



MODUL PRAKTIKUM VIROLOGI

Bagi Mahasiswa Prodi Teknologi Laboratorium Medik

Disusun Oleh

Dr. Annita, M.Biomed

Erni Yohani Mahtuti, S.Pd., M.Kes

Siti Nuryani, S.Si. MSc

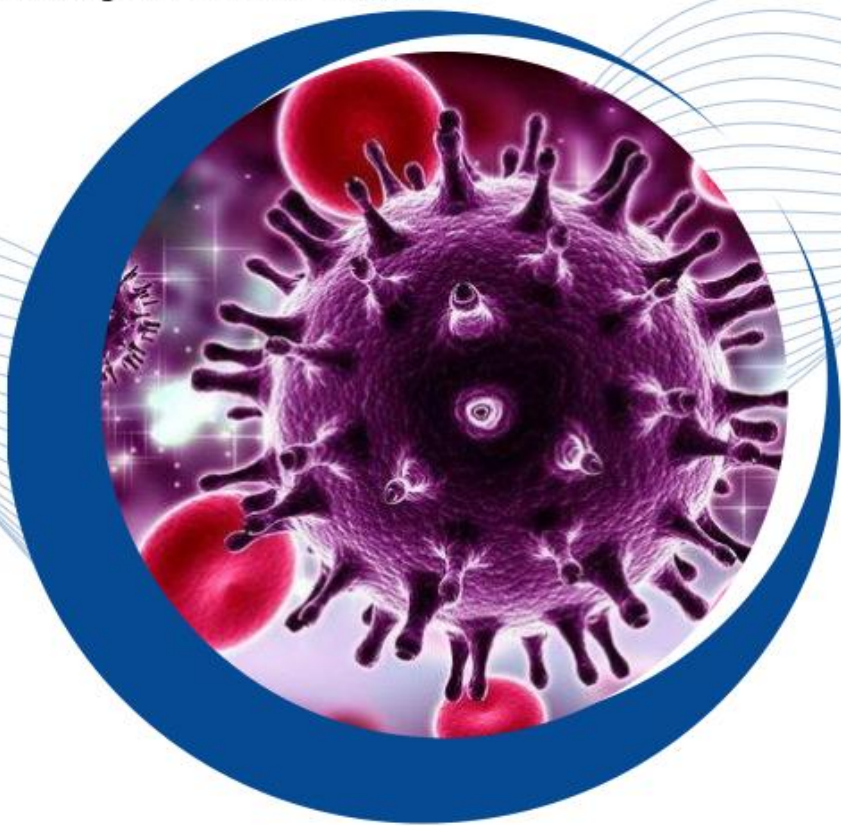
Noor Andryan Ilsan, Ph.D

Munawir Umakaapa, S.Si, M.Biomed

Heri Setiyo Bekti, S.ST, M.Biomed

Maria Eka Suryani, SKM., S.Tr.Kes., M.Si

Suryanata Kesuma, S.ST, M.Si



Reviewer :

Dr. dr. Agustin Iskandar, M.Kes., Sp. PK., Subbs. P.I (K)

**ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK INDONESIA
(AIPTLMI)
2025**



KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga Modul Praktikum Virologi dapat diselesaikan. Virologi adalah cabang ilmu yang mempelajari virus dan agen infeksi serupa. Mencakup struktur dan komposisi virus, Replikasi dan siklus hidup virus, Klasifikasi virus, Interaksi virus dengan inangnya Diagnostik, pencegahan, dan pengendalian virus. Virologi sangat penting dalam bidang kedokteran, kedokteran hewan, pertanian, dan bioteknologi karena banyak virus menyebabkan penyakit serius pada manusia, hewan, dan tumbuhan. Guna mempermudah dalam pelaksanaan praktikum virologi maka modul ini dirancang untuk memberikan pemahaman dasar tentang Virologi serta memperkenalkan Anda pada teknik-teknik laboratorium yang digunakan dalam analisis Virologi.

