN	110
PENDAHULUAN	110
PRAKTIKUM.....	111
METODE TCM (Tes Cepat Molekuler)	111
A. Pra Analitik.....	111
B. Analitik	113
C. Post Analitik	113
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	115
METODE Immunochromatography Test (ICT)	117
A. Pra Analitik.....	117
B. Analitik	118
C. Post Analitik	118
D. Jurnal Praktikum/ Laporan Sementara.....	119
EVALUASI	121
INGKASAN	124

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

GLOSARIUM	124
DAFTAR PUSTAKA	124
MODUL 7 PEMERIKSAAN SITOKIN	126
TUJUAN PEMBELAJARAN	126
PENDAHULUAN	126
PRAKTIKUM	134
1. Pemeriksaan IL- 6	134
A. Pra Analitik.....	134
B. Analitik	137
C. Post Analitik	140
1. Pemeriksaan TNF- α	141
A. Pra Analitik.....	141
B. Analitik	145
C. Post Analitik	147
D. Jurnal Laporan Pratikum Sementara.....	149
EVALUASI	152
MODUL 8 PEMERIKSAAN ALERGI IMUNOGLOBULIN E	159
TUJUAN PEMBELAJARAN	159
PENDAHULUAN	159
PRAKTIKUM	161
A. Pra Analitik.....	161
B. Analitik	162
C. Post Analitik.....	163
D. Jurnal Laporan Praktikum Sementara.....	165
EVALUASI	168
RINGKASAN	169
GLOSARIUM	170
DAFTAR PUSTAKA	171
MODUL 9 PEMERIKSAAN CD4	172
TUJUAN PEMBELAJARAN	172
PENDAHULUAN	172
A. Pra Analitik.....	173
B. Analitik	175
C. Post Analitik.....	178
EVALUASI	179
GLOSARIUM	181
DAFTAR PUSTAKA	182
MODUL 10 TYROID MARKER	183

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

TUJUAN PEMBELAJARAN	183
PENDAHULUAN	183
PRAKTIKUM.....	186
1. Pemeriksaan T3 (Triiodothyronine)	186
A. Pra analitik	186
B. Analitik	187
C. Post Anlitik	189
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	190
2. Pemeriksaan T4 (Triiodothyronine 4).....	193
A. Pra analitik	193
B. Analitik	194
C. Post Anlitik	195
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	197
3. Pemeriksaan TSH (Thyroid Stimulating Hormone).....	200
A. Pra analitik	200
B. Analitik	201
C. Post Analitik	202
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara.....	202
EVALUASI	205
GLOSARIUM.....	209
MODUL 11 KENDALI MUTU PEMERIKSAAN IMUNOSEROLOGI.....	211
TUJUAN PEMBELAJARAN	211
PENDAHULUAN	211
1. Metode Aglutinasi.....	211
2. Metode Rapid atau Imunokromatografi (ICT).....	212
3. Metode Kuantitatif	213
DAFTAR PUSTAKA.....	220



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Prinsip dasar Fiksasi Komplemen 15

Gambar 2 DIRECT ELISA (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016) 16

Gambar 3 INDIRECT ELISA (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016) 17

Gambar 4 Competitive ELISA (Shah & Maghsoudlou, 2016)..... 19

Gambar 5 Sandwich ELISA (Shah & Maghsoudlou, 2016)..... 20

Gambar 6 Konten ELISA KIT. (A) Micromicroplate; (B) Micromicroplate diisi dengan analit; (C) dan (D) Warna kuning terjadi ketika larutan penghenti ditambahkan..... 23

Gambar 7 Reaksi Imunologi metode ELFA 27

Gambar 8 Prinsip Strip Imunokromatografi Tipe Lateral Flow 28

Gambar 9 Skema Komponen Imunokromatografi 29

Gambar 10 Prosedur Western Blotting (Sumber : Bass et al, 2016)..... 32

Gambar 11 Siklus replikasi HBV dan penanda virus utama (Yuen et.al., 2018) 45

Gambar 12 Kurva Standar anti-HBs 52

Gambar 13 Interpretasi Tubex 86

Gambar 14 TYPHIDOT IgG/IgM..... 92

Gambar 15 Protokol *Sheet* (Reagen GX DX IFU V4.6b)..... 113

Gambar 16 Sifat-sifat Sitokin (Baratawidjaja, KG., Rengganis, K., 2014)..... 127

Gambar 17 Sitokin yang berperan pada hematopoiesis 128

Gambar 18 IL-6 pada peradangan, imunitas dan penyakit (Toshio Tanaka dkk, 2014)..... 132

Gambar 19 Prinsip Elisa Sandwich (<https://www.biossusa.com/products/bskh1007>) 134

Gambar 20 Proses Pengenceran Standar IL-6 138

Gambar 21 Prinsip Elisa Sandwich TNF- α (<https://www.mpbio.com>) 141

Gambar 22 Proses Pengenceran Standar TNF- α 146

Gambar 23 *Well* yang sudah diberikan stop solution dan proses pengukuran..... 147

Gambar 24 Kurva Kalibrasi 164

Gambar 25 Kartu kontrol Shewhart 214



DAFTAR TABEL

Tabel 1 Penggunaan ELISA dalam pemeriksaan 21

Tabel 2 Ringkasan dan fungsi komponen zat berdasarkan reaksi..... 24

Tabel 3 Faktor-Faktor Penyebab Kesalahan ECLIA 25

Tabel 4 Pemeriksaan Hormon dan Endokrin..... 25

Tabel 5 Pemeriksaan Penyakit Infeksi 26

Tabel 6 Onkologi (Penanda Tumor) 26

Tabel 7 Kardiologi..... 26

Tabel 8 Penanda Inflamasi dan Autoimun 26

Tabel 9 Pemeriksaan Vitamin dan Obat..... 27

Tabel 10 Pelaporan Hasil MTB..... 113

Tabel 11 Peta Kerja Mikromicroplate..... 138

Tabel 12 Peta Kerja Mikromicroplate..... 145

Tabel 13 Pemantapan mutu metode aglutinasi 212

**MODUL
1**

PENGANTAR PRAKTIKUM IMUNOSEROLOGI LANJUT

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami prinsip Immunoassay
2. Mahasiswa mampu memahami prinsip Fikasi Komplemen
3. Mahasiswa mampu memahami prinsip ELISA
4. Mahasiswa mampu memahami prinsip ECLiA
5. Mahasiswa mampu memahami prinsip ELFA
6. Mahasiswa mampu memahami prinsip ICT
7. Mahasiswa mampu memahami prinsip Western Blotting
8. Mahasiswa mampu memahami prinsip RIA
9. Mahasiswa mampu memahami prinsip CMIA
10. Mahasiswa mampu memahami prinsip *Viral load*

PENDAHULUAN



Pada modul bagian I ini berisi prinsip dan gambaran pemeriksaan yang akan digunakan dalam praktikum imunoserologi lanjut ini. Terdapat 10 poin yang dijabarkan dalam tujuan pembelajaran, maka mahasiswa diharapkan memahaminya dengan baik.

1. Prinsip Immunoassay

Immunoassay merupakan teknik analisis kuantitatif dan kualitatif yang memanfaatkan reaksi spesifik antara antigen dan antibodi untuk mendeteksi, mengidentifikasi, dan mengukur konsentrasi suatu zat target dalam sampel biologis. Teknik ini merupakan salah satu metode

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

analisis yang paling sensitif dan spesifik dalam bidang diagnostik medis, penelitian biomedis termasuk endokrinologi, kardiologi, toksikologi, dan penyakit infeksi (Sequeria, 2019)

Prinsip fundamental immunoassay didasarkan pada kemampuan antibodi untuk mengenali dan berikatan secara spesifik dengan antigen target. Interaksi antigen-antibodi ini bersifat reversibel dan mengikuti hukum aksi massa:



Kekuatan ikatan antara antigen dan antibodi diukur dengan konstanta afinitas (K_a), yang menentukan sensitivitas dan spesifisitas assay, semakin tinggi afinitas antibodi terhadap antigen, semakin sensitif dan spesifik immunoassay tersebut.

A. Komponen utama dalam immunoassay antara lain :

a. Antibodi

- Antibodi primer: merupakan antibodi spesifik untuk mengenali, menangkap dan berkaitan dengan antigen target.
- Antibodi sekunder: merupakan antibodi berlabel (konjugat) yang akan berkaitan dengan antigen target pada epitop lainnya.
- Karakteristik penting: Spesifisitas tinggi, afinitas tinggi, dan juga stabilitas yang tinggi.

b. Antigen

- Molekul target yang akan dideteksi atau diukur.
- Dapat berupa protein, hormon, obat, toksin, atau mikroorganisme
- Harus memiliki sifat imunogenik atau dapat dibuat imunogenik

c. Sistem Deteksi/ Label/ Porter

- Enzim: Peroksidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase
- Fluorofor: FITC, rhodamine, Alexa Fluor
- Radioisotop: ^{125}I , ^3H , ^{14}C
- *Chemiluminescent*: Luminol, acridinium ester
- Elektrokimia: Ferrocyanide, mediator redoks

B. Keunggulan dan Kelemahan Immunoassay

a. Keunggulan Immunoassay

- Spesifisitas Tinggi: Kemampuan membedakan molekul yang mirip secara struktural

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Sensitivitas Tinggi: Dapat mendeteksi konsentrasi sangat rendah (pg/mL - ng/mL)
- *Throughput* Tinggi: Dapat menganalisis banyak sampel secara simultan
- Automasi: Dapat diotomatisasi untuk efisiensi tinggi
- Versatilitas: Dapat diadaptasi untuk berbagai jenis analit

a. Keterbatasan Immunoassay

- *Cross-reactivity*: Terdapat reaksi silang dengan molekul serupa
- *Matrix Effect*: Interferensi dari komponen sampel lain
- *Hook Effect*: Penurunan sinyal pada konsentrasi analit sangat tinggi
- Stabilitas Reagent: Antibodi dapat terdegradasi seiring waktu
- Biaya: Produksi antibodi berkualitas tinggi memerlukan biaya tinggi.

C. Parameter Kinerja Immunoassay :

1. Sensitivitas Analitik

- *Limit of Detection* (LoD): Konsentrasi terendah yang dapat dideteksi
- *Limit of Quantification* (LoQ): Konsentrasi terendah yang dapat diukur akurat

2. Spesifisitas

- Kemampuan mendeteksi analit target tanpa interferensi
- Dievaluasi melalui uji *cross-reactivity*

3. Presisi

- *Repeatability*: Variasi dalam satu run
- *Reproducibility*: Variasi antar run, antar hari, antar operator

4. Akurasi

- Kedekatan hasil dengan nilai sebenarnya
- Dievaluasi menggunakan reference material

5. Linearitas

- Kemampuan memberikan respons proporsional terhadap konsentrasi analit
- Dievaluasi dalam rentang kerja yang ditetapkan

D. Simpulan

Immunoassay merupakan teknologi analitik berbasis reaksi antigen - antibodi yang telah merevolusi diagnostik medis dan penelitian biomedis. Pemahaman mendalam tentang prinsip, komponen, dan karakteristik kinerja immunoassay sangat penting untuk aplikasi yang optimal

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

dalam berbagai bidang. Perkembangan teknologi baru terus meningkatkan sensitivitas, spesifisitas, dan kemudahan penggunaan immunoassay, menjadikannya sebagai *tool* yang semakin *powerful* dalam era *medicine precision* dan *personalized healthcare*.

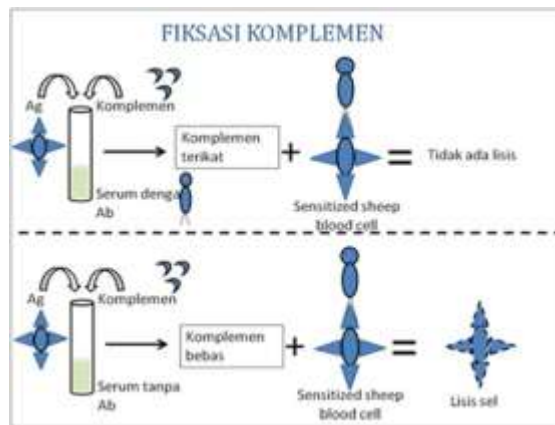
1. Prinsip Fiksasi Complement

Uji Fiksasi komplemen (CFT) merupakan metode klasik untuk menunjukkan keberadaan antibodi dalam serum pasien. Dasar pemeriksaan CFT adalah kemampuan sistem komplemen untuk berikatan dengan kompleks antigen-antibodi. Jika antibodi yang spesifik berikatan terhadap antigen yang dicari ada dalam sampel, maka komplemen akan terfiksasi (terikat) pada kompleks tersebut, dan hal ini dapat dideteksi melalui berbagai cara, termasuk penggunaan eritrosit sebagai indikator. Komponen uji berupa sistem indikator yang menggunakan kombinasi sel darah merah domba dan antibodi fiksasi komplemen seperti imunoglobulin G yang diproduksi terhadap eritrosit domba. Ketika elemen-elemen ini dicampur dalam kondisi optimal, antibodi antidomba mengikat permukaan sel darah merah. Komplemen selanjutnya mengikat kompleks antigen-antibodi yang terbentuk dan akan menyebabkan eritrosit sel darah merah mengalami lisis.

Komponen terminal dari kaskade komplemen (*membran attack complex*), dapat merusak membran sel jika terdapat antibodi spesifik yang mengikat komplemen ke permukaan sel, dalam CFT, eritrosit digunakan sebagai sel target, karena kebocoran membran yang disebabkan oleh komplemen dapat divisualisasikan atau diukur secara visual dan kolorimetri.

Bila di dalam serum terdapat antibodi terhadap antigen tersebut, maka akan terjadi ikatan antigen-antibodi-komplemen, sehingga tidak ada sisa komplemen yang bebas. Sel darah merah tersentisisasi yang kemudian ditambahkan, tidak akan dilisiskan oleh komplemen yang terikat tersebut dan CFT disebut positif. Bila serum tidak terdapat antibodi terhadap antigen tersebut, maka tidak akan terjadi ikatan antigen-antibodi-komplemen atau komplemen dalam keadaan bebas, sehingga sel darah merah yang ditambahkan akan lisis.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



GAMBAR 1 PRINSIP DASAR FIKSASI KOMPLEMEN

2. Prinsip ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu teknik imunologi untuk mendeteksi dan mengukur kadar antibodi, antigen, peptida, protein, glikoprotein, dan hormon dalam sampel biologis (Santoso 2020; Aydin 2015; Alhadj *et.al.*, 2023). Metode ini dapat mengukur *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) banyak digunakan di laboratorium untuk mengukur molekul peptida dan protein secara akurat, andal, mudah, dan sensitif (Hayrapetyan *et.al.*, 2023). ELISA umumnya dilakukan menggunakan mikromicroplate polisiren (plastik) sebagai fase padat yang berisi 96 well atau 48 well, dan akan terjadi proses pengikatan antibodi dengan antigen. Mikromicroplate ELISA yang dijual di pasaran telah melalui proses penempelan (pelapisa) antigen atau antibodi penangkap dan lapisan *blocking*, sehingga pengguna tinggal menambahkan serum atau plasma yang mengandung bahan yang dideteksi atau diukur.

Setelah diinkubasi dan dicuci, *microplate* diinkubasi dengan antibodi yang terikat enzim. Selanjutnya dilakukan pencucian *microplate* dan dilanjutkan dengan penambahan substrat sehingga akan dihasilkan perubahan warna dan nilai *optical density* (OD) lalu dibaca dengan ELISA reader. Tahap pencucian merupakan salah satu tahap yang penting untuk membuang antibodi yang tidak terikat dengan antigen. Tahapan dalam pemeriksaan ELISA menjadi sangat spesifik karena ada tahap pencucian yang berulang (Hidayat dan Wulandari, 2021).

Metode ELISA ini didasarkan pada prinsip mendeteksi interaksi antigen-antibodi dan aktivitas enzimatik yang menghidolisis substrat kromogen menjadi berwarna. Lalu intensitas warna yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 450 nm (Aydin, 2015; Tabatabaei &

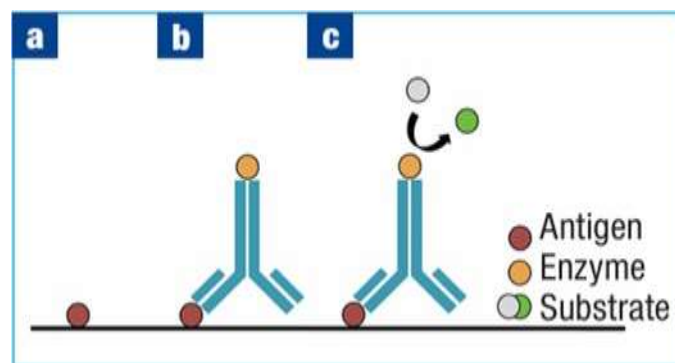
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Ahmed, 2022; Marliana dan Widhyasih, 2018; Tabatabaei & Ahmed, 2022; Weber *et.al.*, 2017; Jiskoot *et.al.*, 2016).

JENIS-JENIS ELISA

1. DIRECT ELISA

Metode ini melibatkan pengujian keberadaan antigen dengan menggunakan antibodi yang spesifik terhadap antigen yang dicurigai dalam sampel. Pengujian dilakukan sebagai berikut: a) *Microplate* (terbuat dari polistirena, polivinil,) dilapisi dengan antigen yang dcari dalam sampel. yang diketahui. b) Ditambahkan antibodi spesifik berlabel enzim (konjugat). c) Pencucian dilakukan untuk menghilangkan zat yang tidak terikat setelah inkubasi selama durasi yang sesuai. d) Substrat kemudian ditambahkan untuk menghasilkan perubahan warna karena hidrolisis enzim yang terikat antibodi. e) Setelah menambahkan *stop solution*, molekul yang diinginkan diukur menggunakan pembacaan ELISA Reader (Aydin, 2015; Aydin *et.al.*, 2025).



GAMBAR 2 DIRECT ELISA (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016)

Kelebihan:

- Pemeriksaan dengan metode ini lebih cepat. Reaksi silang dengan antibodi sekunder dapat dihilangkan.

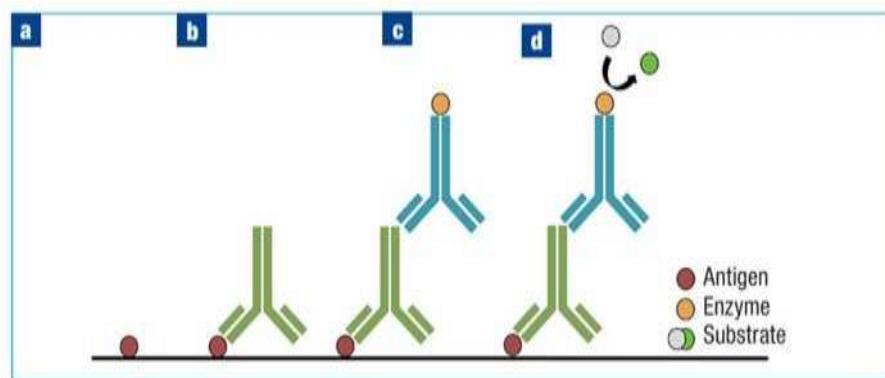
Kekurangan:

- Amplifikasi sinyal yang dihasilkan lemah.
- Harganya mahal
- Kurang fleksibel dalam memilih antibodi primer berlabel enzim.
- Dapat terjadi reaksi antara antibodi primer dengan enzim yang terikat pada antibodi primer tersebut (Hidayat dan Wulandari, 2021; Shah & Maghsoudlou, 2016).

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

2. INDIRECT ELISA

Metode ELISA ini digunakan untuk mendeteksi antibodi dalam cairan biologis yang diduga dan mengukur titernya. Pengujian dilakukan sebagai berikut: a) *Microplate* dilapisi dengan antigen yang diketahui. b) Sampel biologis yang diduga mengandung antibodi yang dicari (misalnya, serum, plasma, dll.) ditambahkan. c) Konjugat (anti-antibodi) ditambahkan. d) Substrat ditambahkan. Setelah itu, diinkubasi lalu *microplate* dicuci. Pada *Direct ELISA* konjugat berikatan dengan antigen, sedangkan dalam *Indirect ELISA*, konjugat berikatan dengan antibodi primer (Aydin, 2015; Aydin *et.al.*, 2025).



GAMBAR 3 INDIRECT ELISA (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016)

Pada metode ini, antigen ditempelkan pada dasar *microplate*, kemudian dimasukkan antibodi primer yang tidak berlabel enzim. Selanjutnya, dimasukkan kembali antibodi sekunder berlabel enzim yang akan berikatan dengan antibodi primer.

Kelebihan:

- Sensitivitas uji meningkat dengan penggunaan antibodi primer dan sekunder.
- Harga terjangkau
- Fleksibel, dapat digunakan beberapa antibodi primer (Shah & Maghsoudlou, 2016)

Kekurangan:

- Reaksi silang dapat terjadi dengan antibodi sekunder yang akan menghasilkan sinyal yang tidak spesifik.
- Memerlukan waktu inkubasi yang lebih lama
- Biaya yang dibutuhkan lebih besar dibandingkan dengan metode langsung (Hidayat dan Wulandari, 2021).

3. COMPETITIVE ELISA

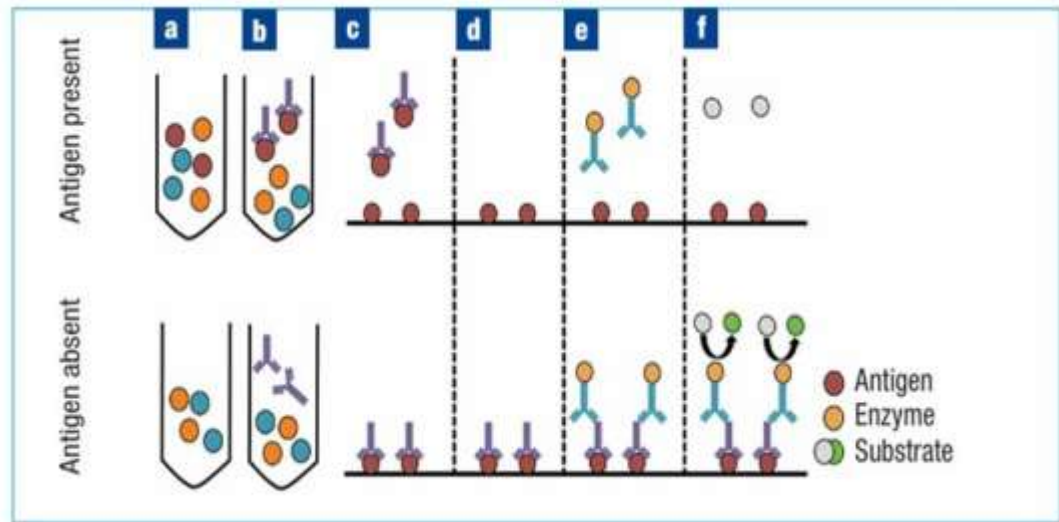
Prinsip ELISA kompetitif untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi antigen atau antibodi dalam sampel. Metode ini melibatkan kompetisi antara antigen dalam sampel dan antigen berlabel (biasanya dikonjugasikan dengan enzim) untuk berikatan dengan antibodi yang terbatas jumlahnya pada permukaan mikrotiter *microplate* (Wang *et.al.*, 2015). ELISA kompetitif menggunakan medium harus mengandung antigen pasien (X), sejumlah antigen berlabel (X*) yang diketahui, dan sejumlah antibodi yang diketahui. Misalnya, jika 20 molekul antibodi dan 20 molekul antigen berlabel (X*) digunakan, dan 5 antibodi berlabel X* mengikat 5 antigen X*, 15 antibodi yang tersisa terikat oleh antigen X pasien. Dengan demikian, semakin besar pengikatan antigen X* berlabel ke antibodi, semakin rendah jumlah antigen pasien yang tetap terikat. Bila yang diukur adalah antibodi dalam sampel, maka akan ada dua antibodi spesifik, satu berupa antibodi-enzim (konjugat) dan yang lain antibodi yang dicari dalam sampel. Kompetisi akan terjadi antara dua antibodi terhadap antigen yang sama (Aydin, 2025).

Kelebihan:

- Cocok untuk molekul kecil yang sulit dianalisis dengan metode lain.
- Sensitivitas tinggi dalam mendeteksi antigen.
- Dapat digunakan untuk sampel kompleks tanpa perlu pemurnian ekstensif.

Kekurangan:

- Interpretasi hasil memerlukan kurva standar yang tepat.
- Waktu yang diperlukan lama
- Rentan terhadap interferensi dari matriks sampel yang kompleks.
- Membutuhkan kontrol kualitas yang ketat.



GAMBAR 4 COMPETITIVE ELISA (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016)

4. SANDWICH ELISA

Metode ini untuk mengukur konsentrasi antigen dalam sampel, memerlukan dua antibodi yang harus mengenali epitop yang berbeda. Antibodi pertama, dikenal sebagai antibodi penangkap dan mengikat antigen, sedangkan antibodi kedua adalah antibodi terbiotinilasi yang mendeteksi antibodi yang ditangkap. Setelah membuang antigen yang tidak terikat, antibodi spesifik antigen lainnya ditambahkan dan diinkubasi lagi. Enzim yang biasanya digunakan dalam metode ini adalah *horseradish peroxidase* (HRP) dan Alkaline phosphatase (ALP), dengan 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) berfungsi sebagai substrat kromogenik. Metode ini yang paling sensitif dari semua jenis ELISA, menawarkan sensitivitas 2–5 kali lebih banyak. Hasilnya, ini adalah pilihan pengukuran yang lebih disukai ketika hanya sejumlah kecil antibodi spesifik yang tersedia dan tidak ada antigen yang dimurnikan (Tabatabaei & Ahmad, 2022). Pada metode ini, antibodi terlebih dahulu ditempelkan pada dasar *mikromicroplate* selanjutnya, sampel uji (antigen) dimasukkan ke dalam lubang pada *mikromicroplate*, kemudian antibodi sekunder yang terikat pada enzim dimasukkan ke dalam lubang pada plat.

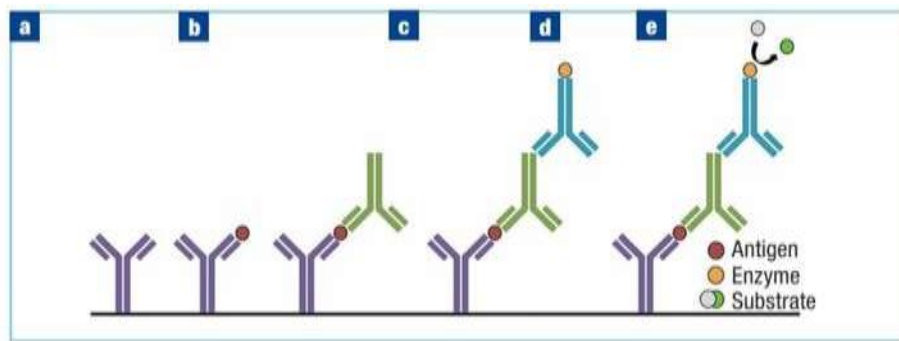
Kelebihan:

- Memiliki spesifitas dan sensitivitas yang tinggi
- Cocok digunakan pada sampel yang kurang murni

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kekurangan:

- Biaya cukup besar karena menggunakan dua antibodi (Hidayat and Wulandari, 2021).



GAMBAR 5 SANDWICH ELISA (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016)

Persyaratan dan prosedur spesimen

ELISA dilakukan pada *mikromicroplate* polistirena, biasanya pelat 96-*well* yang dilapisi untuk mengikat protein dengan kuat (Aydin *et.al.*, 2025). Bergantung pada jenis ELISA, pengujian memerlukan antibodi deteksi primer dan/atau sekunder, analit/antigen, antibodi/antigen pelapis, buffer, pencuci, dan substrat/kromogen (Jacob *et.al.*, 2013). Antibodi deteksi primer adalah antibodi spesifik yang hanya mengikat protein yang diinginkan. Sebaliknya, antibodi deteksi sekunder adalah antibodi terkonjugasi enzim kedua yang mengikat antibodi primer yang tidak terkonjugasi enzim (Aydin, 2015). Ada empat langkah umum utama untuk pengerjaan immunoassay ELISA. Langkah-langkah tersebut adalah:

1. Pelapisan (dengan antigen atau antibodi)
2. Pemblokiran (biasanya dengan penambahan *bovine serum albumin* atau disingkat BSA)
3. Deteksi
4. Pembacaan akhir

Deteksi dilakukan dengan menambahkan substrat yang dapat menghasilkan warna. Ada banyak substrat yang tersedia untuk digunakan dalam deteksi ELISA. Namun, substrat yang paling umum digunakan adalah *horseradish peroxidase* (HRP) dan *alkaline phosphatase* (ALP) (Jacob *et.al.*, 2013). Substrat untuk HRP adalah TMB, yang menghasilkan perubahan warna biru. ALP mengukur warna kuning nitrofenol setelah periode inkubasi suhu ruangan selama 15 hingga 30 menit dan biasanya menggunakan p-nitrofenil-fosfat (pNPP) sebagai substratnya (Aydin *et.al.*, 2025). Berdasarkan keempat langkah di atas terdapat "pencucian" mikromicroplate menggunakan penyangga, seperti garam *phosphate-buffered saline* (PBS) dan deterjen non-ionik, untuk menghilangkan bahan yang tidak terikat. Sumur dicuci dua kali

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

atau lebih selama setiap langkah pencucian, tergantung pada protokol spesifik (Aydin, 2015). Uji imunosorben terkait-enzim diterapkan dalam banyak tes diagnostik (Aydin *et.al.*, 2025). Beberapa penggunaan ELISA dapat mencakup hal-hal berikut:

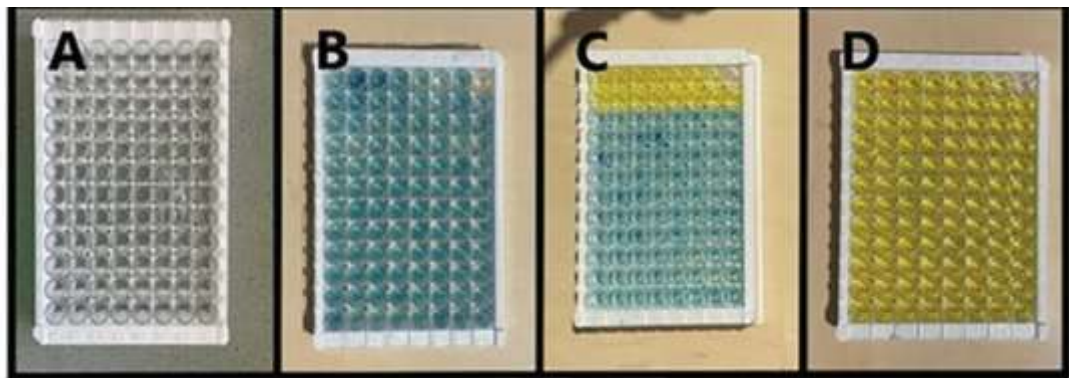
TABEL 1 PENGGUNAAN ELISA DALAM PEMERIKSAAN

No.	Penggunaan ELISA	Pemeriksaan
1	Mendeteksi dan Mengukur Keberadaan Antibodi dalam Darah	<ul style="list-style-type: none">➤ Autoantibodi (anti-dsDNA, anti-dsg1, ANA, dll.)➤ Antibodi terhadap penyakit menular (antibakteri, antivirus, antijamur)➤ Hepatitis A, B, C, HIV, dll.
2	Mendeteksi dan Memperkirakan Kadar Penanda Tumor	<ul style="list-style-type: none">➤ Prostate-specific antigen (PSA)➤ Carcinoembryonic Antigen (CEA)
3	Mendeteksi dan Memperkirakan Kadar Hormon	<ul style="list-style-type: none">➤ Hormon Luteinisasi➤ Hormon Perangsang Folikel/Follicular stimulating➤ Prolaktin➤ Testosteron➤ <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (hCG)
4	Melacak Wabah Penyakit	<ul style="list-style-type: none">➤ Kolera➤ HIV➤ Influenza
5	Mendeteksi Paparan Penyakit Masa Lalu	<ul style="list-style-type: none">➤ HIV➤ Hepatitis
6	Pemeriksaan Darah Donor untuk Kemungkinan Kontaminan Virus	<ul style="list-style-type: none">➤ Anti-HIV-1/2➤ Anti-HCV➤ HBsAg
7	Mendeteksi Penyalahgunaan Narkoba	<ul style="list-style-type: none">➤ Amfetamin➤ Metamfetamin➤ 3,4-methylenedioxymethamphetamine➤ Kokain➤ Benzoylcegonine

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Komponen utama dalam pemeriksaan ELISA yaitu:

- a. **Fase padat (Matriks):** *microplate* mikro 48 atau 96-*well* tempat analit (standar, antigen, atau antibodi) ditempelkan. Polistirena, tabung polivinil dan polipropilena atau pelat mikro sebagai fase padat.
- b. **Konjugat:** merupakan antibodi universal berlabel. Jika tujuannya untuk mendeteksi keberadaan antibodi dalam plasma manusia, konjugat akan mengandung anti-IgG manusia. Enzim yang paling umum digunakan untuk memberi label konjugat meliputi alkali fosfatase (AP), 5-bromo-4-kloro-3-indolyl fosfat/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), horse radish peroksidase
- c. **Substrat:** Zat kromogen yang bereaksi dengan enzim dalam konjugat untuk menghasilkan warna. Bergantung pada struktur kromogen substrat, reaksi menghasilkan produk hijau, kuning, atau biru. Misal, substrat TMB), yang menghasilkan warna biru dengan adanya peroksidase (Shah & Maghsoudlou, 2016). Ketika ditambahkan H_2SO_4 sebagai larutan penghenti, dihasilkan warna kuning.
- d. **Washing:** Pembilasan dengan larutan penyangga fosfat (PBS) atau penyangga pencuci di antara setiap langkah sangat penting.
- e. **Stop Solution:** Langkah terakhir ELISA, yang dikenal sebagai ‘menghentikan reaksi’, melibatkan penggunaan larutan asam (H_2SO_4 , HCl) atau basa (NaOH) untuk menghentikan reaksi enzim-substrat pada waktu yang diinginkan (Shah & Maghsoudlou, 2016). Biasanya, reaksi enzim-substrat selesai dalam waktu 30–60 menit.
- f. **Pembacaan :** Intensitas warna yang dihasilkan pada akhir reaksi diukur secara spektrofotometri pada pembaca ELISA pada panjang gelombang 400-600nm, tergantung pada substrat yang digunakan, dengan 450 nm menjadi yang paling panjang gelombang yang umum digunakan. Hubungan antara kerapatan optik dalam sumur dan konsentrasi analit dalam sampel dapat bersifat langsung (seperti dalam sandwich untuk alas ELISA). Kurva standar dibuat dari data pengenceran serial, dengan konsentrasi diplot pada sumbu x (menggunakan skala log) dan absorbansi pada sumbu y (menggunakan skala linier). Peralatan tambahan untuk pembaca ELISA meliputi komputer dan printer (Aydin *et.al.*, 2025).



GAMBAR 6. KONTEN ELISA KIT. (A) MICROMICROPLATE; (B) MICROMICROPLATE DIISI DENGAN ANALIT; (C) DAN (D) WARNA KUNING TERJADI KETIKA LARUTAN PENGHENTI DITAMBAHKAN (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016)

3. Prinsip ECLIA

Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) merupakan salah satu metode imunodiagnostik paling sensitif dan spesifik dalam mendeteksi biomarker biologis, termasuk hormon, antibodi, antigen, dan protein. ECLIA menggabungkan prinsip reaksi imun (antigen-antibodi) dengan deteksi kuantifikasi bahan yang dideteksi berdasarkan reaksi elektrokimia yang menghasilkan cahaya (chemiluminescence). Molekul pelapor (label), seperti kompleks ruthenium, menghasilkan cahaya ketika tereksitasi oleh tegangan listrik. Intensitas cahaya yang dipancarkan sebanding dengan jumlah kompleks imun terbentuk, dan diukur oleh sistem deteksi cahaya (photomultiplier tube) (Premnath & Zubair, 2023).

Prinsip Kerja ECLIA bekerja berdasarkan:

1. Antigen atau antibodi dalam sampel berikatan dengan reagen immunospesifik yang dilabel ruthenium ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$).
2. Kompleks imun ini ditangkap oleh partikel magnetik (biasanya streptavidin-coated).
3. Setelah pencucian, dialirkan arus listrik dit ke elektroda di dalam cawan pengukur. Reaksi elektrokimia mengoksidasi substrat (seperti tripropilamine) yang bereaksi dengan label (kompleks ruthenium) untuk menghasilkan cahaya.
4. Intensitas luminesensi cahaya yang dihasilkan diukur oleh alat (photomultiplier). Jumlah cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi antigen atau antibodi dalam sampel. Hasilnya dibandingkan dengan kurva kalibrasi standar untuk menentukan kadar molekul target.

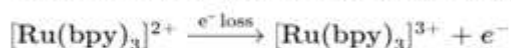
Komponen utama pada reaksi adalah

1. Label: $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (kompleks ruthenium trisbipiridil)
2. Co-reactant: Tripropylamine (TPA)
3. Elektroda kerja: Memicu reaksi oksidasi saat diberikan tegangan listrik.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Langkah reaksi ECLIA (Co-reactant System)

1. Oksidasi Ruthenium oleh Elektroda

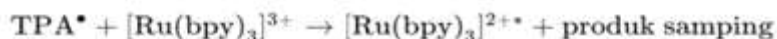


2. Oksidasi Ko-reaktan (TPA)



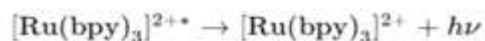
– TPA menghasilkan radikal TPA^\bullet yang sangat reaktif.

3. Transfer Elektron ke Ru(III)



– Terbentuk $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ (keadaan tereksitasi).

4. Emisi Cahaya (Luminesensi)



TABEL 2 RINGKASAN DAN FUNGSI KOMPONEN ZAT BERDASARKAN REAKSI

Komponen	Fungsi Utama
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	Label luminesen; menghasilkan sinyal cahaya saat tereksitasi
TPA (tripropylamine)	Co-reaktan; menghasilkan radikal pereduksi yang mengaktifkan Ru label
Elektroda	Mengalirkan arus listrik untuk oksidasi Ru dan TPA
Magnetic Beads	Mengikat biotinylated antibodies yang telah menangkap analit, menangkap kompleks imun dan memungkinkan pemisahan/pencucian
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$	Spesies tereksitasi yang memancarkan cahaya (dihitung sebagai sinyal ECLIA) Jumlah cahaya yang dihasilkan proporsional dengan konsentrasi analit (antigen atau antibodi)

Prosedur Kerja (Umum pada Platform Otomatis seperti Roche Elecsys)

1. Masukkan sampel ke dalam sistem otomatis.
2. Tambahkan reagen 1 (antibodi berlabel ruthenium).
3. Tambahkan reagen 2 (partikel magnetik streptavidin).
4. Inkubasi dan pencucian otomatis.
5. Aplikasi arus listrik pada elektroda.
6. Deteksi intensitas cahaya.
7. Hasil dianalisis berdasarkan kurva kalibrasi dan kontrol kualitas internal.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

TABEL 3 FAKTOR-FAKTOR PENYEBAB KESALAHAN ECLIA

Faktor	Penjelasan
Interferensi heterofilik	Antibodi non-spesifik dapat mengganggu ikatan antigen–antibodi.
RF (rheumatoid factor)	Dapat meniru kompleks imun palsu.
Sampel hemolisis/lipemik	Menyerap atau memantulkan cahaya sehingga menurunkan akurasi sinyal.
Suhu dan waktu inkubasi	Berpengaruh pada kestabilan kompleks imun dan reaktivitas reagen.
<i>Freeze-thaw</i>	Berulang dapat merusak protein target dan menyebabkan hasil rendah palsu.
Antikoagulan tidak sesuai	EDTA dan heparin bisa memengaruhi reaktivitas pada platform tertentu (Gonzalez et al., 2021).

Keunggulan ECLIA

1. Sensitivitas tinggi (hingga pg/mL)
2. Rentang dinamis luas
3. Reprodusibilitas antar-run baik
4. Otomatisasi penuh, cocok untuk throughput tinggi

Metode ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay) digunakan secara luas dalam diagnostik laboratorium klinik modern karena kemampuannya mendeteksi biomarker dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Berikut adalah jenis-jenis pemeriksaan yang menggunakan ECLIA, dikelompokkan berdasarkan bidang medis:

TABEL 4 PEMERIKSAAN HORMON DAN ENDOKRIN

Nama Pemeriksaan	Fungsi Klinis
TSH, FT3, FT4	Evaluasi fungsi tiroid (hipo/hipertiroidisme)
β -hCG	Diagnosis kehamilan, deteksi keganasan trofoblast
LH, FSH, Estradiol, Progesteron	Gangguan fertilitas, siklus menstruasi
Insulin, C-peptide	Evaluasi fungsi pankreas, diabetes tipe 2
Prolaktin	Evaluasi galaktorea, gangguan hipofisis
Testosteron, DHEA-S	Hiperandrogenisme, gangguan pubertas

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

TABEL 5 PEMERIKSAAN PENYAKIT INFEKSI

Nama Pemeriksaan	Deteksi
HBsAg, anti-HBs, anti-HBc	Hepatitis B
anti-HCV	Hepatitis C
HIV Ag/Ab Combo (p24 + antibodi)	Infeksi HIV
CMV IgM/IgG	Infeksi cytomegalovirus
EBV VCA IgM/IgG	Infeksi Epstein-Barr
Toxoplasma IgM/IgG	Infeksi toksoplasmosis (terutama kehamilan)

TABEL 6 ONKOLOGI (PENANDA TUMOR)

Nama Marker	Kegunaan
PSA, fPSA	Skrining dan monitoring kanker prostat
CEA	Kanker kolorektal, lambung, pancreas
AFP	Kanker hati (HCC), tumor germ cell
CA 125	Kanker ovarium
CA 15-3	Kanker payudara
CA 19-9	Kanker pankreas, GI
β -hCG	Tumor trofoblastik

TABEL 7 KARDIOLOGI

Nama Marker	Kegunaan
Troponin T/I	Diagnosis infark miokard akut (AMI)
NT-proBNP	Diagnosis dan stratifikasi gagal jantung
CK-MB	Cedera otot jantung

TABEL 8 PENANDA INFLAMASI DAN AUTOIMUN

Nama Pemeriksaan	Fungsi
CRP (hs-CRP)	Inflamasi sistemik, risiko kardiovaskular
IL-6	Sitokin proinflamasi (mis. COVID-19 berat, sepsis)
Anti-CCP, RF	Diagnosis artritis rheumatoid
ANA panel	Skrining penyakit autoimun sistemik

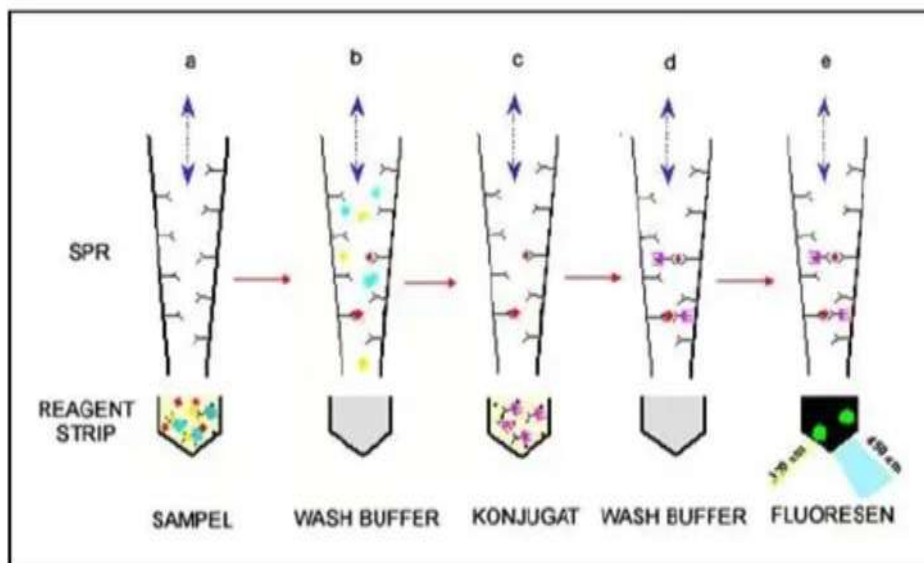
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

TABEL 9 PEMERIKSAAN VITAMIN DAN OBAT

Pemeriksaan	Kegunaan
Vitamin D (25-OH)	Evaluasi defisiensi vitamin D
Ferritin	Anemia defisiensi besi atau inflamasi
Methotrexate	Monitoring terapi kanker/autoimun
Digoxin	Monitoring terapi jantung

4. Prinsip ELFA

Pemeriksaan imunoserologi metode *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) merupakan pengembangan dari metode ELISA. Pada dasarnya metode ELFA adalah metode pemeriksaan yang menggunakan prinsip dasar ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), dengan deteksi berbasis fluoresensi. Dalam ELFA, dengan antibodi atau antigen yang terkonjugasi enzim. Kemudian ditambahkan substrat yang akan menghasilkan produk yang berfluoresensi. Intensitas fluoresensi yang dihasilkan akan sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel. Prinsip pemeriksaan bisa dilihat pada gambar dibawah ini.



GAMBAR 7 REAKSI IMUNOLOGI METODE ELFA

Pada Gambar tersebut a: antibody yang terfiksasi pada dinding SPR menangkap antigen target yang terdapat pada sampel. b: komponen yang tidak terikat akan dikeluarkan selama fase pembilasan. c: Antibodi berlabel alkali fosfatase (konjugat) dalam SPR dan akan berikatan dengan kompleks antigen dan antibody d: Komponen yang tidak terikat akan dikeluarkan pada fase pembilasan e: direaksikan dengan Substrat (4-methyl-umbelliferyl

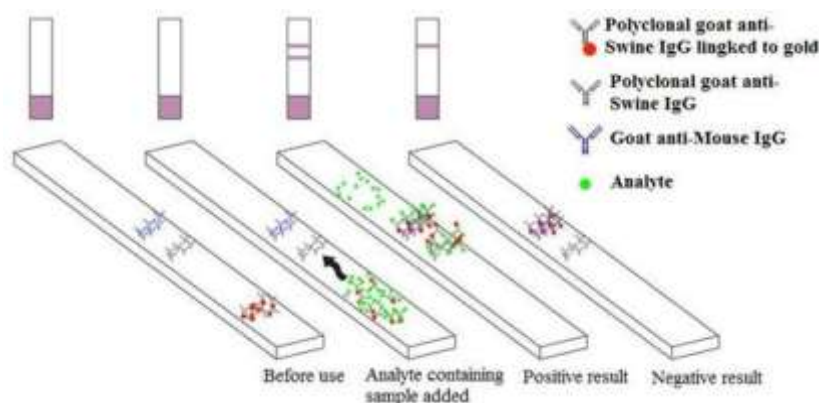
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

phosphate) dalam SPR. Substrat 4-methyl-umbeiliferone (4-MUP) akan dihidrolisis menjadi 4-Methylumbelliferone (4 MU) yang berfluoresens lalu diukur pada panjang gelombang 450 nm. Intensitas fluoresen setara dengan konsentrasi antigen reaktif pada sampel.

5. Prinsip ICT

Imunokromatografi (ICT) merupakanmetoda pemeriksaan yang berbasis penggabungan imunoserologi dengan kromatografi. Pada imunoserologi terjadi reaksi antigen-antibodi, sedangkan pada kromatografi terjadi pemisahan molekul berdasarkan perbedaan berat molekul dan perbedaan kecepatan pergerakan antara fase gerak di dalam fase diam untuk memisahkan komponen (berupa molekul) yang berada pada larutan. Molekul yang terlarut dalam fase gerak, akan melewati membran nitroselulosa/kolom sebagai fase diam.

Imunokromatografi memiliki prinsip yang didasarkan pada reaksi antigen-antibodi pada membrane nitroselulosa yang hasilnya ditunjukkan oleh perubahan pita warna yang terpasang pada nanopartikel emas. *Antibody* akan digabungkan dengan nanopartikel emas melalui proses adsorbs kapilaritas untuk membentuk konjugat antibodi-nanopartikel emas atau *antibody* berlabel emas. Antigen akan dilekatkan pada garis uji dan antibodi universal akan dilekatkan pada garis kontrol. Ketika antigen berikatan dengan antibodi, maka garis uji akan menjadi bwewarna. Larutan sampel yang ditambahkan ke bantalan sampel akan mengalir ke arah bantalan penyerap, dan melewati bantalan konjugat yang mengandung antibodi berlabel nanopartikel emas. Jika larutan sampel mengandung zat yang akan diuji, maka antibodi berlabel emas tersebut akan bereaksi dengan antigen pada garis uji dan garis uji menjadi berwarna merah.