Dalam modul praktikum Virologi, Anda akan mempelajari Pengenalan dasar lab virologi, Kultur virus, Uji Netralisasi, pemeriksaan virus mulai pra analitik, analitik, pasca analitik dan interpretasi hasil, Pemeriksaan virus-virus patogen, Analisis Efek Sitopatik dan Jaminan mutu pemeriksaan virologi. Hal ini akan membantu memahami cara kerja laboratorium dalam mendiagnosis berbagai kondisi Virologi. Kami berharap modul praktikum Virologi dasar ini dapat memberikan landasan yang kuat dalam pemahaman tentang Virologi dan memberikan wawasan praktis dalam melakukan analisis Virologi dasar.

Saya selaku ketua AIPTLMI ijinilah mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada para dosen TLM seluruh Indonesia yang berkontribusi dalam memberikan masukan, tim kelompok kerja, dan pihak-pihak yang tidak bisa saya sebut satu persatu yang telah berjuang dengan segala daya dan upaya, berkorban waktu, tenaga dan pikiran hingga tersusunnya modul ini. Semoga Modul Praktikum Virologi ini bisa berguna untuk membantu dalam proses penyelenggaraan pendidikan Teknologi Laboratorium Medis yang bermutu. Masukan dan saran tentu sangat diperlukan sebagai evaluasi dan perbaikan untuk penyesuaian sesuai kebutuhan di masa yang akan datang.

Wassalamualaikum Wr.Wb

Jakarta, Oktober 2025
Ketua Umum AIPTLMI

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



TIM PENYUSUN

TIM PENYUSUN MODUL PRAKTIKUM VIROLOGI :

Penulis :

1. Dr. Annita, S.ST, M.Biomed
2. Erni Yohani Mahtuti, S.Pd., M.Kes
3. Heri Setyo Beki, M.Imun
4. Maria Eka Suryani, S.K.M., S.Tr.Kes
5. Siti Nuryani, S.Sc., M.Sc
6. Noor Andryan Ilsan, Ph.D
7. Munawir Umakaapa, S.Si., M.Biomed

Reviewer :

Dr. dr. Agustin Iskandar, M.Kes., Sp.PK., Subs.P.I(K)



DAFTAR ISI

Prakata	i
Tim Penyusun	ii
Daftar isi	iii
Daftar Gambar	iv
Daftar Tabel	v
Glosarium	vi
BAB 1 Pengenalan dasar lab virologi (K3, APD, Penanganan limbah virus)	8
BAB 2 Kultur virus	17
BAB 3 Uji Netralisasi	31
BAB 4 Pemeriksaan Viral load SARS-CoV-2	35
BAB 5 Pemeriksaan Viral Load HCV	49
BAB 6 Pemeriksaan Viral Load HBV	56
BAB 7 Pemeriksaan Viral Load HIV	65
BAB 8 Pemeriksaan Antibodi Anti HSV, Anti CMV, Anti Rubella (Panel RORCH).....	78
BAB 9 Analisis Efek Sitopatik	89



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Jas Laboratorium.....	8
Gambar 1.2. Sarung Tangan	8
Gambar 1.3. Masker.....	8
Gambar 1.4. Gloves (pelindung mata).....	8
Gambar 1.5. Sepatu Medis.....	8
Gambar 3. 1. Antibodi netralisasi	33
Gambar 3.2. Uji netralisasi	34
Gambar 3. 3.Uji hemaglutinasi dan hemaglutinasi inhibisi	35
Gambar 4.1 Pengambilan sampel Nasofaring.....	36
Gambar 4.2 Pengambilan Orofaring	36
Gambar 4.3 Tahapan Pemeriksaan SARS-CoV-2	47
Gambar 8.1 Panel Pemeriksaan IgG/IgM TORCH.....	81
Gambar 8.2 Prosedur Pemeriksaan IgG/IgM TORCH	83



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbandingan ketiga metode Kultur	20
Tabel 2.2 Jenis spesimen tergantung jenis virus yang dicurigai dan lokasi infeksi	21
Tabel 2.3 Metode identifikasi dan konfirmasi	24
Tabel 2.4 Parameter Pengamatan Plak	26
Tabel 2.5 Interpretasi hasil kultur virus T4	27
Tabel 2.6 Jaminan Mutu Pemeriksaan Kultur	27
Tabel 2.7 Contoh Jaminan Mutu Sederhana	27
Tabel 4.1 Protokol Kit Ekstraksi (QIAamp Viral RNA Mini Kit Qiagen).....	40
Tabel 4.2 Bahan mendeteksi RNA dari virus SARS-CoV-2	42
Tabel 4.4 <i>Cycling Condition</i>	43
Tabel 4.5 Kontrol Kualitas	44
Tabel 4.6 Nilai Normal	44
Tabel 7.1 Nilai Normal Ct Value	73
Tabel 8.1 Rangkuman Pelaporan Hasil Pemeriksaan	83



GLOSARIUM

Istilah	Pengertian
AASLD	: <i>American Association for the Study of Liver Diseases, organisasi yang menetapkan pedoman klinis untuk penyakit hati, termasuk hepatitis B.</i>
ALT (Alanine Aminotransferase)	: Enzim hati yang meningkat saat terjadi kerusakan hati; digunakan bersama viral load untuk menilai progresivitas hepatitis B.
Amplifikasi	: Proses memperbanyak salinan RNA/DNA target dalam PCR untuk memudahkan deteksi.
Annealing/Elongasi	: Tahapan dalam PCR di mana primer menempel pada DNA target dan enzim memperpanjang rantai DNA baru.
Aviditas IgG	: Kekuatan ikatan antibodi IgG terhadap antigen spesifiknya, digunakan untuk membedakan infeksi baru (avidity rendah) dari infeksi lama (avidity tinggi).
cDNA (complementary DNA)	: DNA yang disintesis dari RNA template menggunakan enzim reverse transcriptase.
CMIA	: Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, metode pemeriksaan antibodi/antigen berbasis reaksi kimia bercahaya, digunakan di laboratorium klinis.
CPE (Cytopathic Effect)	: Perubahan morfologi atau kerusakan sel inang akibat infeksi virus.
Ct (Cycle threshold)	: Jumlah siklus PCR saat sinyal fluoresen pertama kali terdeteksi; digunakan untuk menghitung konsentrasi RNA virus.
Ct Value (Cycle Threshold Value):	: Jumlah siklus yang dibutuhkan oleh mesin PCR untuk mendeteksi sinyal RNA virus. Semakin rendah nilai Ct, semakin tinggi jumlah virus (viral load).
Cy5/VIC	: Kanal fluoresensi dalam PCR yang digunakan untuk mendeteksi kontrol internal.
FAM	: Kanal fluoresensi dalam PCR untuk mendeteksi DNA HBV, RNA HCV
Garis C (Control)	: Garis kontrol pada rapid test yang wajib muncul untuk memastikan reagen dan prosedur pemeriksaan berjalan benar.
Hepatoseluler Karsinoma (HCC)	: Jenis kanker hati primer yang sering disebabkan oleh hepatitis B kronis.
IC (Internal Control)	: Komponen kontrol dalam PCR untuk mendeteksi adanya hambatan atau kegagalan pada proses ekstraksi dan amplifikasi.
IFA	: Immunofluorescence Assay, metode serologi berbasis mikroskop fluoresen untuk mendeteksi antibodi spesifik.
IgG	: Immunoglobulin G, jenis antibodi yang diproduksi setelah IgM dan bertahan lama sebagai penanda infeksi lampau atau kekebalan tubuh.
IgM	: Immunoglobulin M, jenis antibodi yang pertama kali diproduksi tubuh saat terjadi infeksi akut.
Internal Control (IC)	: RNA buatan yang ditambahkan ke sampel untuk memverifikasi bahwa proses ekstraksi dan amplifikasi berhasil tanpa gangguan.
IU/mL (International Units per milliliter)	: Satuan pengukuran konsentrasi virus dalam darah.
Kultur Primer	: Kultur sel yang langsung diambil dari jaringan organisme dan hanya dapat tumbuh dalam waktu terbatas.