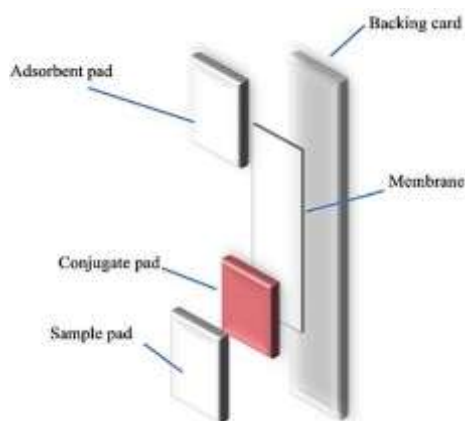
GAMBAR 8 PRINSIP STRIP IMUNOKROMATOGRAFI TIPE LATERAL FLOW
(SUMBER: KUSWANDI ET AL., 2017)

Secara umum, terdapat dua format dasar dalam imunokromatografi yaitu format *sandwich* dan format kompetitif, tergantung dari ukuran dan sifat molekul yang ditargetkan. Pada format *sandwich* biasa digunakan untuk menguji analit yang berukuran besar dan memiliki beberapa situs antigenic, sedangkan format kompetitif digunakan untuk menguji

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

analit yang lebih kecil dan hanya memiliki satu situs antigenic saja, sehingga tidak dapat mengikat dua antibody secara bersamaan. Tahapan imunokromatografi untuk mendeteksi zat uji atau analit terdiri dari beberapa tahapan, yaitu persiapan antibody terhadap analit target, persiapan label, pelabelan molekul antibody, perakitan semua komponen ke plat penopang, aplikasi sampel dan mendapatkan hasil.

Imunokromatografi memiliki membrane nitro selulosa sebagai membrane kapiler, antibody atau antigen spesifik yang difiksasi pada garis uji T (*test line*), protein rekombinan atau antibody lain yang difiksasi di garis kontrol C (*control line*), dan antibody yang dilabel dengan pewarna.



GAMBAR 9 SKEMA KOMPONEN IMUNOKROMATOGRAFI
(SUMBER: NUNTAWONG ET AL., 2022)

Terdapat beberapa keuntungan dari metode pengujian menggunakan imunokromatografi yaitu memberikan hasil dalam waktu yang relative cepat selama 15-20 menit, stabil dalam jangka panjang, dan relatif murah untuk diproduksi. Keunggulan tersebut membuat pengujian imunokromatografi cocok diaplikasikan langsung di tempat karena mudah digunakan dan tidak memerlukan bantuan instrumentasi khusus. Selain itu, terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas kinerja metode dalam parameter strip imunokromatografi diantaranya adalah ukuran partikel emas (GNPs atau *gold nanoparticles*), kondisi konjugasi antibody dengan nanopartikel emas, konsentrasi antibody di zona penangkap, dan efek penggunaan zat penghambat atau *blocking substances* dan buffer kimia yang berbeda dalam preparasi strip.

6. Prinsip Western Blotting

Western blotting (WB), juga dikenal sebagai imunoblotting, adalah teknik laboratorium utama yang digunakan secara luas untuk menganalisis ekspresi protein dan modifikasi pasca-translasi dalam sampel biologis. Metode ini bergantung pada pengikatan spesifik antibody terhadap protein target, yang memungkinkan para peneliti untuk mendeteksi dan mengukur

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

protein yang diinginkan. WB melibatkan beberapa langkah rumit, mulai dari isolasi sampel protein dan elektroforesis gel hingga inkubasi antibodi dan deteksi sinyal. Dalam panduan komprehensif ini, akan memandu melalui prinsip, dan prosedur Western blotting.

Teknik WB pada dasarnya digunakan untuk mengukur tingkat ekspresi protein dan modifikasinya dalam sampel jaringan yang dihomogenisasi dan sel yang dilisiskan. WB bergantung pada prinsip ketersediaan paratope antibodi spesifik terhadap epitope antigen diu (protein yang diminati). Selama WB, antibodi yang digunakan tidak hanya ditujukan terhadap protein yang diminati tetapi juga modifikasi kimiawi spesifiknya termasuk glikosilasi dan fosforilasi residu asam amino yang ada di dalamnya. WB mencakup denaturasi protein dalam sampel jaringan yang dihomogenisasi dan sel yang dilisis yang selanjutnya mengalami elektroforesis gel akrilamida lalu dipisahkan berdasarkan ukuran, dan selanjutnya ditransfer ke membran nilon. Membran selanjutnya diinkubasi dengan antibodi yang bereaksi dengan protein yang diminati dengan mengikat antigen spesifiknya. Kompleks Antigen-Antibodi yang dihasilkan umumnya divisualisasikan menggunakan sistem uji chemiluminescent sinar-X atau dengan menggunakan sistem dokumentasi gel (Vayanaperumal, 2023).

Prosedur dalam melakukan WB harus disesuaikan dengan tahapan berikut ini :

1. Ekstraksi Protein Seluler

Langkah pertama dalam Western Blot adalah mengekstraksi protein seluler dari campuran kompleks protein intraseluler dan ekstraseluler. Ini dapat dilakukan pada jaringan, sel, atau bahan biologis lainnya. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan sampel yang mewakili sebanyak mungkin protein yang ada (Singh et al, 2021)

2. Kuantifikasi dan Elektroforesis

Setelah ekstraksi, langkah selanjutnya melibatkan kuantifikasi konsentrasi protein dan pemisahan elektroforesis protein dalam matriks gel. Ini memungkinkan pemisahan protein berdasarkan ukuran dan muatan listriknya, menghasilkan pola pita unik yang mencerminkan keberagaman protein dalam sampel.

3. Transfer ke Membran

Pita protein yang dipisahkan kemudian dipindahkan ke membran dengan afinitas tinggi terhadap protein. Hal ini memungkinkan protein berpindah dari gel ke membran, menciptakan representasi yang lebih stabil dan dapat diatasi untuk

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

langkah-langkah berikutnya.

4. Pemblokiran Membran

Sebelum mendeteksi protein tertentu, membran “diblokir” untuk mengurangi pengikatan nonspesifik. Ini dilakukan dengan menggunakan bahan yang sesuai misal albumin ke membran untuk menutupi situs pengikatan yang tidak spesifik.

5. Deteksi Antigen

Langkah penting selanjutnya adalah mendeteksi antigen, yaitu protein yang ingin diidentifikasi. Ini dilakukan dengan menggunakan antibodi yang spesifik untuk protein tersebut. Antibodi ini berinteraksi dengan protein yang dicari dan membentuk kompleks antigen-antibodi yang dapat dideteksi.

6. Inkubasi dengan Antibodi Sekunder

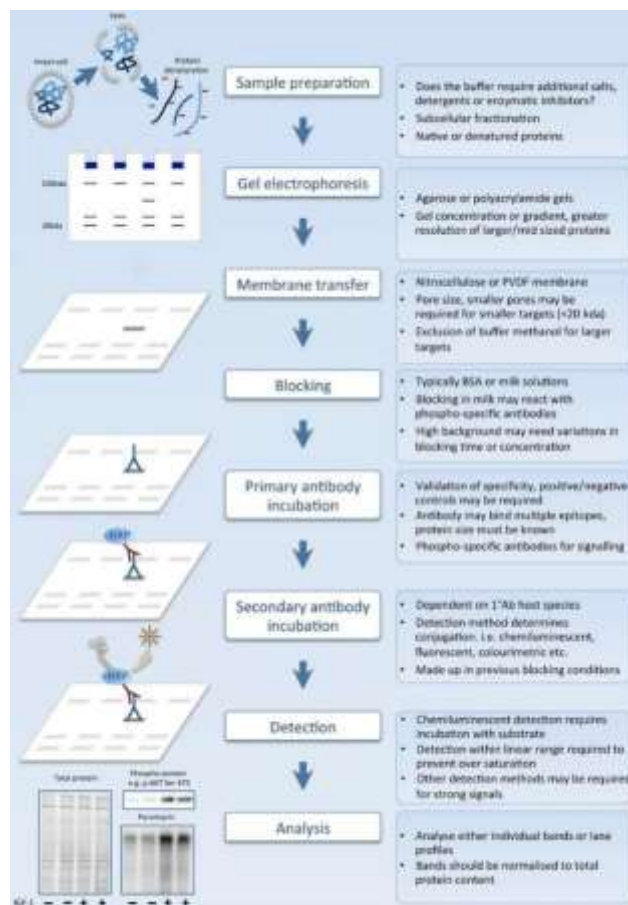
Selanjutnya ialah menginkubasi membran dengan antibodi sekunder berlabel, seperti kemiluminesen atau fluoresensi. Langkah ini memperkuat sinyal dan memfasilitasi deteksi protein dengan lebih efektif.

7. Pengembangan dan Deteksi Sinyal

Kemudian kita perlu melakukan proses pengembangan untuk menghasilkan sinyal yang dapat terdeteksi. Sinyal ini seharusnya secara teoretis sebanding dengan derajat pengikatan antigen-antibodi yang terjadi selama langkah sebelumnya.

8. Kuantifikasi dengan Densitometri

Langkah terakhir melibatkan kuantifikasi pita yang dihasilkan menggunakan perangkat lunak densitometri. Ini memungkinkan peneliti untuk mengukur intensitas pita, yang dapat dihubungkan dengan jumlah relatif protein dalam sampel. Lebih lanjut, anda dapat melihat infografik berikut ini.



GAMBAR 10 PROSEDUR WESTERN BLOTTING (SUMBER : BASS ET AL, 2016)

7. Prinsip RIA

Radioimmunoassay (RIA) merupakan salah satu teknik immunoassay sensitif yang membantu dalam penentuan antigen atau antibodi dalam sampel dengan bahan berlabel berupa radioisotop. Metode ini merupakan jenis interaksi antigen-antibodi secara in vitro. Radioisotop digunakan sebagai pengganti enzim sebagai label untuk dikonjugasikan dengan antigen atau antibodi, teknik pendeteksian kompleks antigen-antibodi disebut radioimmunoassay.

Prinsip pemeriksaan ini yaitu antigen dan antibodi berikatan secara spesifik membentuk kompleks Ag-Ab. Antigen dapat diberi label atau dikonjugasikan dengan radioisotop. Biasanya dipakai metoda Radioimmunoassay Competitive yaitu Antigen yang tidak berlabel dari sampel bersaing dengan antigen berlabel radioisotop untuk mengikat paratop antibodi tertentu. Antigen yang tidak berlabel ketika berikatan dengan antibodi, meningkatkan jumlah antigen berlabel radioisotop bebas dalam larutan. Oleh karena itu konsentrasi antigen berlabel bebas berbanding lurus dengan antigen tidak berlabel yang terikat.

Pada Radioimmunoassay Competitive terjadi tiga hal:

- Reaksi imun yaitu pengikatan antigen, antibodi.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Reaksi pengikatan kompetitif atau perpindahan kompetitif (Ini memberikan spesifisitas).
- Pengukuran emisi radio (Ini memberikan sensitivitas).

8. Prinsip CMIA

CMIA (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*) adalah metode imunodiagnostik berbasis reaksi antigen-antibodi yang menggunakan mikropartikel paramagnetik dan reaksi kimia berpendar (*chemiluminescence*) untuk mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi dalam sampel biologis, seperti darah atau serum. CMIA memiliki tingkat sensitivitas yang tidak kalah dengan prinsip deteksi lainnya. Berikut ini merupakan prinsip kerja CMIA :

1. Imobilisasi Antigen/Antibodi

Mikropartikel paramagnetik dilapisi dengan antibodi atau antigen spesifik tergantung pada target yang ingin dideteksi.

2. Reaksi Antigen-Antibodi

Sampel pasien (misalnya serum) ditambahkan. Jika mengandung antigen atau antibodi target, maka akan terjadi ikatan spesifik dengan partikel tersebut.

3. Penambahan Konjugat Berlabel Chemiluminescence

Setelah pencucian, ditambahkan konjugat yang mengandung enzim ester akridinium. Enzim ini akan menghasilkan cahaya saat bereaksi dengan substrat tertentu.

4. Deteksi Cahaya (Chemiluminescence)

Intensitas cahaya yang dihasilkan diukur oleh detektor. Jumlah cahaya sebanding dengan konsentrasi antigen/antibodi dalam sampel.

9. Prinsip *Viral load*

Viral load atau muatan virus merupakan parameter kuantitatif yang mengukur jumlah partikel virus atau materi genetik virus dalam sampel biologis, biasanya dinyatakan dalam satuan kopi per mililiter (copies/mL) plasma atau serum (Li et al., 2020). Pengujian *viral load* telah menjadi alat diagnostik esensial dalam monitoring terapi antiretroviral dan deteksi berbagai patogen virus misalnya HIV, dengan aplikasi yang semakin berkembang dalam era pandemi COVID-19 (Pham et al., 2022).

A. Prinsip Dasar *Viral load*

1. Amplifikasi Asam Nukleat

Metode *viral load* berdasarkan pada deteksi RNA virus dalam plasma atau DNA dalam leukosit menggunakan teknologi polymerase chain reaction (PCR), branched-chain DNA (bDNA), atau amplifikasi berbasis urutan asam nukleat (Li et al., 2020). Prinsip dasar dari pengujian *viral load* adalah deteksi dan kuantifikasi materi genetik virus melalui teknik amplifikasi molekuler yang memungkinkan deteksi virus bahkan dalam jumlah yang sangat kecil.

2. Teknologi Digital Droplet PCR

Penggunaan droplet digital PCR (ddPCR) telah terbukti superior dalam mengukur *viral load* pada berbagai jenis spesimen (Zheng et al., 2020). Teknologi ddPCR memberikan sarana yang lebih akurat untuk memantau *viral load*, terutama dalam sampel dengan konsentrasi virus rendah, dan memungkinkan kuantifikasi yang lebih presisi dibandingkan metode PCR konvensional.

3. Teknologi Real-Time RT-PCR

Real-time RT-PCR menggunakan teknologi yang sepenuhnya otomatis dan dapat mengkuantifikasi RNA virus dengan batas deteksi terendah sekitar 500 copies/ml (Ford et al., 2019). Teknologi ini memungkinkan deteksi dan kuantifikasi simultan dalam satu reaksi, memberikan hasil yang cepat dan akurat.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

B. Aplikasi Metode *Viral load*

1. Monitoring Terapi HIV

Pengujian *viral load* pada penderita HIV membantu memantau efektivitas terapi antiretroviral (ART), namun masih sebagian besar diuji menggunakan *platform* berbasis laboratorium sentral yang memiliki waktu pemrosesan yang lama (Drain et al., 2022)

2. Diagnostik dan Monitoring COVID-19

Viral load SARS-CoV-2 dan deteksi virus infeksius dalam saluran pernapasan merupakan dua parameter kunci untuk memperkirakan tingkat infeksius (Killingley & Mann, 2022). *Viral load* SARS-CoV-2 mencapai puncaknya dari sampel saluran pernapasan atas sekitar onset gejala, dengan *viral load* dari sampel sputum mungkin lebih tinggi daripada sampel saluran pernapasan atas (Cevik et al., 2021).

10. Prediksi Mortalitas COVID-19

Viral load SARS-CoV-2 pada saat diagnosis telah terbukti sebagai prediktor independen mortalitas COVID-19 (Pujadas et al., 2020). *Platform* deteksi SARS-CoV-2 saat ini melaporkan hasil kualitatif, namun teknologi berbasis RT-PCR memungkinkan perhitungan *viral load* yang berkorelasi dengan risiko transmisi dan keparahan penyakit.

11. Implementasi *Point-of-Care Testing*

Pengembangan teknologi *point-of-care* untuk pengujian *viral load* HIV telah menjadi fokus utama untuk meningkatkan akses testing di daerah dengan sumber daya terbatas (Ford et al., 2019). Teknologi ini memungkinkan pengujian dengan waktu pemrosesan yang lebih singkat dan mengurangi kompleksitas peralatan yang diperlukan.

a. Inovasi

Metode *viral load* telah berkembang menjadi teknologi diagnostik yang esensial dalam manajemen penyakit virus, dengan aplikasi yang meluas dari monitoring HIV hingga diagnostik COVID-19. Inovasi teknologi seperti digital droplet PCR, *point-of-care testing*, dan *pooled testing* terus dikembangkan untuk meningkatkan akses dan efisiensi pengujian. Meskipun demikian, tantangan dalam implementasi di daerah dengan sumber daya terbatas dan kebutuhan untuk

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

meningkatkan kualitas data tetap menjadi fokus utama dalam pengembangan sistem pengujian *viral load* yang berkelanjutan dan *equitable*.

EVALUASI



1. Seorang pasien HIV berusia 35 tahun melakukan pemeriksaan *viral load* secara rutin. Hasil pemeriksaan menunjukkan *viral load* 50.000 *copies/mL*. Setelah 6 bulan menjalani terapi antiretroviral (ARV), *viral load* turun menjadi undetectable (<20 *copies/mL*). Apa yang dapat disimpulkan dari hasil pemeriksaan tersebut?
 - A. Pasien sudah sembuh dari HIV
 - B. Terapi ARV efektif dalam menekan replikasi virus
 - C. Pasien tidak perlu melanjutkan terapi ARV
 - D. *Viral load* akan tetap undetectable selamanya
 - E. Pasien sudah kebal terhadap HIV
2. Prinsip dasar Western blot adalah deteksi protein spesifik melalui tahapan yang berurutan. Manakah urutan tahapan yang BENAR dalam prosedur Western blot?
 - A. Elektroforesis → Transfer → *Blocking* → Inkubasi antibodi primer → Inkubasi antibodi sekunder → Deteksi
 - B. Transfer → Elektroforesis → *Blocking* → Inkubasi antibodi sekunder → Inkubasi antibodi primer → Deteksi
 - C. *Blocking* → Elektroforesis → Transfer → Inkubasi antibodi primer → Inkubasi antibodi sekunder → Deteksi
 - D. Elektroforesis → *Blocking* → Transfer → Inkubasi antibodi primer → Inkubasi antibodi sekunder → Deteksi
 - E. Transfer → *Blocking* → Elektroforesis → Inkubasi antibodi primer → Inkubasi antibodi sekunder → Deteksi
3. Dalam Western blot, Ganti dengan: ada tahap penambahan *blocking buffer* seperti BSA atau susu skim. Apakah fungsi dari penambahan bahan tersebut?
 - A. Memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul.
 - B. Mentransfer protein dari gel ke membran.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- C. Mencegah ikatan non-spesifik antibodi dengan membran.
 - D. Mengaktifkan enzim pada antibodi sekunder.
 - E. Melarutkan protein sampel sebelum elektroforesis
4. Prinsip dasar Immunochromatography Test (ICT) didasarkan pada fenomena fisik dan imunologi. Manakah pernyataan yang PALING TEPAT mengenai prinsip kerja ICT?
- A. Pemisahan antigen berdasarkan ukuran molekul melalui membran berpori
 - B. Reaksi antigen-antibodi yang divisualisasi melalui partikel berwarna yang bermigrasi secara lateral.
 - C. Denaturasi protein target menggunakan suhu tinggi pada strip test.
 - D. Elektroforesis antigen pada membran nitroselulosa.
 - E. Presipitasi antigen-antibodi dalam larutan buffer khusus
5. Dalam ICT (Rapid Test), terdapat beberapa area penting pada *strip test*. "Test Line" pada strip tersebut?
- A. Tempat sampel diteteskan pertama kali.
 - B. Lokasi antibodi penangkap (*capture antibody*) yang spesifik terhadap antigen target.
 - C. Area penyimpanan konjugat antibodi-partikel emas.
 - D. Zona kontrol untuk memastikan validitas hasil tes.
 - E. Tempat migrasi buffer pencuci
6. Pada metode CMIA (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*), prinsip deteksi didasarkan pada reaksi kemiluminesensi. Manakah pernyataan yang benar mengenai mekanisme deteksi dalam CMIA?
- A. Enzim pada konjugat antibodi mengkatalisis substrat kromogenik menghasilkan warna yang dapat diukur secara spektrofotometri.
 - B. Partikel magnetik yang terikat kompleks antigen-antibodi dipisahkan menggunakan medan magnet, kemudian diukur turbiditasnya.
 - C. Substrat kemiluminesensi (seperti luminol) bereaksi dengan enzim label menghasilkan emisi cahaya yang dideteksi oleh fotomultiplier.
 - D. Fluorofor pada antibodi dieksitasi dengan sinar UV dan emisi fluoresensinya diukur pada panjang gelombang tertentu.
 - E. Partikel emas koloid pada konjugat antibodi menghasilkan absorbansi yang proporsional dengan konsentrasi analit

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

7. Dalam metode ELISA sandwich, terdapat beberapa tahapan yang harus dilakukan secara berurutan. Manakah urutan tahapan yang BENAR dalam metode tersebut?
- A. *Coating* antibodi penangkap → *Blocking* → Penambahan sampel → Antibodi deteksi → Substrat enzim → *Stop solution*.
 - B. Penambahan sampel → *Coating* antibodi penangkap → *Blocking* → Antibodi deteksi → Substrat enzim → *Stop solution*.
 - C. *Blocking* → *Coating* antibodi penangkap → Penambahan sampel → Antibodi deteksi → Substrat enzim → *Stop solution*.
 - D. *Coating* antibodi penangkap → Penambahan sampel → *Blocking* → Antibodi deteksi → Substrat enzim → *Stop solution*.
 - E. *Coating* antibodi penangkap → *Blocking* → Antibodi deteksi → Penambahan sampel → Substrat enzim → *Stop solution*
8. Prinsip deteksi pada metode ECLIA (*Electrochemiluminescent Immunoassay*) menggunakan teknologi yang berbeda dari *immunoassay* konvensional. Manakah pernyataan yang paling tepat mengenai mekanisme deteksi dalam ECLIA?
- A. Enzim peroksidase mengkatalisis substrat TMB menghasilkan warna biru yang diukur secara spektrofotometri.
 - B. Partikel magnetik yang terlabel ruthenium mengalami reaksi elektrokemiluminesensi menghasilkan emisi cahaya ketika diberi stimulasi listrik.
 - C. Fluorofor pada antibodi dieksitasi dengan laser dan emisi fluoresensinya dideteksi secara *real-time*.
 - D. Substrat kemiluminesensi bereaksi dengan alkaline phosphatase menghasilkan cahaya yang diukur dengan luminometer.
 - E. Partikel emas koloid pada konjugat antibodi menghasilkan sinyal *surface plasmon resonance*
9. Dalam uji fiksasi komplemen, sistem indikator yang digunakan untuk mendeteksi adanya fiksasi komplemen terdiri dari komponen apakah sistem indikator pada tes tersebut?
- A. Sel darah merah kelinci + anti-human immunoglobulin.
 - B. Sel darah merah domba + hemolisin (antibodi anti-sel darah merah domba).
 - C. Partikel lateks + antibodi spesifik antigen.
 - D. Substrat kromogenik + enzim peroksidase.
 - E. Fluorofor + antibodi berlabel fluoresen

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

10. Dalam metode RIA (*Radioimmunoassay*), prinsip dasar pengukuran didasarkan pada kompetisi antara antigen berlabel radioaktif dengan antigen dalam sampel. Manakah pernyataan yang benar mengenai interpretasi hasil dalam RIA kompetitif?
- A. Semakin tinggi konsentrasi antigen dalam sampel, semakin tinggi radioaktivitas yang terdeteksi.
 - B. Semakin tinggi konsentrasi antigen dalam sampel, semakin rendah radioaktivitas yang terdeteksi.
 - C. Radioaktivitas yang terdeteksi tidak berhubungan dengan konsentrasi antigen dalam sampel.
 - D. Radioaktivitas hanya terdeteksi jika tidak ada antigen dalam sampel.
 - E. Radioaktivitas yang terdeteksi selalu konstan tidak tergantung konsentrasi antigen

Kunci Jawaban

- 1. B
- 2. A
- 3. C
- 4. B
- 5. B
- 6. C
- 7. A
- 8. B
- 9. B
- 10. B

DAFTAR PUSTAKA



Alhajj M, Zubair M and Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.

Amini, M., Pourmand, M., Faridi-Majidi, R., Heiat, M., Mohammad, N., Safari, M., Noorbakhsh, F., & Baharifar, H. 2020. Optimising Effective Parameters to Improve Performance Quality in Lateral Flow Immunoassay for Detection of PBP2a in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Experimental Nanoscience*. Vol 15 (1), 266-279. <https://doi.org/10.1080/17458080.2020.1775197>.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015; 72: 4–15.
- Jacob, K.D., Hooten, N.N., Trzeciak, A.R., Evans, M.K., 2013. Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease. *Mech Ageing Dev*, 134(0): 139-157.
- Bass, J.J., Wilkinson, D.J. Rankin, D. Philips, B.E. Szewczyk, N.J. Smith, K. Atherton, P.J. 2026. An Overview of Technical Considerations for Western Blotting Applications to Physiological Research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. Vol 27 (1). 4 – 25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>.
- Bhuiyan, S., Ahmed, A., Rahman, M., & Karim, M. (2022). Sample handling in automated immunoassay platforms: Challenges and best practices. *Clinical Biochemistry*, 97, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.12.004>.
- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A. E., Schafers, J., & Ho, A. (2021). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV *viral load* dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, 2(1), e13-e22.
- Drain, P. K., Dorward, J., Bender, A., Lillis, R., Marinucci, F., Sacks, J., ... & Garrett, N. (2022). Point-of-care HIV *viral load* testing: an essential tool for a sustainable global HIV/AIDS response. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3), e00097-18.
- Ford, N., Doherty, M., Shubber, Z., Meintjes, G., Williams, B., Ajose, O., ... & Hallett, T. B. (2019). HIV *viral load* monitoring and mortality risk among people living with HIV. *AIDS*, 33(15), 2375-2381.
- Gonzalez, V., Ruiz, A., & Delgado, M. (2021). Preanalytical variables and their impact on immunoassay accuracy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 59(4), 635–643. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1234>.
- Harun, H., Tenri, E., Ulang, B. Tes CA 19-9 Dengan Metode Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA). <https://www.scribd.com/doc/189839418/Tes-Ca-19-9-ELFA-2>
- Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju, C. 2023. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol* 2023; 2612: 1–17.
- Hidayat, R., Wulandari, P. (2021). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique Guideline. *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, 5(5), 447-453. <https://doi.org/10.32539/bsm.v5i5.228>.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Jacob, K.D., Hooten, N.N., Trzeciak, A.R., Evans, M.K., 2013. Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease. *Mech Ageing Dev*, 134(0): 139-157.
- Jayalie,V.F., Surya, M., & Nainggolan, L. 2016. Prinsip Imunokromatografi Imunoglobulin a Saliva sebagai Metode Deteksi Dini dan Cepat Virus Dengue secara Non-Invasif. *Jurnal Mahasiswa Kedokteran Indonesia*, 22-28. <https://www.researchgate.net/publication/304677417>,
- Jiang, W., Zeng, L., Liu, L., Song, S., & Kuang, H. 2017. Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Phenylethanolamine A. *Food and Agricultural Immunology*. Vol 29 (1), 182-192. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1364709>.
- Jiskoot W, Kijanka G, Randolph TW, et al. Mouse Models for Assessing Protein Immunogenicity: Lessons and Challenges. *J Pharm Sci* 2016; 105: 1567–1575.
- Kamil., Siti, R., Muhammad, K., Muhammad, S.A., Wahid. 2021. Pemeriksaan Alpha-Fetoprotein (AFP) Metode ELFA Menggunakan Alat Vidas Biomerieux Di Laboratorium Immuno Serologi RSUD Abdul Wahab Sjahranie Samarinda. *Jurnal Teknologi Laboratorium Medik Borneo* 2021, 1 (1), 42 – 45.
- Killingley, B., & Mann, A. J. (2022). SARS-CoV-2 *viral load* and shedding kinetics. *Nature Reviews Microbiology*, 21(3), 147-161.
- Konstantinou, G.N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2017;1592:79-94. [PubMed]
- Kuswandi, B., Gani, A., & Ahmad, M. 2017. Immuno Strip Test for Detection of Pork Adulteration in Cooked Meatballs. *Food Bioscience*. Vol 19, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.001>
- Li, C., Zhao, C., Bao, J., Tang, B., Wang, Y., & Gu, B. (2020). Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Clinica Chimica Acta*, 510, 35-46.
- Makatini, Z., Myer, L., Patel, F., Newell, M. L., Fatti, G., Grimwood, A., & Technau, K. G. (2025). Implementation of pooled testing to increase access to routine *viral load* monitoring for people living with HIV on antiretroviral therapy. *Scientific Reports*, 15(1), 1-10
- Nuntawong, P., Putalun, W., Tanaka, H., Morimoto, S., & Sakamoto, S. 2022. Lateral Flow Immunoassay for Small- Molecules Detection in Phytoproducts: a Review. *Journal of Natural Medicine*. Vol 76 (3), 521-545. <https://doi.org/10.1007/s11418-022-01605-6>.
- Pham, T. D., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. (2022). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 13(1), 10-30.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Premnath, S. M., & Zubair, M. (2023). Electrochemiluminescence method. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580516/>.
- Pujadas, E., Chaudhry, F., McBride, R., Richter, F., Zhao, S., Wajnberg, A., & Cordon-Cardo, C. (2020). SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(9), e70.
- Roche Diagnostics. (2021). *Elecsys® assays method sheets*. Roche. Retrieved from <https://diagnostics.roche.com/>.
- Sajid, M., Kawde, A.-N., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.
- Santosa, B. (2020). Buku Ajar: Teknik Elisa Metode Elisa untuk Pengukuran Protein Metallothionein pada Daun Padi Ir Bagendit. Semarang: Unimus Press.
- Sequeira, S. (2019). An overview on interference in clinical immunoassays: A cause for concern. *Hamdan Medical Journal*, 12(4), 158–163. https://doi.org/10.4103/HMJ.HMJ_3_19
- Singh, K. K. Gupta, A. Bharti, C. Sharma, H. 2021. Emerging Techniques of Western Blotting For Purification And Analysis of Protein. *Future Journal of Pharmaceutical Science*. 7(239), 1 – 14. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00386-1>
- Shah, K., Maghsoudlou, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)* 2016; 77: C98–C101.
- Srisrattakarn, A., Tippayawat, P., Chanawong, A., Tavichakorntrakool, R., Daduang, J., Wonglakorn, L., & Lulitanond, A. 2020. Development of a Prototype Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of *Staphylococcal* Protein a in Positive Blood Culture Samples. *Diagnostic*. Vol 10 (794), 1-16. doi:10.3390/diagnostics10100794.
- Su, H., Lin, Y., Wang, X., & Liu, L. (2024). Multiplex electrochemiluminescence immunoassay for biomarker panels. *Scientific Reports*, 14(1), 2231. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-04231-x>
- Tabatabaei MS and Ahmed M. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol* 2022; 2508: 115–134.
- Vayanaperumal, K. Western Blotting a review: Principle, Protocol and Problem Solving. *Journal of GCS Advanced Research and Reviews*. 16(03), 178-187. <https://doi.org/10.30574/gscarr.2023.16.3.0324>.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Vidas AFP. (2015). Kit Insert Reagen Vidas AFP Metode ELFA. Biomerieux SA.

Waluyo, J., Hari, N., Agus, A. Kajian Teknoekonomi Perangkat Pencacah Radioimmunoassay (RIA) IP.8. Pusat Kemitraan Teknologi Nuklir. TEKNOEKONOMI ISSN 1978-2918. <https://media.neliti.com/media/publications/17889-ID-kajian-teknoekonomi-perangkat-pencacah-radioimmunoassay-ria-ip8.pdf>

Wang, X., Wang, Y., Ma, L., et al. (2015). *Development of an improved competitive ELISA based on a monoclonal antibody against lipopolysaccharide for the detection of bovine brucellosis*. BMC Veterinary Research, 11, 118. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0436-3>

Weber J, Peng H and Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. Exp Mol Med 2017; 49: e305.

Yang, M. et al. (2023). *Co-reactant-enhanced ECL detection systems for immunosensing applications*. Biosensors & Bioelectronics, 226, 115119.

Zhang, M., Li, Y., Chen, Q., & Zhou, Y. (2022). Electrochemiluminescence immunoassay technologies for protein biomarkers: Recent advances and future trends. *Biosensors and Bioelectronics*, 198, 113834. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113834>

Zheng, S., Fan, J., Yu, F., Feng, B., Lou, B., Zou, Q., ... & Liang, T. (2020). *Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study*. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1-11.

**MODUL
2**

PEMERIKSAAN MARKER HEPATITIS

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan Antigen HbSAg dengan metode ELISA
2. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan Antibodi Anti-HBS dengan metode ELISA

PENDAHULUAN



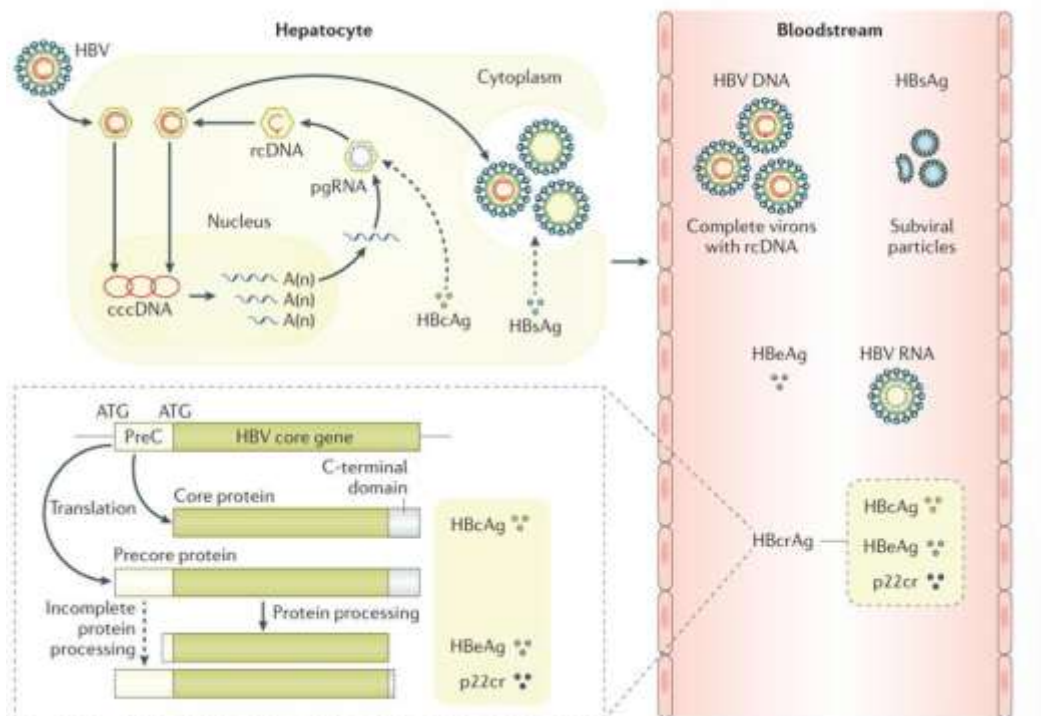
Virus Hepatitis B (HBV) menyebabkan infeksi kronis dan merupakan masalah kesehatan utama di seluruh dunia (Yuen *et.al.*, 2018). Sekitar 350 juta orang saat ini terinfeksi HBV kronis, sebagian besar di antaranya berada di Asia dan Afrika. Sekitar 15–40% pasien yang terinfeksi mengalami sirosis, gagal hati, atau kanker (Qin *et.al.*, 2024; Zong *et.al.*, 2019). HBV merupakan virus DNA berselubung yang termasuk dalam famili *Hepadnaviridae*. Selubung tersebut mengelilingi nukleokapsid ikosahedral, yang membungkus genom DNA sirkuler beruntai ganda (rcDNA) yang sebagian berukuran ~3,2 kb (Yuen *et.al.*, 2018). Infeksi hepatitis B kronis didefinisikan sebagai masih terdeteksinya antigen permukaan hepatitis B (HBsAg; glikoprotein virus) dalam serum setelah 6 bulan infeksi. Penularan HBV terutama melalui darah dan cairan tubuh, termasuk penularan perinatal dan bayi baru lahir yaitu penularan dari ibu ke anakserta cara seksual dan parenteral (Yuen *et.al.*, 2018).

Perjalanan alami infeksi virus hepatitis B (HBV) ditentukan oleh hubungan timbal balik antara replikasi virus dan kekebalan tubuh inang. Deteksi serologis protein virus (antigen permukaan hepatitis B (HBsAg)) dan antibodi yang diproduksi inang (anti-HBs) biasanya dilakukan untuk mengevaluasi status infeksi HBV (Kwak *et.al.*, 2019). Penanda serologis utama hepatitis B akut dan kronis adalah deteksi HBsAg dalam serum, Pasien dengan pemulihan klinis infeksi HBV, antibodi

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

terhadap HBsAg (antiHBs) dan antigen inti hepatitis B (HBcAg; anti-HBc) mungkin dapat dideteksi. Antibodi anti-HBc mungkin tetap dapat dideteksi pada pasien dengan infeksi HBV kronis, dan penanda serum lainnya dapat menilai status virologi penyakit. Secara konvensional, infeksi HBV kronis didiagnosis dengan tes positif berulang untuk HBsAg, 6 bulan setelah tes positif awal. Sebaliknya, setelah pemulihan dari infeksi HBV akut, kadar HBsAg menjadi tidak terdeteksi. Konsentrasi HBsAg berbeda selama berbagai fase penyakit longitudinal dan umumnya lebih tinggi pada individu dengan HBeAg yang terdeteksi (Seto *et.al.*, 2014). Total anti-HBc yang diukur dengan immunoassay merupakan penanda infeksi HBV akut, kronis, dan sembuh. Selain itu, keberadaan anti-HBc dapat memprediksi reaktivasi HBV yang terkait dengan terapi immunosupresif. Immunoglobulin M (IgM) anti-HBc terdeteksi selama infeksi HBV akut dan juga terdeteksi selama eksaserbasi HBV kronis ini mungkin menjadi satu-satunya penanda serologis yang terdeteksi pada hepatitis B akut (Yuen *et.al.*, 2018). Kadar anti-HBs digunakan sebagai marker terhadap hepatitis B virus, jika kadar >- 10 IU/L dianggap protektif terhadap inveksi HBV (Kasih, 2017).

Selain tes serum, penilaian status fibrosis dan sirosis pada pasien dengan infeksi HBV kronis juga penting untuk prognosis penyakit, indikasi pengobatan, dan manajemen. Tes penyakit hati yang akurat tetapi invasif adalah biopsi hati, sedangkan tes noninvasif meliputi transient elastography (untuk mengukur kekakuan hati) atau berbagai biomarker serum (Castera *et.al.*, 2015).



GAMBAR 11 SIKLUS REPLIKASI HBV DAN PENANDA VIRUS UTAMA (YUEN ET.AL., 2018)

Setelah virus masuk ke hepatosit melalui polipeptida pengangkut bersama reseptor afinitas tinggi natrium taurocholate (diagram kiri atas), DNA sirkuler rileks (rcDNA) virus hepatitis B (HBV)

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

memasuki nukleus dan diubah menjadi DNA sirkuler tertutup kovalen (cccDNA) dalam bentuk minikromosom cetakan transkripsi utama virus. Produk transkripsi diekspor dari nukleus, dengan RNA pregenomik yang lebih besar (pgRNA) dimasukkan ke dalam kompleks replikasi dalam sitoplasma yang terdiri dari polimerase virus dan protein inti. Pada kompleks replikasi ini, pgRNA ditranskripsi balik menjadi DNA HBV yang dapat menjalani pengemasan lebih lanjut. Kapsid yang mengandung DNA HBV mengikat protein permukaan HBV pada retikulum endoplasma, ditranslokasi ke dalam lumen sebelum keluar dari hepatosit melalui jalur sekresi dan kemudian dilepaskan sebagai partikel virus dewasa. mRNA yang ditranskripsi dari cccDNA juga menghasilkan berbagai antigen virus, kecuali cccDNA, semua produk virus lainnya (rcDNA HBV, RNA HBV, antigen e hepatitis B (HBeAg), antigen permukaan hepatitis B (HBsAg), antigen inti hepatitis B (HBcAg), dan protein *precore* 22 kDa (p22cr)) mudah diukur dalam darah (diagram kanan).



1. Pemeriksaan Antigen HbSAg Metode ELISA Kualitatif

A. Pra Analitik

1. Prinsip: Sandwich-ELISA (Ab-Ag-Ab HRP)

Strip microwell polistiren dilapisi antibodi monoklonal yang spesifik untuk HBsAg. Sampel selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim (Horseradish peroxidase, HRP). Terjadi reaksi imunologi (HBsAg akan *dicapture* oleh antibodi spesifik dalam fase solid), proses pencucian akan menghilangkan yang tidak terikat. Kromogen yang mengandung Tetramethyl-Benzidine (TMB), [kromogen A] dan urea peroxidase [kromogen B] ditambahkan. Reaksi imun “*sandwich*” akan ditandai dengan perubahan kromogen (tidak berwarna) menjadi biru karena terhidrolisis oleh enzim HRP konjugate. Penambahan *stop solution* (sulfuric acid) akan merubah warna biru menjadi kuning, intensitas warna diukur untuk menunjukkan jumlah HBsAg yang ditangkap di dalam *well*.

2. Jenis sampel

Sampel yang digunakan pada pemeriksaan ini hanya serum atau plasma. Tidak ada persiapan khusus pada pasien sebelum diambil sampelnya. Sampel tidak boleh lipemik atau hemolisis. Sampel yang tidak langsung dilakukan pemeriksaan harus disimpan pada suhu -20°C .

3. Alat dan Bahan

- *Microwell Microplate*
- Mikropipet 50-500 μL dan Tip
- Inkubator/Oven/Waterbath
- ELISA Reader
- Positive Control
- Negative Control
- HRP-Conjugate
- *Wash Buffer* (20x)
- Chromogen Solution A
- Chromogen Solution B
- *Stop Solution*
- Aquades Steril

B. Analitik

1. Prosedur Kerja Pemeriksaan Antigen HbSAg ELISA Kualitatif

- Step 1 (persiapan) : siapkan *well* untuk Blank (A1), NC (B1, C1, D1), PC (E1, F1) dan spesimen uji
- Step 2 (penambahan reagen dan spesimen): masukkan sebanyak 50 μL PC, NC, dan spesimen uji ke *well*
- Step 3 (penambahan HRP-conjugate): masukkan sebanyak 50 μL enzim HRP ke semua *well* kecuali blank
- Step 4 (inkubasi): tutup permukaan *microplate* dan diamkan selama 60 menit pada suhu 37°C
- Step 5 (pencucian): buka penutup *microplate*, tambahkan *washing buffer* sebanyak 400 μL di setiap *well*, keringkan pada *tissue*. Lakukan sebanyak 5X
- Step 6 (pewarnaan): tambahkan kromogen A dan B masing-masing 50 μL ke semua *well*. Diamkan selama 15 menit di suhu 37°C dan kondisi gelap (biru)
- Step 7 (penghentian reaksi): tambahkan 50 μL stop solution ke setiap *well* (kuning)
- Step 8 (pengukuran absorbansi): baca hasil pada absorbansi 450nm dalam waktu 10 menit setelah menghentikan reaksi.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

C. Post Analitik

1. Intrepretasi Hasil HbSAg ELISA

Nilai *cut off* (C.O)

$$C.O = NC \times 2.1$$

Keterangan:

- NC: Rerata nilai kontrol negatif (NC)
- Jika nilai C.O. < 0.05 tetap tulis 0.05

Kriteria yang harus dipenuhi (Jaminan mutu)

$$\text{Blank: } < 0.080$$

$$\text{PC: } \geq 0.080$$

$$\text{NC: } \leq 0.100$$

$$\text{Negatif: } A / C.O. < 1$$

$$\text{Positif: } A / C.O. \geq 1$$

$$\text{Borderline: } A / C.O = 0.9-1.1$$

D. Jurnal Laporan/laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Langkah Kerja :

Hasil : Data pasien

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kesimpulan :

Pembimbing

.....,

20...

Praktikan

() ()

2. Pemeriksaan Anti-HBs Metode ELISA Kuantitatif

A. Pra Analitik

1. Prinsip

Untuk mendeteksi anti-Hbs, kit ini menggunakan metode ELISA antigen "sandwich" yaitu strip *microwell* polistiren dilapisi dengan HBsAg rekombinan. Spesimen serum atau plasma pasien ditambahkan ke mikrowell sebelum penambahan HBsAg kedua yang dikonjugasikan dengan HRP-*Conjugate*. Jika terdapat anti-HBs dalam spesimen, antigen yang dilapisi terlebih dahulu dan konjugat akan terikat pada dua domain variabel antibodi dan selama inkubasi, imunokompleks spesifik yang terbentuk ditangkap pada fase padat. Setelah dicuci untuk menghilangkan spesimen dan HRP-*Conjugate* yang tidak terikat, larutan kromogen yang mengandung TMB dan urea peroksida ditambahkan ke dalam *well*. adanya kompleks antigen-antibodi-antigen (HRP) "Sandwich", kromogen yang tidak berwarna dihidrolisis oleh HRP-*Conjugate* yang terikat menjadi produk berwarna biru. Warna biru berubah menjadi kuning setelah ditambahkan *stop solution* yang mengandung asam sulfat. Intensitas warna diukur dan sebanding dengan jumlah antibodi yang ditangkap dalam *well* dan spesimennya.

2. Jenis Sampel

Sampel yang digunakan pada pemeriksaan ini hanya serum atau plasma. Tidak ada preparasi khusus pada pasien sebelum diambil sampelnya. Sampel tidak boleh lipemik atau hemolisis dan terhindar dari kontaminasi. Sampel yang tidak langsung dilakukan pemeriksaan harus disimpan pada suhu -20°C .

3. Alat dan Bahan

- *Microwell Microplate*
- Mikropipet 50-500 μL dan Tip
- Inkubator/Oven/Waterbath
- *ELISA Reader*
- Standar (0,10,20,40,80,160 mIU/mL)
- *HRP-Conjugate*
- *Wash Buffer* (20x)
- Chromogen Solution A
- Chromogen Solution B
- Stop Solution
- Aquades Steril

B. Analitik

1. Prosedur Pemeriksaan

- Step 1 (persiapan): siapkan *well* untuk Blank (A1), Standar (B1-G, H1-E2), dan spesimen uji
- Step 2 (penambahan reagen dan spesimen): masukkan sebanyak 50 μL standar dan spesimen uji ke *well*.
- Step 3 (penambahan *HRP-conjugate*): masukkan sebanyak 50 μL enzim HRP ke semua *well* kecuali blank
- Step 4 (inkubasi): tutup permukaan *microplate* dan diamkan selama 60 menit pada suhu 37°C
- Step 5 (pencucian): buka penutup *microplate*, tambahkan washing buffer sebanyak 350 μL di setiap *well*, keringkan pada tissue. Lakukan sebanyak 5X
- Step 6 (pewarnaan): tambahkan kromogen A dan B masing-masing 50 μL ke semua *well*. Diamkan selama 15 menit di suhu 37°C dan kondisi gelap (biru)

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Step 7 (penghentian reaksi): tambahkan 50 μL stop *solution* ke setiap *well* (kuning)
- Step 8 (pengukuran absorbansi): baca hasil pada absorbansi 450nm dalam waktu 10 menit setelah menghentikan reaksi.

C. Post Analitik

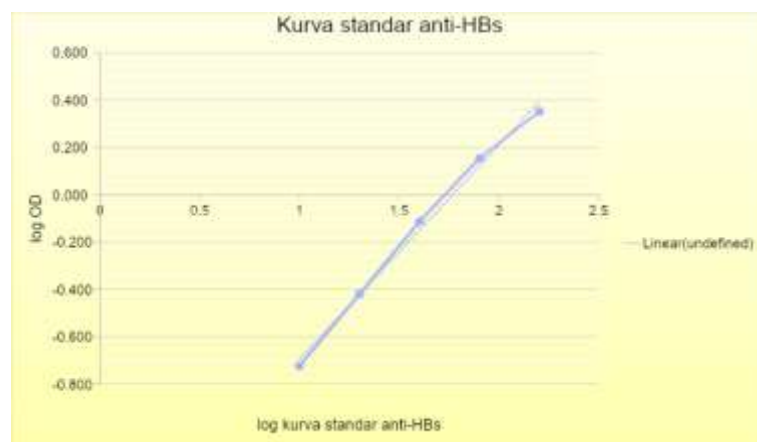
1. Intrepretasi Hasil

- **Calibration: Standard Curve**

Contoh Perhitungan Kurva Standar

Standar (mIU/mL)	Log standar (mIU/mL)	Mean OD (A)	Log Mean OD
10	=LOG10(A4)	0,189	=LOG10(C4)
20		0,380	
40		0,770	
80		1,427	
160		2,249	

- Setelah hasil keluar, blok hasil *log* standar dan hasil *log mean*. Kemudian pilih menu insert--> Chart--> X Y Scatter
- Untuk mengeluarkan fungsi rumus persamaan *regresi linear*, pilih *Chart Design* -> *Quick Layout* --> *Layout 9*



GAMBAR 12 KURVA STANDAR ANTI-HBS

Rumus persamaan:

$y=0,9055x-1,6008$, maka

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

$$x=(y+1,6008)/ 0,9055$$

Sehingga jika OD sampel 0,412 A, diubah ke logaritma =LOG10(0,412) menjadi
0 ,3851

$$x=(y+1,6008)/ 0,9055$$

$$=(-0,3851+1,6008)/ 0,9055$$

$$= 1,34257$$

diubah ke konsentrasi dengan = POWER (10;1,34257) menjadi 22 mIU/mL.

Catatan : konsentrasi sampel dapat diperoleh langsung dengan mengikuti petunjuk program pada ELISA reader.

Hasil tes valid jika kriteria kontrol kualitas terpenuhi

- 1) Hasil OD blanko, yang hanya mengandung kromogen dan stop solution adalah < 0,080 pada 450nm
- 2) OD standar 0 mIU/ml harus <0,100 pada 450/600-650nm atau 450nm setelah blanko
- 3) OD standar 160 mIU/ml harus >1,500 pada 450/600-650nm atau 450nm setelah blank
- 4) Negative Result (S/C.O)= <10 mIU/mL
- 5) Positive Result (S/C.O)= ≥ 10 mIU/mL

D. Jurnal laporan/Laporan sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

Langkah Kerja :

Hasil : Data pasien

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kesimpulan :

Pembimbing Praktikan 20...

() ()

EVALUASI



1. Seorang pria berusia 28 tahun datang ke laboratorium klinik untuk pemeriksaan fungsi hati. Ia mengeluhkan mual, lemas, dan penurunan nafsu makan sejak satu minggu terakhir. Pemeriksaan darah menunjukkan hasil pemeriksaan HBsAg menunjukkan hasil positif titer tinggi. Apakah yang menyebabkan hasil tersebut?
 - A. Bakteri hepatitis B
 - B. Virus hepatitis B
 - C. *Salmonella typhi*
 - D. *E.coli*
 - E. *Treponema pallidum*
2. Seorang pria berusia 35 tahun datang ke laboratorium klinik untuk melakukan skrining hepatitis B. TTLM akan melakukan pemeriksaan HBsAg menggunakan metode ELISA untuk mendeteksi adanya infeksi virus hepatitis B. Sebelum pemeriksaan dimulai, melakukan mengambil sampel sesuai prosedur standar. Jenis sampel apakah yang tepat digunakan dalam pemeriksaan ini?
 - A. Urin
 - B. Saliva
 - C. Whole Blood
 - D. Serum
 - E. Cairan Otak
3. Seorang TTLM sedang melakukan pemeriksaan ELISA untuk mendeteksi keberadaan antigen HBsAg dalam sampel. Selama proses kerja, ia menggunakan beberapa reagen. Salah satu reagen yang digunakan berfungsi sebagai antibodi monoklonal yang sudah terkonjugasi dengan enzim untuk mendeteksi antigen spesifik pada sampel. Apakah reagent tersebut?
 - A. Stop Solution
 - B. HRP-Conjugate
 - C. Chromogen A
 - D. Chromogen B
 - E. Wash buffer
4. Seorang mahasiswa TTLM sedang melakukan pemeriksaan HBsAg menggunakan metode ELISA. Setelah menambahkan sampel dan reagen konjugat ke dalam mikrowell, selanjutnya

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- tahap menghilangkan sisa reagen yang tidak berikatan. Tahap ini penting untuk mengurangi reaksi non-spesifik dan meningkatkan akurasi hasil. Apakah reagent pada tahap tersebut?
- A. Stop Solution
 - B. HRP-Conjugate
 - C. Chromogen A
 - D. Chromogen B
 - E. Wash buffer
5. Seorang TTLM sedang menyelesaikan pemeriksaan HBsAg menggunakan metode ELISA. Setelah penambahan substrat kromogen, larutan dalam mikrowell menunjukkan perubahan warna sebagai hasil reaksi enzimatik. Kemudian menambahkan reagen tertentu untuk menghentikan reaksi tersebut agar warna tidak terus berkembang. Reagent apakah tersebut?
- A. Stop Solution
 - B. HRP-Conjugate
 - C. Chromogen A
 - D. Chromogen B
 - E. Wash buffer
6. Seorang mahasiswa sedang mengikuti praktikum pemeriksaan HBsAg menggunakan metode ELISA. Setelah melalui tahap inkubasi dengan HRP-conjugate dan penambahan reagen kromogen, larutan dalam well berubah menjadi biru, menandakan terjadinya reaksi enzimatik. Untuk menghentikan reaksi tersebut, ia menambahkan stop solution sesuai instruksi. Setelah penambahan stop solution, warna larutan dalam well berubah. Warna apa yang dihasilkan pada well setelah penambahan reagent terakhir tersebut?
- A. Merah
 - B. Kuning
 - C. Hijau
 - D. Biru
 - E. Ungu
7. Seorang TTLM menerima sejumlah sampel serum untuk pemeriksaan HBsAg dengan metode ELISA. Namun, karena keterbatasan, sebagian sampel baru akan dianalisis sekitar satu bulan ke depan. Kepala laboratorium menginstruksikan agar sampel disimpan dengan suhu yang sesuai untuk menjaga stabilitas tanpa merusak integritasnya. Berpakah suhu yang sesuai pada kasus tersebut?
- A. 2-8 °C
 - B. 27°C

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- C. 37°C
 - D. -20°C
 - E. -5°C
8. Seorang mahasiswa sedang melakukan praktikum pemeriksaan HBsAg. Tahapan terakhir pemeriksaan setelah seluruh tahapan selesai, termasuk penambahan stop solution, kemudian membaca nilai absorbansi dari masing-masing sampel pada panjang gelombang tertentu, biasanya 450 nm. Apakah alat yang digunakan untuk pemeriksaan tersebut?
- A. Flowcytometer
 - B. Thermal Cyclcer
 - C. Sentrifus
 - D. Spektrofotometer
 - E. ELISA Reader
9. Seorang pasien menjalani pemeriksaan HBsAg di laboratorium menggunakan metode ELISA. Hasil pengukuran menunjukkan nilai absorbansi sampel lebih besar dari nilai Cut Off (C.O) yang ditentukan. Apakah hasil pemeriksaannya?
- A. Positif IgG
 - B. Positif IgM
 - C. Positif
 - D. Negatif
 - E. Invalid
10. Seorang TTLM melakukan pemeriksaan HBsAg pada sampel serum pasien menggunakan metode ELISA. Dalam metode ini, antigen HBsAg yang ada dalam sampel akan “ditangkap” oleh antibodi spesifik yang sudah terikat pada permukaan mikrowell, kemudian antibodi pelapor (conjugate) akan menempel pada antigen yang terikat sehingga menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi. Apakah metode ELISA yang digunakan?
- A. Direct ELISA
 - B. Indirect ELISA
 - C. Sandwich ELISA
 - D. Kompetitif ELISA
 - E. Kompetisi ELISA

Kunci Jawaban

- 1. B
- 2. D

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

3. B
4. E
5. A
6. B
7. D
8. E
9. C
10. C

RINGKASAN



Hepatitis merupakan penyakit peradangan hati yang disebabkan oleh virus hepatitis. Pemeriksaan HBsAg adalah pemeriksaan yang digunakan untuk mendeteksi antigen Hepatitis B. Pemeriksaan ini juga bermanfaat untuk menetapkan bahwa hepatitis akut yang diderita disebabkan oleh virus hepatitis B. Anti-HBs adalah antibodi yang dihasilkan oleh sistem kekebalan tubuh sebagai respons terhadap infeksi virus hepatitis B atau vaksinasi hepatitis B. Adanya anti-HBs dalam darah menunjukkan bahwa seseorang memiliki perlindungan terhadap infeksi hepatitis B

GLOSARIUM



- Hepatitis: Peradangan pada hati yang bisa disebabkan oleh infeksi virus, konsumsi alkohol berlebihan, obat-obatan, atau penyakit autoimun
- Virus Hepatitis A (HAV): Virus yang menyebar melalui makanan atau air yang terkontaminasi. Biasanya menyebabkan infeksi akut dan tidak kronis.
- Virus Hepatitis C (HCV): Virus yang paling sering menyebabkan hepatitis kronis. Umumnya menyebar melalui darah, terutama melalui jarum suntik yang terkontaminasi.
- Virus Hepatitis D (HDV): Virus yang hanya bisa menginfeksi orang yang sudah terinfeksi hepatitis B.
- Virus Hepatitis E (HEV): Virus yang mirip dengan HAV, menyebar melalui makanan atau air yang terkontaminasi, umumnya di daerah dengan sanitasi buruk.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Akut: Gejala penyakit yang timbul jangka pendek; hepatitis akut berlangsung selama beberapa minggu hingga bulan.
- Kronis: Gejala penyakit yang timbul jangka panjang; hepatitis kronis bisa berlangsung lebih dari 6 bulan dan berisiko menyebabkan kerusakan hati permanen.
- Sirosis: Kerusakan hati yang parah dan menetap akibat peradangan kronis, termasuk akibat hepatitis.
- Fibrosis hati: Pembentukan jaringan parut di hati akibat peradangan atau cedera, tahap awal dari sirosis.
- Transaminase: Enzim hati (seperti ALT dan AST) yang naik saat hati mengalami peradangan atau kerusakan.
- Vaksin Hepatitis: Vaksin yang tersedia untuk mencegah hepatitis A dan B. Belum tersedia vaksin untuk hepatitis C.
- Hepatomegali : Pembesaran hati yang bisa terjadi akibat hepatitis.
- Jaundice (Ikterik): Kondisi menguningnya kulit dan mata akibat penumpukan bilirubin, sering muncul pada hepatitis.

DAFTAR PUSTAKA



Castera, L., Chan, H.L.Y., Arrese, M. 2015. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of Hepatology*, 63: 237-264.

Kit Insert Wantai Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) ELISA

Kit Insert Wantai anti-HBs ELISA (Quantitative)

Kwak, M.S., Chung, G.E., Yang, J.I., Yim, J.Y. 2019. Long-term outcomes of HBsAg/ anti-HBs double-positive versus HBsAg single-positive patients with chronic hepatitis B. *Scientific Nature Reports* 9:19417. doi.org/10.1038/s41598-019-56015-8

Seto, W.K., Wong, D.K.H., Fung, J., Huang, F.Y., Liu, K.S.H., Lai, C.L., Yuen, M.F. 2014. Linearized hepatitis B surface antigen and hepatitis B core-related antigen in the natural history of chronic hepatitis B. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(11): 1173–1180.

Qin, Y., Zhou, W., Zhou, X., Li, H. 2024. Case Report: Long-term outcomes of HBsAg/ anti-HBs double-positive versus HBsAg single-positive patients with chronic hepatitis B human type II

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

tumour necrosis factor receptor-antibody fusion protein induced occult hepatitis B virus reactivation leading to liver failure. *Journal of International Medical Research*, 52(1): 1-9.

Yuen, M.F., Chen, D.S., Dusheiko, G.M. Janssen, H.L.A., Lau, D.T.Y., Locarnini, S.A., Peters, M.G., Lai, C.L. 2018. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 4: 18035. doi: 10.1038/nrdp.2018.35.

Zong, L., Peng, H., Sun, C., Li, F., Zheng, M., Chen, Y., Sun, H.R., Tian, Z. 2019. Breakdown of adaptive immunotolerance induces hepatocellular carcinoma in HBsAg-tg mice. *Nature Communication*, 10:221.

**MODUL
3**

PEMERIKSAAN TUMOR MARKER

TUJUAN PEMBELAJARAN



- 1 Mahasiswa mampu memahami dan melakukan tentang pemeriksaan CEA menggunakan metode ELISA
- 2 Mahasiswa mampu memahami dan Melakukan tentang pemeriksaan PSA menggunakan metode ELISA

PENDAHULUAN



Sel mempunyai tugas utama yaitu bekerja dan proliferasi Bekerja tergantung aktivitas sitoplasma sedangkan proliferasi tergantung pada aktivitas intinya. Proliferasi sel adalah proses fisiologi yang terjadi hampir pada semua jaringan tubuh manusia di berbagai sel untuk proliferasi Homeostasis mempertahankan antara proliferasi sel dan kematian sel yang terprogram (apoptosis) secara normal. Mutasi pada DNA sel menyebabkan kemungkinan terjadinya neoplasma sehingga terdapat gangguan pada proses regulasi homeostasis sel. Karsinogen menyebabkan mutasi materi genetik ini mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terkontrol dan pembentukan tumor atau neoplasma. Neoplasma adalah kumpulan sel abnormal yang terbentuk oleh sel-sel yang tumbuh terus menerus secara tidak terbatas, tidak berkoordinasi dengan jaringan sekitarnya dan tidak berguna bagi tubuh.

Tumor adalah Pembengkakan yang disebabkan oleh adanya inflamasi atau peradangan dan pertumbuhan jaringan yang abnormal di dalam tubuh. Tumor berdasarkan pertumbuhannya dapat dibedakan menjadi tumor ganas (*malignant tumor*) dapat menginvasi jaringan lain dan beranak sebar

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

ketempat yang jauh (metastasis), dapat resisten terhadap apoptosis, tidak selektif terhadap faktor anti pertumbuhan. Tumor jinak: tidak menginvasi dan tidak menyebar ke jaringan lain disekitarnya. Tumor ganas ini juga disebut kanker. Tumor ganas atau kanker dianggap sebagai pertumbuhan yang tidak terkendali, secara patologi tumor ganas disebut sebagai penyakit sel. Karena tidak terkendalinya pertumbuhan sel dapat membentuk masa yang menginfiltrasi organ dan menyebabkan terganggunya fungsi organ tersebut. Kanker merupakan penyakit dengan penyebab *multifactor* yang terbentuk dalam jangka waktu yang lama dan mengalami kemajuan melalui stadium yang berbeda-beda.

Carcinoembryonic antigen (CEA) adalah protein yang dihasilkan oleh epitel saluran cerna janin yang juga dapat diekstraksi dari tumor saluran cerna orang dewasa. Pemeriksaan CEA ini bertujuan untuk mengetahui adanya kanker usus besar, khususnya adenocarcinoma. Pemeriksaan CEA merupakan uji laboratorium yang tidak spesifik karena hanya 70% kasus didapatkan peningkatan CEA pada kanker usus besar dan pankreas. Peningkatan kadar CEA dilaporkan pula pada keganasan oesophagus, lambung, usus halus, dubur, kanker payudara, kanker serviks, sirosis hati, pneumonia, pankreatitis akut, gagal ginjal, penyakit inflamasi dan trauma pasca operasi. Penting diketahui pula bahwa kadar CEA dapat meningkat pada perokok.

Carcinoembryonic (CEA) adalah gliko protein dengan berat molekul 180 KDa disintesa selama perkembangan normal janin dalam tractus gastrointestinal dan pancreas dan disekresi ke dalam sistem sirkulasi. Pada orang dewasa CEA disintesa tidak semuanya. Dapat dideteksi pada orang yang bukan perokok dengan metoda imunologi. CEA banyak digunakan sebagai tanda untuk kanker gastrointestinal. Meskipun CEA berhubungan dengan *colorectal cancer*, keganasan lainnya dapat menyebabkan kenaikan kadar CEA, termasuk dada, paru-paru, perut, ovarium dan organ lainnya. Kondisi lemah yang menyebabkan kadar lebih tinggi dari normal termasuk inflamasi paru-paru, hati (cirrhosis) dan tractus gastrointestinal dan tumor jinak. Perokok berat mempunyai kadar lebih tinggi dari konsentrasi normal CEA. Pengukuran kuantitatif CEA digunakan dalam monitoring pasien dengan diagnosis keganasan, yang diketahui menaikkan konsentrasi CEA.

Prostat Specific Antigen (PSA) dipakai untuk diagnosis kanker prostat. Dahulu kala pemeriksaan kanker prostat dilakukan pemeriksaan aktifitas *prostatic acid phosphatase* (PAP), diikuti dengan pemeriksaan colok dubur. Tetapi aktivitas PAP yang tinggi disertai dengan pembesaran kelenjar prostat selalu sudah terjadi metastasis. Untuk pemeriksaan dini kanker prostat dipakai pemeriksaan PSA. Kadar PSA dapat meningkat pada hipertrofi prostat jinak dan lebih tinggi lagi pada kanker prostat. Kadar PSA meningkat setelah colok dubur atau bedah prostat. Pemeriksaan PSA disarankan untuk pemeriksaan rutin pada pria usia lebih dari 40 tahun. Total PSA (tPSA) terdiri dari PSA bebas dan PSA kompleks. Kadar PSA total dipakai untuk mendapatkan persen (%) PSA bebas

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Antigen prostate spesifik (PSA) adalah glycoprotein (*serine protease*) dengan berat molekul 28.4 KDa disintesis melalui sel epitelial prosta. PSA tidak hanya dideteksi pada pria tetapi juga pada wanita dengan carcinoma payudara (30-40%). Pada serum pria PSA dapat di deteksi sebagai molekul bebas atau kompleks dengan metoda imunologi. PSA total dideteksi dengan ELISA. Kenaikan kadar PSA ditemukan pada kanker jinak, ganas dan metastase. Karena kanker prostat adalah bentuk umum ke dua malignancy pria, deteksi kenaikan kadar PSA memainkan peranan penting dalam diagnosa pertama. Ditemukan kadar PSA dalam serum lebih berguna pada prostatic acid phosphate (PAP) dalam diagnose dan monitoring pengobatan pasien karena kenaikan sensitivitasnya.

Cancer Antigen 125 (CA-125) merupakan suatu tumor marker yang digunakan untuk membantu menyebabkan diagnosa dari kanker ovarium. CA-125 terdapat pada semua jaringan yang berasal dari derivat sel mesotel dan epitel koelomid diantaranya peritoneum, pleura, tuba, pericardium, endometrium, dan endocervix. Pemeriksaan ini merupakan gold standar dari kanker ovarium selain dari ada aminesis pemeriksaan fisik, USG abdomen, biopsi, pemeriksaan darah rutin.

Pada kanker payudara manusia, Carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA) 15-3, dan cancer antigen (CA) 27-29 yang berasal dari kelenjar susu telah menjadi area investigasi penting untuk deteksi dini tumor. Protein CEA, yang berperan dalam adhesi sel, dapat meningkat pada berbagai jenis kanker. Sementara itu, CA 15-3 dan CA 27-29 merupakan antigen protein yang mengandung karbohidrat dan ditemukan dalam glikoprotein transmembran MUC-1, yang berfungsi menghambat lisis sel tumor serta mengurangi interaksi antar sel.

Peningkatan kadar CA 15-3 dalam serum pada saat diagnosis sering dikaitkan dengan stadium kanker payudara yang lebih lanjut. Pada CA 15-3, meskipun studi perbandingan telah menunjukkan korelasi serupa dengan stadium kanker dan ukuran tumor pada CA 27-29, biomarker ini jelas memiliki signifikansi prognostik pada kanker payudara stadium awal. Evaluasi CA 15-3 bersama dengan CEA menjadi teknik non-invasif yang menjanjikan untuk mendeteksi tumor mammae. Kombinasi CA 15-3 dan CEA dapat menjadi lebih bermakna bila disertai evaluasi deregulasi sirkulasi mikroRNA-21 (miR-21), yang diketahui berpotensi sebagai penanda prognostik berharga dalam deteksi dini kanker payudara.

PRAKTIKUM



1. Pemeriksaan Carcinoembryonic antigen (CEA)

A. Pra Analitik

1. Tujuan : untuk mendeteksi/ memantau kadar keganasan dalam sampel penderita.
2. Alat
 - Mikropipet
 - Tabung
 - *Yellow tip dan blue tip*
 - *Timer*
 - *Beaker glass* ukuran 100 ml
 - rak tabung
 - tabung serologis
 - Strip perekat
 - Mikroplate reader (bisa dibaca pada 450nm, 630-690 nm)
3. Reagent dalam kit
 - Vial MIC= *Mikrotiter strips* (mengandung streptavidin)
 - Vial CAL= Calibrator A-F (0=A), (5=B), (10=C), (25=D), (50=E), dan (250=F) ng/ml
 - Vial CON= antibody Enzyme conjugate yaitu *anti-CEA antibody (monoclonal, mouse)* terbiotasinasi, anti-CEA antibody (*monoclonal, mouse*) berlabel HRP.
 - Vial WS = *wash solution* (larutan pencuci)
 - Vial SUB= *Substrate Reagent*
 - Vial STOP= stop solution
 - *Deionised water* (Air deionisasi)
4. Stabilitas reagent

Reagent stabil sampai kadar luasa yang tertera pada masing-masing label bila disimpan pada suhu 2-8 °C. Setelah dibuka dan disimpan sesuai suhu akan pertahan

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

selama 60 hari.

Persiapan reagen

- Semua reagen harus disuhu kamarkan 15-25 °C sebelum digunakan.
- Sebelum menggunakan reagen harus dihomogenkan

5. Preparasi reagent

- Semua reagen harus disuhu kamarkan 15-25 °C sebelum digunakan dan reagen harus dihomogenkan terlebih dahulu.
- Encerkan larutan kerja pencuci kedalam 1000 ml sesuai kebutuhan (WASH) stabil stabil 60 hari suhu 15-25°C. Encerkan larutan kerja pencuci kedalam 1000 ml sesuai kebutuhan stabil 60 hari suhu 15-25°C. Pengenceran larutan pencuci 50x hingga 1000 ml air deionisasi contoh total larutan pencuci murni berisi 20ml x 50 pengenceran maka total keseluruhan larutan adalah 1000ml artinya hingga 1000 ml. Maka makna pengenceran wash artinya 1+49 (1:10) cara menghitung adalah jika kebutuhan adalah 1000 ml larutan pencuci yang sudah diencerkan maka 1000 ml dibagi 10 (pembanding) = 20 ml pencuci dan untuk pengencer adalah 20ml x 49 (penjumlah) maka 980 ml untuk jumlah pengencer dan total keseluruhan jika dijumlahkan adalah 1000 ml.
- Cara kerja larutan pencuci jika pengerjaan pencucian secara manual encerkanlah sesuai kebutuhan. Contoh pencucian secara manual adalah: lepaskan strip perekat pada *wells*/sumur, hisap larutan dalam *wells* dan dibuang kemudian tambahkan pencuci yang sudah diencerkan, hisap kembali setelah 30 detik dan lakukan sebanyak 3 kali pencucian, jika setelah selesai semua tahap pencucian hilangkan sisa larutan dengan *microplate* secara terbalik pada kertas atau tisu untuk pencucian otomatis lihat SOP. Khusus ATLM dapat melatih kemampuan dalam memipet.

6. Sampel

Sampel/spesimen yang digunakan adalah serum.

7. Penyimpanan sampel

Jika sampel disimpan sebelum pemeriksaan maka stabilitas penyimpanannya 5 hari suhu 2-8°C, 30 hari minus 20°C, tidak boleh beku ulang atau mencair hanya sekali. Hindari sampel lipemik dan ikterik

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

B. Analitik

a. Prinsip

Berdasarkan teknik sandwich ELISA yang menggunakan ikatan antibodi berlabel biotin dengan konjugat HRP/Peroksidase-Streptavidin. Pada langkah inkubasi pertama, specimen, kalibrator atau control dan konjugat *enzyme* (antibody monoclonal anti-CEA berlabel peroksidase atau biotinylated) dicampurkan untuk membentuk *sandwich* kompleks yang terikat pada permukaan sumur melalui interaksi biotin dengan *immobilized* streptavidin. Pada akhir inkubasi, kelebihan konjugat enzyme dan antigen yang tidak terikat dicuci. Setelah penambahan substrat, terjadi warna biru, perubahan warna kuning setelah reaksi dihentikan dengan *reagen stop*. Intesitas warna terjadi berbanding lurus dengan konsentrasi CEA dalam specimen. Absorban kalibrator dan specimen diukur dengan memakai ELISA reader. Konsentrasi spesimen yang tidak diketahui dihitung dari kurva *dose response* yang dihasilkan dengan memakai serum kalibrator yang diketahui konsentrasi CEA nya.

b. Prosedur

Ikuti prosedur sesuai penjelasan reagent dan spesimen di temperatur suhu ruang dan dihomogenisasi sebelum melakukan pemeriksaan		
Langkah 1	Wel (µl)	
	A1-D2 Kalibrator	E2 dst Sampel
CAL <i>in duplicate</i> (Laurutan Kalibrasi)	25	-
Spesimens, kontrol, <i>in duplicate</i>	-	25
CON	100	100
Campurkan secara hati-hati selama 15 detik		
Tutup strip dengan para film atau foil		
Inkubasi 60 menit 20-25 °C		
Lakukan pencucian 3 kali sesuai prosedur (lihat prosedur pencucian)		
Cuci	300	300
Langkah 2		
(SUB) Substrat	100	100
Tidak digoyang setelah penambahan SUB		
Inkubasi 15 menit 20-25 °C		
STOP (Stop Solution)	50	50
Campurkan secara hati-hati		
Baca absorban dengan ELISA microplate readers panjang gelombang 450 nm sesegera mungkin atau dalam 30 menit setelah menghentikan reaksi, jika tersedia bisa menggunakan panjang gelombang 630-690 nm. konsentrasi spesimen yang		

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

tidak diketahui diinterpolasi dari kurva respons dosis yang dihasilkan dengan memanfaatkan kalibrator serum dengan konsentrasi CEA yang diketahui

Prosedur pencucian (WASH):

1= Lepaskan perekat, hisap isinya, tambahkan cairan pencuci, setelah 30 detik waktu perendaman dan ulangi pencucian dua kali.

2= Jika menggunakan mesin cuci otomatis, lakukan wash strips 3 kali tambahan. pastikan mesin cuci mengisi semua sumur secara penuh dan menyedot secara efisien setelah 30 detik (sisa cairan: <math><15\mu\text{l}</math>)

3= setelah pencucian, hilangkan sisa cairan dengan mengetuk pelat secara terbalik pada kertas tisu

Ikuti gambar dibawah, bahwa penempatan huruf pada prosedur disesuaikan dengan contoh gambar plat dibawah ini

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal : 0	Cal :										
B	Cal : 0	Cal :										
C	Cal :	Cal :										
D	Cal :	Cal :										
E	Cal :	spl										
F	Cal :	spl										
G	Cal :	dist										
H	Cal :											

C. Post Analitik

Perhitungan

Gunakan kurva dosis respon untuk menghitung konsentrasi CEA dalam spesimen

1. Buat plot absorbans untuk tiap kalibrator secara duplikat yang berhubungan dengan konsentrasi CEA dalam ng/ml pada kertas grafik linear
2. Tarik garis lurus kurva melalui titik plotting
3. Untuk mengukur kadar CEA dari sampel yang tidak diketahui (S), tempatkan rata-rata pada sumbu vertical pada garis, dan baca konsentrasi dalam ng/ml dari sumbu horizontal pada grafik.

Validasi test

Hasil dinyatakan berlaku apabila memenuhi kriteria di bawah ini

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

1. Maksimum absorbant CAL F. OD. ≥ 1.3
2. Perbedaan antara duplikat kalibrator F tidak boleh melebihi 10 %

Interprestasi hasil

1. CEA dikenal baik sebagai tumor marker, dapat mnedeteksi beberapa macam tumor, tetapi mempunyai sensitivitas dan spesifisitas klinik yang rendah. Pasien dengan colorectal kancer tidak menunjukkan kenaikan nilai CEA. Perkembangan atau kemunduran penyakit tidak selalu menghasilkan kenaikan kadar CEA.
2. Perokok menunjukkan hasil nilai lebih tinggi dari tidak perokok
3. CEA merupakan pertanda penting pada metstasis. Kadar tinggi dapat terjadi pada metastasis tulang, hati, paru-paru dan lainnya
4. Kadar yang tinggi tetap setelah pengobatan biasanya menunjukkan area residual malignant, atau metastasis
5. Penurunan yang stabil dapat dihubungkan dengan prognosis yang bermanfaat
4. Pengukuran kadar CEA sendiri tidak cukup untuk diagnosis kondisi patologis. Ini digunakan dalam hubungannya dengan manifestasi klinik lin dan diagnosis parameter.

Hasil yang diharapkan

	Kadar CEA
Bukan perokok (99 %)	< 5 ng/ml
Perokok	< 10 ng/ml

D. Jurnal laporan/Laporan sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Alat dan Bahan :

Langkah Kerja :

Hasil : Data pasien

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

--

<p>Kesimpulan :</p>

.....,

20...

() ()

2. Pemeriksaan Prostate Specific Antigen (PSA)

A. Pra Analitik

1. Tujuan : Untuk mendeteksi antigen prostat di dalam serum penderita

2. Alat

- Mikropipet
- Tabung
- *Yellow tip dan blue tip*
- *Timer*
- *Beaker glass* ukuran 100 ml
- rak tabung
- tabung serologis
- Strip perekat
- Mikroplate reader (bisa dibaca pada 450nm, 630-690 nm)

3. Reagent dalam kit

- Vial MIC= *Mikrotiter strips* (mengandung streptavidin)
- Vial CAL= *Calibrators* A-F (0=A), (5=B), (10=C), (25=D), (50=E), dan (250=F) ng/ml
- Vial CON= *Antibody Enzyme Conjugate* yaitu *anti-PSA*, (*mab, mouse*) label HRP.
- Vial WS = *Wash solution* (larutan pencuci)
- Vial SUB= *Substrate Reagent*
- Vial STOP= *Stop solution*
- *Deionised water* (Air deionisasi)

4. Stabilitas reagent

- Reagent stabil bila disimpan pada suhu 2-8 °C

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

5. Lakukan preparasi reagent

- Semua reagen harus disuhu kamarkan 15-25 °C sebelum digunakan dan reagen harus dihomogenkan terlebih dahulu.
- Encerkan larutan kerja pencuci 1+20 (1:21) (WASH) stabil 60 hari suhu 15-25°C. Pengenceran 1 bagian wash ditambah 20 bagian pengencer maka artinya adalah (1:21), sebagai contoh jika kebutuhan wash dalam 1050 ml, maka 1050 ml dibagi 21 = 50ml (bagian Wash) dan untuk pengencer adalah 50 ml x 20 (penjumlah) = 1000ml (pengencer) maka total keseluruhan adalah 1050ml. Hitung sesuai kebutuhan praktikum yang dilakukan dapat menghitung sesuai kebutuhan.
- Cara kerja larutan washer jika pengerjaan pencucian secara manual encerkanlah sesuai kebutuhan. Contoh pencucian secara manual adalah : lepaskan strip perekat pada *wells*/sumur, hisap larutan dalam *wells* dan dibuang kemudian tambahkan *wash* yang sudah diencerkan, hisap kembali setelah 30 detik dan lakukan sebanyak 3 kali pencucian, jika setelah selesai semua tahap pencucian hilangkan sisa larutan dengan *microplate* secara terbalik pada kertas atau tisu untuk pencucian otomatis lihat SOP.

6. Sampel

Sampel/spesimen yang digunakan adalah serum.

7. Penyimpanan sampel

Sampel/spesimen yang digunakan adalah serum. Sampel dapat disimpan 5 hari pada suhu 2-8°C, 30 hari minus 20°C, tidak boleh beku ulang atau mencair hanya sekali. Hindari sampel lipemik dan ikterik.

B. Analitik

1. Metode: Sandwich ELISA

2. Prinsip

Berdasarkan teknik sandwich ELISA yang menggunakan ikatan antibodi berlabel biotin Streptavidin dengan konjugat HRP. Streptavidin telah dilabeli pada permukaan sumur mikrotiter. Pada langkah inkubasi pertama, specimen, kalibrator atau control dan konjugat enzyme (antibodi monoclonal anti-PSA berlabel peroksidase atau biotinylated) dicampurkan untuk membentuk *sandwich* kompleks yang terikat pada permukaan sumur melalui interaksi biotin dengan *immobilized streptavidin*. Pada akhir inkubasi, kelebihan konjugat enzyme dan antigen yang tidak terikat dicuci. Setelah substrat yang ditambahkan, terjadi warna biru, perubahan warna kuning setelah reaksi dihentikan dengan *reagen stop*. Intesitas warna terjadi berbanding lurus dengan konsentrasi PSA dalam specimen.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Absorban kalibrator dan specimen diukur dengan memakai ELISA *reader*. Konsentrasi specimen yang tidak diketahui dihitung dari respons dosis kurva yang dihasilkan dengan memakai serum kalibrator yang diketahui konsentrasi PSA nya.

3. Prosedur

Ikuti prosedur sesuai penjelasan reagent dan spesimen di temperatur suhu ruang dan dihomogenisasi sebelum melakukan pemeriksaan		
Langkah 1	Wel (μ l)	
	A1-D2 Kalibrator	E2 dst Sampel
CAL <i>in duplicate</i> (Larutan Kalibrasi)	25	-
Sampel, <i>controls, in duplicate</i>	-	25
CON	100	100
Mix secara hati-hati selama 15 detik		
Tutup strip dengan para film atau foil		
Inkubasi 30 menit 20-25 °C		
Lakukan pencucian 3 kali sesuai prosedur pencucian (dibawah)		
WASH (Larutan Pencuci)	300	300
Langkah 2		
SUB	100	100
Tidak digoyang mix setelah penambahan SUB		
Inkubasi 15 menit 20-25°C		
STOP solution	50	50
Campurkan secara hati-hati		
Baca absorban dengan humareader panjang gelombang 450 nm sesegera mungkin atau dalam 10 menit setelah menghentikan reaksi, jika tersedia bisa menggunakan panjang gelombang 630-690 nm		
Prosedur pencucian (WASH):		
1= Lepaskan perekat, hisap isinya, tambahkan cairan pencuci, setelah 30 detik waktu perendaman dan ulangi pencucian dua kali.		
2= Jika menggunakan mesin cuci otomatis, lakukan wash strips 3 kali tambahan. pastikan mesin cuci mengisi semua sumur secara penuh dan menyedot secara efisien setelah 30 detik (sisa cairan:<15 μ l)		
3= setelah pencucian, hilangkan sisa cairan dengan mengetuk pelat secara terbalik pada kertas tisu		

Ikuti gambar dibawah, bahwa penempatan huruf pada prosedur disesuaikan dengan contoh gambar plat dibawah ini

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal : 0	Cal :										
B	Cal : 0	Cal :										
C	Cal :	Cal :										
D	Cal :	Cal :										
E	Cal :	spl										
F	Cal :	spl										
G	Cal :	dist										
H	Cal :											

C. Post Analitik

Perhitungan

Gunakan *kurva dose* untuk menghitung konsentrasi PSA dalam spesimen/sampel yang tidak diketahui

1. Buat Plot absorbans untuk tiap kalibrator secara duplikat yang berhubungan dengan konsentrasi PSA dalam ng/ml pada kertas grafik *linear*
2. Tarik garis lurus kurva melalui titik ploting
3. Untuk mengukur kadar PSA dari sampel yang tidak diketahui (S), tempatkan rata-rata pada sumbu vertikal pada garis, dan baca konsentrasi dalam ng/ml dari sumbu horizontal pada grafik.

Validasi test

Hasil dinyatakan berlaku apabila memenuhi kriteria di bawah ini

1. Maksimum absorbans rata-rata OD. CAL F ≥ 1.2
2. Dilakukan pemeriksaan pada 3 tingkatan
 - a. Konsentrasi CEA pada 80 % O.D max = 40 ± 10 ng/ml
 - b. Konsentrasi CEA pada 50 % O.D max = 25 ± 8 ng/ml
 - c. Konsentrasi CEA pada 20 % O.D max = 10 ± 4 ng/ml
3. Perbedaan antara duplikat CAL F tidak melebihi 10 %

Interprestasi hasil

1. Kanker prostat bentuk umum ke dua *malignancy* pria, menunjukkan kenaikan insiden yang tinggi pada pria berumur 50 tahun.
2. Metode yang paling sensitive untuk diagnosis. Dan monitoring pengobatan adalah pengukuran secara kuantitatif. PSA dalam serum

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

3. Konsentrasi PSA mempunyai hubungan yang baik untuk ukuran dan status perkembangan tumor.
4. Kadar PSA meningkat tidak hanya dalam karsinoma ganas, tetapi juga dalam prostat hypertrophy jinak (BPH). Karena itu dengan mengukur PSA sendiri tidak cukup untuk mengatakan kanker harus digunakan dengan penemuan klinis lain dan parameter diagnosis.
5. Kadar PSA yang tinggi menurun sangat cepat setelah pembedahan prostat.
6. Kadar tinggi yang tetap biasanya menunjukkan sisa area keganasan atau metastasis.
7. Kenaikan kadar PSA pada pengobatan lanjut menunjukkan perkembangan kanker prostat dalam tahap dini (6 bulan lebih awal dari metoda diagnosis).
8. Pengukuran PSA bebas dapat membantu membedakan kondisi BPH pada kanker prostat.

Hasil yang diharapkan

	Kadar PSA
Pria sehat	< 4 ng/ml

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

Langkah Kerja :

--

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Hasil	:	Data pasien
Kesimpulan	:	

.....,

20...

Pembimbing

Praktikan

() ()

EVALUASI



1. Seorang mahasiswa Teknologi Laboratorium Medis sedang mengikuti sesi diskusi, dosen menjelaskan bahwa tubuh manusia terdiri dari triliunan sel yang masing-masing memiliki fungsi spesifik. Apakah tugas utamanya?
 - A. Menyimpan cadangan makanan dan menyaring racun
 - B. Bekerja dan berkembang biak
 - C. Menghasilkan hormon dan menyimpan energi
 - D. Menghasilkan enzim dan protein
 - E. Transport makanan

2. Pada laboratorium, seorang mahasiswa mengamati jaringan tubuh manusia dan mempelajari proses yang memungkinkan jaringan tersebut berkembang dan memperbaiki diri. Proses ini berlangsung di hampir semua jaringan tubuh secara fisiologis. Proses fisiologis apakah tersebut?
 - A. Metastasis
 - B. Apoptosis
 - C. Proliferasi sel
 - D. Mutasi genetic
 - E. Diferensiasi

3. Seorang pasien laki-laki berusia 55 tahun datang ke laboratorium klinik untuk pemeriksaan lanjutan setelah ditemukan adanya benjolan pada leher yang terus membesar dalam beberapa bulan terakhir. Hasil biopsi menunjukkan adanya proliferasi sel yang abnormal dan tidak terkendali. Apakah penyebab utama hal tersebut?
 - A. Produksi hormon berlebih
 - B. Mutasi pada DNA sel
 - C. Gangguan fungsi hati
 - D. Infeksi virus
 - E. Kurangnya nutrisi dalam tubuh

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

4. Seorang wanita berusia 42 tahun datang ke poliklinik dengan keluhan munculnya benjolan di leher bagian depan yang sudah dirasakan selama 3 bulan. Benjolan tersebut tidak terasa nyeri, tidak mengalami perubahan warna kulit, dan tidak bertambah besar secara signifikan. Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan fungsi tiroid normal, dan hasil biopsi menunjukkan bahwa sel-sel tumbuh teratur. Benjolan tersebut termasuk jenis?
- A. Kista
 - B. Tumor ganas
 - C. Tumor jinak
 - D. Polip
 - E. Tanda lahir
5. Seorang pria berusia 60 tahun datang ke laboratorium klinik dengan keluhan penurunan berat badan, gangguan buang air besar, dan nafsu makan menurun. Dokter mencurigai adanya keganasan di saluran pencernaan dan meminta pemeriksaan penanda tumor Carcinoembryonic Antigen (CEA). Apakah fungsi pemeriksaan tersebut?
- A. Kanker hati
 - B. Kanker usus besar
 - C. Kanker paru-paru
 - D. Kanker payudara
 - E. Kanker prostat
6. Seorang pria berusia 65 tahun datang ke laboratorium untuk pemeriksaan rutin. Ia sering buang air kecil terutama di malam hari dan merasa aliran urin melemah. Dokter mencurigai adanya gangguan pada kelenjar prostat dan meminta pemeriksaan Prostate-Specific Antigen (PSA). Apakah fungsi pemeriksaan tersebut?
- A. Kanker hati
 - B. Kanker usus besar
 - C. Kanker paru-paru
 - D. Kanker payudara
 - E. Kanker prostat
7. Seorang wanita berusia 50 tahun datang ke rumah sakit dengan keluhan nyeri perut bagian bawah, perut terasa kembung, dan siklus menstruasi yang tidak teratur. Dokter mencurigai adanya

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

kelainan pada organ reproduksi dan merujuk pasien untuk melakukan pemeriksaan penanda tumor CA-125 (Cancer Antigen 125). Apakah fungsi pemeriksaan tersebut?

- A. Kanker hati
- B. Kanker usus besar
- C. Kanker ovarium
- D. Kanker payudara
- E. Kanker prostat

8. Seorang mahasiswa Teknologi Laboratorium Medis sedang mengikuti praktikum pemeriksaan HBsAg menggunakan metode ELISA. Pada salah satu tahap menggunakan washer. Apakah fungsi pada tahap tersebut?

- A. membuang reagen yang tidak terikat dan zat-zat yang tidak diinginkan
- B. menghentikan reaksi enzimatik yang sedang berlangsung
- C. untuk berubah warna saat bereaksi dengan enzim yang terikat pada antibodi atau antigen
- D. menjaga stabilitas dan keefektifan reagen
- E. sebagai label yang terikat pada antibodi atau antigen.

9. Seorang mahasiswa Teknologi Laboratorium Medis sedang melakukan pemeriksaan ELISA untuk mendeteksi HBsAg dalam serum pasien. Setelah penambahan substrat dan terbentuknya warna sebagai hasil reaksi enzim, mahasiswa diminta menambahkan stop solution ke dalam sumur (well) reaksi. Apakah fungsi penambahan akhir tersebut?

- A. membuang reagen yang tidak terikat dan zat-zat yang tidak diinginkan
- B. menghentikan reaksi enzimatik yang sedang berlangsung
- C. untuk berubah warna saat bereaksi dengan enzim yang terikat pada antibodi atau antigen
- D. menjaga stabilitas dan keefektifan reagen
- E. sebagai label yang terikat pada antibodi atau antigen.

10. Seorang mahasiswa Teknologi Laboratorium Medis sedang melakukan pemeriksaan ELISA untuk mendeteksi antigen tertentu dalam sampel serum. Setelah penambahan substrat dan terbentuknya warna pada sumur reaksi, mahasiswa tersebut menambahkan stop buffer untuk mengakhiri proses reaksi. Apa fungsi stop buffer tersebut?

- A. membuang reagen yang tidak terikat dan zat-zat yang tidak diinginkan
- B. menghentikan reaksi enzimatik yang sedang berlangsung
- C. untuk berubah warna saat bereaksi dengan enzim yang terikat pada antibodi atau antigen

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- D. menjaga stabilitas dan keefektifan reagen dan menghentikan reaksi enzimatik
- E. Sebagai label yang terikat pada antibodi atau antigen.

Kunci Jawaban:

1. B
2. C
3. B
4. C
5. B
6. E
7. C
8. A
9. B
10. D

RINGKASAN



Sel memiliki dua fungsi utama yaitu bekerja dan berproliferasi. Proliferasi sel terjadi hampir di seluruh jaringan tubuh dan harus seimbang dengan apoptosis (kematian sel terprogram) untuk menjaga homeostasis. Ketidakseimbangan akibat mutasi DNA dapat menyebabkan neoplasma (pertumbuhan sel abnormal). Neoplasma dapat bersifat jinak (benign) atau ganas (malignant/kanker). Tumor ganas tumbuh tidak terkendali, dapat menyebar (metastasis), dan mengganggu fungsi organ.

Carcinoembryonic Antigen (CEA) adalah protein yang diproduksi selama masa janin dan bisa meningkat pada beberapa jenis kanker, terutama kanker usus besar. Namun, peningkatan CEA juga bisa terjadi karena kondisi non-kanker seperti infeksi, penyakit inflamasi, atau pada perokok berat. Prostate Specific Antigen (PSA) digunakan untuk mendeteksi kanker prostat. PSA bisa meningkat karena kanker maupun kondisi jinak seperti pembesaran prostat. CA15-3 serum saat diagnosis telah dikaitkan dengan stadium kanker payudara yang lebih lanjut. *alpha-fetoprotein* (AFP) merupakan penanda tumor yang digunakan dalam pemeriksaan kanker hati, kanker ovarium, dan kanker testis. *Beta 2-microglobulin* (B2M) adalah zat penanda tumor yang digunakan dalam pemeriksaan kanker darah, *multiple myeloma* dan *limfoma*.

GLOSARIUM



- Sel : Unit dasar kehidupan yang memiliki kemampuan bekerja dan berproliferasi.
- Sitoplasma : Bagian cair dalam sel tempat berlangsungnya proses metabolisme sel.
- Inti sel (nukleus) : Organel pengendali aktivitas reproduksi dan informasi genetik sel.
- Proliferasi sel : Proses pertumbuhan atau pembelahan sel.
- Apoptosis : Kematian sel yang terprogram secara alami.

DAFTAR PUSTAKA



Aditiyono., Ali B.H dan Herman, S. 2018. CA 125 Dan Risk Of Malignancy Index (Rmi)² Sebagai Prediktor Keganasan Tumor Ovarium Tipe Epitel. Mandala of Health : A Scientific Journal Vol.11, No.1, Maret 2018, Hal. 18-30.

Harianja, E., dan Agistya, A.S., 2022. Pemeriksaan Prostate Specific Antigen (PSA) Menggunakan Alat Vidas. Jurnal Teknologi Laboratorium Medik Borneo 2022, 2(1), 31-38.

Kit reagent CEA metode ELISA HUMAN. <https://drive.google.com/file/d/1-y8QdsyQU5vAkQ5s0vJSNzNKfsbof489/view?usp=sharing>

Kit reagent PSA metode ELISA HUMAN. <https://drive.google.com/file/d/1mGT3CGCWAoc7bNx61sfxKvWjv0MwZ7aQ/view?usp=sharing>

Kim, S.H., dkk., 2024. Combined Application of CEA, CA 15-3, and CA 27-29 for the Evaluation of Diagnostic Performance in Canine Mammary Gland Tumors. J Vet Clin 2024; 41(6): 359-369. <https://doi.org/10.17555/jvc.2024.41.6.359>

Sabaruddin, H. dan Ferry, AM. 2018. Korelasi Tumor Marker Cancer Antigen(CA-125) terhadap kadar Hemoglobin, Leukosit, dan *Microplatelet* Limfosit Ratio pada Pasien Kanker Ovarium di RSUD ULIN Banjarmasin. Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma 7(1) : 93-106.

MODUL
4

PEMERIKSAAN TYPHOID

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan tifoid menggunakan metode Inhibition Magnetic Binding Immunoassay (IMBI)/TUBEX TF
2. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan tifoid menggunakan metode deteksi IgG/IgM, dan typhidot.

PENDAHULUAN



Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella sp.* terutama *Salmonella typhi* dan *Salmonella paratyphi*. Penyakit ini masih sering dijumpai di negara berkembang yang terletak di subtropis dan daerah tropis seperti Indonesia.

Salmonella typhi masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan dan air yang tercemar. Sebagian kuman dihancurkan oleh asam lambung dan sebagian masuk ke usus halus, mencapai jaringan limfoid plak Peyreri di ileum terminalis yang hipertrofi. *Salmonella typhi* memiliki fimbria khusus yang dapat menempel ke lapisan epitel plak Peyreri sehingga bakteri dapat difagositosis. Setelah menempel, bakteri memproduksi protein yang mengganggu lapisan mikrovilus usus dan memaksa sel usus untuk membentuk kerutan membrane yang akan melapisi bakteri dalam vesikel. Bakteri dalam vesikel akan menyeberang melewati sitoplasma sel usus dan dipresentasikan ke makrofag. Setelah sampai pada kelenjar getah bening mesenterika, kuman kemudian masuk ke aliran darah melalui duktus torasikus sehingga terjadi bakterimia pertama yang asimtomatik. *S.typhi* juga bersarang dalam sistem retikuloendotelial terutama pada hati dan limfa, dimana kuman meninggalkan sel fagosit, berkembang biak, dan masuk ke dalam sirkulasi darah lagi, sehingga terjadi bakterimia kedua dengan gejala sistemik.

Masa inkubasi demam tifoid berlangsung antara 10-14 hari. Gejala yang timbul bervariasi, dari gejala klinis ringan sampai berat, dari asimtomatik hingga gambaran penyakit yang khas, yang dapat disertai dengan sejumlah komplikasi. Sebagian kasus demam tifoid dapat berakhir dengan kematian. Diagnosa untuk demam tifoid dapat dilakukan dengan

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

menggunakan beberapa metode, yaitu IMBI, IgG/IgM dan typhidot.