Modul Praktikum Virologi

Kultur Sel Diploid	:	Kultur sel dengan jumlah kromosom normal, bisa membelah beberapa kali, contohnya WI-38, MRC-5.
Kultur Virus	:	Proses memperbanyak virus dalam sistem biologis (sel hidup) untuk tujuan diagnostik, penelitian, atau produksi vaksin.
Kurva Standar	:	Grafik log antara Ct dan konsentrasi DNA virus yang digunakan untuk menghitung jumlah virus secara kuantitatif.
Lateral Flow Assay (LFA)	:	Metode imunokromatografi aliran lateral dalam bentuk rapid test, untuk deteksi kualitatif antibodi atau antigen di spesimen darah, serum, atau plasma.
LLOQ (Lower Limit of Quantification)	:	Batas bawah deteksi kuantitatif alat; di bawah nilai ini hasil tidak dapat diukur secara akurat.
LOD (Limit of Detection)	:	Batas terendah RNA HCV yang masih dapat dideteksi oleh alat.
Master Mix	:	Campuran reagen PCR yang berisi enzim, primer, probe, dan buffer yang dibutuhkan untuk reaksi amplifikasi.
Media Kultur	:	Nutrien dan sistem pendukung yang digunakan untuk menumbuhkan sel atau jaringan tempat virus dikulturkan.
Nilai Kritis	:	Hasil pemeriksaan yang melebihi batas linieritas alat dan perlu pengenceran ulang agar bisa dikuantifikasi dengan akurat.
Plaque	:	Daerah bening pada lapisan sel yang menandakan lisis (kerusakan) sel akibat infeksi virus.
Primer dan Probe	:	Oligonukleotida pendek yang dirancang untuk mengenali dan mengikat bagian spesifik DNA target dalam PCR.
Probe	:	Molekul pendek berlabel fluoresen yang dirancang untuk mengenali dan mengikat RNA target dalam PCR.
R ² (Koefisien Regresi)	:	Ukuran statistik pada kurva standar PCR yang menunjukkan akurasi hubungan antara Ct dan konsentrasi DNA virus.
Real-Time PCR	:	Metode PCR yang memungkinkan pemantauan jumlah RNA virus secara langsung selama proses amplifikasi.
Relaps	:	Kambuhnya infeksi HCV setelah sebelumnya tidak terdeteksi (setelah terapi).
Seropositif	:	Kondisi di mana antibodi spesifik terhadap patogen tertentu terdeteksi dalam serum seseorang.
Slope Kurva	:	Kemiringan grafik pada kurva standar PCR; menunjukkan efisiensi amplifikasi. Nilai ideal: -3,10 hingga -3,60.
Sustained Virological Response (SVR)	:	Tidak terdeteksinya HCV RNA dalam darah 12–24 minggu setelah terapi selesai; dianggap sebagai penyembuhan virologis.
TaqMan®	:	Teknologi PCR berbasis probe berlabel fluoresen yang memecah saat reaksi berlangsung, memungkinkan deteksi spesifik dan kuantitatif.
TCID ₅₀ (Tissue Culture Infective Dose 50%)	:	Ukuran jumlah virus yang dibutuhkan untuk menginfeksi 50% sel kultur
ULOQ (Upper Limit of Quantification)	:	Batas atas deteksi alat; hasil di atas nilai ini perlu dilakukan pengenceran dan pemeriksaan ulang.
Viral Load	:	Jumlah RNA HCV, DNA HBV dalam darah, menunjukkan tingkat replikasi virus dan infektivitas pasien.
Virus Titer	:	Jumlah partikel virus aktif dalam suatu sampel (dinyatakan dalam PFU/mL atau TCID ₅₀).