PRAKTIKUM



METODE INHIBITION MAGNETIC IMMUNOASSAY (IMBI)

A. Pra analitik

1. Tujuan Pemeriksaan

- 1) Untuk mendeteksi kompleks antigen-antibodi *S.Typhi*
- 2) Untuk menjelaskan macam bentuk kompleks antigen-antibodi mengendap pada dasar sumur/ *microplate*
- 3) Untuk menentukan derajat kereaktifan dari antibody IgM *S.typhi O* dalam serum manusia yang diduga menderita demam tifoid

2. Metode

Inhibition Magnetic Binding Immunoassay (IMBI)

3. Prinsip

Deteksi spesifik adanya serum antibody IgM terhadap *S.typhi O9* LPS, dengan cara menghambat ikatan antara antibody IgM anti O9 yang terkonjugasi pada partikel latex yang berwarna dengan antigen lipopolisakarida *S.typhi* yang terkonjugasi pada partikel *magnetic*, selanjutnya ikatan inhibisi yang dihasilkan adalah setara dengan konsentrasi antibody IgM *S.typhi* dalam sampel.

4. Jenis dan Kriteria Spesimen/Syarat Sampel

Tes ini dirancang hanya untuk digunakan serum. Sampel plasma tidak boleh digunakan. Sampel harus bebas dari hemolisis dan kontaminasi. Jika uji tidak segera dilakukan, sampel serum dapat disimpan pada suhu 2-8°C, dan untuk menyimpan jangka panjang, serum harus disimpan pada suhu -20°C.

5. Alat dan Bahan

- 1) Partikel Coklat, yaitu partikel magnet warna coklat yang telah disensitisasi dengan antigen *S.typhi*.
- 2) Partikel Biru, partikel lateks warna biru yang telah disensitisasi dengan antibody *S.typhi*
- 3) Buffer pencuci untuk membersihkan serum yang berwarna
- 4) Serum kontrol positif
- 5) Serum kontrol negatif
- 6) Strip tabung V/ Sumur pereaksi

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- 7) Standar skala warna pembanding
- 8) Paket insert

B. Analitik

1) Prosedur Kerja:

1. Tambahkan 45 μ L TUBEX TF Brown Reagent (detektor) ke strip sumur pereaksi TUBEX.
2. Tambahkan 45 μ L serum pasien, kontrol positif dan kontrol negatif TUBEX TF. Homogenkan 10 kali dengan pipet.
3. Inkubasi selama 2 menit pada suhu kamar
4. Tambahkan 90 μ L TUBEX TF Blue Reagent (indikator).
5. Tutup strip sumur reaksi TUBEX menggunakan selotip. Miringkan strip 90° dan goyangkan *well* strip selama 2 menit.
6. Tempatkan strip sumur reaksi TUBEX pada skala pembanding warna TUBEX. Biarkan terjadi pemisahan magnet selama 5 menit.
7. Nilai Normal



GAMBAR 13 INTERPRETASI TUBEX

Negatif	: Skala 0 atau < 2
Meragukan	: Skala 2
Positif lemah	: Skala 4
Positif	: Skala > 6

C. Post Analitik

1. Pelaporan Hasil

Baca skor hasilnya dengan membandingkan warna setiap pada skala pembanding warna TUBEX. Skala warna berkisar dari skor 0 (tes negatif) sampai 10 (tes positif).

2. Sumber Kesalahan Pemeriksaan

- 1) Penilaian warna reaksi yang bersifat subjektif, sehingga pengalaman dan ketelitian petugas sangat mempengaruhi hasil

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- 2) Dapat memungkinkan memberi hasil positif atau negatif palsu, terutama pada daerah endemic atau pada pasien dengan penyakit infeksi lain yang dapat memicu reaksi silang antibodi
- 3) Sensitivitas dan spesifisitas yang tidak konsisten

3. Jaminan Mutu Pemeriksaan

- Audit mutu dan evaluasi berkala: laboratorium perlu melakukan audit internal dan partisipasi dalam program penjaminan mutu eksternal untuk memastikan konsistensi hasil pemeriksaan IMBI/Tubex TF dari waktu ke waktu
- Pelatihan dan kompetensi tenaga laboratorium: tenaga laboratorium harus berlatih dalam prosedur pemeriksaan dan interpretasi hasil agar tidak terjadi kesalahan teknis yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan
- Prosedur Standar Operasional (SOP): pemeriksaan dilakukan dengan prosedur yang baku, mulai dari penanganan sampel, penambahan reagen, inkubasi, hingga pembacaan hasil pada skala warna magnetik.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

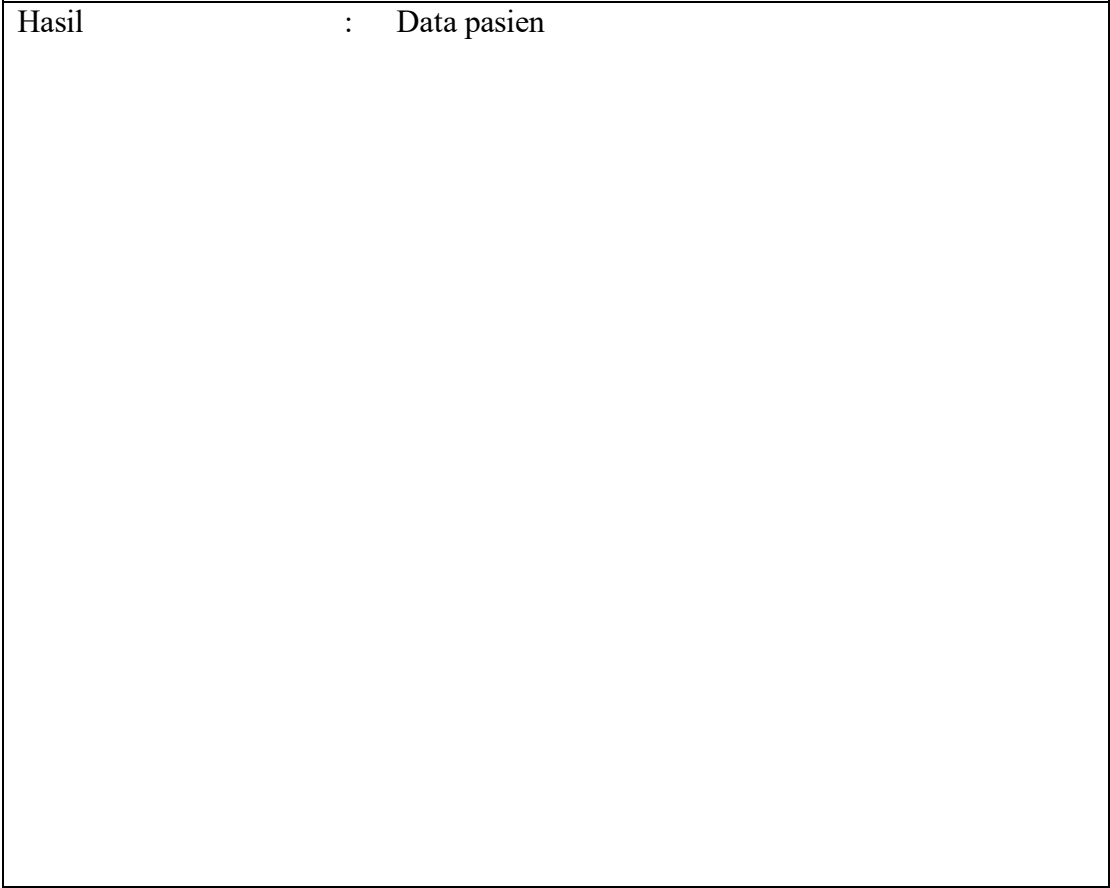
D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:	
Tujuan	:	
Prinsip	:	
Spesimen Pemeriksaan	:	
Alat dan Bahan	:	
Langkah Kerja	:	

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



Hasil : Data pasien



Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kesimpulan :

Pembimbing Praktikan 20...

() ()

METODE TYPHIDOT IgG/IgM

A. Pra Analitik

1. Tujuan Pemeriksaan

Untuk mendeteksi secara kualitatif dan diferensiasi antibody IgM dan IgG spesifik DALAM serum Atau plasma terhadap antigen OMP *Salmonella typhi* spesifik.

2. Metode

Typhidot IgG/IgM

3. Prinsip

Antigen OMP *S.typhi* yang spesifik diimobilisasi ke membrane nitrat selulosa sebagai garis uji. Ketika sampel uji ditambahkan ke bantalan sampel, sampel tersebut akan bermigrasi. Jika antibody IgG dan IgM anti-*S.typhi* terdapat dalam sampel uji, keduanya akan bereaksi dengan antibody IgG anti-manusia koloid emas atau IgM anti-manusia koloid emas untuk membentuk kompleks. Kompleks tersebut akan terus bergerak pada membrane nitrat selulosa dan kemudian ditangkap oleh antigen OMP *S.typhi* spesifik yang diimobilisasi, sehingga menghasilkan pita berwarna merah muda keunguan. Garis kontrol mengandung antibody IgG kelinci anti-tikus yang berikatan dengan antibody IgG tikus anti-manusia yang terkonjugasi emas atau antibody IgM tikus anti-manusia. Pita kontrol berfungsi sebagai indikasi migrasi yang valid pada garis/pita kontrol

4. Jenis dan Kriteria Spesimen/Syarat Sampel

- Serum atau plasma
- Hindari sampel yang lipemik atau keruh
- Jika sampel serum atau plasma tidak segera diuji, sampel harus disimpan pada suhu 2-8°C. Jika penyimpanan yang diinginkan lebih dari 3 hari, simpan sampel pada suhu -20°C

5. Alat dan Bahan

- 1) *Cassette Rapid Typhidot IgG/IgM kit Reszon Diagnostic*
- 2) *Buffer Chase*
- 3) Buku petunjuk (tersedia dalam kit)
- 4) Peralatan dan perlengkapan untuk pengambilan dan persiapan sampel
- 5) Peralatan untuk mengeluarkan sampel, seperti pipet
- 6) *Timer*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

B. Analitik

1. Prosedur Kerja

- 1) Letakkan kaset uji dan cairan buffer di suhu ruang. Jika terlihat adanya endapan dalam buffer chase, kocok botol dengan kuat dan diamkan
- 2) Beri label pada kaset uji dengan nama sampel
- 3) Tambahkan 45 μ L serum/plasma ke setiap sumur sampel. Pastikan tidak ada gelembung udara
- 4) Tambahkan 1 tetes buffer ke setiap sumur sampel. Serum/plasma akan mulai menyerap ke dalam membran. Kaset dapat di ketuk dengan hati-hati di atas meja untuk memudahkan sampel mengalir ke membrane
- 5) Baca hasil setelah 20 menit

2. Nilai Normal dan Interpretasi Hasil



GAMBAR 14 TYPHIDOT IGG/IGM

- **Positif :** Jika pita berwarna muncul pada garis kontrol (C) dan garis uji (T)
- **Negatif:** Jika pita berwarna hanya muncul pada garis kontrol (C)
- **Invalid :** Jika pita berwarna tidak muncul pada garis kontrol (C) dan garis uji (T) atau pita berwarna hanya muncul pada garis uji (T) saja.

C. Post Analitik

1. Pelaporan Hasil

Baca hasil setelah 20 menit

2. Sumber Kesalahan Pemeriksaan

- Waktu pengambilan sampel yang tidak tepat
- Reaksi silang dengan infeksi lain, adanya antibodi terhadap bakteri atau virus lain dapat menyebabkan reaksi silang sehingga menghasilkan positif palsu
- Kualitas reagen dan penyimpanan
- Kondisi sampel yang digunakan

3. Jaminan Mutu Pemeriksaan

- Kontrol kualitas dan evaluasi berkala: laboratorium perlu melakukan kontrol kualitas internal secara rutin dan mengikuti program penjaminan mutu eksternal (*proficiency*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

testing) untuk memastikan konsistensi dan reliabilitas hasil pemeriksaan typhidot dari waktu ke waktu

- Interpretasi hasil dan pelatihan tenaga laboratorium: hasil positif IgM menunjukkan infeksi akut atau baru terjadi, sedangkan IgG menunjukkan infeksi lama atau imunisasi sebelumnya. interpretasi yang tepat memerlukan pemahaman tentang dinamika antibody dan kondisi klinis pasien agar tidak terjadi kesalahan diagnosis. Tenaga laboratorium harus terlatih dalam prosedur dan interpretasi untuk menghindari kesalahan teknis
- Pengambilan dan penanganan sampel: pengambilan darah harus tepat dan penanganan sampel harus sesuai standar untuk menghindari degradasi antibody yang dapat mempengaruhi hasil
- Standar Prosedur Operasional (SOP): pemeriksaan dilakukan sesuai dengan petunjuk pabrikan tanpa memerlukan peralatan khusus atau pelatihan intensif, sehingga memudahkan penerapan di laboratorium kecil sekalipun

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:	
Tujuan	:	
Prinsip	:	
Spesimen Pemeriksaan	:	
Alat dan Bahan	:	
Langkah Kerja	:	

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

Hasil : Data pasien

Kesimpulan :

....., 20...

Pembimbing

Praktikan

() ()



1. Seorang pasien berusia 30 tahun datang ke klinik dengan keluhan demam tinggi yang berlangsung selama lebih dari 3 hari, disertai nyeri perut, dan gangguan pencernaan seperti diare. Dokter menyarankan pemeriksaan tubex-Tf dan hasilnya skala 6. Apakah penyebab infeksi tersebut?
 - a. *Plasmodium falciparum*
 - b. *Salmonella typhi*
 - c. *Virus influenza*
 - d. *Candida albicans*
2. Seorang pria berusia 25 tahun mengeluhkan demam tinggi, nyeri perut, dan diare setelah beberapa hari. Setelah periksa ke dokter ternyata positif tifoid. Bagaimana penularan penyakit tersebut?
 - a. Gigitan nyamuk
 - b. Kontak langsung dengan darah penderita
 - c. Konsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi atau tercemar
 - d. Udara pernapasan
3. Pada pasien yang datang dari rujukan dokter untuk pemeriksaan tifoid. TTLM melakukan pemeriksaan tubex. Pertama memipet brown reagent. Kemudian tambahkan control dan sampel. Apakah langkah selanjutnya ?
 - a. Inkubasi
 - b. Tutup
 - c. Tambahkan blue reagent
 - d. Baca di skala warna
4. Pada pasien yang datang dari rujukan dokter untuk pemeriksaan tifoid. TTLM melakukan pemeriksaan tubex. Apakah tujuan dari pemeriksaan tersebut?
 - a. Antigen H dari *Salmonella typhi*
 - b. Antigen LPS dari *Escherichia coli*
 - c. Antigen Vi dari *Salmonella typhi*
 - d. Antigen O9 dari *Salmonella typhi*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

5. Seorang TTLM melakukan pemeriksaan tubex. Hasil yang didapat skala 6. Menunjukkan apakah hasil tersebut?
 - a. Indikasi kuat adanya infeksi tifoid aktif
 - b. Tidak ada infeksi tifoid aktif
 - c. Hasil tidak valid dan harus diulang
 - d. Infeksi tifoid sudah sembuh

6. Pada pasien yang datang dari rujukan dokter untuk pemeriksian tifoid. TTLM melakukan pemeriksaan rapid Typhidot IgM. Apakah tujuan dari pemeriksaan tersebut?
 - a. DNA bakteri Salmonella typhi
 - b. Antigen bakteri Salmonella typhi
 - c. Antibodi IgM yang menunjukkan infeksi akut atau baru
 - d. Antibody IgM yang menunjukkan infeksi lama

7. Pada pasien yang datang dari rujukan dokter untuk pemeriksian tifoid. TTLM melakukan pemeriksaan rapid Typhidot IgG IgM. Hasil pemeriksaan IgG positif dan IgM negatif. Apakah arti hasil tersebut?
 - a. Infeksi tifoid aktif
 - b. Paparan atau pemulihan dari infeksi tifoid sebelumnya
 - c. Infeksi tifoid kronis
 - d. Tidak ada infeksi tifoid

8. TTLM melakukan pemeriksian tifoid. Metode yang digunakan ICT menggunakan rapid Typhidot IgG IgM. Hasil pemeriksaan typhidot IgM dan IgG keduanya negative. Apakah arti hasil tersebut?
 - a. Infeksi tifoid sedang dalam masa inkubasi
 - b. Infeksi tifoid aktif
 - c. Infeksi tifoid kronis
 - d. Tidak ada infeksi tifoid saat ini atau sebelumnya

9. Pada suatu pemeriksaan labortorium untuk deteksi tifoid. Alat yang digunakan yaitu dilihat perubahn warna yang tertera pada alat tersebut yaitu Typhidot IgG IgM, apakah prinsip alat tersebut?
 - a. Aglutinasi latex
 - b. ELISA

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- c. ICT
- d. FIA

10. Seorang pria usia 32 tahun dirawat di rumah sakit setelah mengalami demam tinggi. riwayat pemeriksaan laboratorium sebelumnya menunjukkan hasil positif infeksi *Salmonella typhi*. komplikasi serius yang paling mungkin terjadi pada kondisi tersebut?
- a. Perforasi usus halus
 - b. Gagal ginjal akut
 - c. Pneumonia
 - d. Hepatitis virus

Kunci Jawaban

- 1. B
- 2. C
- 3. A
- 4. D
- 5. A
- 6. C
- 7. B
- 8. D
- 9. C
- 10. A

RINGKASAN



Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella sp.* terutama *Salmonella typhi* dan *Salmonella paratyphi*. Masa inkubasi demam tifoid berlangsung antara 10-14 hari. Gejala yang timbul bervariasi, dari gejala klinis ringan sampai berat, dari asimtomatik hingga gambaran penyakit yang khas, yang dapat disertai dengan sejumlah komplikasi. Sebagian kasus demam tifoid dapat berakhir dengan kematian. Diagnosa untuk demam tifoid dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode yaitu IMBI, IgG/IgM dan typhidot.

GLOSARIUM



- Asimptomatik : kondisi dimana seseorang menderita suatu penyakit, tetapi tidak menunjukkan gejala apapun
- Hipertrofi : peningkatan ukuran sel-sel dalam jaringan tubuh sebagai respon terhadap stimulus tertentu
- Mikrovillus : tonjolan kecil menyerupai jari pada permukaan sel yang berfungsi untuk meningkatkan luas permukaan sel.
- Retikuloendotelial : sistem kekebalan tubuh

DAFTAR PUSTAKA



- Andayani, A., & Ermawati, N. 2021. Identifikasi Antibodi IgM *Salmonella typhi* Metode IMBI (Inhibition Magnetic Binding Immunoassay) Untuk Membantu Diagnosa Demam Typhoid. *Judika (Jurnal Nusantara medika)*. Vol 5 (1), 1-5.
- Bharmoria, A., Shukla, A., Sharma, K. 2017. Typhoid Fever as a Challenge for Developing Countries and Exclusive Diagnostic Approaches Available for the Enteric Fever. *Int Vaccine Res*. Vol 2 (2). 1-16.
- Kasim, V. 2020. Peran Imunitas Pada Infeksi *Salmonella typhi*. Gorontalo: CV Athra Samudra.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Ley, B., et al. 2011. Assesment and Comparative Analysis of a Rapid Diagnostic Test (TUBEX®) for the Diagnosis of Typhoid Fever Among Hospitalized Children in Rural Tanzania. *BMC Infectious Diseases*. Vol 11, Hal 174.

Nurdin., & Julianti,A. 2018. Deteksi Imunoglobulin Miu (IgM) dan Imunoglobulin Gamma (IgG) pada Penderita Demam Tifoid. *Jurnal Media Analis Kesehatan*. Vol 9 (2), 107-112.

Typhidot Rapid IgG/IgM (Combo) Version2 (A Rapid Test for Detection of Typhoid Fever). Reszon Diagnostics International Sdn. Bhd.

**MODUL
5**

PEMERIKSAAN MALARIA

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan Malaria dengan metode ICT
2. Mahasiswa mampu verifikasi dan validasi hasil pemeriksaan Malaria dengan metode ICT

PENDAHULUAN



Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium*. Parasit tersebut ditularkan kepada manusia melalui gigitan nyamuk dari *anopheles* betina. Spesies yang dapat menginfeksi manusia diantaranya *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium knowlesi*. Spesies malaria paling banyak di Indonesia adalah *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Malaria termasuk penyakit endemis, migrasi penduduk yang cepat, serta perpindahan dan kepergian penduduk dari daerah endemik, secara tidak langsung mempengaruhi peningkatan kejadian malaria. Tingginya angka penyakit malaria bisa dikarenakan terdapat kendala mengenai kesulitan dalam mendiagnosa secara cepat dan tepat. Sekarang ini ada pemeriksaan imunoserologi yang lebih mudah mendeteksi malaria menggunakan rapid test dengan prinsip ICT. Kelebihan pemeriksaan ini selain mudah alat ini juga dapat lebih cepat dalam membantu mendeteksi malaria.

PRAKTIKUM



Metode Rapid test Malaria Pv/Pf

A. Pra analitik

1. Tujuan Pemeriksaan
 - a. Mahasiswa mampu memahami pemeriksaan Rapid test Malaria *Pv/Pf*
 - b. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan Rapid test Malaria *Pv/Pf*
 - c. Mahasiswa mampu validasi pemeriksaan Rapid test Malaria *Pv/Pf*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

2. Alat dan Bahan

- a. Pipet/ mikropipet
- b. Sputit/lancet
- c. Swab alcohol
- d. Kapas kering
- e. *Rapid test*
- f. *Reagen Buffer*
- g. *timer*

3. Sampel

Sampel yang digunakan untuk pemeriksaan adalah darah. Bisa dari darah kapiler maupun dari vena dengan antikoagulan (heparin, citrate, ataupun EDTA). Jika tidak bisa langsung diperiksa sampel darah disimpan pada suhu $2 - 8^{\circ}\text{C}$ yang dapat bertahan selama 3 hari.

B. Analitik

1. Metode: Imunokromatografi (ICT)

2. Prinsip:

Selama pengujian, volume spesimen darah yang cukup diteteskan ke dalam bagian sumur sampel (S) dari kaset uji, buffer ditambahkan ke sumur. Buffer berisi deterjen yang melisiskan sel darah merah dan melepaskan berbagai antigen, akan bermigrasi melalui aksi kapiler melintasi strip yang ditahan dalam kaset. Pv-LDH jika ada dalam spesimen akan mengikat konjugat emas Pv-LDH. Imunokompleks ditangkap pada membran oleh antibodi anti Pv-LDH yang telah dilapisi sebelumnya. terbentuknya daerah T1 berwarna merah anggur yang menunjukkan hasil uji positif Pv atau pHRP-II jika ada dalam spesimen akan mengikat konjugat emas pHRP-II. Imunokompleks kemudian ditangkap pada membran oleh antibodi anti pHRP-II yang telah dilapisi sebelumnya, terbentuknya T2 berwarna merah anggur yang menunjukkan hasil uji positif Pf. Tidak adanya warna pada daerah T (T1 dan T2) menunjukkan hasil negatif. Uji tersebut pada daerah kontrol harus menunjukkan warna merah anggur dari imunokompleks konjugat emas *goat antimouse IgG/mouse IgG* (anti Pv-LDH dan anti pHRP-II) terlepas dari perkembangan warna pada salah satu daerah T. Jika tidak terbentuk warna hasil uji tidak valid dan spesimen harus diuji ulang dengan perangkat lain.

3. Prosedur

- a. Bawa specimen dan komponen pengujian pada suhu ruang.
- b. Ketika sudah siap digunakan, buka *casette* dari bungkusnya dan keluarkan *casette*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

beserta pipet yang tersedia. Letakkan pada permukaan datar dan kering.

- c. Berilah label atau Identitas pada *cassette*
- d. Tuangkan *specimen* darah dengan menggunakan pipet dari reagent (sesuai batas) atau menggunakan mikropipet sebanyak 5 μL dalam sumur sampel (S) jangan sampai ada gelembung.
- e. Kemudian tambahkan *reagent buffer* 3 tetes (sekitar 100-150 μL) dengan cepat.
- f. Atur *timer* setelah 5 penambahan pertama (sampel dan buffer) tambahkan 1 tetes lagi reagent buffer lagi untuk memperjelas hasil pemeriksaan
- g. Baca hasilnya pada 20-30 menit. Jangan membaca hasil pemeriksaan setelah lebih dari 30 menit.

C. Post Analitik

Interpretasi Hasil

1. Positif

- Positif Pv : terdapat garis berwarna merah anggur pada daerah control dan T1
- Positif Pf : terdapat garis berwarna merah anggur pada daerah control dan T2.
- Postif Pf dan Pv : terdapat garis berwarna merah anggur pada daerah control, T1 dan T2.

2. Negative : terdapat garis berwarna merah anggur hanya pada daerah control, sedangkan T1 dan T2 tidak ada

3. Invalid : Jika pada daerah control tidak berkembang atau tidak terdapat garis merah anggur. Bisa mengulang pemeriksaan menggunakan alat baru.

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Prinsip :
Spesimen Pemeriksaan :
Alat dan Bahan :
Langkah Kerja :

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Hasil	: Data pasien
Kesimpulan	:

.....,

20...

Pembimbing

Praktikan

() ()

EVALUASI



1. Seorang laki-laki berusia 24 tahun datang ke laboratorium dengan membawa rujukan untuk pemeriksaan rapid malaria. Hasil pemeriksaan menunjukkan positif. Apakah penyebab dari penyakit tersebut?
 - a. *Staphylococcus aureus*
 - b. *Plasmodium sp*
 - c. *Salmonella thypi*
 - d. *Treponema pallidum*
 - e. *Virus dengue*
2. Seorang TTLM pada laboraratorium melakukan pengujian malaria. Pengujian tersebut menggunakan prinsip yaitu sampel dimasukkan kedalam alat kemudian buffer ditambahkan ke daerah uji. Kemudian buffer berisi deterjen yang melisiskan sel darah merah dan melepaskan berbagai antigen, akan bermigrasi melalui aksi kapiler dalam alat. Hasil akhir uji akan dilihat perubahan warna. Apakah prinsip alat tersebut?
 - a. Aglutinasi
 - b. Presipitasi
 - c. Aglutinasi
 - d. IMBI
 - e. ELISA
3. Seorang laki-laki berusia 28 tahun datang ke klinik dengan keluhan demam naik turun yang sudah berlangsung selama lima hari, disertai menggigil dan nyeri kepala. Ia baru kembali dari perjalanan ke wilayah yang diketahui merupakan daerah endemis malaria. Dokter mencurigai pasien terinfeksi *Plasmodium* dan meminta dilakukan pemeriksaan cepat (rapid test) malaria. Spesimen apakah yang digunakan pada pemeriksaan tersebut?
 - a. Darah
 - b. Serum
 - c. Plasma
 - d. Urine

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- e. feses
4. Seorang laki-laki berusia 35 tahun datang ke unit gawat darurat rumah sakit daerah dengan gejala demam tinggi, menggigil, berkeriangat dingin, serta nyeri otot. Dokter mencurigai infeksi malaria dan meminta dilakukan pemeriksaan rapid test malaria. Apakah tujuan pemeriksaan itu?
 - a. Untuk mengetahui antibodi Plasmodium palsivarum
 - b. Untuk mengetahui antibodi Plasmodium fivax
 - c. Untuk mengetahui antigen Plasmodium palsivarum
 - d. Untuk mengetahui antigen Plasmodium fivax
 - e. Untuk mengetahui antigen Plasmodium palsivarum dan fivax
5. Seorang TTLM melakukan pemeriksaan rapid malaria. Hasil pemeriksaan terdapat garis merah anggur pada cassette daerah kontrol dan T1. Apakah arti hasil pemeriksaan tersebut?
 - a. Positif Pv
 - b. Positif Pf
 - c. Positif Pv dan Pf
 - d. Negative
 - e. Invalid
6. Seorang laki-laki berusia 40 tahun datang ke laboratorium klinik dengan membawa surat rujukan dari dokter untuk pemeriksaan darah untuk pemeriksaan rapid malaria. TTLM mengambil sampel dan kemudian melakukan pemeriksaan yang hasilnya adalah positif malaria. Apakah vektor utama penularan penyakit tersebut?
 - a. Nyamuk *Aedes aegypti* betina
 - b. Nyamuk *Anopheles sp* betina
 - c. Nyamuk *Culex sp* betina
 - d. Nyamuk *Anopheles sp* Jantan
 - e. Nyamuk *Aedes aegypti*
7. Pada suatu laboratorium menerima pasien dengan rujukan melakukan pemeriksaan rapid test malaria. Setelah memasukkan sampel, buffer dan inkubasi kemudian dilanjutkan dengan pembacaan hasil. Apakah pertama yang akan diamati?
 - a. T1
 - b. Kontrol
 - c. T2
 - d. waktu

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- e. sampel
8. Seorang dokter menuliskan rujukan pemeriksaan malaria. Pemeriksaan tersebut diminta cepat agar dapat membantu untuk menentukan suatu penyakit. TTLM melakukan pemeriksaan rapid test. Apakah keunggulan pemeriksaan tersebut?
- Dapat menghitung jumlah parasite
 - Mudah digunakan dan hasil cepat
 - Bisa mendeteksi genotipe malaria
 - Hanya perlu satu petugas
 - Paling sensitif
9. Seorang TTLM melakukan pemeriksaan rapid ICT malaria. Hasil pemeriksaan didapatkan perubahan warna pada garis C dan T1 sedangkan T2 tidak. Apakah kesimpulan hasil pemeriksaan tersebut?
- Positif Pv
 - Positif Pf
 - Positif Pv dan Pv
 - Negatif
 - invalid
10. Seorang TTLM melakukan pemeriksaan rapid ICT malaria. Hasil pemeriksaan didapatkan perubahan warna pada garis C dan sedangkan T1 dan T2 tidak. Apakah kesimpulan hasil pemeriksaan tersebut?
- Positif Pv
 - Positif Pf
 - Positif Pv dan Pv
 - Negatif
 - Invalid

Kunci Jawaban

- B
- C
- A
- E
- A
- B
- B

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

8. C
9. B
10. D

RINGKASAN



Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh Plasmodium. Metode pemeriksaan yang digunakan dalam bidang serologi untuk mendeteksi malaria menggunakan metode imunokromatografi. Metode ini merupakan metode yang cepat dan mudah dikerjakan. Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui antigen dari *Plasmodium falciparum* dan *vivax*. Sampel yang digunakan untuk pemeriksaan ini adalah darah utuh baik bisa dari kapiler maupun vena dengan antikoagulan EDTA, heparin dan citrat.

GLOSARIUM



- Plasmodium : Genus parasit penyebab malaria: termasuk *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale*, dan *knowlesi*
- Nyamuk Anopheles betina : Vektor utama penular malaria ke manusia
- Endemisitas : Tingkat penyebaran lokal penyakit, memengaruhi kejadian malaria
- RDT : Rapid Test Diagnostik
- Anopheles betina : Jenis nyamuk yang menjadi vektor penular malaria
- Migrasi penduduk : Perpindahan penduduk dari satu wilayah ke wilayah lain

DAFTAR PUSTAKA



Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. Pedoman Teknis Pemeriksaan Parasit Malaria.

Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2023. Buku Saku Tata Laksana Kasus Malaria.

Kementrian Kesehatan RI. 2020. Modul Pelatihan Mikroskopis Malaria Bagi Tenaga Atlm (Ahli Teknologi Laboratorium Medik). Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit. Direktorat Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tular Vektor dan Zoonotik. Jakarta.

Insert Kit Orient gene malaria (Pv/Pf) tes *Cassette diagnostic*.
<https://drive.google.com/file/d/15KRKyh9CUe9tpgOvPSR3w3ISCrjhRYte/view?usp=sharing>

**MODUL
6**

PEMERIKSAAN TUBERCULOSIS (TBC)

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami prinsip, menyebutkan peralatan dan melakukan pemeriksaan TBC dengan metode TCM (qPCR).
2. Mahasiswa mampu memahami prinsip, menyebutkan peralatan dan melakukan pemeriksaan TBC dengan metode ICT.

PENDAHULUAN



Tuberkulosis (TBC) merupakan salah satu penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan global, termasuk di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang umumnya menyerang paru-paru, namun juga dapat menyerang organ lain seperti ginjal, tulang, dan otak. TBC menular melalui percikan dahak (droplet) yang keluar saat penderita batuk, bersin, atau berbicara. Deteksi dini dan pemeriksaan yang tepat sangat penting untuk mencegah penularan lebih lanjut dan memulai pengobatan sesegera mungkin (Orgeur et al, 2024)

Pemeriksaan TBC melibatkan serangkaian prosedur untuk menegakkan diagnosis secara akurat. Pemeriksaan yang tepat dan menyeluruh akan membantu tenaga kesehatan menentukan strategi penanganan yang efektif sesuai kondisi pasien. Pemeriksaan untuk diagnosis TBC sangat beragam, pemeriksaan TBC secara konvensional seperti pemeriksaan mikroskopis sputum dan kultur bakteri memiliki keterbatasan dalam hal sensitivitas dan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan hasil. Perkembangan teknologi diagnostik telah menghadirkan inovasi dalam pemeriksaan TB melalui beberapa tes antara lain tes molekuler cepat (Tes Cepat Molekuler/ TCM) dan tes antibodi dengan menggunakan rapid test. Tes Cepat Molekuler, yang juga dikenal sebagai molecular diagnostic test, merupakan teknologi berbasis PCR (Polymerase Chain Reaction) yang mampu mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* dalam waktu singkat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Metode ini tidak hanya dapat mengidentifikasi keberadaan bakteri TBC,

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

tetapi juga dapat mendeteksi resistensi terhadap obat anti-TBC tertentu, khususnya rifampisin (Gideon et al, 2023)

Tes antibodi TBC menggunakan rapid test merupakan pemeriksaan serologis yang mendeteksi respons imun tubuh terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* melalui identifikasi antibodi spesifik dalam darah. Meskipun metode ini menawarkan kemudahan dalam pelaksanaan dan hasil yang cepat, penggunaannya memerlukan interpretasi yang hati-hati karena adanya kemungkinan reaksi silang dan variasi respons imun individual (Kontsevaya et al, 2024)

Kedua metode pemeriksaan ini memiliki karakteristik, kelebihan, dan keterbatasan masing-masing yang perlu dipahami oleh tenaga kesehatan untuk dapat menerapkannya secara optimal dalam program penanggulangan TBC. Pemahaman yang komprehensif tentang prinsip kerja, prosedur pelaksanaan, interpretasi hasil, serta indikasi penggunaan kedua metode ini akan berkontribusi pada peningkatan kualitas diagnosis TBC dan pada akhirnya mendukung upaya eliminasi TBC di Indonesia.

PRAKTIKUM



METODE TCM (Tes Cepat Molekuler)

A. Pra Analitik

1. Tujuan :
 - a. Mendeteksi keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) secara cepat dan akurat.
 - b. Mengidentifikasi resistensi terhadap rifampisin sebagai indikator MDR-TB.
 - c. Memberikan hasil diagnosis dalam waktu singkat untuk memfasilitasi pengobatan dini.
2. Metode
TCM (Test Cepat Molekuler)/ qPCR
3. Prinsip
TCM menggunakan teknologi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *real-time* yang terintegrasi dalam sistem kartrid otomatis untuk:
 - a. Lisis Sel: Pemecahan dinding sel bakteri MTB menggunakan sonikasi dan reagent khusus
 - b. Ekstraksi DNA: Isolasi DNA MTB dari sampel secara otomatis
 - c. Amplifikasi: Penggandaan sekuens DNA target secara eksponensial menggunakan:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Primer spesifik untuk gen *rpoB* (RNA polymerase β subunit), DNA polymerase *thermostable Thermal cycling* otomatis

- d. Deteksi Real-time: Monitoring amplifikasi menggunakan *fluorescent probes*
- e. Analisis Mutasi: Deteksi mutasi pada gen *rpoB* yang mengindikasikan resistensi antibiotik rifampisin.

4. Jenis/ Kriteria Sampel/ Syarat Sampel

Jenis spesimen yang dapat diperiksa :

- a. Spesimen saluran pernafasan respiratori
Sputum (hasil berdahak secara spontan, sputum induksi, bilasan bronkus (*bronchial washing*) dan *lavage bronkoalveolar* (BAL)).
- b. Spesimen Non Respiratori
Cairan pleura, cairan serebrospinal (CSF), aspirat kelenjar getah bening, jaringan biopsi dan urine (pada kasus TB ginjal).

Kriteria sampel yang boleh diperiksa :

- a. Sputum minimal bervolume 2 -5 ml.
- b. Konsistensi mukopurulen lebih baik dari pada saliva
- c. Pengumpulan sebaiknya pagi hari (*overnight*).

5. Alat dan Bahan

Alat :

- a. qPCR
- b. PC atau laptop dengan software yang sesuai dengan alat Qpcr.
- c. UPS (Uninterruptible Power Supply) dan Stabilizer.
- d. *BSC Class II*
- e. *Centrifuge*
- f. Mikropipet, tip steril dan bebas DNase/RNase
- g. Tabung conical steril ukuran 15 ml
- h. Vortex dan Timer

Bahan :

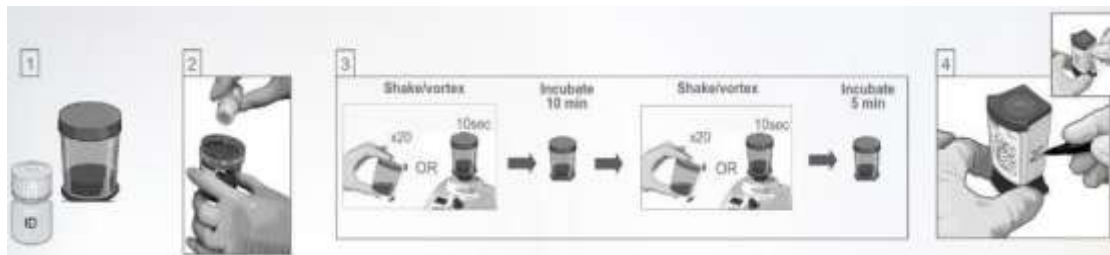
- a. *Cartridge Xpert MTB/RIF*
- b. Reagen : NaOH, Isopropanol pelisis), buffer (Penstabil DNA)
- c. Internal control

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

B. Analitik

1. Prosedur Kerja

- a. Preparasi Sampel Reagen (SR) : pastikan reagen dalam suhu ruang sebelum digunakan dan vorteks supaya reagen dalam keadaan homogen.



GAMBAR 15 PROTOKOL SHEET (REAGEN GX DX IFU V4.6B)

- b. Pengelolaan spesimen sputum : tambahkan sampel sputum + SR dengan perbandingan (1:2). Tutup tabung dan vorteks kurang lebih 10 – 15 detik atau kocok kencang sebanyak 20x kemudian inkubasi suhu ruang selama 10 menit.
- c. Vorteks diulang selama 10 – 15 menit atau kocok kencang sebanyak 20x, kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah inkubasi perhatikan kualitas dahak, apabila masih kental dan menggumpal tambahkan waktu inkubasi selama 5 – 10 menit.
- d. Siapkan *cartridge* Xpert MTB/RIF, beri identitas pada salah satu sisinya dengan identitas dengan barcode/ spidol.
- e. Buka penutup *cartridge*
- f. Pindahkan dahak yang sudah diproses (poin b,c) menggunakan pipet ke dalam ruang sampel pada *cartridge*, hindari terbentuknya gelembung udara.
- g. Tutup *cartridge* dengan rapat kemudian, segera proses sampel menggunakan mesin qPCR.

2. Nilai Rujukan : Negatif TB

C. Post Analitik

1. Pelaporan Hasil

TABEL 10 PELAPORAN HASIL MTB

Status MTB	Status RIF	Intepretasi
MTB Not Detected	-	Negatif TB
MTB Detected High	RIF Resistance Not Detected	TB Sensitif
MTB Detected High	RIF Resistance Detected	TB Resisten
MTB Detected Medium	RIF Resistance Not Detected	TB Sensitif

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

MTB Detected Medium	RIF Resistance Detected	TB Resisten
MTB Detected Low	RIF Resistance Not Detected	TB Sensitif
MTB Detected Low	RIF Resistance Detected	TB Resisten
MTB Detected Very Low	RIF Resistance Not Detected	TB Sensitif
MTB Detected Very Low	RIF Resistance Detected	TB Resisten
MTB Detected Very Low	RIF Resistance Intermediate	Diulang
Invalid		Diulang

Interpretasi secara semi kuantitatif dengan melihat nilai *Cycle Threshold* (Ct) :

- a. **Ct < 16**: Bacterial load tinggi ($\approx 3+$ pada mikroskopis)
- b. **Ct 16-22**: Bacterial load sedang ($\approx 2+$ pada mikroskopis)
- c. **Ct 22-28**: Bacterial load rendah ($\approx 1+$ pada mikroskopis)
- d. **Ct > 28**: Bacterial load sangat rendah (mikroskopis negatif)

2. Sumber Kesalahan

- a. Volume sampel tidak adekuat < 2ml
- b. Terdapat inhibisi PCR yakni dengan kondisi sampel dengan darah berlebih dan mucus masih dalam keadaan kental tapi tetap di *running* atau saliva berlebih disbanding sputum.
- c. Sampel sputum terkontaminasi obat kumur atau makanan.
- d. Waktu tunda pemeriksaan lebih dari 24 jam tanpa preservatif.
- e. Rasio antara SR dan Sputum tidak tepat, homogenisasi tidak sempurna.
- f. Masalah pada cartridge atau reagen yang disimpan pada suhu yang kurang tepat atau kadaluarsa.
- g. Instrumen qPCR tidak dikalibrasi, maintenance tidak teratur, tegangan listrik tidak stabil atau software error seperti terdapat bug atau *corrupted* data.

3. Jaminan Mutu Pemeriksaan

- a. QC setiap minggu dengan menggunakan sampel positif dan sampel negatif saat *running* sampel.
- b. Cek kebersihan alat dan suhu dilakukan maintenance secara rutin
- c. Lakukan kalibrasi dan *service* setiap bulan.
- d. Tabung ekstraksi dan tip harus steril dan yang mengandung DNase/RNase.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:
Langkah Kerja	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

[Empty box for notes or observations]

Hasil : Data pasien

[Empty box for results or discussion]

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kesimpulan :

....., 20...
Pembimbing Praktikan

() ()

METODE Immunochromatography Test (ICT)

A. Pra Analitik

1. Tujuan

Mendeteksi secara cepat keberadaan antigen atau antibodi *spesifik Mycobacterium tuberculosis* dalam spesimen klinis untuk diagnosis awal tuberkulosis, memberikan hasil dalam waktu 15-30 menit tanpa memerlukan peralatan laboratorium yang kompleks.

2. Metode

ICT menggunakan prinsip reaksi antigen-antibodi dengan sistem aliran lateral (*lateral flow*). Spesimen ditambahkan pada bantalan sampel, kemudian bermigrasi melalui membran nitroselulosa yang mengandung antibodi monoklonal spesifik terhadap antigen *M. tuberculosis*. Jika terdapat antigen target, akan terbentuk kompleks antigen-antibodi yang ditandai dengan munculnya garis berwarna pada area test line.

3. Prinsip

- Reaksi imunologi: Interaksi spesifik antara antigen *M. tuberculosis* dengan antibodi monoklonal
- Migrasi kapiler: Perpindahan spesimen melalui membran dengan bantuan buffer
- Deteksi visual: Pembentukan garis berwarna sebagai indikator hasil positif

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

d. Kontrol internal: *Control line* untuk memvalidasi bahwa tes berjalan dengan benar

4. Jenis/ Kriteria Sampel/ Syarat Sampel

Darah vena/ Serum/ Plasma, dengan kriteria berikut ini karena akan mengganggu pemeriksaan (Matthew and Krasowski, 2019)

- a. Darah tidak hemolisis
- b. Darah tidak lipemik berlebihan.
- c. Darah tidak ikterik berat.

5. Alat dan Bahan

Alat : Mikropipet, *yellow tip*, *timer*

Bahan : Kit rapid tes TB, buffer

B. Analitik

1. Prosedur Kerja

- a. Biarkan KIT dan sampel mencapai suhu ruang yakni 15 – 20°C, jangan membuka kemasan KIT jika belum siap digunakan.
- b. Teteskan sampel serum sebanyak 100 – 200 µl ke dalam lubang bantalan sampel.
- c. Tambahkan 2 – 3 tetes buffer untuk membantu migrasi melalui membrane.
- d. Biarkan selama 15 – 20 menit pada suhu ruang.
- e. Jangan memindahkan atau menggoyangkan selama inkubasi, baca hasil maksimal dalam 30 menit (waktu ini tentatif baca KIT lebih lanjut).
- f. Amati munculnya garis pada area test dan kontrol dengan pencahayaan yang cukup dan catat intensitas garis.

2. Nilai Rujukan : Negatif. / tidak terdeteksi antibody anti TB

C. Post Analitik

1. Interpretasi Hasil

Positif : Muncul 2 garis pada garis kontrol (C) dan garis tes (T).

Negatif : Hanya muncul 1 garis pada area kontrol (C) saja.

Invalid : Tidak muncul garis pada area kontrol (C) atau tidak muncul garis sama sekali.

2. Sumber Kesalahan

- a. False positif dapat terjadi pada kasus pasien menderita autoimun, kontaminasi silang dan infeksi bakteri non tuberculosis.
3. False negatif dapat terjadi pada kasus pasien terinfeksi namun pada *window period*, immunosupresi berat, TB ekstra paru, kadar antibody dibawah LOD.
4. Jaminan Mutu PemeriksaanGunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk operasional setiap hari setiap 20 sampel/ per shift.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- a. Validasi suhu penyimpanan KIT yakni 2- 30 °C.
- b. Gunakan serum dengan kadar antibodi yang telah diketahui kadarnya.
- c. Bandingkan dengan metode yang direkomendasikan misal qPCR atau kultur.

D. Jurnal Praktikum/ Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:
Langkah Kerja	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

Hasil : Data pasien

Kesimpulan :

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

.....,

20...

Pembimbing

Praktikan

() ()

EVALUASI



1. Seorang pria 45 tahun datang ke Puskesmas dengan keluhan batuk berdahak selama 3 minggu, disertai penurunan berat badan dan demam malam hari. Dokter mencurigai TBC dan memutuskan untuk melakukan pemeriksaan TCM. Hasil menunjukkan "MTB detected, Rifampicin resistance not detected". Apa interpretasi hasil tersebut?
 - A. Pasien tidak menderita TBC
 - B. Pasien menderita TBC sensitif obat
 - C. Pasien menderita TBC resisten obat
 - D. Pemeriksaan harus diulang
2. Seorang wanita 30 tahun datang HIV positif datang dengan gejala batuk kronis. Pemeriksaan dahak menyatakan bahwa BTA negatif. Dokter melanjutkan dengan TCM. Mengapa TCM dipilih dalam kasus ini ?
 - A. Lebih murah dari BTA Mikroskopis
 - B. Tidak memerlukan sampel dahak
 - C. Lebih sensitif pada pasien HIV
 - D. Hanya digunakan untuk skrining secara massal.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

3. TCM menggunakan teknologi *nested real time PCR* untuk mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis*. Apa keunggulan utama metode ini dibandingkan mikroskopis BTA ?
 - A. Lebih cepat dan akurat
 - B. Tidak memerlukan pelatihan teknis
 - C. Dapat dilakukan di rumah pasien
 - D. Tidak memerlukan listrik
4. Seorang pasien dengan hasil TCM “MTB not detected” tetapi gejala klinis sangat kuat mengarah ke TBC. Bagaimana langkah selanjutnya ?
 - A. Langsung mulai pengobatan TBC
 - B. Ulangi TCM dengan sampel baru
 - C. Lakukan pemeriksaan ICT
 - D. Lakukan pemeriksaan darah lengkap
5. ICT (Immunochromatographic Test) digunakan dalam skrining TBC laten. Apa prinsip kerja dari ICT ?
 - A. Deteksi DNA MTB
 - B. Deteksi antibodi terhadap MTB
 - C. Deteksi RNA MTB
 - D. Deteksi resistensi obat
6. Seorang pasien dengan hasil ICT positif namun TCM negatif. Apa interpretasi yang paling mungkin?
 - A. Pasien sedang dalam fase aktif TBC
 - B. Pasien tidak pernah terpapar MTB
 - C. Pasien pernah terpapar MTB (TBC laten)
 - D. Hasil ICT tidak valid
7. Pada pemeriksaan *Mycobacterium tuberculosis* masing – masing metode memiliki kelemahan dan kelebihan. Kelemahan utama dari pemeriksaan ICT dibandingkan TCM adalah.....
 - A. Tidak bisa mendeteksi TBC aktif
 - B. Tidak terlalu mahal
 - C. Tidak tersedia di Indonesia
 - D. Tidak bisa digunakan oleh anak - anak
8. Seorang pasien dengan hasil TCM “MTB detected, Rifampicin resistance detected”. Apa diagnosis yang tepat ?
 - A. TBC sensitive obat
 - B. TBC laten
 - C. TBC resisten obat (TBC RO)

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

D. Bukan TBC

9. Seorang pasien laki-laki berusia 46 tahun datang ke rumah sakit dengan gejala batuk berdahak lebih dari 2 minggu, kadang disertai darah, demam pada malam hari, dan penurunan berat badan. Dokter mencurigai pasien menderita Tuberkulosis (TBC) dan meminta pemeriksaan laboratorium. TTLM melakukan pemeriksaan TCM. Apakah keunggulan metode tersebut?
- A. Dapat mendeteksi resistensi rifampisin dalam waktu singkat
 - B. Tidak memerlukan laboratorium
 - C. Tidak memerlukan pelatihan
 - D. Hanya digunakan anak - anak
10. Pemerintah telah menetapkan program Indonesia bebas TBC 20230, maka dalam program nasional TOSS TBC semua layanan diminta untuk mengadakan pemeriksaan TBC, metode mikroskopis lebih diminati karena mudah dalam pengerjaannya namun tidak dapat mengetahui secara langsung antibiotik yang resisten terhadap bakteri, maka metode TCM yang di gunakan mengapa metode TCM lebih diminati ?
- A. Menyaring TBC laten di Masyarakat
 - B. Mendiagnosis TBC aktif dan resistensi obat
 - C. Menentukan jenis pengobatan HIV
 - D. Menentukan status imunisasi BCG

Kunci Jawaban:

- 1. B
- 2. C
- 3. A
- 4. B
- 5. B
- 6. C
- 7. A
- 8. C
- 9. A
- 10. B

RINGKASAN



TCM adalah tes yang sangat baik untuk diagnosis TBC cepat dan deteksi MDR-TB, tetapi perlu digunakan dengan tepat dan dikombinasi dengan evaluasi klinis yang baik. Metode ICT (Immunochromatographic Test) tidak dapat dijadikan patokan utama dalam diagnosis TBC aktif, baik menurut WHO maupun Kementerian Kesehatan RI. ICT hanya dapat digunakan sebagai alat skrining tambahan atau untuk penelitian, bukan sebagai dasar diagnosis TBC aktif. Diagnosis TBC harus ditegakkan dengan metode yang mendeteksi keberadaan langsung dari bakteri, seperti TCM atau kultur.

GLOSARIUM



Catridge TCM: Wadah reagen khusus yang digunakan dalam alat TCM. Setiap penyakit memiliki cartridge berbeda.

Sputum : Dahak yang dikeluarkan dari saluran pernapasan, digunakan sebagai sampel utama dalam pemeriksaan TCM.

TCM (Tes Cepat Molekuler) : Metode diagnostik berbasis real-time PCR untuk mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) dan resistensi terhadap rifampisin.

qPCR (*quantitative* PCR) atau real time PCR : Teknik amplifikasi DNA yang memungkinkan deteksi langsung dan kuantitatif dari DNA target secara cepat.

Rifampisin : Obat lini pertama untuk TBC. Deteksi resistensinya penting untuk menentukan apakah pasien menderita TBC resisten obat (TBC-RO).

Window Period : *Window period* adalah rentang waktu antara infeksi awal dan saat infeksi dapat terdeteksi oleh tes diagnostik.

DAFTAR PUSTAKA



Gideon Nsubuga, Samuel Kennedy, Yasha Rani, Zibran Hafiz, Soyeon Kim, Morten Ruhwald, David Alland, Jerrold Ellner, Moses Joloba, Susan E. Dorman, Adam Penn-Nicholson, Lydia

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Nakiyngi. 2023. Diagnostic accuracy of the NOVA Tuberculosis Total Antibody Rapid test for detection of pulmonary tuberculosis and infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. Vol 31 (100362) <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2023.100362>

Kontsevaya I, Cabibbe AM, Cirillo DM, DiNardo AR, Frahm N, Gillespie SH, Holtzman D, Meiwes L, Petruccioli E, Reimann M, Ruhwald M, Sabiiti W, Saluzzo F, Tagliani E, Goletti D. Update on the diagnosis of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2024 Sep;30(9):1115-1122. doi: 10.1016/j.cmi.2023.07.014. Epub 2023 Jul 23. PMID: 37490968.

Matthew, D dan Krasowski, M.D. 2019. Educational Case : Hemolysis and Lipemia Interference With Laboratory Testing. *Journal of Academic Pathology*. Vol 6. 1-5. <https://doi.org/10.1177/2374289519888754>

Orgeur M, Sous C, Madacki J, Brosch R. Evolution and emergence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2024 Mar 1;48(2):fuae006. doi: 10.1093/femsre/fuae006. PMID: 38365982; PMCID: PMC10906988.

Wulandari DA, Hartati YW, Ibrahim AU, Pitaloka DAE, Irkham. Multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Chim Acta*. 2024 Jun 1;559:119701. doi: 10.1016/j.cca.2024.119701. Epub 2024 May 1. PMID: 38697459.

**MODUL
7**

PEMERIKSAAN SITOKIN

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa memahami pengertian sitokin
2. Mahasiswa memahami dan melakukan pemeriksaan IL-6 metode ELISA
3. Mahasiswa memahami dan melakukan pemeriksaan TNF- α metode ELISA

PENDAHULUAN



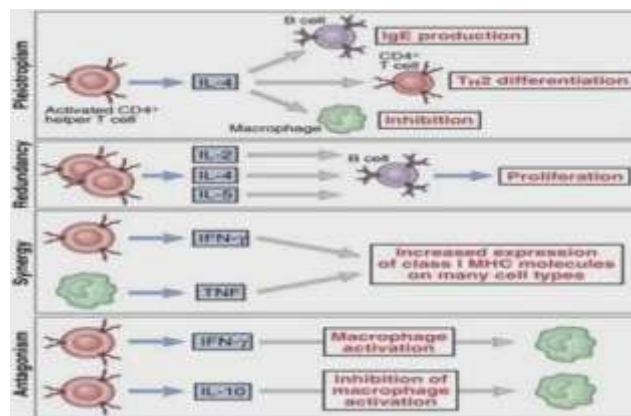
Pengertian dan Sifat Umum

Sitokin adalah sekelompok protein yang berfungsi sebagai pembawa pesan seluler dalam sistem kekebalan tubuh. Sitokin berperan dalam mengatur interaksi antar sel dan memacu reaktivitas imun, baik pada imunitas non spesifik maupun spesifik. Pada awalnya, istilah sitokin di kenal sebagai limfokin, karena diproduksi oleh sel limfosit B dan T yang diaktifkan. Ternyata selain sel limfosit, protein tersebut juga dihasilkan oleh sel makrofag, sel eosinofil, sel mast, sel endotel dan sel epitel.

Sitokin memberikan efeknya dengan mengikat reseptor spesifik pada permukaan sel target, yang kemudian memulai jalur pensinyalan intraseluler yang mengatur berbagai respons seluler. Pengikatan ini dapat menyebabkan efek autokrin, parakrin, atau endokrin, tergantung pada rentang aksi sitokin. Pensinyalan autokrin terjadi ketika sitokin bekerja pada sel yang memproduksinya, pensinyalan parakrin memengaruhi sel di dekatnya, dan pensinyalan endokrin melibatkan efek sistemik melalui aliran darah. Keseimbangan dan koordinasi yang rumit dari aksi sitokin sangat penting untuk menjaga homeostasis imun. Sitokin memiliki beberapa sifat umum, seperti :

1. Pleiotropik, dimana sitokin dapat beraksi pada berbagai sel dan memiliki fungsi yang berbeda.
2. Redudansi (*pleonastic*), yang berarti dua atau lebih sitokin dapat mempunyai fungsi yang sama.
3. Sinergistik, aksi dari beberapa sitokin dapat meningkatkan aksi sitokin.
4. Antagonistik, aksi satu sitokin memiliki efek yang berlawanan dari aksi sitokin lain.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



GAMBAR 16 SIFAT-SIFAT SITOKIN (BARATAWIDJAJA, KG., RENGGANIS, K., 2014)

Fungsi Sitokin

Sitokin dapat diklasifikasikan sebagai faktor pro-inflamasi atau anti-inflamasi, sebagai kemokin yang mengatur migrasi sel, atau sebagai faktor stimulasi yang mendorong proliferasi, kelangsungan hidup dan diferensiasi sel hematopoietik dan progenitornya. Klasifikasi yang luas ini menjadi rumit oleh bukti bahwa sebagian besar sitokin sangat pleiotropik dan dapat mengatur berbagai proses biologis. Fungsi sitokin bergantung pada jaringan, konteks imun atau inflamasi dan lingkungan mikro, karena faktor yang pro-inflamasi dalam satu konteks dapat menjadi anti-inflamasi di konteks lain. Misalnya, interleukin (IL)-4 adalah pendorong utama peradangan pada penyakit alergi seperti asma, tetapi memiliki efek anti-inflamasi pada kondisi autoinflamasi seperti rheumatoid arthritis dan psoriasis. Sitokin memiliki banyak fungsi yang penting untuk berfungsinya sistem imun dan kesehatan secara keseluruhan. Fungsi sitokin terutama meliputi:

1. Komunikasi Sel:

Sitokin bertindak sebagai pembawa pesan antar sel dan memungkinkan sel-sel untuk berkomunikasi dan berkoordinasi dalam respons imun.

2. Regulasi Kekebalan Tubuh:

Sitokin mengatur pertumbuhan dan aktivitas sel-sel imun, termasuk sel T, sel B, sel dendritik dan makrofag. Pada respon imun non spesifik, sitokin diproduksi oleh makrofag dan sel NK. Pada imunitas spesifik sitokin diproduksi oleh sel limfosit.

3. Peradangan (inflamasi)

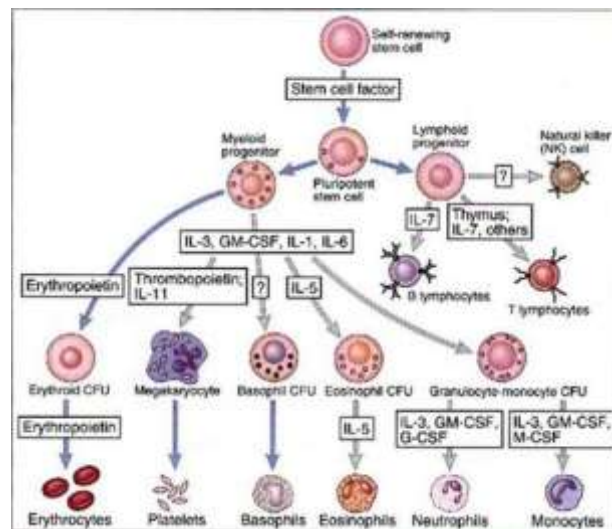
Sitokin berperan dalam memulai dan mengendalikan peradangan (inflamasi), yang merupakan respons penting terhadap infeksi dan cedera. Untuk melakukan fungsi tersebut, sitokin diklasifikasikan menjadi dua yaitu sitokin proinflamasi dan anti inflamasi. Sitokin proinflamasi disekresikan dari sel Th1, sel CD4⁺, makrofag, dan sel dendritik. Sitokin ini ditandai dengan produksi beberapa Interleukin (IL), IL-1, IL-2, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- γ , dan TNF- α . Sitokin

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

proinflamasi yang utama adalah IL-1, IL-6, dan TNF- α . Sitokin ini memberi sinyal melalui reseptor sitokin tipe I (CCR1) yang secara struktural berbeda dari jenis reseptor sitokin lainnya. Sitokin ini penting untuk mengoordinasikan respons imun yang dimediasi sel dan memainkan peran penting dalam modulasi sistem imun. Sitokin proinflamasi secara umum mengatur pertumbuhan, aktivasi sel, diferensiasi, dan pergerakan sel imun ke tempat infeksi dengan tujuan untuk mengendalikan dan membasmi patogen intraseluler, termasuk virus. Sitokin anti-inflamasi seperti antagonis reseptor IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, dan TGF- β adalah serangkaian molekul imunoregulatori yang menghambat respons inflamasi berlebih dari sitokin pro-inflamasi. Misalnya, IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi poten dengan fungsi imunoregulatori yang menghambat produksi beberapa sitokin pro-inflamasi. IL-10 juga memiliki efek anti-inflamasi pada eosinofil, basofil, dan sel mast, dan dengan demikian memainkan peran utama dalam pengendalian dan pengaturan alergi dan asma.

4. Pertumbuhan dan Diferensiasi Sel:

Beberapa sitokin juga terlibat dalam mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel, termasuk sel-sel darah (hematopoiesis) dan sel-sel jaringan lain. Sitokin yang berperan dalam hematopoiesis seperti *Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF), *Monocyte Colony Stimulating Factor* (M-CSF), IL-7 dan dan IL-3.



GAMBAR 17 SITOKIN YANG BERPERAN PADA HEMATOPOIESIS
(BARATAWIDJAJA, KG., RENGGANIS, K., 2014)

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Jenis Sitokin

Sitokin merupakan modulator utama peradangan. Sitokin diproduksi sebagai respons terhadap patogen yang menyerang untuk merangsang, merekrut, dan memperbanyak sel imun. Berdasarkan sel yang mensekresi, target aksi dan fungsinya, sitokin dapat dikelompokkan berdasarkan sebagai berikut :

1. Interleukin (IL) : Interleukin berperan dalam mengatur pertumbuhan, diferensiasi, dan fungsi berbagai sel kekebalan. Contohnya adalah IL-2 yang berperan dalam aktivasi sel T, dan IL-10 yang memiliki efek anti-inflamasi.
2. Interferon (IFN) : Interferon berperan dalam melawan infeksi virus dan mengaktifkan sel kekebalan. Contohnya adalah IFN- α dan IFN- β yang berperan dalam respons imun bawaan terhadap virus serta IFN- γ yang mengaktifkan makrofag, sel NK dan meningkatkan regulasi MHC.
3. Faktor Nekrosis Tumor (TNF) : TNF berperan dalam inflamasi dan apoptosis (pemrograman kematian sel). TNF- α adalah sitokin inflamasi yang penting dalam respons imun.
4. Faktor Stimulasi Koloni (CSF) : CSF berperan dalam mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel darah, terutama sel darah putih.
5. Kemokin : Kemokin adalah sitokin yang berperan dalam menarik sel-sel kekebalan ke lokasi infeksi atau cedera (kemotaktik). Kemokin diklasifikasikan menjadi empat subfamili utama, yaitu kemokin CXC, CC, CX3C, dan XC, yang memiliki perbedaan struktural dan fungsional. Kemokin memainkan peran penting dalam mengatur pergerakan dan lokalisasi limfosit dan sebagian sel dendritik. Kemokin CXC terutama terlibat dalam perekrutan sel imun ke lokasi peradangan dan kemokin homeostatis yang memediasi migrasi homeostatis. Beberapa kemokin juga memiliki fungsi ganda dan dapat bersifat inflamasi dan atau antiinflamasi tergantung pada lokasi ekspresi dan konsentrasi
6. *Transforming Growth Factor* (TGF) : TGF berperan dalam berbagai proses biologis, termasuk pertumbuhan sel, diferensiasi dan inflamasi. TGF- β adalah sitokin yang memiliki efek anti-inflamasi dan berperan dalam pemulihan jaringan.
7. Limfokin : Sitokin yang diproduksi oleh limfosit B dan T. Contohnya adalah IL-2 yang diproduksi oleh sel T dan IL-4 yang diproduksi oleh sel B.

Pemeriksaan Sitokin

Sitokin bertanggung jawab atas regulasi dinamis pematangan, pertumbuhan dan responsivitas sel imun. Satu sitokin dapat disekresikan oleh berbagai jenis sel dan dapat bekerja pada beberapa jenis sel, menghasilkan berbagai aktivitas biologis. Variasi kadar sitokin dalam berbagai cairan biologis seperti serum, darah, tinja, saliva, dan keringat, memberikan informasi berharga mengenai diagnosis, stadium dan prognosis berbagai penyakit. Produksi sitokin yang tidak normal

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

atau meningkat dapat menyebabkan kegagalan organ dan kematian. Kadar sitokin digunakan sebagai indikator penting untuk mengevaluasi gangguan klinis. Kuantifikasi sitokin yang akurat menawarkan informasi berharga dalam konteks klinis untuk memantau status imun pasien dan untuk menyesuaikan terapi pada berbagai penyakit. Beberapa sitokin yang sering diperiksa IL-6, IL-10, TNF- α dan IFN- γ . Manfaat pemeriksaan sitokin adalah

1. Mendeteksi dan memantau peradangan, kadar sitokin yang tinggi dapat menunjukkan adanya peradangan dalam tubuh, baik yang disebabkan oleh infeksi, penyakit autoimun atau kondisi lainnya.
2. Membantu diagnosis penyakit, pemeriksaan sitokin dapat membantu dokter mendiagnosis berbagai penyakit, termasuk penyakit autoimun seperti rheumatoid arthritis, lupus, dan psoriasis, serta beberapa jenis kanker.
3. Memantau respons terhadap pengobatan, tes sitokin dapat digunakan untuk melihat bagaimana tubuh merespons pengobatan, terutama pengobatan yang ditujukan untuk mengurangi peradangan atau menekan sistem kekebalan tubuh.
4. Mendeteksi badai sitokin, pemeriksaan sitokin dapat membantu mendeteksi badai sitokin, suatu kondisi serius yang ditandai dengan peningkatan kadar sitokin yang cepat dan dramatis, yang dapat menyebabkan kerusakan organ dan bahkan kematian.

Metode yang paling umum digunakan untuk kuantifikasi sitokin adalah *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *polymerase chain reaction* (PCR). Metode ini dapat diandalkan tetapi memakan waktu, memerlukan instrumen berbasis laboratorium yang mahal, personel terlatih, waktu persiapan sampel yang lama dan tingkat kompleksitas yang tinggi dalam penanganan sampel.

INTERLEUKIN-6 (IL-6)

Pendahuluan

Interleukin-6 (IL-6) adalah sitokin yang memiliki aktivitas pleiotropik. IL-6 menginduksi sintesis protein fase akut seperti CRP, serum amiloid A, fibrinogen dan hepsidin dalam hepatosit dan menghambat produksi albumin. IL-6 juga memainkan peran penting pada respons imun yang didapat dengan menginduksi sel B untuk berdiferensiasi menjadi sel pembentuk antibodi (sel plasma) dan perkembangan sel T efektor. Selain itu, IL-6 dapat mendorong diferensiasi atau proliferasi beberapa sel non imun. Karena aktivitas pleiotropik, produksi IL-6 yang terus-menerus dan tidak teratur menyebabkan timbulnya atau berkembangnya berbagai penyakit.

IL-6 pertama kali dideskripsikan pada tahun 1973 sebagai protein yang disekresikan oleh limfosit T yang membantu diferensiasi sel B menjadi sel-sel penghasil antibodi dan pertama kali dikenal sebagai *B Stimulating Factor 2* (BSF2). Satu dekade kemudian, protein lain yang sebelumnya dikenal sebagai faktor stimulasi hepatosit (hepatosit stimulating factor/HSF), interferon- β 2 (IFN- β 2),

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

serta faktor pertumbuhan plasmasitoma dikloning dan ditemukan bahwa molekul-molekul tersebut identik dengan IL-6. Peran sitokin tersebut, pertama kali menggambarkan aktivitas pleotropiknya dari IL-6. Pada tahun 1988, Sitokin BSF2 diganti namanya menjadi IL-6.

IL-6 adalah polipeptida kecil (berat molekul 19–28 kDa), terdiri dari empat heliks α . Biasanya dalam bentuk monomer, terdiri dari 184 residu asam amino, tempat glikosilasi dan dua ikatan disulfida. Gen penyandi IL-6 terletak pada kromosom 7p dan mencakup 4 intron dan 5 ekson. Gen ini diproduksi oleh limfosit B, limfosit T, makrofag, termasuk mikroglia, fibroblas, keratinosit, sel mesangial, sel endotel vaskular, sel mast, dan sel dendritik. Ekspresi IL-6 terutama diaktifkan oleh interleukin 1 β (IL-1 β) dan tumor necrosis factor-alpha (TNF α), selain itu, cara lain untuk mendorong sintesisnya seperti aktivasi *Toll-like receptor* (TLR), prostaglandin, adipokin, respons stres, dan sitokin lainnya. IL-6 diekspresikan dalam banyak jenis sel, seperti adiposit, fibroblas, osteoblas, sel endotel, neuron, limfosit, monosit, neutrofil, dll. dan ekspresinya bergantung pada aktivasi sel. Kadar IL-6 yang beredar pada orang sehat sangat rendah, sekitar 1 pg/ml, tetapi selama peradangan, kadar IL-6 meningkat dengan cepat.

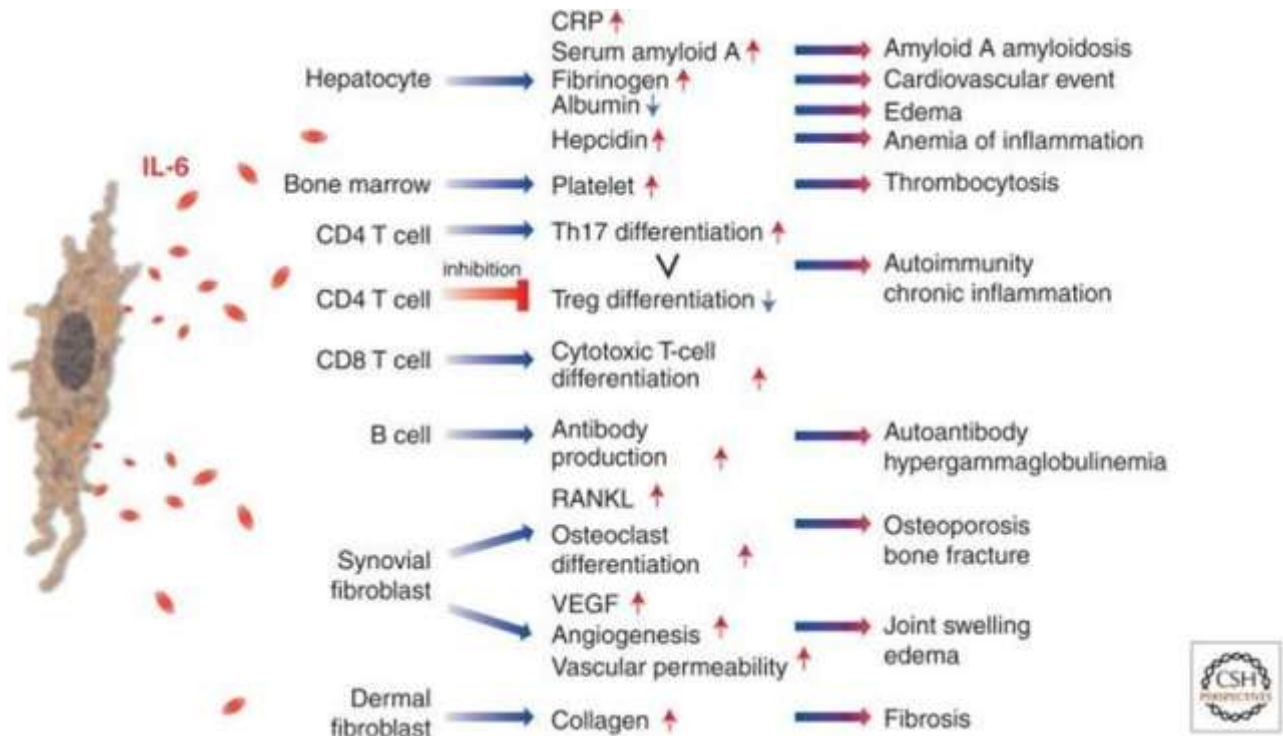
Pada tahap awal peradangan, setelah IL-6 disintesis dalam lesi lokal, IL-6 bergerak ke hati melalui aliran darah, diikuti oleh induksi cepat berbagai macam protein fase akut seperti protein C-reaktif (CRP), serum amiloid A (SAA), fibrinogen, haptoglobin, dan α 1-antichymotrypsin. Di sisi lain, IL-6 mengurangi produksi fibronectin, albumin, dan transferin. Efek biologis pada hepatosit ini pada awalnya dipelajari sebagai milik HSF. Ketika konsentrasi SAA yang tinggi bertahan untuk waktu yang lama, keadaan mengarah pada komplikasi serius dari beberapa penyakit inflamasi kronis melalui pembentukan amiloidosis amiloid A. Hal ini mengakibatkan deposisi fibril amiloid, yang menyebabkan kerusakan progresif pada berbagai organ. IL-6 juga terlibat dalam regulasi kadar serum besi dan seng melalui kontrol *transporter* mereka. Untuk serum besi, IL-6 menginduksi produksi hepcidin, yang menghalangi aksi *transporter* besi ferroportin 1 pada usus, sehingga mengurangi kadar serum besi dan menyebabkan hipoferremia dan anemia pada peradangan kronis. IL-6 juga meningkatkan ekspresi seng ZIP14 pada hepatosit dan menginduksi hipozincemia yang terlihat pada peradangan. Ketika IL-6 mencapai sumsum tulang, IL-6 meningkatkan pematangan megakariosit yang menyebabkan pelepasan trombosit sehingga terjadi trombositosis. Perubahan kadar CRP, jumlah sel darah merah dan trombosit digunakan untuk mengevaluasi tingkat keparahan peradangan dalam pemeriksaan laboratorium klinis rutin.

IL-6 juga meningkatkan diferensiasi spesifik sel T CD4⁺ naif, sehingga memainkan peran penting dalam menghubungkan respons imun non spesifik (bawaan) dengan respons imun spesifik (yang didapat). IL-6 juga merupakan sinyal peringatan atas kerusakan jaringan atau kematian sel dalam peradangan noninfeksi seperti luka bakar atau trauma. Ekspresi IL-6 dikontrol secara ketat

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

oleh mekanisme transkripsi dan pascatranskripsi. Sintesis IL-6 yang terus berkelanjutan (tidak terkendali) memberikan efek negatif pada peradangan kronis dan autoimunitas.

Peningkatan kadar IL-6 telah ditemukan pada pasien dengan penyakit kardiovaskular aterosklerotik, resistensi insulin, kanker stadium lanjut, asma atopik dan artritis reumatoid.



GAMBAR 18 IL-6 PADA PERADANGAN, IMUNITAS DAN PENYAKIT (TOSHIO TANAKA DKK, 2014)

Pemeriksaan IL-6 digunakan untuk menilai peradangan dan status kekebalan, dapat dilakukan dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Metode ELISA merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menilai kuantifikasi kadar peptide, protein, antibodi dan hormon berdasarkan prinsip antigen antibodi. Pada teknik ini akan dilakukan imobilisasi antigen pada permukaan yang solid, selanjutnya akan diikat oleh antibodi sehingga terbentuk kompleks ikatan antigen antibody, kompleks ini akan terikat dengan enzim. Sinyal deteksi berupa perubahan warna akan terbentuk akibat reaksi antara enzim dengan substrat.

TUMOR NEKROSIS FAKTOR (TNF- α)

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) adalah sitokin pleiotropik. TNF- α diproduksi terutama oleh sel-sel sistem imun bawaan, seperti makrofag dan sel natural killer (NK), serta sel-sel sistem imun adaptif, khususnya, sel limfosit T. TNF- α terlibat dalam beberapa proses homeostatis dan inflamasi, dan memainkan peran utama dalam penyakit autoimun dan inflamasi. Meskipun sangat

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

penting untuk respons imun normal, produksinya yang tidak terkontrol dapat menyebabkan inflamasi berlebihan. TNF- α adalah pengatur utama inflamasi akut dan kronis dan dalam keadaan tertentu, menyebabkan kematian sel melalui apoptosis dan nekroptosis. TNF- α memiliki peran penting dalam respons dini terhadap infeksi virus dengan meningkatkan infiltrasi limfosit ke lokasi infeksi.

Pada tahun 1975 TNF- α diidentifikasi sebagai faktor larut yang menyebabkan nekrosis tumor, dan awalnya disebut sebagai *Cachectin* atau *Differentiation Inducing Factor* (DIF). Kemudian, gen penyandi *cachectin* dan TNF- α dikonfirmasi sebagai molekul identik. Setelah diproduksi dan dilepaskan ke aliran darah, TNF- α mengikat dua reseptor utamanya yaitu: reseptor TNF 1 (TNF-R1) dan reseptor 2 (TNF-R2). R1, menjadi reseptor membran yang ditemukan di sebagian besar jenis sel. Reseptor 2, diekspresikan secara intensif oleh sel limfosit T dan sel endotel. Pengikatan TNF- α ke reseptor 1 dapat mengaktifkan faktor transkripsi faktor nuklir kappa-rantai ringan (NF- κ B). NF- κ B adalah faktor transkripsi regulatori utama yang mengendalikan ekspresi beberapa gen sitokin pro-inflamasi. Secara spesifik, aktivasi dan translokasi NF- κ B ke dalam nukleus sel menginduksi transkripsi IL-6, IL-1 β dan TNF- α . Bersama-sama, TNF- α dan NF- κ B memfasilitasi dan memperkuat respons inflamasi dengan mengaktifkan sel B, mengatur produksi sitokin, dan memodulasi peradangan dan apoptosis

Efek biologis utama TNF- α adalah mengintegrasikan imunitas bawaan dan adaptif. Awalnya, TNF- α mengaktifkan limfosit T dan B, mempengaruhi kemotaksis makrofag dan sel Natural Killer (NK), keduanya merupakan Sel Penyaji Antigen (APC) yang termasuk dalam imunitas bawaan. Interaksi sel-ke-sel tersebut merangsang imunitas adaptif untuk berinteraksi, yang diperankan oleh limfosit T dan B. TNF- α juga memicu produksi Prostaglandin (PG), meningkatkan induksi demam dan pelepasan protein fase inflamasi akut, seperti *C-Reactive Protein* (CRP), ekspresi gen sitokin dan kemokin, dan aktivasi sel endotel, yang berkontribusi secara signifikan terhadap perubahan vaskular untuk meningkatkan aliran darah di lokasi cedera. TNF- α , bersama dengan interleukin lain, meningkatkan kapasitas resorpsi tulang.

TNF- α berperan pada berbagai mekanisme seperti pada respon inflamasi, TNF- α merupakan mediator utama dalam respons inflamasi akut terhadap infeksi dan cedera. TNF- α juga berperan dalam mengatur sistem kekebalan tubuh, termasuk aktivasi sel-sel imun dan produksi sitokin lain (immunomodulasi), Pembentukan tumor dengan menghambat pertumbuhan tumor, tetapi juga dapat berperan dalam pertumbuhan tumor pada kondisi tertentu. Regulasi kematian sel dengan cara memicu apoptosis (kematian sel terprogram) atau nekrosis (kematian sel akibat cedera) tergantung pada kondisi sel dan lingkungan. meregulasi pembentukan tulang (osteogenesis) dan perbaikan tulang. TNF- α juga terlibat dalam respon immune pada penyakit autoimun seperti rheumatoid arthritis, psoriasis, dan penyakit Crohn.

PRAKTIKUM

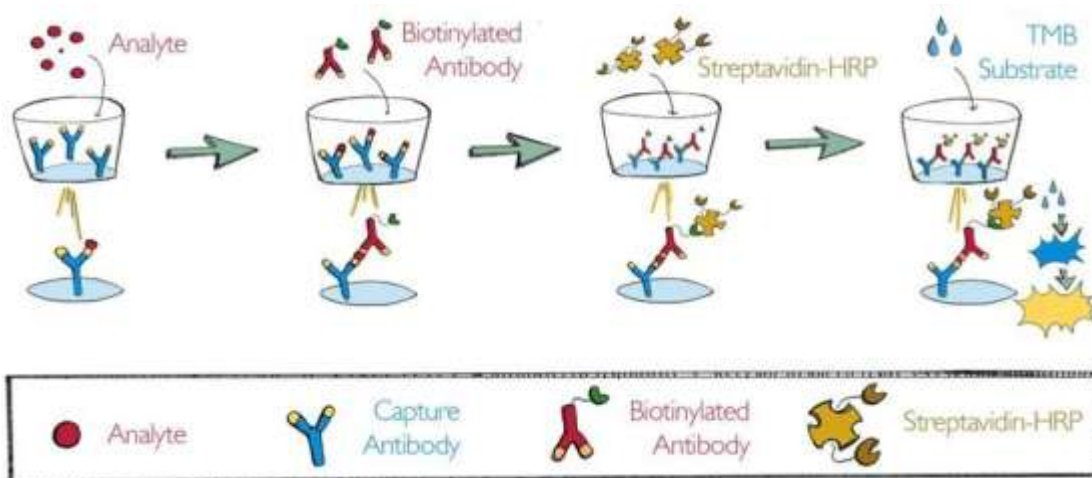


1. Pemeriksaan IL- 6

A. PraAnalitik

Prinsip Pemeriksaan

Antibodi anti-IL-6 akan berikatan dengan IL-6 yang terdapat dalam spesimen membentuk kompleks ikatan antibodi anti IL-6 dan IL-6. Selanjutnya, kompleks ini akan berikatan dengan antibodi anti-IL-6 berlabel biotin. Setelah penambahan enzim yang akan berikatan dengan anti-IL-6 berlabel biotin pada kompleks tersebut, enzim tersebut akan bereaksi dengan substrat sehingga menghidrolisis substrat kromogenik menjadi senyawa yang berwarna. Senyawa berwarna ini akan diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Nilai absorbansi sebanding dengan konsentrasi IL-6. Kurva standar dibuat dengan memplot nilai absorbansi terhadap konsentrasi standar dan konsentrasi sampel yang tidak diketahui ditentukan menggunakan kurva standar ini.



GAMBAR 19 PRINSIP ELISA SANDWICH ([HTTPS://WWW.BIOSSUSA.COM/PRODUCTS/BSKH1007](https://www.biossusa.com/products/BSKH1007))

Bahan Pemeriksaan

Serum, plasma EDTA atau heparin), urin, Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), cairan serebrospinal (CSF), dan cairan ketuban.

Catatan :

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

1. Sampel harus segera diuji setelah diambil atau harus disimpan dalam keadaan beku.
2. Sampel disiapkan sesuai dengan petunjuk kit. Beberapa kit mungkin memerlukan pengenceran sampel sebelum menembarkannya ke dalam *well*.
3. Sampel yang telah dicairkan dihomogenkan secara menyeluruh sebelum pengujian dan hindari siklus pembekuan/pencairan berulang, yang dapat menyebabkan hasil yang salah.
4. Sampel yang mengalami hemolisis atau lipemik jangan digunakan.
5. Pengenceran awal yang direkomendasikan untuk serum dan plasma adalah 3x.
 - a. Sampel dencerkan tiga kali lipat dengan buffer pengencer sebelum pengujian, misalnya 50 μ l sampel + 100 μ l buffer pengencer atau 100 μ l sampel untuk single + 200 μ l buffer pengencer untuk duplikat.
 - b. Campuran di homogenkan dengan baik (tidak berbusa). Gunakan Vortex.
6. Pengenceran awal yang dianjurkan untuk urin, cairan lavage bronkoalveolar, cairan serebrospinal adalah 3x. Pengenceran awal yang disarankan untuk cairan ketuban adalah 50x.
7. Stabilitas dan penyimpanan: Sampel harus disimpan pada suhu -20°C , atau lebih baik pada suhu -70°C untuk penyimpanan jangka panjang. Hindari siklus pembekuan/pencairan berulang. Jangan simpan sampel yang telah diencerkan.

Pengolahan Sampel

1. Serum
 - a. *Whole blood* tanpa antikoagulan di inkubasikan pada suhu kamar selama 20 menit atau pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.
 - b. *Whole blood* di sentrifuge pada kecepatan 2000 – 3000 rpm selama 20 menit.
 - c. Serum dipisahkan dari sel darah dan masukkan ke dalam cup serum.
 - d. Serum dapat segera dideteksi atau dapat disimpan di suhu -20°C atau -80°C untuk pengujian selanjutnya.
2. Plasma EDTA, Sitrat atau heparin.
 - a. *Whole blood* yang mengandung antikoagulan di sentrifuge pada kecepatan 2000 – 3000 rpm selama 20 menit.
 - b. Plasma dipisahkan dari sel darah dan masukkan ke dalam cup serum.
 - c. Plasma dapat segera dideteksi atau dapat disimpan di suhu -20°C atau -80°C untuk pengujian selanjutnya.
3. Sampel Biologis Lainnya (Urin, BALF, CSF, Cairan ketuban)
 - a. Sampel dikumpulkan di dalam tabung, kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 20 menit.
 - b. Cairan supernatant dikumpulkan dan di masukkan ke dalam cup serum untuk segera

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

dideteksi atau simpan pada suhu -80°C untuk pengujian selanjutnya.

4. Sampel Jaringan
 - a. Sampel jaringan dipotong dan ditimbang, selanjutnya jaringan ditambahkan dengan PBS (pH 7,4).
 - b. Sampel jaringan dihomogenisasi (dihancurkan) dalam kondisi dingin, suhu 4°C .
 - c. Sampel tersebut selanjutnya di sentrifuge dengan kecepatan 2000-3000 rpm, selama 20 menit.
 - d. Cairan supernatant dikumpulkan dan di masukkan ke dalam cup serum untuk segera dideteksi atau simpan pada suhu -80°C untuk pengujian selanjutnya

Reagen

Reagen yang digunakan disesuaikan dengan kit yang akan digunakan. Adapun reagen yang digunakan dapat berupa :

1. Antibodi monoklonal anti-IL-6
2. Antibodi monoklonal anti-IL-6 berlabel biotin
3. *Streptavidin-HRP Conjugate*
4. Larutan Standar IL-6
5. *Quality Control High dan Low (QCH dan QCL)*
6. *Dilution Buffer*
7. *Blocking Buffer*
8. *Wash Solution*
9. *Substrat Solution*
10. *Stop solution*

Catatan :

Bila reagen harus dilakukan pengenceran, maka proses kerja pengenceran dilakukan sesuai manual prosedur dari reagen Kit tersebut.

Alat

1. Sentrifuge
2. Wadah serum
3. *Elisa Reader*
4. *Elisa washing*
5. *Mikrowell microplate*
6. *Seal Microplate*
7. Mikropipet

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

8. Tip

Tindakan Pencegahan

Hindari kontak dengan *stop solution* dan *substrate solution* yang bersifat asam dan mengandung hidrogen peroksida dan tetra methyl benzidine (TMB). Kenakan sarung tangan dan pelindung mata serta pakaian saat menangani reagen ini. *Stop solution* dan *substrate solution* dapat menyebabkan iritasi kulit atau mata. Jika terjadi kontak dengan *stop solution* dan *substrate solution*, cuci kulit atau mata secara menyeluruh dengan air dan bila diperlu cari pertolongan medis.

Petunjuk Test

1. Hindari kontaminasi antara sampel dan reagen. Untuk tujuan ini, gunakan tip disposibel untuk setiap sampel dan reagen.
2. Larutan substrat harus tidak berwarna sampai ditambahkan ke pelat. Jauhkan larutan substrat dari cahaya.
3. *Stop Solution* harus tidak berwarna sampai ditambahkan ke pelat. Warna yang terbentuk di dalam *well* akan berubah dari biru menjadi kuning segera setelah penambahan *stop solution*.
4. *Well* yang berwarna hijau menunjukkan bahwa *stop solution* belum tercampur secara menyeluruh dengan *substrate solution*.
5. Limbah pemeriksaan dibuang sesuai dengan persyaratan peraturan yang berlaku

B. Analitik

Metode : ELISA Sandwich

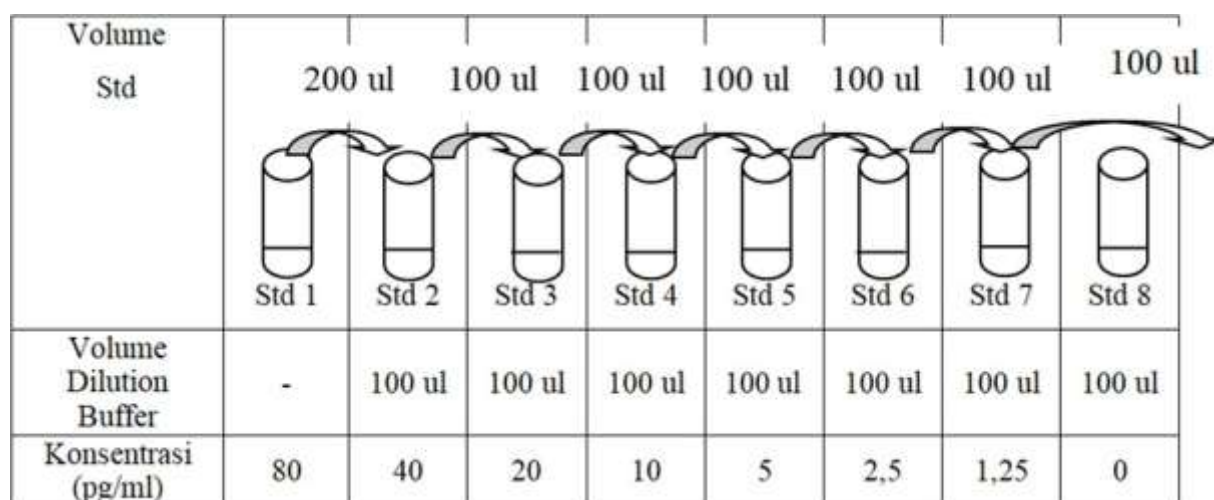
Cara Kerja Pemeriksaan IL-6

1. Semua reagen dan sampel di suhu kamarkan (18 - 25°C) sebelum digunakan.
2. Sketsa/peta kerja *microwell* dibuat dalam kertas kerja.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

TABEL 11 PETA KERJA MIKROMICROPLATE

	Stand ar		Microwell sampel									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	QC H	QC H	S.7	S.7	S.15	S.15	S.23	S.23	S.31	S.31
B	2	2	QCL	QCL	S.8	S.8	S.16	S.16	S.24	S.24	S.32	S.32
C	3	3	S. 1	S. 1	S.9	S.9	S.17	S.17	S.25	S.25	S.33	S.33
D	4	4	S. 2	S. 2	S.10	S.10	S.18	S.18	S.26	S.26	S.34	S.34
E	5	5	S. 3	S. 3	S. 11	S. 11	S. 19	S. 19	S. 27	S. 27	S. 35	S. 35
F	6	6	S. 4	S. 4	S.12	S.12	S.20	S.20	S.28	S.28	S.36	S.36
G	7	7	S. 5	S. 5	S.13	S.13	S.21	S.21	S.29	S.29	S.37	S.37
H	8	8	S. 6	S. 6	S.14	S.14	S.22	S.22	S.30	S.30	S.38	S.38



GAMBAR 20 PROSES PENGECERAN STANDAR IL-6

- Standar IL-6 dibuat serial pengenceran di dalam *well* standar dengan prosedur yang dapat dilihat pada gambar 20.
- Microwell* yang berisi serial standar 1 sampai dengan 8 dihomogenkan.
- Capture antibodi* (Antibodi monoklonal anti-IL-6) di pipet sebanyak 100 ul dan di masukkan ke dalam setiap *well*, *well* ditutup dengan *seal microplate* kemudian dinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C atau selama semalam pada suhu 4°C.
- Seal microplate* di buka, larutan dibuang dan *well* dicuci 3 kali dengan *wash solution*. Cuci dengan mengisi setiap *well* dengan *Wash solution* (0,35 ml per *well*) menggunakan

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

autowasher. Setelah pencucian terakhir, bersihkan sisa *wash solution* yang tersisa dengan aspirasi dan balikkan microplate pada tisu yang bersih.

7. *Blocking Buffer* ditambahkan sebanyak 200 ul, untuk membuat I-6 pada sampel menempel pada *well*. kemudian diinkubasi selama selama 1 jam pada suhu 25°C
8. Serum *control* dan sampel di pipet 100 ul kemudian dimasukkan ke dalam *well* sesuai dengan peta kerja.
9. *Well* ditutup dengan *seal microplate* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 25°C
10. *Seal microplate* di buka, larutan dibuang dan *well* dicuci 3 kali dengan *wash solution*. Cuci dengan mengisi setiap *well* dengan *Wash solution* (0,35 ml per *microwell*) menggunakan *autowasher*. Setelah pencucian terakhir, bersihkan sisa *wash solution* yang tersisa dengan aspirasi dan balikkan piring pada tisu yang bersih.
11. Larutan antibodi berlabel biotin di pipet sebanyak 100 ul dan di masukkan ke dalam setiap *well*, kemudian dihomogenkan.
12. *Well* ditutup dengan *seal microplate* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 25°C
13. *Seal microplate* di buka, larutan dibuang dan pencucian dilakukan sesuai dengan langkah no 7.
14. Streptavidin-HRP conjugate dipipet sebanyak 100 ul dan dimasukkan ke masing-masing *well* kemudian dihomogenkan.
15. *Well* ditutup dengan *seal microplate* yang baru dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25°C.
16. *Seal microplate* di buka, larutan dibuang dan pencucian dilakukan sesuai dengan langkah no 7.
17. *Substrat solution* di pipet sebanyak 100 ul dan dimasukkan ke masing-masing *well*, kemudian dihomogenkan.
18. *Well* ditutup dengan *seal microplate* yang baru dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C dan gelap (lindungi *well* dari sinar matahari langsung atau cahaya). Waktu inkubasi dapat diperpanjang (hingga 20 menit) jika suhu di bawah 20°C. Jangan mengocok *well* selama inkubasi.
19. *Stop Solution* dipipet sebanyak 100 ul ke setiap *well* (warna berubah dari biru ke kuning).
20. Absorban standar, serum kontrol dan sampel dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.
21. Kadar IL-6 dihitung berdasarkan nilai absorban menggunakan rumus persamaan garis.

Catatan :

1. Pencucian manual dapat dilakukan dengan memipet *wash solution* sebanyak 0,35 ml dan dimasukkan ke dalam setiap *well*, kemudian hisap larutan dalam *well* dan dibuang,

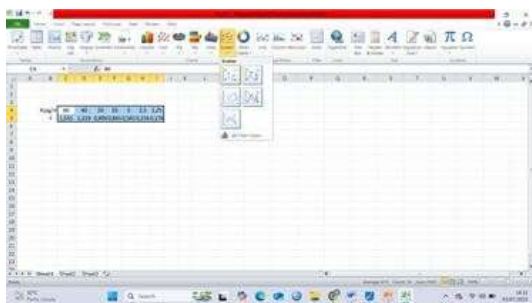
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- pengerjaan tersebut diulangi dua kali. Setelah pencucian terakhir, balikkan dan ketuk pelat dengan kuat pada tisu. Pastikan wash solution telah dikeluarkan seluruhnya.
2. Ikuti petunjuk khusus yang diberikan dalam manual kit ELISA untuk hasil optimal.
 3. Pastikan pencampuran reagen dan sampel yang tepat untuk menghindari kesalahan.
 4. Perhatikan baik-baik waktu inkubasi dan suhu.
 5. Cuci *well* secara menyeluruh untuk menghilangkan reagen yang tidak terikat.
 6. Hindari menyentuh dasar *well* selama penghisapan dan pencucian.
 7. Lindungi larutan substrat dari cahaya.
 8. Baca absorbansi segera setelah menambahkan larutan penghenti.
 9. Pastikan pembuangan reagen dan bahan bekas dilakukan dengan benar sesuai peraturan yang berlaku.