BAB I

PENGENALAN DASAR LABORATORIUM VIROLOGI

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip-prinsip K3 di laboratorium virologi.
2. Mahasiswa mampu mengidentifikasi dan memilih APD yang sesuai untuk pekerjaan di laboratorium virologi BSL-2.
3. Mahasiswa mampu mendemonstrasikan prosedur pemakaian (*donning*) dan pelepasan (*doffing*) APD dengan benar.
4. Mahasiswa mampu menjelaskan prosedur penanganan tumpahan bahan infeksius.
5. Mahasiswa mampu membedakan dan mengelola limbah infeksius dan non-infeksius.

PENDAHULUAN

Laboratorium virologi merupakan lingkungan kerja dengan risiko paparan agen infeksius biologis yang tinggi. Virus, sebagai agen penyebab penyakit, tidak dapat dilihat dengan mata telanjang dan dapat menyebar melalui aerosol, percikan (droplet), kontak langsung, maupun tidak langsung. Oleh karena itu, pemahaman dan penerapan **Keselamatan dan Kesehatan Kerja (K3)** yang ketat adalah fondasi utama bagi setiap analis kesehatan yang bekerja di bidang ini.

Prinsip utama K3 di laboratorium virologi adalah untuk melindungi tiga elemen penting:

1. **Personel (Petugas Laboratorium):** Mencegah terjadinya infeksi akibat kerja (*laboratory-acquired infections*).
2. **Produk/Spesimen:** Mencegah kontaminasi silang antar spesimen yang dapat menyebabkan hasil pemeriksaan tidak valid.
3. **Lingkungan:** Mencegah pelepasan agen infeksius ke lingkungan sekitar laboratorium

Untuk mencapai tujuan tersebut, setiap personel wajib memahami dan menerapkan praktik-praktik berikut:

1. **Biosafety Level (BSL):** Laboratorium virologi klinis umumnya beroperasi pada BSL-2. Ini berarti personel harus terlatih dalam menangani agen patogenik, akses ke laboratorium

Modul Praktikum Virologi

dibatasi saat pekerjaan sedang berlangsung, dan prosedur yang berpotensi menghasilkan aerosol atau percikan harus dilakukan di dalam **Biological Safety Cabinet (BSC)**.

2. **Alat Pelindung Diri (APD):** APD adalah baris pertahanan terakhir untuk melindungi personel. Penggunaan APD yang tepat, sesuai standar, serta prosedur pemakaian (*donning*) dan pelepasan (*doffing*) yang benar adalah keterampilan esensial. APD (Alat Pelindung Diri) penting di lab virologi untuk melindungi dari virus dan bahan berbahaya lainnya, termasuk: jas lab/coveralls, sarung tangan, kacamata pelindung (*goggles*), respirator/masker (terutama N95 atau lebih tinggi untuk virus), pelindung kepala, dan sepatu tertutup (kadang dengan penutup sepatu atau boot anti-air). Pemilihan APD tergantung pada tingkat keamanan biosafety (BSL) laboratorium dan jenis patogen yang ditangani.



Gambar 1.1 Jas Laboratorium



Gambar 1.2. Sarung Tangan



Gambar 1.3. Masker



Gambar 1.4. Goggles (pelindung mata)



Gambar 1.5. Sepatu medis

3. **Penanganan Limbah:** Limbah laboratorium adalah limbah yang dihasilkan dari kegiatan di dalam laboratorium. Limbah laboratorium dapat berasal dari :

- a. Bahan baku kadaluarsa
- b. Bahan habis pakai (media perbenihan tidak terpakai)
- c. Produk proses laboratorium (sisa spesimen)
- d. Produk penanganan limbah (jarum setelah di autoklaf)

Adapun jenis-jenis limbah di laboratorium:

- a. Limbah non infeksius (limbah domestik)