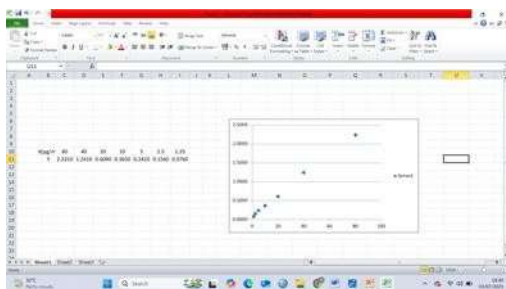
Post Analitik

Interpretasi Hasil

1. Buat kurva standar yang memplot nilai absorbansi dengan kadar standar pada program Microsoft Excel. Dimana nilai X adalah kadar standar dan Y adalah absorbansi.
2. Selanjutnya, Nilai X dan y diblok
3. Kemudian, Klik Insert
4. Selanjutnya, pilih Grafik Scatter

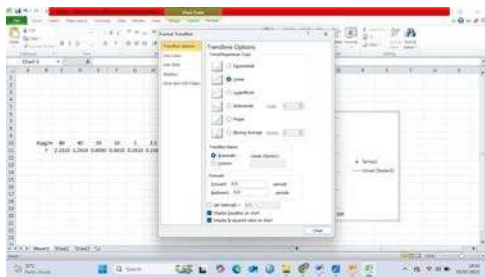


5. Sehingga akan didapatkan kurva scatter kadar Vs absorbansi

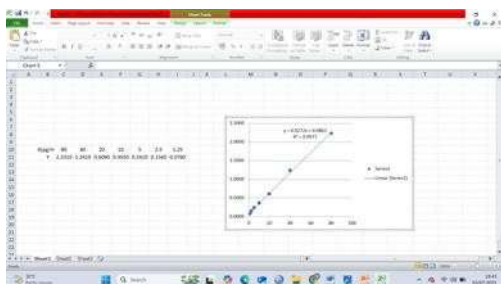


6. Kemudian, arahkan kursor ke salah satu titik dan klik kanan
7. Selanjutnya, pilih add trendline, kemudian pilih equation on chart and r squared value.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



8. Sehingga akan didapatkan persamaan garis dan nilai R^2 . Nilai R^2 harus mendekati nilai 1



9. Selanjutnya, konsentrasi dihitung dengan menggunakan persamaan garis yang di dapat sebelumnya (misal persamaan garis yang didapatkan adalah $Y = 0.0272x + 0.0863$), dimana nilai X ialah kadar dan Y adalah absorbans. Apabila absorbans sampel misalnya 0,912, maka absorbans dijadikan nilai Y dan dicari nilai X yang merupakan kadar IL-6, dengan persamaan : $x = (0,912 - 0,0863)/0,0272$, maka $x = 3,67$ pg/ml

1. Pemeriksaan TNF- α

A. Pra Analitik

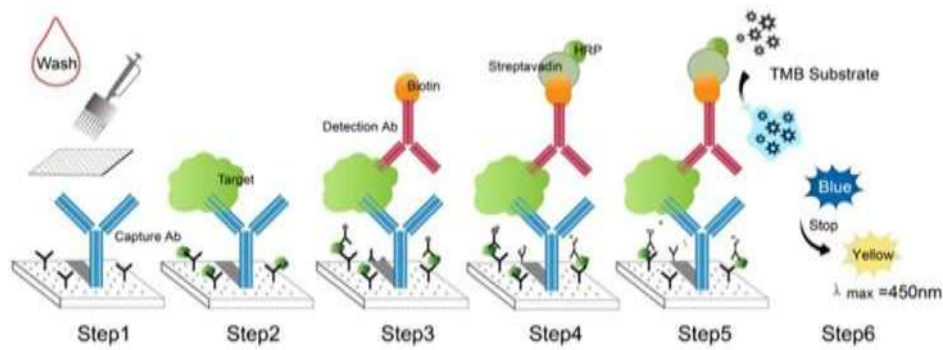
Tujuan Pemeriksaan

Mengukur kadar TNF- α yang terdapat di dalam spesimen.

Prinsip Pemeriksaan

Antibodi anti TNF- α diserap ke dalam *microwell*. TNF- α yang ada dalam sampel atau standar mengikat antibodi anti TNF- α yang telah ada dalam *microwell*. Antibodi anti TNF- α manusia yang terkonjugasi biotin ditambahkan dan mengikat TNF- α yang ditangkap oleh antibodi pertama. Setelah inkubasi, Streptavidin-HRP ditambahkan dan mengikat antibodi anti TNF- α manusia yang terkonjugasi biotin. Enzim tersebut akan bereaksi dengan substrat sehingga menghidrolisis substrat menjadi senyawa kromogenik (berwarna). Senyawa berwarna ini akan diukur nilai absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Nilai absorbans sebanding dengan konsentrasi anti TNF- α . Kurva standar dibuat dengan memplot nilai absorbans terhadap kadar TNF- α standar dan kadar TNF- α pada sampel yang tidak diketahui ditentukan menggunakan kurva standar ini.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



GAMBAR 21 PRINSIP ELISA SANDWICH TNF- α ([HTTPS://WWW.MPBIO.COM](https://www.mpbio.com))

Bahan Pemeriksaan

Serum, plasma EDTA atau heparin, urin, supernatan kultur sel.

Catatan :

1. Sampel harus segera diuji setelah diambil atau harus disimpan dalam keadaan beku. Sampel disiapkan sesuai dengan petunjuk kit. Beberapa kit mungkin memerlukan pengenceran sampel sebelum menembakkannya ke dalam *well*.
2. Sampel yang telah dicairkan dihomogenkan secara menyeluruh sebelum pengujian dan hindari siklus pembekuan/pencairan berulang, yang dapat menyebabkan hasil yang salah.
3. Sampel yang mengalami hemolisis atau lipemik jangan digunakan.
4. Sampel harus dibagi dan harus disimpan beku pada suhu -20°C untuk menghindari hilangnya TNF $-\alpha$ pada sampel. Jika sampel harus diperiksa dalam waktu 24 jam, sampel dapat disimpan pada suhu 2° hingga 8°C .
5. Jangan mencairkan sampel dalam air bersuhu 37°C . Jangan memutar atau mengaduk sampel dengan keras

Pengolahan Sampel

1. Serum
 - a. *Whole blood* tanpa antikoagulan diinkubasikan pada suhu kamar selama 20 menit atau pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.
 - b. *Whole blood* tanpa antikoagulan di sentrifuge pada kecepatan 2000 – 3000 rpm selama 20 menit.
 - c. Serum dipisahkan dari sel darah dan masukkan ke dalam tabung serum.
 - d. Serum dapat segera dideteksi atau dapat disimpan pada suhu -20°C atau -80°C untuk pengujian selanjutnya.
2. Plasma EDTA, Sitrat atau heparin.
 - a. *Whole blood* yang mengandung antikoagulan di sentrifuge pada kecepatan 2000 – 3000

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- rpm selama 20 menit.
- b. Plasma dipisahkan dari sel darah dan masukkan ke dalam tabungserum.
 - c. Plasma dapat segera dideteksi atau dapat disimpan pada suhu -20°C atau -80°C untuk pengujian selanjutnya.
3. Sampel Biologis Lainnya
- a. Sampel dikumpulkan di dalam tabung, kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 2000-3000 rpm selama 20 menit.
 - b. Cairan supernatan dikumpulkan dan di masukkan ke dalam tabung serum untuk segera dideteksi atau simpan pada suhu -80°C untuk pengujian selanjutnya.
4. Sampel Jaringan
- a. Sampel jaringan dipotong dan ditimbang, selanjutnya jaringan ditambahkan dengan PBS (pH 7,4).
 - b. Sampel jaringan dihomogenisasi (dihancurkan) dalam kondisi dingin, 4°C . Sampel tersebut selanjutnya di sentrifuge dengan kecepatan 2000-3000 rpm, selama 20 menit.
 - c. Cairan supernatan dikumpulkan dan di masukkan ke dalam tabung serum untuk segera dideteksi atau simpan pada suhu -80°C untuk pengujian selanjutnya
5. Cairan Supernatan Kultur Sel
- a. Supernatan Kultur sel dimasukkan ke dalam tabung, sentrifuge 2500 rpm pada $2-8^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit.
 - b. Kultur sel yang dijernihkan dipipet supernatannya dan dimasukkan ke dalam tabung serum untuk dideteksi segera atau disimpannya pada suhu -80°C untuk pengujian selanjutnya.

Reagen

Reagen yang digunakan disesuaikan dengan kit yang akan digunakan. Adapun reagen yang digunakan dapat berupa, yaitu :

1. Antibodi monoklonal TNF- α yang telah dilekatkan pada *microplate*
2. Antibodi monoklonal TNF- α berlabel biotin
3. *Streptavidin-HRP Conjugate*
4. Larutan Standar TNF - α
5. *Quality Control High dan Low (QCH dan QCL)*
6. *Dilution Buffer*
7. *Wash Solution*
8. *Substrat Solution*
9. *Stop solution*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Catatan :

Bila reagen harus dilakukan pengenceran, maka proses kerja pengenceran dilakukan sesuai manual prosedur dari reagen Kit tersebut.

Alat

1. Sentrifuge
2. Tabung serum
3. *ELISA Reader*
4. *ELISA washing*
5. *Mikrowell microplate*
6. *Seal Microplate*
7. Mikropipet
8. Tip

Tindakan Pencegahan

1. Hindari kontak dengan *stop solution* dan *substrate solution* yang bersifat asam dan mengandung hidrogen peroksida dan tetra methyl benzidine (TMB). Kenakan sarung tangan dan pelindung mata serta pakaian saat menangani reagen ini. *Stop solution* dan *substrate solution* dapat menyebabkan iritasi kulit atau mata. Jika terjadi kontak dengan *stop solution* dan *substrate solution*, cuci kulit atau mata secara menyeluruh dengan air dan bila diperlu cari pertolongan medis.
2. Dekontaminasi dan buang spesimen dan semua bahan yang berpotensi terkontaminasi karena dapat mengandung agen infeksius. Metode dekontaminasi yang disarankan adalah dengan menggunakan autoklaf minimal selama 1 jam pada suhu 121,5°C. Limbah cair yang tidak mengandung asam dan limbah yang dinetralkan dapat dicampur dengan natrium hipoklorit dalam volume sedemikian rupa sehingga campuran akhir mengandung 1,0% natrium hipoklorit. Biarkan selama 30 menit untuk dekontaminasi yang efektif. Limbah cair yang mengandung asam harus dinetralkan sebelum penambahan natrium hipoklorit.

Petunjuk Test

1. Hindari kontaminasi antara sampel dan reagen. Untuk tujuan ini, gunakan tip *disposable* untuk setiap sampel dan reagen.
2. Saat mencuci secara manual, ujung tip untuk menambahkan wash tidak menyentuh dinding *well*.
3. Larutan substrat harus tidak berwarna sampai ditambahkan ke *microplate*. Jauhkan larutan substrat dari cahaya.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

4. *Stop Solution* harus tidak berwarna sampai ditambahkan ke dalam sumur *microplate*. Warna yang terbentuk di dalam *well* akan berubah dari biru menjadi kuning segera setelah penambahan *stop solution*.
5. Cairan dalam sumur *microplate* yang berwarna hijau menunjukkan bahwa *stop solution* belum tercampur secara menyeluruh dengan *substrate solution*.

B. Analitik

Metode Pemeriksaan : ELISA Sandwich

Cara Kerja Pemeriksaan TNF- α

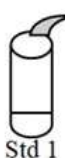
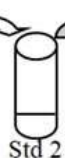






1. Semua reagen dan sampel di suhu kamarkan (18 - 25°C) sebelum digunakan.
2. Sketsa/peta kerja *microplate* dibuat dalam kertas kerja.

TABEL 12 PETA KERJA MIKROMICROPLATE

	Stand ar		Microwell sampel									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	QC H	QC H	S.7	S.7	S.15	S.15	S.23	S.23	S.31	S.31
B	2	2	QCL	QCL	S.8	S.8	S.16	S.16	S.24	S.24	S.32	S.32
C	3	3	S. 1	S. 1	S.9	S.9	S.17	S.17	S.25	S.25	S.33	S.33
D	4	4	S. 2	S. 2	S.10	S.10	S.18	S.18	S.26	S.26	S.34	S.34
E	5	5	S. 3	S. 3	S. 11	S. 11	S. 19	S. 19	S. 27	S. 27	S. 35	S. 35
F	6	6	S. 4	S. 4	S.12	S.12	S.20	S.20	S.28	S.28	S.36	S.36
G	7	7	S. 5	S. 5	S.13	S.13	S.21	S.21	S.29	S.29	S.37	S.37
H	8	8	S. 6	S. 6	S.14	S.14	S.22	S.22	S.30	S.30	S.38	S.38

3. *Well* dicuci dua kali dengan sekitar 400 μ l *wash solution*. *Wash solution* dibiarkan berada di dalam *well* selama sekitar 10 – 15 sebelum dihisap. Berhati-hatilah agar tidak menggores permukaan *well*. Setelah langkah pencucian terakhir, kosongkan *well* dan tepuk *microwell* pada tisu untuk membuang sisa *wash solution*. *Microwell* digunakan segera setelah dicuci atau *microwell* dapat diletakkan terbalik pada kertas penyerap basah selama tidak lebih dari 15 menit. Jangan biarkan *microwell* mengering.
4. Standar TNF- α dibuat serial pengenceran di dalam *well* standar dengan prosedur yang dapat dilihat pada gambar 22.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Volume Std		200 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	
									
Volume Dilution Buffer standar	-	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	100 ul	
Konsentrasi (pg/ml)	100	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0	

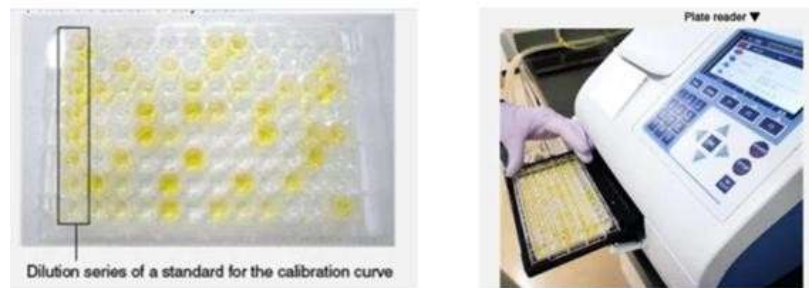
GAMBAR 22 PROSES PENGECERAN STANDAR TNF-A

5. *Well* yang berisi serial standar 1 sampai dengan 8 dihomogenkan.
6. Serum control dan sampel di pipet 50 ul kemudian dimasukkan ke dalam *well* sesuai dengan peta kerja (Bila sampel atau *serum control* harus diencerkan, proses pengenceran lihat manual prosedur).
7. Larutan antibodi berlabel biotin di pipet sebanyak 50 ul dan di masukkan ke dalam setiap *microwell*, kemudian homogenkan.
8. *Well* ditutup dengan seal *microplate* dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 18 sampai 25°C
9. Seal *microplate* di buka, larutan dibuang dan *well* dicuci 4 kali dengan *wash solution*. Cuci dengan mengisi setiap *Well* dengan *Wash solution* (0,35 ml per *well*) menggunakan *autowasher*. Setelah pencucian terakhir, bersihkan sisa *wash solution* yang tersisa dengan menepuk *microwell*. Balikkan *microwell* pada kertas penyerap atau tisu yang bersih.
10. Streptavidin-HRP conjugate dipipet sebanyak 100 ul dan dimasukkan ke masing-masing *well* kemudian dihomogenkan.
11. *Well* ditutup dengan seal *microplate* yang baru dan diinkubasi 1 jam pada suhu 18 sampai 25°C.
12. Seal *microplate* di buka, larutan dibuang dan pencucian dilakukan sesuai dengan langkah no 9.
13. *Substrat solution* di pipet sebanyak 100 ul dan dimasukkan ke masing-masing *well*, kemudian dihomogenkan.
14. *Well* ditutup dengan seal *microplate* yang baru dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25°C dan gelap (lindungi *mikromicroplate* dari sinar matahari langsung atau cahaya). Waktu inkubasi dapat diperpanjang (hingga 20 menit) jika suhu di bawah 20°C. Jangan mengocok plat selama inkubasi. Perkembangan warna pada pelat harus dipantau dan reaksi substrat harus segera. Penentuan periode waktu ideal untuk perkembangan warna harus dilakukan secara individual untuk setiap pengujian. Disarankan untuk menambahkan larutan penghenti

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

saat standar tertinggi telah menghasilkan warna biru tua.

15. *Stop solution* dipipet sebanyak 100 ul ke setiap *well* (warna berubah dari biru ke kuning). Penting agar *stop solution* disebarkan dengan cepat dan merata ke seluruh *well* mikro untuk menonaktifkan enzim sepenuhnya. Hasil harus dibaca segera setelah *stop solution* ditambahkan atau dalam waktu satu jam jika *microwell* disimpan pada suhu 2 - 8°C dalam gelap.
16. Absorban standar, serum kontrol dan sampel dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.
17. Kadar TNF- α dihitung berdasarkan nilai absorban menggunakan rumus persamaan garis.



GAMBAR 23 *WELL* YANG SUDAH DIBERIKAN STOP SOLUTION DAN PROSES PENGUKURAN

Catatan :

1. Pencucian manual dapat dilakukan dengan memipet *wash solution* sebanyak 0,35 ml dan dimasukkan ke dalam setiap *well*, kemudian hisap larutan dalam *well* dan dibuang, pengerjaan tersebut diulangi dua kali. Setelah pencucian terakhir, balikkan dan ketuk pelat dengan kuat pada tissu. Pastikan *wash solution* telah dikeluarkan seluruhnya.
2. Ikuti petunjuk khusus yang diberikan dalam manual kit ELISA untuk hasil optimal.
3. Pastikan pencampuran reagen dan sampel yang tepat untuk menghindari kesalahan.
4. Perhatikan baik-baik waktu inkubasi dan suhu.
5. Cuci *well* secara menyeluruh untuk menghilangkan reagen yang tidak terikat.
6. Hindari menyentuh dasar *well* selama penghisapan dan pencucian.
7. Lindungi larutan substrat dari cahaya.
8. Baca absorbansi segera setelah menambahkan larutan penghenti.
9. Pastikan pembuangan reagen dan bahan bekas dilakukan dengan benar sesuai peraturan yang berlaku.

C. Post Analitik

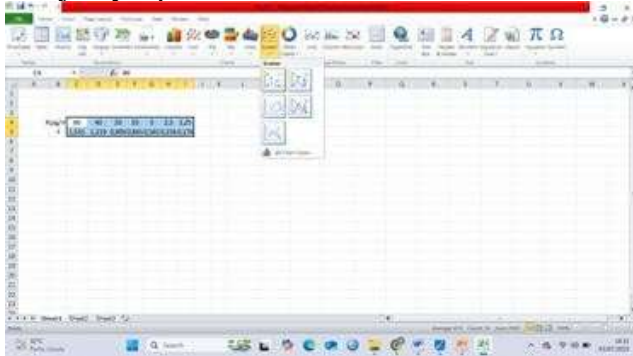
Interpretasi Hasil

1. Buat kurva standar yang memplot nilai absorban dengan kadar standar pada program

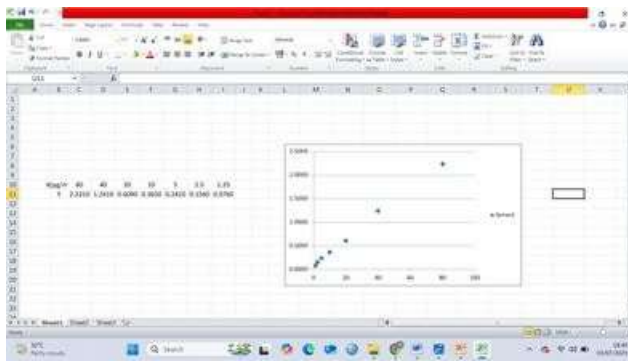
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Microsoft excel. Dimana nilai X adalah kadar standard an Y adalah Absorban.

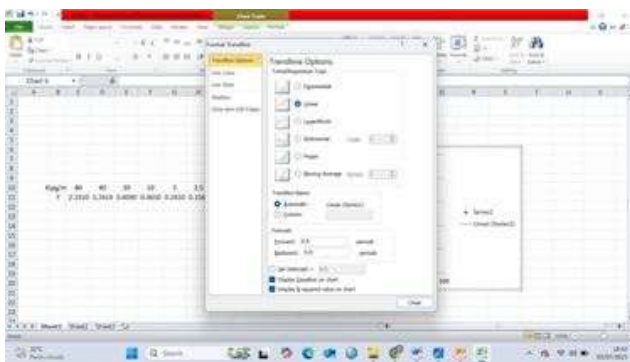
2. Selanjutnya, Nilai X dan y diblok
3. Kemudian, Klik Insert
4. Selanjutnya, pilih Grafik Scatter



5. Sehingga akan didapatkan kurva Scater Konsentrasi Vs absorban

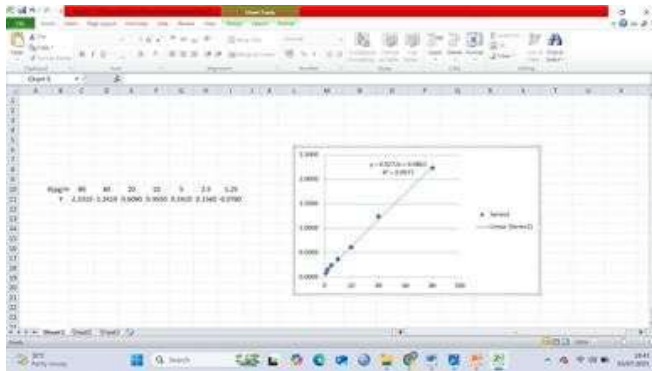


6. Kemudian, arahkan kursor ke salah satu titik dan klik kanan
7. Selanjutnya, pilih add trendline, kemudian pilih *equation on chart and r squared value*.



8. Sehingga akan didapatkan persamaan garis dan nilai R^2 . Nilai R^2 harus mendekati nilai 1

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



9. Selanjutnya, konsentrasi dihitung dengan menggunakan persamaan garis yang di dapat sebelumnya (missal persamaan garis yang didapatkan adalah $Y = 0.0272x + 0.0863$), dimana nilai X ialah kadar dan Y adalah absorban. Apabila absorban sampel misalnya 0,912, maka absorban dijadikan nilai Y dan dicari nilai X yang merupakan kadar TNF- α , dengan persamaan : $x = (0,912 + 0,0863)/0,0272$, maka $x = 3,67$ pg/ml

D. Jurnal Laporan Pratikum Sementara

Judul	:	
Tujuan	:	
Prinsip	:	

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Spesimen :

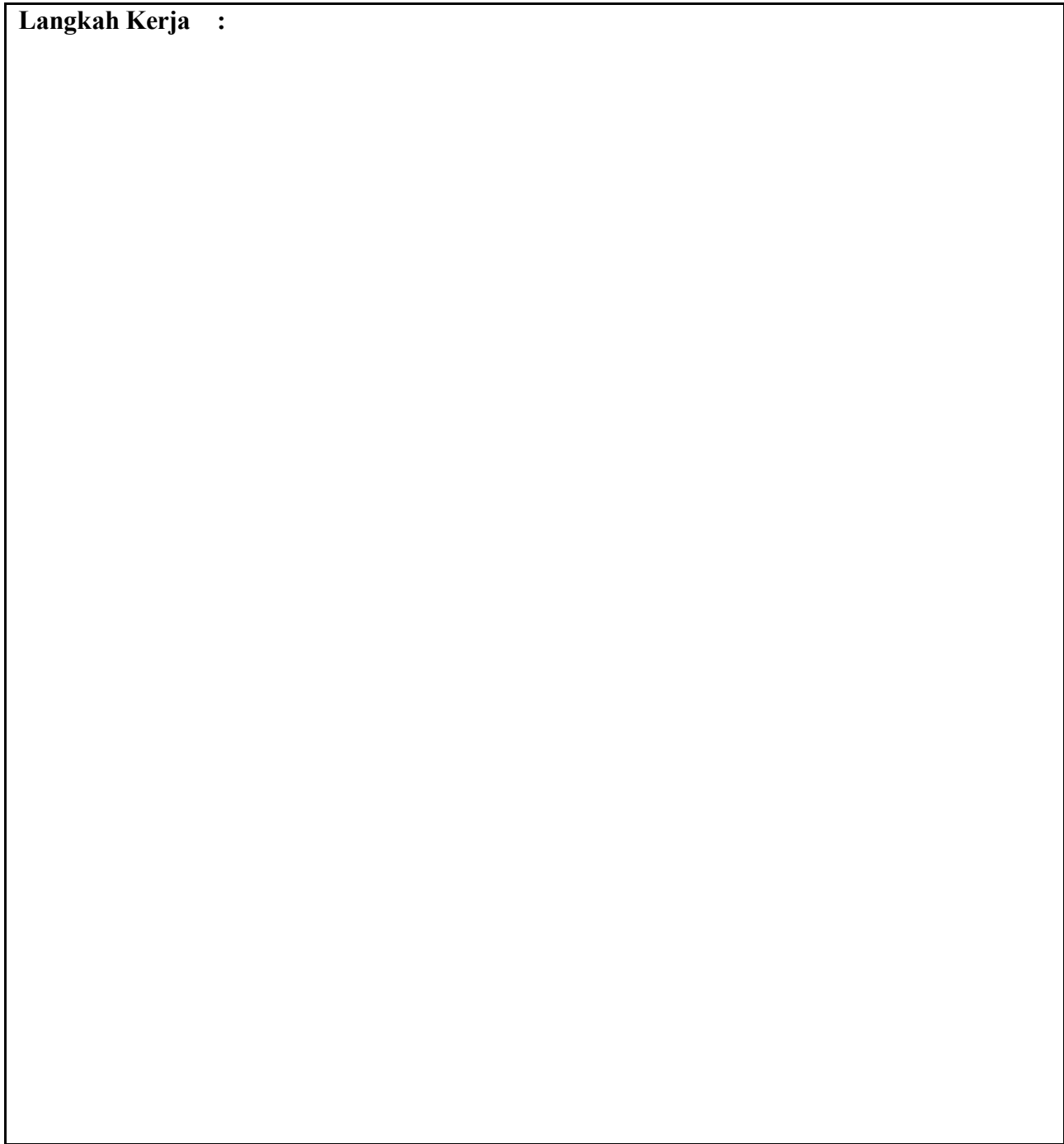
Pemeriksaan

Reagen :

Alat :

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Langkah Kerja :



Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Hasil	Identitas Pasien : Nama : Tempat tanggal Lahir : Jenis Kelamin : Diagnosa Sementara : Hasil Pemeriksaan :
Kesimpulan	:
Pembimbing	Paraf
	Pratikan

EVALUASI



- IL-4 bersama dengan IL-5 berperan dalam menginduksi pengalihan kelas IgE pada sel limfosit B. Berdasarkan gambaran tersebut, apa istilah yang digunakan untuk sifat dari sitokin tersebut ?
 - Pleiotropik
 - Redudansi
 - Sinergistik
 - Pleonastic
 - Antagonistik
- Sitokin ini berperan dalam hematopoiesis, dimana peran dari sitokin ini adalah mengaktivasi pembentukan granulosit dan monosit. Sitokin ini dihasilkan dari sel limfosit T, sel makrofag, sel endotel dan fibroblast. Apakah sitokin yang tersebut ?
 - IL-1
 - IL-6
 - G-CSF
 - M-CSF

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- E. GM-CSF
3. Sitokin ini mempunyai peran menarik sel-sel kekebalan ke tempat infeksi (kemotaktik), apakah sitokin yang dimaksud ?
- A. IL-2
 - B. IL-10
 - C. TNF- α
 - D. TGF- β
 - E. CX3C
4. Sitokin ini mempunyai peran dalam meregulasi kematian sel dengan memicu apoptosis, selain itu juga berperan dalam menghambat pertumbuhan tumor. Apakah jenis sitokin tersebut ?
- A. IL-2
 - B. IL-10
 - C. TNF- α
 - D. TGF- β
 - E. CX3C
5. Seorang tenaga TLM sedang menganalisis hasil pemeriksaan seorang pasien yang sedang menderita inflamasi berat. Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan peningkatan IL-6 dan CRP. Saat ini ATLM sedang mengamati pemeriksaan profil hematologi. Apakah pemeriksaan yang terpengaruh dengan tersebut ?
- A. Lekosit
 - B. Trombosit
 - C. Retikulosit
 - D. Hematokrit
 - E. Hitung jenis lekosit
6. Seorang tenaga TLM sedang menganalisis hasil pemeriksaan seorang pasien yang sedang menderita inflamasi berat. Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan peningkatan IL-6 dan CRP. Apa pemeriksaan laboratorium yang dapat menurun karena terpengaruh hasil tersebut ?
- A. Lekosit
 - B. Trombosit
 - C. Fibrinogen
 - D. Haptoglobin
 - E. Serum Besi
7. Seorang tenaga TLM sedang melakukan pemeriksaan sitokin. Pemeriksaan yang dilakukan mempunyai prinsip antibody penangkap akan berikatan dengan antigen spesifik yang ada di dalam sampel, ikatan kompleks antibody penangkap dan antigen ini akan berikatan dengan

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

antibodi pendeteksi yang dilabel enzim, kemudian enzim tersebut akan menghidrolisis substrat yang ditambahkan menjadi senyawa kromogenik. Apakah metode yang digunakan oleh tenaga TLM pada pemeriksaan tersebut.

- A. ELFA
 - B. ELISA Direk
 - C. ELISA Indirek
 - D. ELISA Sandwich
 - E. ELISA Kompetitif
8. Seorang tenaga TLM sedang mengerjakan pemeriksaan Sitokin dengan menggunakan ELISA sandwich. Saat ini tenaga TLM sedang menambahkan reagen yang akan merubah warna biru menjadi kuning. Apakah reagen yang ditambahkan oleh tenaga TLM tersebut ?
- A. *Stop solution*
 - B. *Blocking Buffer*
 - C. *Substrat Solution*
 - D. *Enzim Conjugate*
 - E. Antibodi pendeteksi
9. Seorang tenaga TLM sedang mengerjakan pemeriksaan Sitokin. Saat ini tenaga TLM sedang melakukan tahapan penting yang bertujuan menghilangkan antibody yang tidak terikat dengan antigen. Apakah tahapan yang dimaksud ?
- A. *Coating*
 - B. *Blocking*
 - C. Inkubasi
 - D. Pencucian
 - E. Stop reaksi
10. Seorang tenaga TLM sedang mengerjakan pemeriksaan Sitokin. Saat ini tenaga TLM sedang melakukan tahapan penambahan enzim. Enzim ini akan menghidrolisis tetra methyl benzidine (TMB) menjadi senyawa yang berwarna biru. Apakah enzim tersebut ?
- A. Catalase
 - B. B-galactosidase
 - C. Acetylcholinesterase
 - D. Alkaline Phospatase
 - E. Horseradish Peroxidase

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kunci Jawaban:

1. C
2. E
3. E
4. C
5. B
6. E
7. D
8. A
9. D
10. E

RINGKASAN



Sitokin adalah protein yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh, sitokin berperan sebagai pembawa sinyal, mengatur interaksi antar sel dan membantu dalam mengendalikan respon imun. Sitokin di produksi oleh berbagai sel dan dilepaskan untuk memberi sinyal pada sel lain untuk melakukan tugas tertentu.

Sitokin pada keadaan tertentu dapat berperan dalam melawan infeksi atau pathogen yang masuk, tetapi pada keadaan tidak terkendali dapat memperparah inflamasi yang dapat menyebabkan suatu keadaan yang dinamakan badai sitokin. IL-6 adalah sitokin pleiotropic yang memiliki berbagai fungsi dalam respon imun dan inflamasi. Sintesis IL-6 yang tidak terkendali memberikan efek negatif pada inflamasi kronis dan autoimun. TNF- α adalah sitokin yang berperan dalam respon imun dan inflamasi termasuk apoptosis. TNF- α berperan dalam berbagai penyakit terutama penyakit yang berbasis inflamasi seperti antara lain autoimun.

Pemeriksaan sitokin seperti IL-6 dan TNF- α dapat dilakukan dengan metode ELISA dan tujuan dari pemeriksaan ini quantifikasi kadar IL-6 dan TNF- α yang dapat digunakan dalam diagnosis dan prognosis penyakit.



Badai sitokin (*cytokine storm*)

: Kondisi medis ketika sistem kekebalan tubuh melepaskan terlalu banyak sitokin ke dalam darah dalam waktu singkat. Kondisi ini menyebabkan sel imun menyerang sel dan jaringan tubuh yang sehat sehingga menimbulkan peradangan (inflamasi yang berat).

Blocking Buffer

: Larutan yang digunakan dalam teknik laboratorium seperti Western blotting, ELISA, dan imunohistokimia untuk mencegah pengikatan antibodi non-spesifik ke membran atau permukaan lain

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

: Suatu teknik yang digunakan untuk mengkuantifikasi kadar peptida, protein, antibodi, antigen dan hormon berdasarkan kompleks antigen antibodi, dimana kompleks ini terikat dengan enzim. Sinyal deteksi berupa perubahan warna yang terbentuk akibat reaksi antara enzim dengan substrat.

ELISA reader

: Alat yang digunakan untuk mendapatkan nilai absorbansi pada pemeriksaan ELISA.

Larutan standard

: Suatu protein yang sudah diketahui kadarnya. Misalnya kadar standar IL-6 adalah 80 pg/mL. Umumnya larutan standar ini akan dibuat menjadi beberapa konsentrasi sehingga akan didapatkan grafik yang menggambarkan kadar standard. Grafik tersebut akan digunakan untuk menghitung kadar pada sampel.

Mikromicroplate

: Suatu wadah tempat dilakukan pengumpulan antigen dan antibodi yang umumnya berisi 96

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Nilai absorban	sumuran (<i>well</i>) : Suatu nilai yang menggambarkan intensitas warna pada ELISA.
<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	: Suatu teknik untuk mendeteksi dan menggandakan (memperbanyak) materi genetik seperti DNA atau RNA dari suatu organisme.
<i>Toll Like Reseptor</i>	: Protein yang berperan dalam imunitas bawaan, untuk mendeteksi patogen yang menyerang. Aktivasi TLR memicu produksi sitokin inflamasi dan mediator imun lainnya.
<i>Whole blood</i>	: Darah yang belum dipisahkan komponen-komponennya, mengandung sel darah merah, sel darah putih, trombosit, dan cairan darah.

DAFTAR PUSTAKA



- Anonim. **Human IL 6 ELISA Kit.** <https://www.biossusa.com/products/bskh1007>
- Anonim. (2023). Human Interleukin-6 Elisa. <https://www.biovendor.com/interleukin-6-human-elisa-1/PDS.pdf>
- Anonim. Human IL-6 (Interleukin 6) ELISA Kit. <https://www.mpbio.com>
- Anonim. (2024). Human TNF-Alpha Elisa. <https://www.biovendor.com/>
- Anonim. Human TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit.. <https://www.mpbio.com>
- Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. (2014). *Imunologi Dasar* (11th ed.). Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Chao Liu, Dewei Chu, Kourosch Kalantar-Zadeh, Jacob George, Howard A. Young, Guozhen Liu. (2021) Cytokines: From Clinical Significance to Quantification *Adv Sci* (Weinh). 2021 Jun 10;8(15):2004433. doi: [10.1002/advs.202004433](https://doi.org/10.1002/advs.202004433)
- Elena Grebenciucova and Stephen Van Haerents. (2023) Interleukin 6: at the interface of human health and disease. *Front Immunol.* 14:1255533. doi: [10.3389/fimmu.2023.1255533](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1255533)
- Gonzalez Caldito N (2023) Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. *Front. Immunol.* 14:1213448. doi: [10.3389/fimmu.2023.1213448](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1213448)
- Jun-Ming Zhang and Jianxiong An. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007 ; 45(2): 27–37. doi:[10.1097/AIA.0b013e318034194e](https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e).

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Luciano B. Silva¹, Alexandrino P. dos Santos Neto, Sandra M.A.S. Maia, Carolina dos Santos Guimaraes , Iliana L. Quidute, Alessandra de A.T. Carvalho, Severino A. Júnior, Jair C. Leão. (2019). The Role of TNF- α as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. *The Open Dentistry Journal*, 2019, Volume 13 333. DOI: 10.2174/1874210601913010332, 2019, 13, 332-338
- Polley DJ, Latham P, Choi MY, Buhler KA, Fritzler MJ and Fritzler ML (2023) Identification of novel clusters of co-expressing cytokines in a diagnostic cytokine multiplex test. *Front. Immunol.* 14:1223817. doi: 10.3389/fimmu.2023.1223817
- Saleh, I, Hidayat, R. (2018). ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. NoerFikri. Palembang
- Toshio Tanaka, Masashi Narazaki, Tadimitsu Kishimoto. (2014).IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. article as *Biol Cold Spring Harb* doi: [10.1101/cshperspect.a016295](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295)

**MODUL
8**

PEMERIKSAAN ALERGI IMUNOGLOBULIN E

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami tujuan pemeriksaan hipersensitivitas
2. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip dan melakukan pemeriksaan IgE total dan spesifik

PENDAHULUAN



Hipersensitivitas merupakan reaksi imun yang berlebihan atau tidak sesuai terhadap antigen atau alergen yang umumnya tidak berbahaya bagi individu sehat. Kondisi ini menjadi salah satu tantangan klinis yang penting karena dapat memicu gangguan sistemik mulai dari reaksi ringan seperti rinitis alergi hingga reaksi berat seperti syok anafilaktik atau kerusakan jaringan kronik. Reaksi hipersensitivitas diklasifikasikan menjadi empat tipe utama menurut Gell dan Coombs: tipe I (alergi), tipe II (sitotoksik), tipe III (kompleks imun), dan tipe IV (*delayed-type hypersensitivity*). Pemeriksaan laboratorium memiliki peran sentral dalam mendeteksi, mengonfirmasi, dan memantau reaksi hipersensitivitas. Uji laboratorium meliputi pemeriksaan IgE total dan spesifik, uji tusuk kulit (*skin prick test*), uji patch, uji netralisasi leukosit, pengukuran sitokin, serta deteksi kompleks imun dan aktivasi komplemen. Pemeriksaan ini membantu menilai mekanisme imun yang terlibat serta menetapkan diagnosis jenis hipersensitivitas secara spesifik.

Dalam praktik Teknologi Laboratorium Medik (TLM), pemahaman terhadap prinsip, teknik, dan interpretasi hasil pemeriksaan hipersensitivitas sangat diperlukan. Hal ini penting untuk mendukung diagnosis klinis yang tepat, pengelolaan alergi, penyakit autoimun, hingga kondisi inflamasi kronik yang terkait dengan disregulasi sistem imun. Dengan pendekatan molekular dan imunologi modern, laboratorium kini juga dapat mengidentifikasi biomarker hipersensitivitas tertentu seperti IL-4, IL-5, IL-13, atau ekspresi reseptor IgE, sehingga diagnosis menjadi lebih akurat dan personal. Oleh karena itu, kompetensi dalam melakukan pemeriksaan laboratorium hipersensitivitas menjadi bagian integral dalam tugas seorang tenaga laboratorium medis, terutama di era kedokteran presisi yang menuntut keakuratan diagnosis berbasis laboratorium.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Hipersensitivitas Tipe I, dikenal juga sebagai reaksi alergi tipe segera, melibatkan respons imun yang dimediasi oleh imunoglobulin E (IgE). Pada paparan pertama terhadap alergen, sel B teraktivasi dan menghasilkan IgE spesifik yang kemudian menempel pada permukaan sel mast dan basofil melalui reseptor Fc ϵ RI. Saat tubuh terpapar kembali oleh alergen yang sama, alergen akan menautkan IgE pada permukaan sel tersebut dan memicu degranulasi, melepaskan mediator seperti histamin, leukotrien, dan prostaglandin. Mediator ini menyebabkan vasodilatasi, peningkatan permeabilitas kapiler, dan kontraksi otot polos, yang menghasilkan gejala seperti gatal, urtikaria, asma, atau bahkan anafilaksis.

Hipersensitivitas Tipe II merupakan reaksi sitotoksik yang dimediasi oleh antibodi IgG atau IgM yang mengenali antigen spesifik pada permukaan sel. Antibodi ini akan menempel pada sel target dan memicu aktivasi sistem komplemen klasik atau mekanisme ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*), yang menyebabkan lisis sel atau fagositosis oleh makrofag. Reaksi ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan pada kondisi seperti anemia hemolitik autoimun, penyakit Graves, atau sindrom Goodpasture.

Hipersensitivitas Tipe III disebabkan oleh pembentukan kompleks imun antara antigen dan antibodi (terutama IgG) dalam jumlah berlebih di dalam sirkulasi. Kompleks imun ini akan mengendap di jaringan seperti ginjal, sendi, atau pembuluh darah, dan memicu aktivasi komplemen. Aktivasi ini akan menarik neutrofil dan sel imun lainnya yang melepaskan enzim proteolitik dan radikal bebas, menyebabkan peradangan dan kerusakan jaringan. Contoh penyakit dengan mekanisme ini adalah lupus eritematosus sistemik (SLE), artritis reumatoid, dan penyakit serum.

Hipersensitivitas Tipe IV, atau *delayed-type hypersensitivity* (DTH), dimediasi oleh sel T, bukan antibodi. Pada paparan pertama terhadap antigen, limfosit T (terutama CD4⁺ Th1) teraktivasi dan membentuk sel T memori. Pada paparan selanjutnya, sel T ini akan mengenali antigen dan melepaskan sitokin seperti interferon-gamma (IFN- γ) dan TNF- α , yang mengaktivasi makrofag dan sel efektor lain. Proses ini memunculkan inflamasi lokal yang berlangsung dalam 24–72 jam setelah paparan antigen. Contoh klasik dari tipe ini adalah uji tuberkulin, dermatitis kontak, dan reaksi terhadap cangkok (*graft-versus-host disease*).



A. Pra Analitik

1. Tujuan : Untuk mendeteksi dan mengukur kadar antibodi IgE total atau spesifik dalam serum pasien, yang berperan penting dalam reaksi alergi dan penyakit hipersensitivitas Alat dan bahan
2. Alat dan Bahan

No.	Alat / Bahan	Fungsi
a.	Tabung vacutainer tanpa antikoagulan	Menampung darah untuk pengambilan serum
b.	Centrifuge	Memisahkan serum dari sel darah
c.	Mikropipet dan tip	Mengambil dan memindahkan volume kecil sampel atau reagen secara presisi
d.	Rak tabung	Menempatkan tabung sampel selama proses
e.	Kit ELISA / CLIA / ECLIA IgE	Reagen dan komponen utama untuk mendeteksi IgE dalam serum
f.	Micromicroplate ELISA	Tempat berlangsungnya reaksi antigen-antibodi
g.	Inkubator	Menjaga suhu optimal selama reaksi berlangsung
h.	Microplate washer	Membersihkan sisa reagen dari sumur ELISA agar hasil tidak bias
i.	ELISA Reader / Immunoassay Analyzer	Membaca hasil absorbansi atau sinyal deteksi IgE
j.	Buffer / Larutan pencuci	Menghilangkan reagen bebas atau yang tidak bereaksi
k.	Substrat TMB dan larutan stop	Menghasilkan warna sebagai indikator reaksi antigen-antibodi
l.	Kontrol positif dan negatif	Sebagai acuan validasi hasil pemeriksaan

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

3. Sampel : serum, plasma dan cairan biologis lainnya

4. Persiapan Sampel

- Ambil darah vena pasien sebanyak $\pm 3-5$ mL ke dalam tabung tanpa antikoagulan.
- Lakukan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh serum.
- Simpan serum pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$ jika pemeriksaan dilakukan dalam 24 jam, atau -20°C jika ditunda lebih lama

5. Persiapan Alat dan Bahan

- Siapkan semua reagen dan alat yang termasuk dalam kit (ELISA, CLIA, atau ECLIA).
- Biarkan semua reagen dan sampel mencapai suhu ruang
- Labeli mikrotiter *microplate* sesuai jumlah sampel, kontrol, dan blanko

6. Pipet Reagen dan Sampel

- Masukkan larutan pengikat (*capture antibody* atau antigen) jika belum tersedia di *microplate kit*.
- Tambahkan sampel serum, kontrol positif, dan negatif ke dalam sumur sesuai petunjuk.
- Tambahkan reagen konjugat (biasanya antibodi anti-IgE yang terikat enzim).

7. Inkubasi : Inkubasi *microplate* pada suhu dan waktu yang ditentukan (biasanya 30–60 menit pada 37°C).

8. Pencucian: Cuci sumur menggunakan larutan buffer pencuci 3–5 kali untuk menghilangkan reagen yang tidak terikat.

9. Penambahan Substrat: Tambahkan substrat (misalnya TMB) ke dalam tiap sumur. Dan Inkubasi kembali sesuai waktu yang ditentukan hingga muncul perubahan warna.

10. Stop solution: Tambahkan larutan penghenti (*stop solution*), biasanya asam sulfat (H_2SO_4), untuk menghentikan reaksi

B. Analitik

1. Metode : Sandwich-ELISA

2. Prinsip: Pada pemeriksaan ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Pelat mikro ELISA yang disediakan dalam kit ini telah dilapisi dengan antibodi spesifik terhadap Manusia IgE. Sampel (atau Standar) ditambahkan ke sumur pelat ELISA mikro dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi deteksi biotinilasi spesifik untuk Human IgE dan konjugat Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan secara berurutan ke setiap sumur mikrolat dan diinkubasi. Komponen-komponennya terbilas. Larutan substrat ditambahkan ke setiap sumur. Hanya sumur yang mengandung Human IgE, antibodi deteksi biotinilasi dan Konjugat Avidin-HRP akan tampak berwarna biru. Enzim-substrat Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan stop dan warna berubah kuning. Kepadatan optik (OD)

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi IgE Manusia

3. Prosedur:

- a. Dipipet reagen dan sampel lalu masukkan larutan pengikat (*capture antibody* atau antigen) jika belum tersedia di *plate kit*.
- b. Tambahkan sampel serum, kontrol positif, dan negatif ke dalam sumur sesuai petunjuk. Tambahkan reagen konjugat (biasanya antibodi anti-IgE yang terikat enzim).
- c. Diinkubasi plate pada suhu dan waktu yang ditentukan (biasanya 30–60 menit pada 37°C).
- d. Cuci sumur menggunakan larutan buffer pencuci 3–5 kali untuk menghilangkan reagen yang tidak terikat.
- e. Tambahkan substrat (misalnya TMB) ke dalam tiap sumur.
- f. Inkubasi kembali sesuai waktu yang ditentukan hingga muncul perubahan warna. Tambahkan larutan penghenti (*stop solution*), biasanya asam sulfat (H₂SO₄), untuk menghentikan reaksi

C.Post Analitik

Prosedur Pembacaan:

1. Jalankan ELISA dengan standar IgE (dengan konsentrasi diketahui) dan sampel pasien.
2. Catat nilai absorbansi dari standar dan buat kurva.
3. Cocokkan absorbansi sampel pasien terhadap kurva untuk mengetahui konsentrasinya.

Pembacaan Hasil

- Baca absorbansi dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang tertentu (biasanya 450 nm).
- Pada alat otomatis (CLIA/ECLIA), hasil terbaca langsung sebagai konsentrasi (IU/mL atau kU/L).

Interpretasi

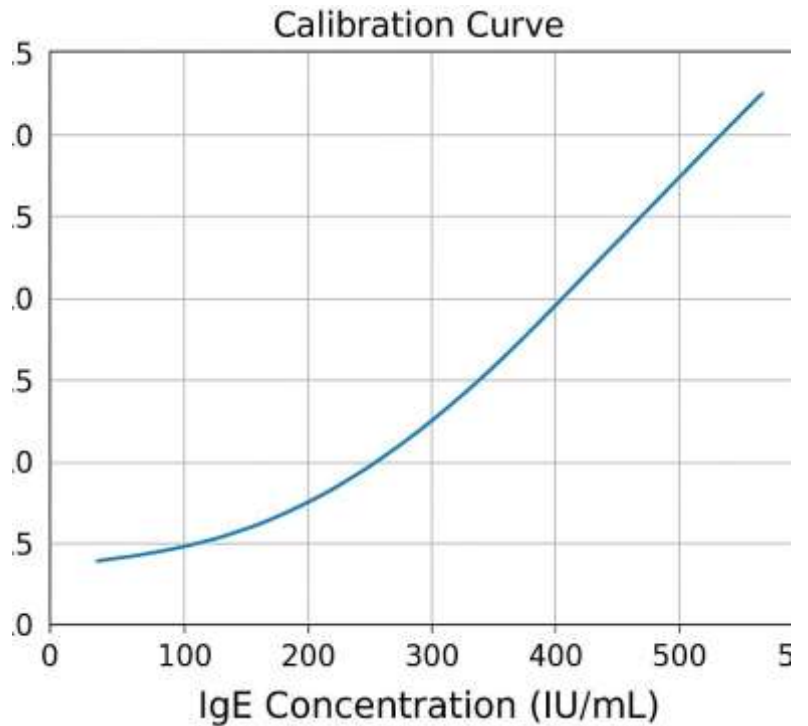
- Bandingkan hasil sampel dengan nilai referensi dari kontrol dan kurva kalibrasi.
- Nilai IgE yang tinggi menunjukkan kemungkinan alergi atau gangguan imun tertentu.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kurva kalibrasi IgE digunakan untuk menentukan konsentrasi IgE dalam sampel pasien berdasarkan hasil absorbansi yang diperoleh dari spektrofotometer pada metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Komponen Kurva:

- Sumbu X (horizontal): Menyatakan konsentrasi IgE (dalam IU/mL), biasanya dimulai dari 0 hingga 500 IU/mL atau lebih tergantung kit.
- Sumbu Y (vertikal): Menunjukkan nilai absorbansi (*optical density/OD*) yang terbaca dari alat ELISA *reader*.
- Kurva: Merupakan grafik hubungan antara konsentrasi IgE standar dan absorbansinya. Grafik ini biasanya menunjukkan hubungan non-linear, khususnya kurva sigmoidal atau eksponensial.



GAMBAR 24 KURVA KALIBRASI

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Konsentrasi IgE (IU/mL)	Interpretasi Klinis
< 100 IU/MI	Normal / tidak ada indikasi alergi
100–300 IU/mL	Meningkat ringan – kemungkinan alergi ringan/subklinis
301–1000 IU/mL	Meningkat sedang – reaksi alergi aktif
> 1000 IU/mL	Meningkat tinggi – alergi berat, asma, dermatitis atopik, atau parasitosis

C. Jurnal Laporan Praktikum Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Langkah Kerja	:
Hasil	: Data pasien

EVALUASI



1. Seorang anak berusia 8 tahun datang ke rumah sakit dengan gejala alergi. Dokter meminta pemeriksaan IgE total. Setelah pengambilan sampel darah vena, teknisi laboratorium akan melakukan pemeriksaan IgE menggunakan metode ELISA.
Apa tahapan awal yang harus dilakukan sebelum memasukkan sampel ke mikrotiter *microplate*?
 - A. Membaca hasil absorbansi di ELISA reader
 - B. Melakukan coating antigen pada *microplate*
 - C. Menambahkan larutan blocking
 - D. Menyiapkan kurva kalibrasi dan kontrol positif-negatif
2. Hasil absorbansi serum pasien adalah 1,200. Berdasarkan kurva kalibrasi, nilai ini setara dengan 600 IU/mL. Nilai referensi normal IgE adalah <100 IU/mL.
Apa interpretasi klinis dari hasil tersebut?
 - A. Normal
 - B. IgE sedikit meningkat, kemungkinan non-spesifik
 - C. IgE sangat tinggi, curiga autoimun
 - D. IgE sedang meningkat, kemungkinan alergi aktif
3. Dalam prosedur ELISA IgE, digunakan antibodi monoklonal anti-IgE yang dilabel dengan enzim peroksidase (HRP).
Apa fungsi dari antibodi berlabel enzim ini?
 - A. Mengikat IgE total dan menghasilkan warna saat reaksi substrat
 - B. Menonaktifkan antigen dalam serum
 - C. Melarutkan protein non spesifik
 - D. Mencegah reaksi silang IgG
4. Selama pemeriksaan IgE, kontrol negatif menunjukkan nilai OD yang cukup tinggi dan kontrol positif menunjukkan nilai OD rendah.
Apa kemungkinan penyebab hasil tersebut?
 - A. Pembacaan kurva terlalu cepat

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- B. Terjadi kesalahan pipet atau kontaminasi
 - C. Reagen terlalu lama didiamkan
 - D. Serum pasien tidak cocok untuk pemeriksaan
5. Dalam pemeriksaan IgE metode ELISA, digunakan substrat TMB (tetramethylbenzidine). Apa yang terjadi setelah substrat ini bereaksi dalam sumur mikrotiter?
- A. Warna merah muda terbentuk jika IgE tinggi
 - B. Warna biru muncul dan berubah kuning setelah ditambahkan stop solution
 - C. Tidak terjadi perubahan warna
 - D. Warna ungu akan menunjukkan hasil positif

Kunci Jawaban:

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

RINGKASAN



Pemeriksaan IgE (Immunoglobulin E) merupakan salah satu metode imunoserologi yang digunakan untuk mendeteksi adanya reaksi hipersensitivitas tipe I, yang berkaitan erat dengan kondisi alergi seperti asma, rinitis alergi, dermatitis atopik, dan alergi makanan. Secara imunologis, hipersensitivitas tipe I terjadi ketika IgE yang diproduksi tubuh berikatan dengan reseptor Fc pada permukaan sel mast dan basofil. Ketika individu kembali terpapar alergen, kompleks ini memicu pelepasan mediator inflamasi seperti histamin yang menyebabkan gejala alergi. Pemeriksaan laboratorium biasanya menggunakan metode ELISA, CLIA, atau ECLIA, dengan langkah-langkah meliputi pengambilan darah vena, pemisahan serum melalui sentrifugasi, penambahan serum ke dalam mikrowell yang telah dilapisi antigen, inkubasi, pencucian, dan pembacaan hasil menggunakan *reader*. Kurva kalibrasi digunakan untuk menginterpretasi kadar IgE berdasarkan nilai absorbansi atau sinyal yang dihasilkan. Nilai IgE total yang tinggi (di atas 100 IU/mL) dapat mengindikasikan adanya alergi aktif, namun interpretasi akhir tetap harus mempertimbangkan kondisi klinis pasien.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Tahap pasca-analitik meliputi verifikasi hasil, pencatatan pada sistem informasi laboratorium, dan pelaporan ke dokter yang menangani. Pemeriksaan ini penting untuk membantu penegakan diagnosis dan pengelolaan pasien dengan gangguan alergi.

Selain mendeteksi IgE total, pemeriksaan ini juga dapat diarahkan untuk mengidentifikasi IgE spesifik terhadap alergen tertentu, seperti debu, serbuk sari, makanan, atau bulu hewan. Pemeriksaan IgE spesifik memberikan informasi yang lebih mendalam mengenai alergen penyebab dan sangat berguna dalam menentukan strategi penanganan alergi secara individual. Dalam praktik laboratorium, penting juga untuk memastikan kualitas hasil melalui kontrol kualitas internal dan eksternal, serta menjaga stabilitas sampel dengan penyimpanan yang sesuai sebelum dan selama pemeriksaan. Dengan pendekatan molekuler dan imunologis yang tepat, pemeriksaan IgE menjadi alat diagnostik yang sangat bernilai dalam praktik klinis modern, terutama dalam bidang alergi dan imunologi klinik.

GLOSARIUM



- **IgE (Immunoglobulin E)** : Jenis antibodi yang terlibat dalam reaksi alergi dan respon imun terhadap parasit.
- **Hipersensitivitas Tipe I** : Reaksi alergi cepat yang dimediasi oleh IgE, melibatkan pelepasan histamin.
- **Alergen** :Zat pemicu alergi yang dapat memicu produksi IgE, seperti debu, serbuk sari, makanan.
- **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)** : Metode laboratorium untuk mendeteksi antibodi atau antigen menggunakan enzim dan substrat.
- **CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)** : Teknik imunologi berbasis cahaya kimia untuk mengukur kadar antibodi atau antigen.
- **ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay)**: Metode berbasis cahaya elektro-kimia untuk deteksi imunologis.
- **Serum**: Bagian cair darah tanpa sel dan fibrinogen, digunakan dalam pemeriksaan laboratorium.
- **Reader ELISA**: Alat untuk membaca nilai absorbansi dari hasil reaksi ELISA.
- **Kurva Kalibrasi**: Grafik yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi standar dengan sinyal (absorbansi/sinyal) untuk menginterpretasi hasil sampel.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- **Absorbansi (OD):** Ukuran seberapa banyak cahaya diserap oleh sampel dalam pemeriksaan ELISA.
- **Mikrowell :** Sumur kecil pada *microplate* ELISA tempat reaksi imunologis berlangsung.
- **Histamin :** Zat kimia yang dilepaskan saat reaksi alergi, menyebabkan gejala seperti gatal dan pembengkakan.
- **Mast Cell / Basofil:** Sel imun yang memiliki reseptor IgE dan berperan dalam reaksi alergi.
- **Sentrifugasi:** Proses pemisahan serum dari darah menggunakan gaya sentrifugal.
- **IgE :** Immunoglobulin E terhadap alergen tertentu untuk identifikasi pemicu alergi.

DAFTAR PUSTAKA



- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology* (9th ed.). Elsevier.
- Baron, E. J., Peterson, L. R., & Finegold, S. M. (2007). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (12th ed.). Mosby Elsevier.
- CLSI. (2014). *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Mayo Clinic Laboratories. (2020). *Immunoglobulin E (IgE), Serum*. Retrieved from <https://www.mayocliniclabs.com>
- Murphy, K., Weaver, C. (2016). *Janeway's Immunobiology* (9th ed.). Garland Science.
- Tang, M. L., Mullins, R. J. (2017). *Food Allergy: Diagnosis and Management*. Medical Journal of Australia, 207(6), 263–268.
- WHO. (2011). *Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory* (2nd ed.). World Health Organization.
- World Allergy Organization. (2019). *IgE Testing Guidelines*. Retrieved from <https://www.worldallergy.org>

**MODUL
9**

PEMERIKSAAN CD4

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa dapat menjelaskan dasar biologis CD4 dan perannya dalam imun pasien HIV.
2. Mahasiswa mampu melakukan pengambilan dan proses untuk analisis CD4.
3. Mahasiswa dapat menjalankan prosedur prosedur ELISA untuk menguji CD4⁺ dengan benar.

PENDAHULUAN



Sel CD4⁺ T-cell—dikenal juga sebagai T helper—merupakan limfosit yang mengekspresikan molekul CD4 pada permukaannya. Sel ini berperan krusial dalam mengkoordinasi respons imunitas adaptif, yaitu dengan memproduksi sitokin dan mengaktifkan sel B, sel CD8⁺, dan makrofag untuk melawan patogen. Melalui fungsi ini, CD4 T-cell menjadi “konduktor” sistem imun, menjaga integritas pertahanan tubuh terhadap infeksi.

HIV secara khusus menargetkan sel CD4⁺ T-cell melalui cara virus melekat pada molekul CD4 dan ko reseptornya (CCR5 atau CXCR4), kemudian memasukkan materi genetiknya ke dalam sel sehingga sel ini menjadi tempat replikasi virus dan akhirnya mati. Kematian ini bisa disebabkan langsung oleh siklus hidup virus atau melalui mekanisme sel “*by stander*” seperti apoptosis dan pyroptosis, yang juga memicu peradangan kronis di jaringan limfoid

Seiring jumlah CD4⁺ menurun akibat infeksi HIV, kemampuan tubuh untuk melawan patogen oportunistik menurun drastis. Bila kadar CD4 turun di bawah 200 sel/ μ L, kondisi ini diklasifikasikan sebagai AIDS dan risiko infeksi berat meningkat tajam. Jumlah normal CD4⁺ berkisar antara 500–1.500 sel/ μ L, dan nilai ini menjadi tolok ukur klinis untuk memantau kesehatan imun pasien HIV

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Fungsi sel CD4⁺ T-cell juga memacu perkembangan respons memori imun, mendukung pematangan antibodi oleh sel B, serta pengaktifan sel CD8⁺. Mereka menginisiasi respons spesifik dan berkelanjutan terhadap patogen, termasuk membantu tubuh merespon vaksin. Namun, kontradiksi terjadi ketika sel yang seharusnya membantu pertahanan menjadi sasaran utama HIV.

Terapi antiretroviral (ART) bertujuan menekan replikasi HIV sehingga laju kerusakan CD4⁺ T-cell melambat atau berhenti, memungkinkan pemulihan jumlah dan fungsi sel imun ini. Pemantauan rutin jumlah CD4⁺ menjadi kunci dalam mengevaluasi efektivitas terapi dan memprediksi risiko infeksi oportunistik. Dengan demikian, CD4 T-cell bukan hanya indikator imunologis, tetapi juga penentu strategi manajemen klinis pasien HIV.

PRAKTIKUM



A. Pra Analitik

1. Tujuan pemeriksaan: untuk mendeteksi secara kuantitatif kadar CD4 pada serum, plasma dan cairan biologis lainnya.
2. **Alat :**
 - Centrifuge, untuk memisahkan serum dari darah vena,
 - Mikropipet untuk pengambilan volume cairan yang presisi,
 - Reader ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) atau *automated immunoassay analyzer* seperti CLIA (*Chemiluminescence Immunoassay*) atau ECLIA (*Electrochemiluminescence Immunoassay*).
 - Inkubator,
 - *Plate washer*,
 - Vortex
3. **Bahan**
 - Pelat ELISA Mikro
 - Standar Referensi
 - Biotinilasi Terkonsentrasi
 - Deteksi Ab (100X)
 - Konjugat HRP Terkonsentrasi (100X)
 - Standar Referensi & Sampel

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Pengencer Ab Deteksi Biotinilasi
- Pengencer Konjugat HRP
- *Wash Buffer* (25X)
- Reagen Substrat
- *Stop Solution*

4. Sampel : serum, plasma dan cairan biologis lainnya.

5. Persiapan Pasien:

- Pasien disarankan dalam kondisi istirahat dan tidak stres berat.
- Tidak diperlukan puasa.
- Informasikan kepada pasien tentang tujuan pengambilan darah.

6. Persiapan Sampel

Tabung pengambilan darah harus sekali pakai, bebas pirogen, dan bebas endotoksin. Sampel darah utuh tidak boleh langsung dibekukan; sampel harus diolah menjadi serum atau plasma untuk pengujian atau penyimpanan. Untuk percobaan ELISA, antikoagulan umum seperti natrium dan kalium EDTA

Pengambilan Sampel:

- Gunakan jarum steril dan spuit atau vacutainer.
- Ambil darah vena sebanyak $\pm 3-5$ mL.
- Gunakan tabung berisi EDTA (antikoagulan).

7. Penyimpanan dan Transportasi:

- Simpan darah pada suhu 20–25°C (jangan dibekukan).
- Pemeriksaan sebaiknya dilakukan dalam waktu 24 jam setelah pengambilan darah.
- Hindari paparan langsung terhadap sinar matahari.

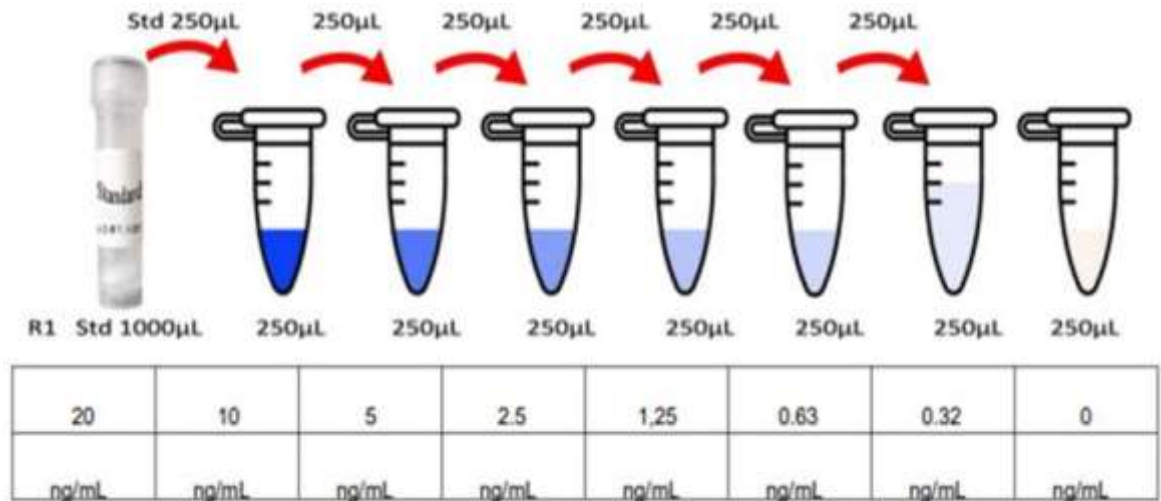
8. Persiapan Reagen

1. Bawa semua reagen ke suhu kamar (18–25°C) sebelum digunakan. Jika kit tidak akan digunakan sekaligus dalam satu uji, harap hanya ambil strip dan reagen yang diperlukan untuk percobaan saat ini, dan simpan sisanya pada kondisi yang disarankan.
2. Buffer pencuci (*Wash Buffer*) : Encerkan 30 mL Buffer pencuci konsentrat dengan 720 mL air deionisasi atau air suling untuk membuat 750 mL Buffer pencuci

Catatan: Jika terbentuk kristal dalam konsentrat, panaskan dalam water bath 40°C dan aduk perlahan sampai kristal benar-benar larut

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

3. Pengenceran serial: Siapkan 7 tabung Ependorve masing-masing ditambahkan 250 μL pengencer standar & sampel(volume bisa disesuaikan, misalnya 500 μL /tabung)



4. Larutan Kerja Antibodi Deteksi Biotinilasi

Hitung jumlah yang dibutuhkan sebelum percobaan (100 μL /sumur). Saat menyiapkan, buat sedikit lebih banyak dari jumlah yang dihitung. Sentrifugasi Antibodi Deteksi Biotinilasi Konsentrat (100X) pada $800 \times g$ selama 1 menit, lalu encerkan menjadi larutan kerja 1X menggunakan Pengencer Antibodi Deteksi Biotinilasi. Perbandingan Antibodi Deteksi Biotinilasi Konsentrat : Pengencer Antibodi Deteksi Biotinilasi = 1 : 99).

5. Larutan Kerja Konjugat HRP

Hitung jumlah yang dibutuhkan sebelum percobaan (100 μL /sumur). Saat menyiapkan, buat sedikit lebih banyak dari jumlah yang dihitung. Sentrifugasi Konjugat HRP Konsentrat (100X) pada $800 \times g$ selama 1 menit, lalu encerkan menjadi larutan kerja 1X menggunakan Pengencer Konjugat. (Perbandingan: Konjugat HRP Konsentrat : Pengencer Konjugat HRP = 1 : 99).

B. Analitik

1. Metode :Sadwich ELISA

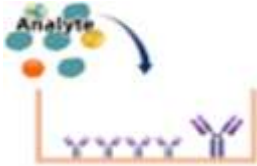
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

2. Prinsip : Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Pelat mikro ELISA yang disediakan dalam kit ini telah dilapisi dengan antibodi spesifik terhadap Manusia CD4. Sampel (atau Standar) ditambahkan ke sumur pelat ELISA mikro dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi deteksi biotinilasi khusus untuk konjugat CD4 Manusia dan Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan secara berurutan ke setiap sumur mikroplat dan diinkubasi. Komponen-komponennya terbilas. Larutan substrat ditambahkan ke setiap sumur. Hanya sumur yang mengandung Human CD4, antibodi deteksi biotinilasi dan Konjugat Avidin-HRP akan tampak berwarna biru. Enzim-substrat. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan stop dan warna berubah kuning. Kepadatan optik (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi CD4 Manusia. Anda dapat menghitung konsentrasi CD4 Manusia disampel dengan membandingkan OD sampel dengan kurva standar

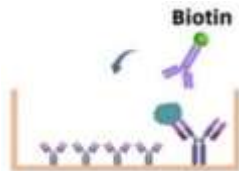
3. Prosedur :

1. Tentukan sumur untuk larutan standar, blanko, dan sampel yang telah ditentukan. Tambahkan 100 ul masing-masing sumur.
2. Tutupi *plate* dengan *sealer* yang tersedia dalam kit. Inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Buang larutan dari setiap sumur dan tepuk tepuk hingga kering menggunakan kain penyerap yang bersih.
3. Tambahkan 300 µL buffer pencuci ke setiap sumur. Rendam selama 0,5 menit, lalu buang dengan aspirasi atau dituang, kemudian tepuk kering dengan kertas penyerap bersih. Ulangi pencucian ini sebanyak 3 kali.
4. Tambahkan 100 µL larutan kerja Antibodi Deteksi Biotinilasi ke setiap sumur. Tutup *microplate* dengan sealer baru. Inkubasi selama 1 jam pada 37°C.
5. Buang larutan dari setiap sumur, lalu ulang pencucian sebanyak 3 kali seperti pada langkah 3.
6. Tambahkan 100 µL larutan kerja Konjugat HRP ke setiap sumur. Tutup *microplate* dengan sealer baru. Inkubasi selama 30 menit pada 37°C
7. Buang larutan dari setiap sumur, lalu ulang pencucian sebanyak 3 kali seperti pada langkah 3.
8. Tambahkan 100 µL Reagen Substrat ke setiap sumur. Tutup *microplate* dengan *sealer* baru. Inkubasi sekitar 15 menit pada 37°C. Lindungi *microplate* dari cahaya.
9. Tambahkan 50 µL *Stop Solution* ke setiap sumur.
10. Tentukan Kerapatan Optik (*Optical Density/OD*) dari setiap sumur menggunakan pembaca mikrotiter (*micromicroplate reader*) yang diatur pada 450 nm.

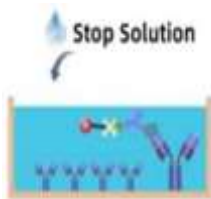
Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



Tambahkan 100 μ L standar atau sampel ke dalam sumur. Inkubasi selama 90 menit pada 37°C. Aspirasi dan cuci sumur sebanyak 3 kali.



Aspirasi dan cuci sumur sebanyak 3 kali. Tambahkan 100 μ L Substrat Reagen. Inkubasi selama 15 menit. pada 37°C.



Tambahkan 50 μ L *Stop Solution*



Baca hasil pada panjang gelombang 450nm, segera. Lakukan perhitungan hasil.

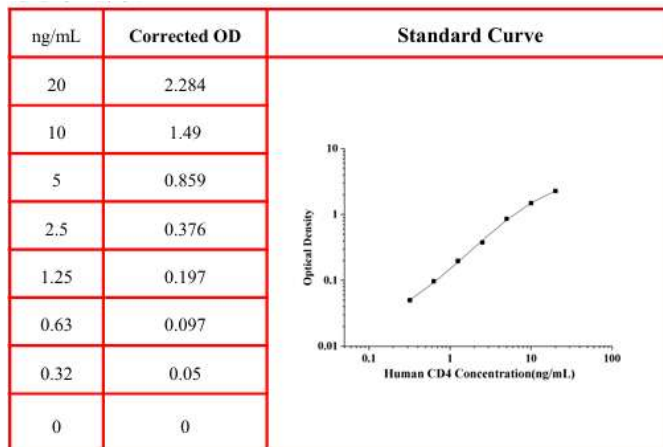
Gambar Prosedur pemeriksaan CD4 menggunakan
ELISA (modul *reedbiotech*)

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

C. Post Analitik

a. Interpretasi Hasil:

- Kurva standar acuan dalam manual ini hanya sebagai panduan. data standar dari setiap percobaan untuk membuat kurva standar dan menghitung konsentrasi zat target dalam sampel.
- Saat membuat kurva standar, pertama-tama hitung nilai OD rata-rata dari standar dan replikasi sampel, lalu kurangi nilai OD blanko serta nilai koreksi. Kemudian, plot konsentrasi pada sumbu X dan nilai OD terkoreksi pada sumbu Y, dan gunakan perangkat lunak untuk melakukan pencocokan logistik empat parameter (4PL) linier. Ini akan menghasilkan kurva standar, yang darinya konsentrasi sampel dapat dihitung (Silakan lihat <http://reedbiotech.com/view/39.html>)
- Konsentrasi aktual adalah konsentrasi terhitung dikalikan dengan faktor pengenceran



EVALUASI



1. Seorang pria usia 35 tahun datang ke klinik untuk pemeriksaan monitoring terapi antiretroviral (ARV). Dokter meminta pemeriksaan CD4⁺ T-cell untuk memantau status imun pasien. Analis laboratorium menerima darah vena yang diambil menggunakan tabung EDTA. Apa langkah pertama yang harus dilakukan analis setelah menerima sampel?
 - A. Melakukan sentrifugasi dan mengambil plasma
 - B. Melakukan labeling tabung reaksi dengan antibodi monoklonal dan menambahkan darah
 - C. Menyimpan darah di freezer hingga pemeriksaan dilakukan
 - D. Menambahkan buffer lisis sebelum antibodi ditambahkan

2. Saat melakukan pemeriksaan CD4, analis tidak mencampur reagen dengan darah secara homogen dan segera melanjutkan ke tahap inkubasi. Apa dampak dari kesalahan ini terhadap hasil pemeriksaan?
 - A. Tidak ada pengaruh karena antibodi tetap bereaksi
 - B. Menghasilkan hasil CD4 yang terlalu tinggi
 - C. Hasil tidak akurat karena antibodi tidak mengenai semua sel target
 - D. Hanya memengaruhi warna reaksi, bukan jumlah CD4

3. Pasien HIV datang untuk pemeriksaan rutin CD4, dan hasil flow cytometry menunjukkan nilai absolut CD4 hanya 180 sel/ μ L. Apa interpretasi hasil tersebut?
 - A. Status imun baik, terapi ARV efektif
 - B. Terdapat risiko tinggi infeksi oportunistik, terapi harus dievaluasi
 - C. Pemeriksaan harus diulang karena nilai terlalu rendah
 - D. CD8 lebih penting dibandingkan CD4 dalam HIV

4. Seorang analis menerima sampel darah EDTA dari pasien HIV untuk pemeriksaan CD4. Sampel baru sampai di laboratorium setelah 24 jam perjalanan tanpa pendingin. Apa dampak yang paling mungkin dari kondisi tersebut terhadap hasil pemeriksaan?
 - A. Kadar CD4 meningkat karena aktivasi limfosit
 - B. Tidak berpengaruh jika segera diperiksa

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- C. Sel darah mengalami degradasi sehingga hasil tidak valid
 - D. Hanya nilai CD8 yang terganggu
5. Pemeriksaan jumlah sel CD4 dalam darah biasanya dilakukan pada pasien yang diduga atau telah terdiagnosis HIV/AIDS. Apakah tujuan pemeriksaan pada pemeriksaan ini?
- A. Menentukan jenis virus HIV yang menginfeksi pasien
 - B. Mengukur kemampuan sel CD4 dalam menghancurkan patogen
 - C. Mengetahui tingkat kerusakan sistem imun dan menentukan stadium penyakit
 - D. Mengidentifikasi infeksi oportunistik yang sedang terjadi
 - E. Menentukan apakah pasien memerlukan vaksinasi tambahan

Kunci Jawaban:

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

RINGKASAN



Pemeriksaan CD4 dilakukan untuk menilai status imunologis pasien, khususnya penderita HIV/AIDS. Tahapan dimulai dari **pra-analitik**, yang mencakup pengambilan sampel darah vena menggunakan tabung EDTA dan penanganan sampel yang benar untuk menjaga stabilitas sel. Tahap **analitik** melibatkan proses labeling sel dengan antibodi monoklonal anti-CD4 berfluorokrom, kemudian dilanjutkan dengan analisis menggunakan flow cytometry, yang menghitung jumlah sel T CD4+ berdasarkan fluoresensi. Selama proses ini, kontrol positif dan negatif sangat penting untuk memastikan akurasi. Terakhir, tahap **pasca-analitik** meliputi interpretasi hasil, pelaporan data laboratorium, serta verifikasi dan validasi hasil oleh analis atau dokter penanggung jawab laboratorium. Keseluruhan proses memerlukan ketelitian tinggi dan standar *biosafety* karena melibatkan darah pasien yang berpotensi menularkan infeksi.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Selain memastikan prosedur teknis berjalan sesuai standar, pemeriksaan CD4 juga harus memperhatikan faktor-faktor yang memengaruhi hasil, seperti waktu pengambilan sampel (idealnya pagi hari) dan kondisi pasien (misalnya adanya infeksi akut atau stres yang bisa menurunkan jumlah CD4 secara sementara). Pemeliharaan alat *flow cytometer*, validasi reagen, serta pelatihan personel laboratorium juga merupakan bagian penting dari jaminan mutu pemeriksaan. Hasil pemeriksaan CD4 biasanya dilaporkan dalam jumlah absolut ($\text{sel}/\mu\text{L}$) dan/atau persentase dari total limfosit. Nilai CD4 di bawah $200 \text{ sel}/\mu\text{L}$ menandakan immunosupresi berat dan meningkatkan risiko infeksi oportunistik. Oleh karena itu, pemeriksaan CD4 bukan hanya memiliki nilai diagnostik, tetapi juga penting dalam pemantauan efektivitas terapi antiretroviral dan pengambilan keputusan klinis lanjutan pada pasien HIV/AIDS.

GLOSARIUM



- **CD4** : Molekul permukaan sel yang ditemukan pada limfosit T-helper; menjadi indikator utama sistem imun.
- **Sel T CD4+** : Jenis limfosit yang memainkan peran penting dalam mengkoordinasi respon imun.
- **Flow Cytometry** : Teknik analisis sel yang menggunakan cahaya laser untuk mengidentifikasi dan menghitung sel berdasarkan marker permukaan seperti CD4.
- **Antibodi Monoklonal** : Antibodi yang diproduksi secara spesifik untuk mengenali satu epitope antigen digunakan dalam pewarnaan sel.
- **Fluorokrom** : Zat pewarna yang memancarkan cahaya fluoresen saat terkena sinar laser, digunakan untuk mendeteksi marker sel.
- **EDTA** : Antikoagulan yang digunakan dalam tabung darah untuk mencegah pembekuan dan menjaga stabilitas sel.
- **Imunosupresi** : Penurunan fungsi sistem imun, sering terjadi pada pasien HIV dengan kadar CD4 rendah.
- **ART (Antiretroviral Therapy)** : Terapi untuk menekan replikasi virus HIV dan mempertahankan jumlah CD4 dalam kisaran normal.
- **Kontrol Positif/Negatif** : Sampel yang digunakan untuk memastikan keakuratan dan kevalidan hasil pemeriksaan laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA



- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2022). *Cellular and Molecular Immunology* (10th ed.). Elsevier.
- Cheesbrough, M. (2010). *District Laboratory Practice in Tropical Countries Part 1* (2nd ed.). Cambridge University Press.
- World Health Organization. (2021). *Laboratory Guidelines for CD4 T-cell Count Testing in Resource-Limited Settings*. WHO Press.
<https://www.who.int>
- CLSI. (2014). *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline*. CLSI Document H43-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Tang, Y. W., Stratton, C. W., & Persing, D. H. (2011). *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratory*. Academic Press.
- Dacie, J. V., & Lewis, S. M. (2017). *Practical Haematology* (12th ed.). Elsevier.
- Rich, R. R. (2019). *Clinical Immunology: Principles and Practice* (5th ed.). Elsevier.
- Kemenkes RI. (2020). *Pedoman Nasional Tatalaksana Klinis HIV dan Terapi Antiretroviral*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

MODUL
10

TYROID MARKER

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami dan Melakukan tentang pemeriksaan T3 menggunakan metode ELISA
2. Mahasiswa mampu memahami dan Melakukan tentang pemeriksaan T4 menggunakan metode ELISA
3. Mahasiswa mampu memahami dan Melakukan tentang pemeriksaan TSH menggunakan metode ELISA

PENDAHULUAN



Tiroid merupakan kelenjar yang terletak di leher. Kelenjar ini berfungsi untuk menghasilkan hormon tiroid yang mengatur metabolisme tubuh, termasuk pertumbuhan dan perkembangan. Kelenjar tiroid menghasilkan hormon tiroid utama yaitu tiroksin (T4) yang kemudian berubah menjadi bentuk aktifnya yaitu triyodotironin (T3). Iodium nonorganik yang diserap dari saluran cerna merupakan bahan baku hormon tiroid. Zat ini dipekatkan kadarnya menjadi 30-40 kalisehingga mempunyai afinitas yang sangat tinggi di dalam jaringan tiroid. T3 dan T4 yang dihasilkan ini kemudian akan disimpan dalam bentuk koloid di dalam tiroid. Sebagian besar T4 kemudian akan dilepaskan ke sirkulasi sedangkan sisanya tetap di dalam kelenjar yang kemudian mengalami daur ulang. Di sirkulasi, hormon tiroid akan terikat oleh protein yaitu globulin pengikat tiroid (*thyroid binding globulin*, TBG) atau prealbumin pengikat albumin (*thyroxine binding prealbumine*, TBPA). Hormon stimulator tiroid (*thyroid stimulating hormone*, TSH) memegang peranan terpenting untuk mengatur sekresi dari kelenjar tiroid. TSH dihasilkan oleh lobus anterior kelenjar hipofisis. Proses yang

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

dikenal sebagai *negative feedback* sangat penting dalam proses pengeluaran hormon tiroid ke sirkulasi dengan demikian, sekresi tiroid dapat mengadakan penyesuaian terhadap perubahan-perubahan di dalam maupun di luar tubuh. Juga dijumpai adanya sel parafolikuler yang menghasilkan kalsitonin yang berfungsi untuk mengatur metabolisme kalsium, yaitu menurunkan kadar kalsium serum terhadap tulang. Pengukuran TSH menjadi hasil test yang jelas dari fungsi tiroid pada banyak keadaan. Nilai TSH berkisar antara rentang luar mayor dari kasus primer penyakit tiroid. Jika TSH tidak normal, lihat nilai dari T4 bebas/ free T4 (fT4). Ketika ada faktor resiko, lihat free T3 (fT3) ketika fT4 normal dan diduga ada tirotoksikosis.

Gangguan pada kelenjar tiroid dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan, seperti hipotiroidisme (produksi hormon tiroid kurang) atau hipertiroidisme (produksi hormon tiroid berlebihan). Hipertiroid adalah suatu kondisi di mana terjadi peningkatan jumlah produksi hormon tiroid dalam tubuh. Dengan kata lain, kelenjar tiroid bekerja lebih aktif, dinamakan dengan thyrotoksikosis.

Triiodothyronin (T3) adalah hormone yang disintesa dan disimpan dalam kelenjar thyroid. Konsentrasi T3 jauh lebih rendah dari T4 tetapi kemampuan metabolismenya lebih besar. Pengukuran T3 sebagai alat penting dalam mendiagnosis penyakit thyroid. Pengukuran ini tidak mencakup pada jenis hyperthyroidism di mana penderita thyrotoxic merupakan kenaikan nilai titer T3 dengan nilai T4 normal. T3 (hyperthyroidism). Kenaikan T3 tanpa kenaikan T4 sering terjadi pada a forrunner of recurrent thyrotoxicosis pada penderita dalam masa pengobatan. Kegunaan teknik T3 juga terbukti pada penderita euthyroidism hanya sebagai tanda T3 normal disamping T4 subnormal. Kegunaan pemeriksaan T3 juga sebagai monitoring penderita dala pengobatan hyperthyroidism dan penderita yang tidak melanjutkan antithyroid. dan ini berguna untuk menentukan euthyroid dengan hyperthyroidism.. pada hyperthyroidism kadar T3 meningkat selama kehamilan, kontrasepsi oral, pengobatan esterogen, TBG (thyroxine binding globulin) meningkat sejajar dalam hal yang sama pada T4. Penurunan kadar TBG juga menurunkan kadar T3. Pemeriksaan T3 bukan merupakan indikator tiroid yang ideal karena variasi kadar protein pengikat dan kadar T3 sangat cepat berfluktuasi oleh stress serta waktu paruh T3 sangat singkat.

Tirosin merupakan produk uatama kelenjar tiroid. Sebagian besar T4 dalam darah berikatan dengan protein pengikat (TBG, TBPA, albumin) sebagian kecil berada dalam bentuk bebas (0.35 %). Bentuk bebas berperan penting secara fisiologis, perubahan protein pengangkutan baik secara kualitatif maupun kuantitatif akan mempengaruhi kadar hormone tiroid total. 5-17 % dari T4 diubah menjadi T3 melalui proses monodeiodinasi di hati, ginjal,

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

jantung dan hipofisis, sebagian lagi menjadi FT4. Waktu paruh T4 dalam plasma adalah enam hari dengan degradasi terjadi di hati. Pemeriksaan T4 bukan indikator status tiroid yang ideal karena variasi kadar protein pengikat. Pemeriksaan yang dapat diandalkan adalah FT4 sebagai lini ke dua.

Thyroxin (T4) adalah hormone yang disintesa dan disimpan dalam kelenjar thyroid. Lebih dari 99% T4 dalam darah diikat kembali dengan protein plasma (terutama TGB) pengukuran total T4 dengan teknik immunoassay adalah salah satu cara screening test yang dapat dipercaya dan diyakini untuk mengukur adanya gangguan thyroid. Kenaikan nilai T4 telah diremukan pada hyperthyroidism karena *grave's disease* dan *plummer's disease* sama seperti dalam akut dan sub akut thyroiditis. Nilai T4 rendah dihubungkan dengan cretinism, myxedema, *hashimoto's disease* dan perbedaan kelainan genetik.

Saat produksi hormon tiroid meningkat, produksi TSH menurun, dan sebaliknya, saat produksi hormon tiroid menurun, produksi TSH meningkat. *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) adalah hormon yang diproduksi oleh kelenjar hipofisis. Ketika jumlah hormon tiroid dalam darah menurun, lebih banyak TSH dilepaskan, sedangkan jika terlalu banyak hormon tiroid, pembentukan TSH menurun.

Tes TSH adalah tes fungsi tiroid yang secara akurat mengukur fungsi tiroid. Hormon tiroksin (T4) dan triiodothyronine (T3) memengaruhi semua sel tubuh. T3 dan T4 plasma yang bersirkulasi terutama terikat pada protein, *thyroid binding globulin* (TBG), dan sebagian kecil dalam bentuk bebas, yaitu *free triiodothyronine* (FT3) dan *free thyroxine* (FT4).

Hormon bebas (FT3 dan FT4) merupakan fraksi aktif secara metabolik yang harus diketahui secara kuantitatif. Hormon terikat dan bebas berada dalam keseimbangan reversibel. Triiodothyronine (T3) dan tiroksin (T4) yang tidak terikat atau bebas berinteraksi dengan reseptor intraseluler dan akhirnya menghasilkan peningkatan metabolisme karbohidrat dan lipid serta merangsang sintesis protein dalam berbagai jenis sel. Pada saat yang sama, mengukur konsentrasi hormon bebas telah menjadi bagian dari pemeriksaan tiroid secara mendetail.



1. Pemeriksaan T3 (Triiodothyronine)

A. Pra analitik

- Tujuan : Untuk mengukur kadar total triiodothyronin (T3) dalam seru/plasma penderita
- Alat : *Microtiter/wells/sumur, yellow tip, mikropipet, timer, beker glass* ukuran 100 ml, rak tabung, tabung serologis, microplate reader.
- Bahan :
 - MIC= Mikrotiter Strips yang dilapisi dengan *anti-T3(sheep)*
 - CAL= *Calibrator* A-F (0=A), (0.5=B), (1.0=C), (2.5=D), (5.0=E), dan (7.5=F) $\mu\text{l/ml}$
 - CON= *Enzyme antigen conjugated* mengandung *T3 HRP Conjugated*.
 - C-DIL= *Conjugated buffer Tris Buffered saline* berwarna merah
 - WS= Wash Solution
 - SUB= Substrate Reagent
 - STOP= stop solution
 - Air deionisasi
- Sampel : Serum atau plasma dengan antikoagulan, heparin atau EDTA. Sampel yang baru dikerjakan 5 hari harus di simpan pada suhu 2-8°C , Jika sampel di simpan 30 hari harus di simpan pada suhu -20°C, tidak boleh beku ulang atau mencair hanya sekali.
- Preparasi reagen : Semua reagen harus disuhu kamarkan 15-25 °C sebelum digunakan. Sebelum menggunakan reagen harus dihomogenkan.
 - Wash Working solution (WASH): Encerkan larutan kerja pencuci kedalam 1000 ml sesuai kebutuhane. Pengenceran wash 50x hingga 1000 ml air deionisasi contoh total larutan *wash* murni berisi 20ml x 50 pengenceran maka total keseluruhan larutan adalah 1000 ml terpenuhilah kalimat hingga 1000 ml. Maka makna pengenceran *wash* artinya 1+49 (1:10) cara menghitung adalah jika kebutuhan adalah 1000 ml larutan *wash* yang sudah diencerkan maka 1000 ml dibagi 10 (pembanding) = 20 ml (*wash*) dan untuk pengencer adalah 20ml x 49 (penjumlah) maka 980 ml untuk jumlah pengencer dan total keseluruhan jika dijumlahkan adalah 1000 ml.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Cara larutan kerja pencuci jika pengerjaan pencucian secara manual encerkanlah sesuai kebutuhan. Contoh pencucian secara manual adalah : lepaskan strip perekat pada *wells*/sumur, hisap larutan dalam *wells* dan dibuang kemudian tambahkan wash yang sudah diencerkan, hisap kembali setelah 30 detik dan lakukan sebanyak 3 kali pencucian, jika setelah selesai semua tahap pencucian hilangkan sisa larutan dengan *microplate* secara terbalik pada kertas atau tisu.

Working Conjugate solution (WCON)

CON 1+ 10 C-DIL misalnya 160 μ l ditambahkan dengan 1,6 ml C-DIL untuk 16 wel.

- Stabilitas

Reagent akan stabil sebelum expired dates dan disimpan dengan suhu 2-8°C. Apabila sudah dibuka maka reagent harus disimpan pada suhu 2-8°C dan bisa bertahan selama 60 hari.

B. Analitik

- Metode : *competitive*
- Prinsip : Berdasarkan prinsip perbandingan ikatan antara T3 dalam specimen dan konjugat T3 peroxidase pada jumlah ikatan tertentu pada sumur yang dilabel dengan anti T3 (domba). Jumlah T3 konjugat peroksidase yang diikat pada sumur berbanding terbalik dengan konsentrasi T3 dalam *specimen*. Setelah inkubasi specimen dan konjugat T3 peroksidase, konjugat enzyme yang tidak diikat dibuang melalui pencucian. Larutan substrat yang ditambahkan, dan timbul warna biru, intensitas warna ini berubah menjadi warna kuning setelah reaksi dihentikan dengan *reagent* stop, berbanding terbalik dengan jumlah T3 dalam specimen. Absorban kalibrator, kontrol dan specimen diukur dengan memakai ELISA reader (HUMAREADER) dengan panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi specimen dihitung dari kuva dose response yang dihasilkan dengan memakai serum kalibrator yang diketahui kadar antigennya.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- Prosedur :

Ikuti prosedur sesuai penjelasan reagent dan spesimen di temperatur suhu ruang dan dihomogenisasi sebelum melakukan pemeriksaan		
Tahap 1	Well/Sumur (μ l)	
	A1-D2 Kalibator	E2 dst Sampel
<i>CAL(Calibrator) A-F in duplicate</i>	50	-
<i>Spesimens, controls, in duplicate</i>	-	50
WCON (working conjugate solution)	100	100
Mix secara hati-hati selama 15 detik		
Tutup strip dengan para film atau foil		
Inkubasi 60 menit 20-25 °C		
Lakukan pencucian 3 kali (sesuai prosedur pencucian)		
<i>WASH</i>	300	300
Step 2		
SUB	100	100
Tidak digoyang mix setelah penambahan SUB (<i>substrate</i>)		
Inkubasi 15 menit 20-25°C		
<i>STOP (stop solution)</i>	50	50
homogenkan secara hati-hati		
Baca absorban dengan humareader panjang gelombang 450 nm sesegera mungkin atau dalam 30 menit setelah menghentikan reaksi, jika tersedia bisa menggunakan panjang gelombang 630-690 nm		
Prosedur pencucian (WASH):		
1= Lepaskan perekat, hisap isinya, tambahkan cairan pencuci, setelah 30 detik waktu perendaman dan ulangi pencucian dua kali.		
2= Jika menggunakan mesin cuci otomatis, lakukan wash strips 3 kali tambahan. pastikan mesin cuci mengisi semua sumur secara penuh dan menyedot secara efisien setelah 30 detik (sisa cairan:<15 μ l)		
3= setelah pencucian, hilangkan sisa cairan dengan mengetuk pelat secara terbalik pada kertas tisu		

Ikuti gambar dibawah, bahwa penempatan huruf pada prosedur disesuaikan dengan contoh gambar plat dibawah ini

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal : 0	Cal :										
B	Cal : 0	Cal :										
C	Cal :	Cal :										
D	Cal :	Cal :										
E	Cal :	spl										
F	Cal :	spl										
G	Cal :	dist										
H	Cal :											

C. Post Analitik

Interprestasi hasil

- Konsentrasi total serum triiodothyronine tergantung dari banyak factor : fungsi kelenjar thyroid dan pengaturannya. TBG dan ikatan triiodothyronine pada TGB.
- Jadi konsentrasi total triiodothyronine sendiri tidak cukup untuk menentukan status klinik.
- Nilai total serum triiodothyronine dapat meningkat dalam kondisi kehamilan atau memakai kontrasepsi oral. Nilai T3 menurun ditemukan pada penyakit wasting protein, penyakit liver tertentu dan pemakaian hormone dan obat-obatan.
- Hasil penelitian terhadap subyek euthyroid

Perhitungan:

- Gunakan kurva dosis untuk menghitung konsentrasi triiodothyronine dalam specimen yang tidak diketahui
 1. Plot ukur absorbant terhadap konsentrasi kalibrator dalam kertas grafik linear.
 2. Tarik garis lurus kurva melalui titik plotting.
 3. Pengukuran hasil dalam kurva kalibrator, dimana konsentrasi analit dalam sampel dapat ditentukan.
 4. Untuk mengukur konsentrasi analit pilih dari kurva pilihan yang sesuai atau pas dan di validasi (misalnya dari titik ke titik).

Validasi test

Hasil dinyatakan berlaku apabila memenuhi criteria dibawah ini

CAL	Kisaran yang diterima (OD)
-----	----------------------------

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

A	≥ 1.3
B	$< 0.90 \times$ absorbant CAL A
C	$< 0.88 \times$ absorbant CAL B
D	$< 0.70 \times$ absorbant CAL C
E	$< 0.70 \times$ absorbant CAL D
F	$< 0.80 \times$ absorbant CAL E
Perbedaan antara duplikat dari kalibrator tidak boleh melebihi 10 %	

Hasil yang diharapkan

Rata-rata	1.36 ng/ml
Standar deviasi (S.D)	0.33 ng/ml
Expected range (± 2 S.D)	0.69-2.02

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Langkah Kerja	:
Hasil	: Data pasien

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kesimpulan :

Pembimbing

Praktikan

() ()

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

2. Pemeriksaan T4 (Triiodothyronine 4)

A. Pra analitik

- Tujuan : Untuk mengukur kadar total thyroxine (T4) dalam serum/plasma penderita
- Alat : *Microtiter/wells/sumur, yellow tip*, mikropipet, *timer*, *beker glass* ukuran 100 ml, rak tabung, tabung serologis, microplate reader.
- Bahan :
 - MIC= Mikrotiter Strips yang dilapisi dengan *anti-T4(sheep)*
 - CAL= *Calibrator A-F (0=A), (2=B), (5=C), (10=D), (15=E), dan (25=F) µl/dl*
 - CON= *Enzyme antigen conjugated* mengandung *T4 HRP Conjugated*.
 - C-DIL= *Conjugated buffer* berisi *Tris Buffered saline* berwarna merah
 - WS= Wash Solution
 - SUB= Substrate Reagent
 - STOP= stop solution
 - Air deionisasi
- Sampel : Serum atau plasma dengan antikoagulan, heparin atau EDTA, sampel yang baru dikerjakan harus di simpan 5 hari suhu 2-8⁰C, Jika di simpan selama 30 hari, di simpan pada suhu -20⁰C, tidak boleh beku ulang atau mencair hanya sekali. Tidak lipemik, hemolisis.
 - Wash Working solution (WASH) :Encerkan larutan kerja pencuci kedalam 1000 ml sesuai kebutuhan. Pengenceran wash 50x hingga 1000 ml air deionisasi contoh total larutan *wash* murni berisi 20ml x 50 pengenceran maka total keseluruhan larutan adalah 1000 ml terpenuhilah kalimat hingga 1000 ml. Maka makna pengenceran *wash* artinya 1+49 (1:10) cara menghitung adalah jika kebutuhan adalah 1000 ml larutan *wash* yang sudah diencerkan maka 1000 ml dibagi 10 (pembanding) = 20 ml (*wash*) dan untuk pengencer adalah 20ml x 49 (penjumlah) maka 980 ml untuk jumlah pengencer dan total keseluruhan jika dijumlahkan adalah 1000 ml.

Cara larutan kerja pencuci jika pengerjaan pencucian secara manual encerkanlah sesuai kebutuhan. Contoh pencucian secara manual adalah: lepaskan strip perekat pada *wells/sumur*, hisap larutan dalam *wells* dan dibuang kemudian tambahkan wash yang sudah diencerkan, hisap kembali setelah 30 detik dan lakukan sebanyak 3 kali pencucian, jika setelah selesai semua tahap pencucian hilangkan sisa larutan dengan *microplate* secara terbalik pada kertas atau tisu.
 - *Working Conjugate solution (WCON)*

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

CON 1+ 10 C-DIL misalnya 160 µl ditambahkan dengan 1,6 ml C-DIL untuk 16 wel.

- Stabilitas

Reagent akan stabil sebelum expired dates dan disimpan dengan suhu 2-8°C. Apabila sudah dibuka maka reagent harus disimpan pada suhu 2-8°C dan bisa bertahan selama 60 hari.

B. Analitik

- Metode : ELISA

- Prinsip : Berdasarkan prinsip perbandingan ikatan antara T4 dalam specimen dan konjugat T4 peroxidase yang terdapat pada sumur yang dilabel dengan anti T4 (domba). Jumlah T4 konjugat peroksidase yang dilekatkan pada sumur berbanding terbalik dengan konsentrasi T4 dalam specimen. Setelah inkubasi specimen dan konjugat T4 peroksidase, konjugat enzyme yang tidak terikat dibuang dalam waktu yang sama melalui pencucian. Larutan substrat yang ditambahkan, dan timbul warna biru. Intesitas warna akan berubah menjadi warna kuning setelah reaksi dihentikan dengan *reagent stop*, berbanding terbalik dengan jumlah T4 dalam specimen. Absorban kalibrator, kontrol dan spesimen diukur dengan memakai *ELISA reader* (HUMAREADER) dengan panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi specimen dihitung dari kurva dosis respon yang dihasilkan dengan mekai serum kalibrator yang diketahui kadar antigennya.

- Prosedur :

Ikuti prosedur sesuai penjelasan reagent dan spesimen di temperatur suhu ruang dan dihomogenisasi sebelum melakukan pemeriksaan		
Tahap 1	Well/Sumur (µl)	
	A1-D2 Kalibrator	E2 dst Sampel
<i>CAL (calibarators) in duplicate</i>	25	-
<i>Spesimens, controls, in duplicate</i>	-	25
<i>WCON (working conjugate solution)</i>	100	100
Mix secara hati-hati selama 15 detik		
Tutup strip dengan para film atau foil		
Inkubasi 60 menit 20-25 °C		
Lakukan pencucian 3 kali sesuai prosedur diatas atau SOP pada link		
<i>WASH(working wash solution)</i>	300	300
Step 2		
<i>SUB (Substrate reagent)</i>	100	100
Tidak digoyang mix setelah penambahan SUB		
Inkubasi 15 menit 20-25°C		
<i>STOP (stop solution)</i>	50	50

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Mix secara hati-hati
Baca absorban dengan <i>humareader</i> panjang gelombang 450 nm sesegera mungkin atau dalam 30 menit setelah menghentikan reaksi, jika tersedia bisa menggunakan panjang gelombang 630-690 nm
Prosedur pencucian (WASH):
<p>1= Lepaskan perekat, hisap isinya, tambahkan cairan pencuci, setelah 30 detik waktu perendaman dan ulangi pencucian dua kali.</p> <p>2= Jika menggunakan mesin cuci otomatis, lakukan wash strips 3 kali tambahan. pastikan mesin cuci mengisi semua sumur secara penuh dan menyedot secara efisien setelah 30 detik (sisa cairan:<15µl)</p> <p>3= setelah pencucian, hilangkan sisa cairan dengan mengetuk pelat secara terbalik pada kertas tisu</p>

Ikuti gambar dibawah, bahwa penempatan huruf pada prosedur disesuaikan dengan contoh gambar plat dibawah ini

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal : 0	Cal :										
B	Cal : 0	Cal :										
C	Cal :	Cal :										
D	Cal :	Cal :										
E	Cal :	spl										
F	Cal :	spl										
G	Cal :	dist										
H	Cal :											

C. Post Anlitik

Perhitungan:

Gunakan kurva dosis respon untuk menghitung konsentrasi thyroxine dalam spesimen yang tidak diketahui.

- Buat plot ukur absorban terhadap konsentrasi kalibrator dalam kertas grafik linear.
- Tarik garis lurus kurva melalui titik ploting.
- Pengukuran hasil dalam kurva kalibrator, dimana konsentrasi analit dalam sampel dapat ditentukan.
- Untuk mengukur konsentrasi analit pilih dari kurva pilihan yang sesuai atau pas dan di validasi (misalnya dari titik ke titik).

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Validasi Hasil Tes

CAL	Kisaran yang diterima (OD)
A	≥ 1.3
B	$< 0.88 \times$ absorbant CAL A
C	$< 0.80 \times$ absorbant CAL B
D	$< 0.80 \times$ absorbant CAL C
E	$< 0.85 \times$ absorbant CAL D
F	$< 0.80 \times$ absorbant CAL E
Perbedaan antara duplikat dari kalibrator tidak boleh melebihi 10 %	

Interprestasi hasil

- Konsentrasi total serum thyroxine tergantung dari banyak factor : fungsi kelenjar thyroid dan pengaturannya. TBG dan ikatan thyroxine pada TGB. Jadi konsentrasi total thyroxine sendiri tidak cukup untuk menentukan status klinik.
- Nilai total serum thyroxine dapat meningkat dalam kondisi kehamilan atau pemakai kontrasepsi oral. Nilai T3 menurun ditemukan pada penyakit wasting protein, penyakit liver tertentu dan pemakaian hormone dan obat-obatan. Informasi diagnostic terbaik tentang situasi thyrostasi dapat diperoleh dengan test TRH.
- Hasil yang diharapkan

	Laki-laki	Wanita
Rata-rata	7,6 $\mu\text{g/dL}$	8,2 $\mu\text{g/dL}$
Standart deviasi (SD)	1,6 $\mu\text{g/dL}$	1,7 $\mu\text{g/dL}$
Range yang diharapkan (± 2 SD)	4,4 – 10,8 $\mu\text{g/dL}$	4,8-11,6 $\mu\text{g/dL}$

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:
Spesimen Pemeriksaan	:
Alat dan Bahan	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Langkah Kerja :

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Hasil	:	Data pasien
-------	---	-------------

--

Kesimpulan	:
------------	---

Pembimbing

Praktikan

() ()

3. Pemeriksaan TSH (Thyroid Stimulating Hormone)

A. Pra analitik

- Tujuan : Penentuan kadar TSH dalam serum penderita yang digunakan dalam membedakan hipotiroidisme sekunder dan tersier dari penyakit tiroid primer.
- Alat : *Microtiter/wells/sumur, yellow tip, mikropipet, timer, beker glass* ukuran 100 ml, rak tabung, tabung serologis, microplate reader.
- Bahan :
 - MIC= Mikrotiter Strips yang dilapisi dengan *anti-TSH(monoclonal, mouse)*
 - CAL= *Calibrator A-F* , TSh level:(0=A), (0.5=B), (3.0=C), (6.0=D), (15.0=E), dan (30.0=F) mIU/l
 - CON= *Enzyme conjugate* mengandung *anti TSH(goat)*. Berlabel HRP
 - WS= *Wash Solution*
 - SUB= *Substrate Reagent*
 - STOP= *stop solution*
 - Air deinosasi
- Sampel : Serum, sampel yang baru dikerjakan harus di simpan 5 hari suhu 2-8⁰C, Jika di simpan selama 30 hari, di simpan pada suhu -20⁰C, tidak boleh beku ulang atau mencair hanya sekali. Tidak lipemik, hemolisis.
 - Wash Working solution (WASH) : Dilute [WS]20x] 1 + 19 dengan air deinosasi, e.g. 50 ml [WS]20x] + 950 ml = 1000 ml.
- Stabilitas

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Reagent akan stabil sebelum expired dates dan disimpan dengan suhu 2-8°C. Apabila sudah dibuka maka reagent harus disimpan pada suhu 2-8°C dan bisa bertahan selama 60 hari.

B. Analitik

Metode : Sandwich ELISA

Prinsip :

ELISA TSH menggunakan antibodi anti-TSH monoklonal yang sangat spesifik yang dilapisi pada permukaan sumur mikrotiter. Pada langkah inkubasi pertama, spesimen, kalibrator atau kontrol, dan konjugat enzim (anti-TSH berlabel peroksidase) dicampur untuk membentuk kompleks sandwich yang terikat pada permukaan sumur melalui interaksi dengan antibodi yang diimmobilisasi. Pada akhir inkubasi, konjugat enzim berlebih dicuci. Reagen substrat ditambahkan (langkah 2) dan warna yang dihasilkan, yang berubah menjadi kuning setelah menghentikan reaksi dengan larutan penghenti, diukur secara fotometrik. Intensitas warna berbanding lurus dengan konsentrasi TSH dalam sampel. Absorbansi kalibrator dan spesimen ditentukan menggunakan pembaca mikroplat ELISA atau sistem ELISA otomatis (seperti HumaReader atau lini ELISYS HUMAN).

Prosedur :

Ikuti prosedur sesuai penjelasan			
Reagent dan spesimen di temperature suhu ruang dan dihogenisasi sebelum melakukan pemeriksaan			
Tahap 1	Wel (µl)		
		A1-D2 Calibrators	E2 dst Sampel
CAL A-F <i>in duplicate</i>		50	-
<i>Spesimens, controls in duplicate</i>		-	50
CON		100	100
Mix secara hati-hati selama 15 detik			
Tutup strip dengan parafilm atau foil			
Inkubasi 60 menit 20-25 0C			
Lakukan pencucian 5 kali (lihat prosedur pecucian)			
<i>WASH</i>		300	300

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Tahap 2			
SUB		100	100
Tidak digoyang mic setelah penambahan SUB			
Inkubasi 15 menit 20-25 0C			
STOP		100	100
Mix secara hati-hati			
Baca absorban dengan <i>humareader</i> panjang gelombang 450 nm sesegera mungkin atau dalam 30 menit setelah menghentikan reaksi, jika tersedia bisa menggunakan panjang gelombang 630-690 nm			
<p>Prosedur pencucian (WASH):</p> <p>1= Lepaskan perekat, hisap isinya, tambahkan cairan pencuci, setelah 30 detik waktu perendaman dan ulangi pencucian empat kali.</p> <p>2= Jika menggunakan mesin cuci otomatis, lakukan pencucian strip 5 kali. Pastikan mesin cuci mengisi semua sumur secara penuh dan menyedot secara efisien setelah 30 detik (sisa cairan:<15µl)</p> <p>3= setelah pencucian, hilangkan sisa cairan dengan mengetuk pelat secara terbalik pada kertas tisu</p>			

C. Post Analitik

Nilai normal 0,35 uIU/mL - 4,50 uIU/mL

Validasi

Hasil uji valid jika memenuhi kriteria berikut:

Rerata absorbansi (OD) of [CAL] F \geq 1.2

Perbedaan antarduplikat [CAL] F tidak melebihi 10%.

D. Jurnal Praktikum/Laporan Sementara

Judul	:
Tujuan	:
Prinsip	:

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Spesimen Pemeriksaan :
Alat dan Bahan :
Langkah Kerja :

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

--

Hasil : Data pasien

--

Kesimpulan :

--

--

Pembimbing

Praktikan

() ()

EVALUASI



1. Seorang remaja berusia 16 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah merasa lelah, sering merasa dingin, dan berat badannya naik meski pola makannya tidak berubah. Dokter kemudian melakukan pemeriksaan darah dan menemukan bahwa kadar hormon tiroid pasien tersebut rendah. Apa fungsi utama hormon T3 dan T4 di dalam tubuh yang membuat gangguan kadar hormon tersebut menyebabkan keluhan pada pasien?
 - A. Menyimpan glukosa
 - B. Mengatur metabolisme tubuh
 - C. Menghasilkan sel darah merah
 - D. Menyaring racun dari darah
 - E. Menetralkan racun
2. Seorang wanita berusia 35 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah lelah, berat badan bertambah meskipun nafsu makan menurun, serta kulit terasa kering. Dokter mencurigai adanya gangguan hormonal dan melakukan pemeriksaan laboratorium. Hasil menunjukkan kadar hormon tiroid yang rendah. Hormon tiroid disintesis dan disimpan di kelenjar?
 - A. Hipofisis
 - B. Paratiroid
 - C. Tiroid
 - D. Adrenal
 - E. Limfe

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

3. Seorang pria berusia 28 tahun datang ke klinik dengan keluhan jantung berdebar, penurunan berat badan yang cepat, dan rasa gelisah yang berlebihan. Dokter mencurigai adanya hipertiroidisme dan melakukan pemeriksaan kadar hormon tiroid. Hormon tiroid yang memiliki efek metabolik lebih kuat adalah:
- A. T4
 - B. TSH
 - C. FT4
 - D. FT3
 - E. T3
4. Seorang wanita berusia 42 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah lelah, berat badan bertambah, dan merasa kedinginan meskipun cuaca panas. Dokter mencurigai adanya gangguan tiroid dan melakukan pemeriksaan laboratorium. Hasil menunjukkan kadar hormon tiroid T3 dan T4 yang rendah. Untuk menilai respons tubuh terhadap kondisi ini, dokter juga memeriksa kadar TSH pasien.
- Apa yang terjadi pada kadar TSH saat kadar T3 dan T4 menurun?
- A. TSH menurun
 - B. TSH tetap
 - C. TSH meningkat
 - D. TSH tidak diproduksi
 - E. Tidak berdampak
5. Seorang wanita berusia 30 tahun datang ke klinik dengan keluhan jantung berdebar, penurunan berat badan yang cepat meskipun nafsu makan meningkat, serta sering merasa gelisah dan berkeringat. Pemeriksaan fisik menunjukkan pembesaran kelenjar tiroid. Dokter mencurigai adanya gangguan endokrin dan melakukan pemeriksaan laboratorium yang menunjukkan kadar hormon tiroid yang sangat tinggi. Kondisi yang dialami pasien disebut hipertiroidisme. Apa itu hipertiroidisme?
- A. Kekurangan hormon tiroid
 - B. Produksi TSH berlebihan
 - C. Produksi hormon tiroid berlebihan
 - D. Kanker tiroid
 - E. Pertumbuhan sel berlebih
6. Seorang pria berusia 45 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah lelah, penurunan konsentrasi, dan perubahan berat badan yang tidak dapat dijelaskan. Dokter mencurigai adanya gangguan fungsi tiroid dan memutuskan untuk melakukan pemeriksaan laboratorium. Untuk mendapatkan gambaran paling akurat tentang fungsi tiroid pasien, dokter memilih

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

metode pemeriksaan yang paling andal dan umum digunakan dalam praktik klinis.

Pemeriksaan paling andal untuk menilai fungsi tiroid adalah?

- A. T3 total
- B. T4 total
- C. TSH dan FT4
- D. Kadar glukosa
- E. CEA

7. Seorang wanita berusia 33 tahun datang ke laboratorium untuk pemeriksaan lanjutan terkait gangguan tiroid yang dialaminya. Dokter ingin mengetahui bagaimana hormon tiroid beredar dalam tubuh dan mengapa sebagian besar hormon tiroid tidak langsung aktif secara bebas dalam darah. Ia menjelaskan bahwa dalam sirkulasi darah, hormon tiroid terikat oleh protein tertentu yang berfungsi sebagai pengangkut utama. Apa nama protein utama yang mengikat hormon tiroid dalam darah?

- A. Albumin
- B. Hemoglobin
- C. Insulin
- D. Thyroid Binding Globulin
- E. Beta HCG

8. Seorang pria berusia 40 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah lelah, penurunan berat badan, dan detak jantung yang cepat. Dokter mencurigai adanya gangguan metabolisme akibat perubahan kadar hormon tiroid. Setelah pemeriksaan laboratorium, ditemukan bahwa kadar T4 pasien normal, namun kadar T3 meningkat. Dokter menjelaskan bahwa hormon T4 yang diproduksi oleh kelenjar tiroid akan diubah menjadi T3, bentuk aktif yang lebih kuat, di beberapa organ tubuh. Di mana hormon T4 diubah menjadi T3 dalam tubuh?

- A. Kulit dan otot
- B. Paru-paru
- C. Pankreas
- D. Usus
- E. Hati, ginjal, dan jantung

9. Seorang wanita berusia 37 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah lelah, kulit kering, dan penurunan konsentrasi. Dokter mencurigai adanya gangguan tiroid dan memutuskan untuk melakukan pemeriksaan laboratorium. Salah satu parameter yang diperiksa adalah FT4, karena dianggap sebagai indikator penting dalam menilai fungsi tiroid secara langsung tanpa dipengaruhi oleh protein pengikat dalam darah. Apakah FT4 itu?

- A. Tiroksin terikat protein

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- B. T3 bebas
- C. Tiroksin bebas yang aktif
- D. Hormon dari hipofisis
- E. FT4

10. Seorang wanita berusia 50 tahun datang ke klinik dengan keluhan mudah lelah, kulit kering, sembelit, dan wajah tampak bengkak. Pemeriksaan laboratorium menunjukkan kadar hormon tiroid T4 yang sangat rendah. Dokter menjelaskan bahwa kondisi ini dapat disebabkan oleh gangguan autoimun atau penurunan fungsi tiroid yang parah, dan merujuk pasien untuk evaluasi lebih lanjut terhadap kemungkinan penyakit tiroid kronis. Penyakit yang berhubungan dengan rendahnya kadar T4 adalah?

- A. Graves' disease
- B. Hipertiroidisme
- C. Myxedema dan Hashimoto's disease
- D. Plummer's disease
- E. Parkinson

Kunci Jawaban:

- 1. B
- 2. C
- 3. D
- 4. C
- 5. C
- 6. C
- 7. D
- 8. E
- 9. C
- 10. C

RINGKASAN



Kelenjar tiroid terletak di leher dan berperan penting dalam mengatur metabolisme tubuh melalui produksi dua hormon utama: **Tiroksin (T4)** dan **Triiodotironin (T3)**. T3 memiliki efek metabolik yang lebih kuat meski jumlahnya lebih sedikit dibanding T4.

Hormon-hormon ini memengaruhi pertumbuhan, perkembangan, dan fungsi sel tubuh. **Sebagian besar T3 dan T4 terikat pada protein**, hanya sebagian kecil berada dalam bentuk bebas (FT3 dan FT4) yang aktif secara metabolik.

Thyroid Stimulating Hormone (TSH) diproduksi oleh kelenjar hipofisis dan berfungsi mengatur produksi hormon tiroid. Saat kadar T3/T4 rendah, TSH meningkat, dan sebaliknya.

Gangguan kelenjar tiroid meliputi:

- **Hipertiroidisme:** Produksi hormon tiroid berlebihan → metabolisme meningkat → gejala seperti detak jantung cepat, tremor, dan penurunan berat badan.
- **Hipotiroidisme:** Produksi hormon tiroid kurang → metabolisme menurun → gejala seperti kelelahan, kulit kering, dan penambahan berat badan.

Pemeriksaan hormon tiroid (T3, T4, FT3, FT4, TSH) sangat penting untuk mendeteksi gangguan fungsi tiroid. Pemeriksaan **FT4 dan TSH** lebih diandalkan dibanding T3/T4 total karena lebih akurat menggambarkan fungsi tiroid sebenarnya.

GLOSARIUM



- Neoplasma : Pertumbuhan sel abnormal yang tidak terkontrol dan tidak berguna.
- Tumor : Massa atau benjolan akibat pertumbuhan jaringan abnormal.
- Hipotiroidisme : Kondisi kekurangan hormon tiroid.
- Hipertiroidisme : Kondisi kelebihan hormon tiroid (thyrotoksikosis).
- T3 : hormon tiroid yang diproduksi oleh kelenjar tiroid dan sebagian diubah dari hormon T4 di jaringan tubuh lain.
- T4 : suatu hormon utama yang diproduksi oleh kelenjar tiroid, untuk pertumbuhan, mengatur metabolisme tubuh.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

- TSH : hormon untuk merangsang kelenjar tiroid agar memproduksi dan melepaskan hormon tiroid yaitu T3 dan T4 dan juga dapat digunakan sebagai indikator gangguan fungsi kelenjar tiroid.

DAFTAR PUSTAKA



- Kit Reagent T3 ELISA HUMAN. https://drive.google.com/file/d/1hE2f-d4AgNyKD3YXVjTuu2_PpZOzrk_Y/view?usp=sharing
- Kit Reagent T4 ELISA HUMAN. https://drive.google.com/file/d/101QQha7F53k0OEHuMn54zUJkV9RgnWXm/view?usp=drive_link
- Kit Reagent TSH ELISA HUMAN. <https://drive.google.com/file/d/1WYLnfqJnAfe8NpAhrMIPicEkVthpGtMc/view?usp=sharing>
- Srikandi, P. R. (2020). Hipertiroidismee Graves Disease:Case Report. *Jurnal Kedokteran RAFLESIA*, 6(1), 30–35.
- Suryantini, N.K.M., dkk. 2024. Gangguan Hormon Tiroid Hipotiroidisme: Literature Review. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, Vol. 11, No. 6, Juni 2024.
- Tandra, H. (2020). *Mencegah dan mengatasi penyakit tiroid*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Tunjung, E. (2018). Hubungan Kadar TSH Terhadap Kadar FT4 Pada Pasien Tiroid Di Bangkalan. *Surabaya : The Journal of Muhamadiyah Medical Laboratory Technologist*, 1(2), 110–119.

**MODUL
II**

KENDALI MUTU PEMERIKSAAN IMUNOSEROLOGI

TUJUAN PEMBELAJARAN



1. Mahasiswa mampu memahami kendali mutu pemeriksaan menggunakan prinsip aglutinasi
2. Mahasiswa mampu memahami kendali mutu pemeriksaan menggunakan prinsip imunokromatografi
3. Mahasiswa mampu memahami kendali mutu pemeriksaan menggunakan prinsip kuantitatif

PENDAHULUAN



Kendali mutu merupakan suatu proses atau sistem yang digunakan untuk memastikan bahwa produk atau layanan yang dihasilkan memenuhi standar mutu yang telah ditetapkan. Bagi tenaga Ahli Teknologi Laboratorium Medik hal ini merupakan suatu yang sangat penting untuk menjamin pemeriksaan yang dilakukan. Pada dasarnya pemantapan mutu dilakukan secara internal dan eksternal. Pemantapan mutu internal (PMI) adalah suatu kegiatan pengendalian mutu yang dilakukan di dalam suatu laboratorium sendiri, sedangkan pemantapan mutu eksternal (PME) adalah suatu kegiatan pemantapan mutu yang dilakukan oleh pihak luar untuk menilai kinerja laboratorium tersebut.

Pemantapan mutu ini akan selalu dilakukan setiap harinya. Adapun kegiatan pemantapan mutu bertujuan menjamin produk berupa hasil pemeriksaan laboratorium berkualitas, menjamin hasil pemeriksaan untuk membantu diagnosis tepat. Untuk itu semua Ahli Teknologi Laboratorium Medik harus mampu memahami dan melakukan pemantapan mutu laboratorium. Dalam bidang Imunoserologi sendiri disini akan dibahas pemantapan mutu diantaranya dengan prinsip metode pemeriksaan:

1. Metode Aglutinasi

Mekasnisme dasar metode aglutinasi ini adalah akan terjadi reaksi antara antigen dan antibody yang akan bisa dilihat dengan mata. Untuk pemantapan mutunya bisa dilihat dari

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

bahan kontrol yang biasanya sudah disediakan oleh produsen dari panel pemeriksaan. Hasil pemeriksaan reagen yang benar ditunjukkan oleh hasil reaksi yang diharapkan. Tabel merupakan contoh *quality control* untuk mendeteksi antibodi atau antigen dengan metode aglutinasi.

TABEL 13 PEMANTAPAN MUTU METODE AGLUTINASI

Tes Pemeriksaan	Prosedur kontrol	Hasil
Aglutinasi latex (HCG)	Serum kontrol negatif	Tidak Terjadi Penggumpalan
	Serum kontrol positif	Terjadi Penggumpalan
Aglutinasi latex (CRP)	Serum kontrol negatif	Tidak Terjadi Penggumpalan
	Serum kontrol positif	Terjadi Penggumpalan
Aglutinasi latex (ASTO)	Serum kontrol negatif	Tidak Terjadi Penggumpalan
	Serum kontrol positif	Terjadi Penggumpalan
Aglutinasi langsung (widal)	Kontrol antigen	Tidak Terjadi Penggumpalan
	Serum kontrol negatif	Tidak Terjadi Penggumpalan
	Serum kontrol positif	Terjadi Penggumpalan

2. Metode Rapid atau Imunokromatografi (ICT)

Pada metode Rapid test atau imunokromatografi (ICT) pada dasarnya dilihat perubahan warna yang terjadi pada alat pemeriksaan. Pada metode ini menggunakan dua quality control yaitu:

a. Pemantapan Mutu Internal

Sebelum menggunakan alat rapid perlu dicermati standart operasionalnya (SOP). Hal tersebut disebabkan pada setiap merek biasanya akan ada perbedaan terkait volume sampel, *buffer*, waktu pembacaan ataupun warna yang dihasilkan dari suatu pemeriksaan. Pada rapid tes kontrol internal akan menyatu dengan alat tersebut. Kontrol tersebut akan terlihat setiap kali pembacaan. Apabila dalam suatu pemeriksaan garis pada kontrol tidak muncul atau tidak sesuai yang diharapkan maka hasilnya adalah invalid dan tidak boleh dikeluarkan hasilnya. Maka akan dilakukan pemeriksaan ulang. Pada pengulangan kedua hasil juga menunjukkan invalid, maka kontrol eksternal harus dilakukan sebelum mengulang pemeriksaan yang ke tiga.

b. Pemantapan Mutu Eksternal

Kontrol ini adalah bahan kontrol yang telah dikenal reaktif dan non reaktif yang disediakan dalam setiap paket atau dapat dibeli secara terpisah dari produsen tertentu.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Kontrol eksternal adalah sampel alternatif yang digunakan untuk menilai integritas dan sistem, serta untuk memastikan bahwa teknisi laboratorium melakukan pemeriksaan dengan tepat. Pemeriksaan kontrol eksternal dengan hasil yang tidak valid atau meragukan harus dilakukan untuk menemukan apakah masalah yang muncul disebabkan oleh prosedur pemeriksaan yang salah atau ada masalah pada spesimen. Kontrol positif dan negatif perlu diperiksa jika terdapat dua hasil yang tidak valid berturut-turut pada seorang pasien. Jika hasil kontrol eksternal valid, ada kemungkinan masalah disebabkan oleh adanya bahan pengganggu pada spesimen. Penggunaan kontrol eksternal dianjurkan dalam kondisi berikut:

1. Setiap kali ada pergantian petugas atau saat ada petugas baru yang melakukan pemeriksaan.
2. Ketika membuka paket kit yang baru, saat menerima pengiriman kit baru meskipun nomor lotnya sama dengan yang sedang dipakai.
3. Ketika suhu di area pemeriksaan berada di luar batas yang ditetapkan oleh pabrik
4. Secara berkala dengan jarak waktu tertentu.

Seberapa sering pemeriksaan kontrol perlu dilaksanakan tergantung pada jumlah pemeriksaan yang telah dilakukan, seberapa sering kit baru atau nomor lot baru diterima, perubahan suhu penyimpanan, serta frekuensi rotasi staf. Hasil dari kontrol tersebut perlu dicatat. Apabila hasil dari kontrol eksternal tidak akurat, maka pemeriksaan sampel pasien sebaiknya dihindari dan semua tes yang dilakukan sejak kontrol terakhir dengan hasil yang benar tidak dapat dianggap valid sampai masalah dapat diatasi untuk mengidentifikasi penyebabnya. Hasil dari pemeriksaan ulang harus dicatat bersamaan dengan tindakan yang diambil untuk menyelesaikan masalah. Jika kontrol eksternal menunjukkan hasil yang tidak tepat, langkah-langkah harus diambil untuk menemukan penyebab masalah dengan mengikuti panduan pemecahan masalah dari kontrol eksternal. Prosedur ini akan membantu mengidentifikasi apakah kesalahan itu berasal dari kit, kontrol eksternal, atau metode operator. Jika diperlukan bisa menghubungi produsen untuk mendapatkan bantuan.

3. Metode Kuantitatif

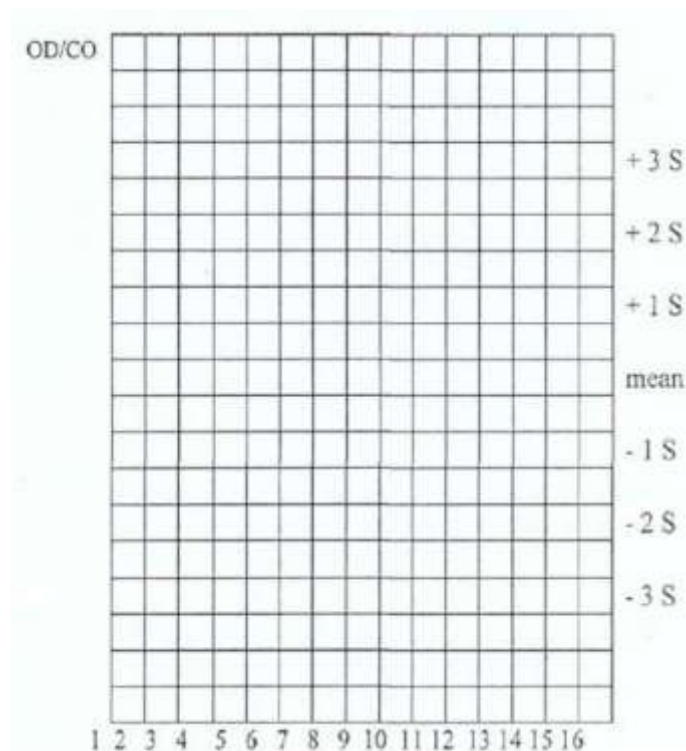
Pemantapan mutu internal (PMI) kuantitatif umumnya dilakukan dengan tiga variasi konsentrasi kontrol yaitu konsentrasi rendah, normal, dan tinggi. Tiga tingkat kontrol, karena kurva immunoassay yang menggambarkan hubungan antara dosis dan respons tidak linear dan memerlukan beberapa kalibrator. Dalam penggunaan tiga bahan dapat meningkatkan respons prosedur quality control terhadap meningkatnya kesalahan analitik. Namun, dalam beberapa keadaan, penerapan menggunakan dua jenis bahan kontrol sudah cukup. Pemeriksaan tiga

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

variasi bahan kontrol diperlukan untuk memperoleh hasil quality control yang memuaskan pada sistem otomatis. Pada system otomatis jika terdapat ketidak sesuaian kontrol biasa akan diulangi pemeriksaan kalibrasi ulang, kalibrasi dengan lot baru atau perawatan mayor.

Pemantapan Mutu Internal (PMI) imunoserologi metode kuantitatif dilaksanakan menggunakan kartu kontrol Shewhart, serta menerapkan metode statistik untuk analisis. Kartu kontrol Shewhart didasarkan pada penggunaan spesimen PMI dan dibuat melalui langkah-langkah berikut:

1. Gunakanlah setidaknya spesimen 20 kali atau lebih pemeriksaan untuk PMI untuk dan catat nilai OD, batas cut-off, atau titer antibodi (lihat apa yang tersedia saja).
2. Hitunglah nilai rata-rata dan deviasi standar (SD).
3. Buatlah grafik dengan pemeriksaan pada sumbu x dan OD, batas cut-off, atau titer antibodi pada sumbu y.
4. Di sumbu y, tuliskan nilai rata-rata, -3, -2, -1, 1, 2, dan 3 SD.
5. Nilai OD atau batas cut-off yang diperoleh dari spesimen PMI dipetakan secara berurutan setiap kali pemeriksaan dilakukan.
6. Tentukan keabsahan pemeriksaan dengan menerapkan aturan Westgard.
7. Kejadian besar seperti perubahan nomor batch dari alat uji dan instrumen yang digunakan harus dicatat dalam kartu.



GAMBAR 25 KARTU KONTROL SHEWHART

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Aturan Westgard diterapkan untuk menganalisis informasi pada kontrol Shewhart. Aturan Westgard disini berfungsi untuk menetapkan batasan kinerja tertentu untuk pemeriksaan spesifik dan dapat membantu dalam mengidentifikasi kesalahan dalam suatu kontrol baik kesalahan acak maupun sistematis. Kesalahan acak merujuk pada variasi yang tidak dapat diprediksi dalam pengukuran, yang mengakibatkan nilai yang diperoleh berbeda dari nilai sebenarnya dengan cara yang tidak teratur. Sementara itu, kesalahan sistematis adalah kesalahan yang muncul secara konsisten dalam satu arah, sehingga semua pengukuran menyimpang dari nilai yang sebenarnya dengan besaran yang tetap atau sebanding.

Berikut adalah aturan dalam Sistem *Westgard Multirules* :

1. Aturan **1_{2s}**. Seluruh analisis dari satu rangkaian dinyatakan di luar kontrol yaitu melebihi batas rata-rata $\pm 3SD$. Hal tersebut menunjukkan adanya kesalahan acak.
2. Aturan **1_{3s}**. Pemeriksaan pada suatu seri dianggap keluar kontrol jika hasil dari dua pemeriksaan berturut turut melewati batas yaitu $x + 2 SD$ atau $x - 2 SD$. . Hal tersebut menunjukkan adanya kesalahan kesalahan acak.
3. Aturan **2_{2s}**. Pengujian dalam suatu pemeriksaan keluar dari kontrol dengan nilai berturut-turut berada di luar batas yang sama, yakni $x + 2SD$ atau $x - 2SD$. Hal tersebut menunjukkan adanya kesalahan sistematis.
4. Aturan **R_{4s}**. Aturan ini hanya berlaku jika kita menggunkan dua kontrol. Untuk hasil pemeriksaan dinyatakan diluar kontrol dengan seliesih antara dua kontrol yang beurrtan melebihi 4 S. Aturan tersebut menunjukan adanya kesalahan sistematis.
5. Aturan **4_{1s}**. Semua pengujian dalam seri pemeriksaan keluar dari kontrol jika terdapat beturut-turut berada diluar batas yang sma $x + 1SD$ ataupun $x - 1SD$. Aturan tersebut mengidentifikasi kesalahan sistematis.
6. Aturan 10x. Semua pengujian dalam seri pemeriksaan keluar dari kontrol jika ada 10 pengukuran berurutan yang jatuh di sisi yang sama dari nilai rata-rata. Aturan tersebut mengidentifikasi terjadinya kesalahan sistematis.

Pada pemeriksaan imunoserologi metode kuantitatif sering digunakan aturan *quality control*. Sutu laboratorium yang sudah mempunyai alat yang memadai dan juga menggunakan tiga Kontrol lebih menyukai menggunkan multirule karena laboran bisa mendeteksi aturan mana yang dilanggar sehingga bisa mengidentifikasi apakah kesalahan acak atau sistematis sehingga tahu tindak lanut apa yang akan dilakukan.

Metode *quality control* sebaiknya ditentukan berdasarkan tampilan dari masing-masing parameter. Langkah awal dilakukan yaitu menetapkan standart kualitas yang

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

diperlukan. Hal tersebut bisa diperoleh dengan melihat *total error allowable* (TEa). TEa merupakan batas total eror yang diperbolehkan menurut *Clinical Laboratory Improvement Amandement* (CLIA). Laboratorium perlu memahami presisi serta akurasi dengan menghitung Koefisien Variasi (CV) dan kesalahan dari setiap parameter. Presisi adalah suatu bentuk kemampuan parameter pemeriksaan untuk dapat memberikan hasil yang konsisten. Sedangkan akurasi adalah tingkat kedekatan suatu pengukuran, perkiraan, atau hasil dengan nilai sebenarnya. CV adalah ukuran statistik yang menunjukkan seberapa besar data dalam suatu kumpulan data terhadap nilai rata-ratanya ($CV\% = (\text{Standar Deviasi}/\text{mean}) \times 100$). Selanjutnya juga dihitung nilai bias. Bias adalah selisih antara hasil pemeriksaan bahan kontrol dengan nilai yang sebenarnya. Nilai tersebut merupakan komponen yang berperan dalam menilai akurasi suatu pemeriksaan. Rata-rata dan SD mempunyai peran dalam pembuatan grafik *Levey–Jennings* untuk menetapkan termasuk dalam kriteria penolakan atau peringatan dalam mengidentifikasi kesalahan. Apakah kesalahan sistematis, kesalahan acak, atau kegagalan metode pemeriksaan berdasarkan aturan *westgard*. *Six Sigma* adalah suatu metode penilaian kualitas dan kinerja proses, yang mengukur seberapa baik suatu proses memenuhi persyaratan atau spesifikasi yang ditetapkan.

Six Sigma menunjukkan jumlah prosedur *quality control* yang diperlukan pada setiap parameter. Apabila nilai CV dan bias ada pada tingkat rendah, *six sigma* akan berada tinggi. Sebaliknya jika CV dan bias tinggi maka kinerja metode menjadi buruk dan memerlukan lebih banyak prosedur *quality control*.

EVALUASI



1. seorang TTLM sedang menjalani di sebuah laboratorium klinik rumah sakit. Sebelum mulai memeriksa sampel pasien, harus menjalankan prosedur kendali mutu internal. Apakah tujuannya?
 - A. Mengurangi biaya operasional
 - B. Memastikan hasil pemeriksaan akurat sesuai standar
 - C. Mempercepat proses pemeriksaan
 - D. Mengurangi jumlah sampel

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

2. Sebagai seorang yang bekerja dilaboratorium. Salah satu kegiatan yang rutin dalam Pemantapan Mutu Internal (PMI) yaitu proses untuk memantau hasil pemeriksaan laboratorium secara berkala. Siapa yang bertanggung jawab melakukan itu?
 - A. Pihak luar seperti distributor
 - B. Tim audit eksternal
 - C. Staf laboratorium sendiri
 - D. Petugas mutu regional
3. Pada sebuah laboratorium rumah sakit TTLM sedang melakukan kegiatan evaluasi mutu laboratorium. Saat itu, laboratorium menerima bahan uji PME (Pemantapan Mutu Eksternal) dari lembaga penyelenggara eksternal untuk pengujian glukosa darah. Kapan PME tersebut sebaiknya dilakukan?
 - A. Hanya sekali setahun
 - B. Setelah penggantian petugas, batch kit baru, perubahan suhu, dan secara berkala
 - C. Ketika hasil pasien tampak normal
 - D. Tidak diperlukan jika PMI sudah baik
4. Pada sebuah laboratorium rumah sakit TTLM menerima rujukan pemeriksaan. Pemeriksaan tersebut menggunakan metode aglutinasi. Ditunjukkan bagaimana pada kontrol positifnya?
 - A. Warna berubah
 - B. Tidak ada perubahan
 - C. Terjadi penggumpalan
 - D. Garis kontrol muncul
5. Pada sebuah laboratorium rumah sakit TTLM menerima rujukan pemeriksaan. Pemeriksaan tersebut menggunakan metode ICT. Apa yang terjadi jika pada rapid test garis kontrol tidak muncul?
 - A. Hasil dianggap positif
 - B. Hasil dianggap negatif
 - C. Hasil dianggap invalid, harus diulang
 - D. Hasil dianggap error, pasien diberi pengobatan
6. Pada sebuah laboratorium rumah sakit. TTLM selalu melakukan beberapa control. Berapa tingkat kontrol internal pada metode kuantitatif otomatis yang sesuai ketentuan?
 - A. Satu tingkat
 - B. Dua atau tiga tingkat (rendah, normal, high)
 - C. Empat tingkat
 - D. Lima tingkat

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

7. Seorang TTLM sedang melakukan kontrol pagi ini. Hal tersebut berbarengan dilakukannya kontrol eksternal. Hasil control eksternal tidak sesuai. Langkah apa yang dilakukan?
 - A. Lanjutkan pemeriksaan pasien
 - B. Evaluasi kontrol eksternal dan hentikan sementara pemeriksaan
 - C. Ganti petugas
 - D. Lewati kontrol dan catat hasil
8. Pada sebuah laboratorium rumah sakit TTLM menerima formulir pemeriksaan . Pemeriksaan tersebut menggunakan metode ICT. Dimanakah letak kontrol pada metode tersebut?
 - A. Di luar alat
 - B. Terpisah dalam botol kecil
 - C. Menyatu dengan alat rapid
 - D. Hanya ada di lab pusat
9. seorang yang bekerja dilaboratorium rumah sakit. Salah satu kegiatan yang rutin dalam Pemantapan Mutu Internal (PMI). siapa yang bertanggung jawab mencatat hasil kontrol?
 - A. Distributor alatSer
 - B. Semua staf laboratorium yang menjalankan kontrol
 - C. Hanya manajer laboratorium
 - D. Ahli mikrobiologi eksternal
10. Pada sebuah laboratorium rumah sakit. TTLM melakukan control pagi hari. Hasilnya kontrol kuantitatif di system otomatis keluar dari range. Apakah yang sebaiknya dilakukan ?
 - A. Abaikan dan lanjutkan testing
 - B. Lakukan kalibrasi ulang atau perawatan alat mayor
 - C. Ganti jenis tes
 - D. Hanya catat dan lanjutkan

Kunci Jawaban:

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

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

8. C
9. B
10. B

RINGKASAN



Kendali mutu adalah sistem untuk memastikan produk atau layanan sesuai standar yang telah ditetapkan. Di laboratorium medik, ini penting agar hasil pemeriksaan akurat dan mendukung diagnosis yang tepat. Dilakukan setiap hari, baik secara internal maupun eksternal. Jenis Kendali Mutu ada 2 yaitu PMI dan PME. Untuk PMI pada metode imunoserologi:

- A. Metode Aglutinasi : Gunakan serum kontrol negatif dan positif. Hasil yang benar: negatif → tidak menggumpal, positif → menggumpal.
- B. Metode Rapid / Imunokromatografi: Gunakan alat rapid yang memiliki kontrol internal. Jika garis kontrol tidak muncul hasil invalid, harus diuji ulang. Jika tetap invalid dua kali evaluasi kontrol eksternal sebelum uji ulang ketiga.
- C. Metode Kuantitatif: Gunakan kontrol internal pada tiga level konsentrasi (rendah, normal, tinggi). Jika nilai keluar dari range, ulangi kalibrasi atau pemeliharaan alat.

Untuk PME pada metode imunoserologi dilakukan oleh pihak luar. Gunakan sampel serum kontrol berreaktif dan non-reaktif. Evaluasi untuk memastikan teknisi dan alat bekerja sesuai prosedur. Diperlukan terutama bila berganti petugas, membuka *batch kit* baru, suhu penyimpanan di luar batas, evaluasi rutin berkala. Jika kontrol eksternal invalid 2x beruntun makan hentikan sementara pemeriksaan pasien sejak kontrol terakhir valid. Selidiki penyebab (kit, kontrol, teknik), lakukan tindakan korektif, catat hasil ulang dan tindakan. Jika perlu, hubungi produsen untuk dukungan.

GLOSARIUM



- Kendali Mutu: Sistem atau proses untuk memastikan produk/layanan memenuhi standar mutu yang telah ditetapkan.
- Pemantapan Mutu Internal (PMI): Pengendalian mutu yang dilakukan di dalam laboratorium sendiri.
- Pemantapan Mutu Eksternal (PME) : Penilaian mutu laboratorium oleh pihak luar menggunakan kontrol eksternal.
- Metode Aglutinasi : Reaksi antigen-antibodi yang terlihat berupa penggumpalan, misalnya pada HCG, CRP, ASTO, atau Widal.
- Kontrol Negatif: Sampel kontrol yang seharusnya tidak menunjukkan reaksi (misalnya, tidak menggumpal).
- Kontrol Positif : Sampel kontrol yang seharusnya menunjukkan reaksi (misalnya, menggumpal atau muncul garis).
- Rapid Test / Imunokromatografi : Metode cepat yang membaca hasil berupa perubahan warna/garis pada alat pemeriksaan.
- Kontrol Internal (Rapid Test) : Kontrol yang terintegrasi dalam alat rapid; garis kontrol harus muncul agar hasil dianggap valid.
- Kontrol Eksternal : Bahan kontrol dari produsen luar, digunakan untuk menilai integritas sistem dan ketepatan prosedur.
- Metode Kuantitatif : Tes yang memberikan hasil numerik.

DAFTAR PUSTAKA



- James O., Westgard, Sten A., Westgard. 2014. "Introducing Westgard Sigma Rules™." 10 Desember 2020. Retrieved (<https://www.westgard.com/westgard-sigma-rules.htm>).
- Kumar, B., Vinodh and Thuthi, M. 2018. "Sigma Metrics as a Tool for Evaluating the Performance of Internal Quality Control in a Clinical Chemistry Laboratory." *Journal of Laboratory Physicians* 10(02):194–99.

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut

Marliana, N., dan Retno, M.W. 2018. Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medik (TLM) Imunoserologi. Kenterian Kesehatan Republik Indonesia Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kehatan Bdan Pengembangan Dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatn Edisi 2018.

Pratama, R.A., Dewi, K.Y., dan Doni, S. 2021. Aplikasi Metrik Sigma Dalam Pemantapan Mutu Internal Pada Pemeriksaan Ureum Disalah Satu Laboratorium Rumah Sakit Kabupaten Pangandara. Jounal of Indonesian Medical Laboratory and Sience. Vol 2 No. 2:175-184.

Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 43 Tahun 2013. Tentang Cara Penyelenggaraan Laboratorium Klinik yang Baik

BIODATA PENULIS



Sri Wahyuni, S.ST., M.Imun. merupakan perempuan yang lahir di Kediri Jawa timur. Jenjang pendidikan penulis meliputi D4 Analis Kesehatan Institut Ilmu kesehatan Bhakti Wiyata Kediri dan S2 Magister Immunologi Univeritas Airlangga Surabaya. Saat ini penulis merupakan pengajar di D4 Teknologi Laboratorium Medis Intitut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiayata Kediri

Email : sri.wahyuni.sst@iik.ac.id



Fransisca Probo Setyoningrum, S.Tr.A.K , M.Kes lahir di Semarang, 22 April 1997. Dosen Program Studi Teknologi Laboratorium Medik, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Pelita Harapan. Penulis telah menyelesaikan studi di D3 Prodi Analis Kesehatan Politeknik Katolik Mangunwijaya (2015-2018), D4 Prodi Teknologi Laboratorium Medik Universitas Muhammadiyah Semarang (2018-2019), S2 Prodi Ilmu Laboratorium Klinis Univeritas Muhammadiyah dengan peminatan Biologi Molekuler (2019-2022) dan sedang melanjutkan studi S3 Kesehatan Masyarakat dengan peminatan Epidemiologi di Universitas Negeri Semarang. email fransiscaprobo3@gmail.com dan nomor handphone 088233119428.



Titi Purnama, S.Si.,M.Kes. Penulis lahir di Raha tanggal 16 September 1989. Penulis merupakan Dosen tetap di Universitas Mandala Waluya, Penulis menempuh Pendidikan di S1 Teknologi Laboratorium Kesehatan, Universitas Hasanuddin (2007) dan melanjutkan Pendidikan S2 Ilmu Biomedik di Universitas Hasanuddin (2013)

Saat ini penulis merupakan Pengajar di Program Studi D4 Teknologi Laboratorium Medis (TLM) Universitas Mandala Waluya.

Email : titipurnam@gmail.com



Renowati, S.Si.T, M.Biomed (Imunologi), lahir di Padang pada tanggal 01 Juli 1973. Penulis menempuh pendidikan di Sekolah Menengah Kejuruan SMAK (Sekolah Menengah Analis Kesehatan) Yayasan perintis Padang (1992-2002), D3 Analis Kesehatan Akademi Analis Kesehatan Perintis (2006-2008), D4 Analis Kesehatan (2008-2010), Program pasca sarjana S2 Biomedik pada Universitas Andalas (2013-2017), sekarang sedang melanjutkan pendidikan program pasca sarjana S3 biomedik di Universitas Andalas. Penulis saat ini menjadi dosen TLM Universitas Perintis Indonesia.
Email Penulis : renowati73@gmail.com



Norma Farizah Fahmi, S.ST. M.Imun lahir di Bangkalan, 09 Maret 1994. Jenjang pendidikan penulis meliputi D4 Analis Kesehatan Universitas Setia Budi dan S2 Imunologi Universitas Airlangga. Saat ini penulis merupakan pengajar di D3 Analis Kesehatan Universitas Noor Huda Mustofa.
Email : normafarizah@universitashn.ac.id



Nazula Rahma Shafriani, S.Si, M.Biomed. lahir di Sleman, 28 Agustus 1991. Penulis menempuh pendidikan S1 di Institut Pertanian Bogor (IPB) prodi Biokimia pada tahun 2010-2014 lalu melanjutkan S2 di Universitas Gadjah Mada (UGM) prodi Ilmu Biomedik peminatan Biokimia pada tahun 2016-2018. Penulis merupakan dosen prodi D4 Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta. Saat ini penulis mengampu mata kuliah Imunologi Dasar, Imunoserologi, Imunohematologi, Biologi Molekuler, Biologi Sel, dan Biokimia.
Email : nazula.rahma@unisayogya.ac.id

Modul Praktikum Imunoserologi Lanjut



Siti Sakdiah, SKM, M. Biomed lahir di Jambi, pada 29 Juli 1975. Menyelesaikan pendidikan S1 di Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia dan S2 di Fakultas Ilmu Biomedik program Immunologi dan Sains Tranfusi Universitas Sriwijaya. Saat ini penulis merupakan pengajar di D4 Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes jambi.

Email : sitisakdiah1975@gmail.com



Retno Martini Widhyasih, S.Si, M.Biomed lahir di Malang, 3 Januari 1970. Jenjang pendidikan penulis meliputi D3 Analisis Kesehatan AAK MH. Thamrin Jakarta, S1 Biologi UIA Jakarta, Magister Ilmu Biomedik di Universitas Indonesia tahun 2012.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Prodi D3 dan Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik, Poltekkes Kemenkes Jakarta III.

Email : retnomartiniw@gmail.com