Limbah non infeksius di laboratorium contohnya kertas, kardus, tisu, sisa makanan/minuman, tisu, kaleng minuman, dan botol minuman. Upaya penanganan limbah termasuk limbah non infeksius dilakukan dengan melakukan pemilahan, pengumpulan, pengangkutan, pengolahan dan pemrosesan akhir. Upaya pemilahan dapat dilakukan sesuai dengan kategori limbah yang ada, berlabel dan memiliki warna wadah yang berbeda untuk memudahkan pengelolaan selanjutnya. Sesuai ketentuan untuk limbah padat non medis menggunakan kantong plastik hitam.



Gambar 1.5. Wadah penyimpanan limbah non-infeksius

- b. Limbah infeksius (limbah medis)

- 1) Limbah infeksius cair

Limbah cair di laboratorium contohnya darah, urin, cairan tubuh, limbah yang dihasilkan alat pengujian, sisa-sisa bahan pemeriksaan, cat untuk pemeriksaan mikroskopis, dan air bekas pencucian alat. Air limbah yang berasal dari laboratorium harus diolah di Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL), bila tidak mempunyai IPAL harus dikelola sesuai ketentuan yang berlaku melalui kerjasama dengan pihak lain atau pihak yang berwenang.

2) Limbah infeksius padat

Limbah infeksius padat di laboratorium seperti sarung tangan sekali pakai, masker, kapas, kaset rapid test, pot sampel, tabung darah, dan pipet. Limbah padat infeksius (sarung tangan, kapas dan tisu yang terkena darah/cairan tubuh) dimasukkan ke dalam tempat sampah injak yang telah dilapisi dengan kantong plastik warna kuning



Gambar 1.6. Wadah penyimpanan limbah infeksius padat

3) Limbah infeksius tajam

Limbah medis tajam seperti jarum suntik, lanset, objek glass dan yang beresiko mengalami pecahan harus ditampung dalam tempat khusus yang dikenal dengan sebutan safety box. Safety box harus sesuai dengan standar agar tidak memungkinkan terjadinya kebocoran, tumpahan maupun tertusuk bagi petugas.



Gambar 1.7. Wadah penyimpanan limbah infeksius tajam



PRAKTIKUM

A. Pra analitik

1. Tujuan Pemeriksaan

- Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip-prinsip K3 di laboratorium virologi.
- Mahasiswa mampu mengidentifikasi dan memilih APD yang sesuai untuk pekerjaan di laboratorium virologi BSL-2.
- Mahasiswa mampu mendemonstrasikan prosedur pemakaian (*donning*) dan pelepasan (*doffing*) APD dengan benar.
- Mahasiswa mampu menjelaskan prosedur penanganan tumpahan bahan infeksius.
- Mahasiswa mampu membedakan dan mengelola limbah infeksius dan non-infeksius

2. Metode:

Demonstrasi, simulasi, dan praktik langsung (observasi).

3. Prinsip:

Prinsip kerja pada topik ini adalah pencegahan paparan dan kontaminasi melalui penerapan praktik kerja aman, penggunaan barrier (APD dan BSC), dan dekontaminasi limbah yang efektif.

4. Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel

Pada praktikum pengenalan ini, **tidak ada spesimen biologis dari pasien yang digunakan**. "Spesimen" yang ditangani adalah peralatan laboratorium dan larutan non-infeksius (misalnya, air berwarna) yang digunakan untuk simulasi tumpahan

5. Alat dan bahan

a. Alat

- Biologi Safety Cabinet (BSC) Kelas II
- Autoklaf
- Wadah tahan tusukan (*sharps container*)
- Kantong plastik biohazard (warna kuning atau merah, berlogo biohazard)
- Tempat sampah terpilah (infeksius dan non-infeksius)
- Botol semprot untuk disinfektan
- *Spill kit* (berisi bahan penyerap, penjepit, disinfektan, kantong biohazard)
- *Eyewash station*

Modul Praktikum Virologi

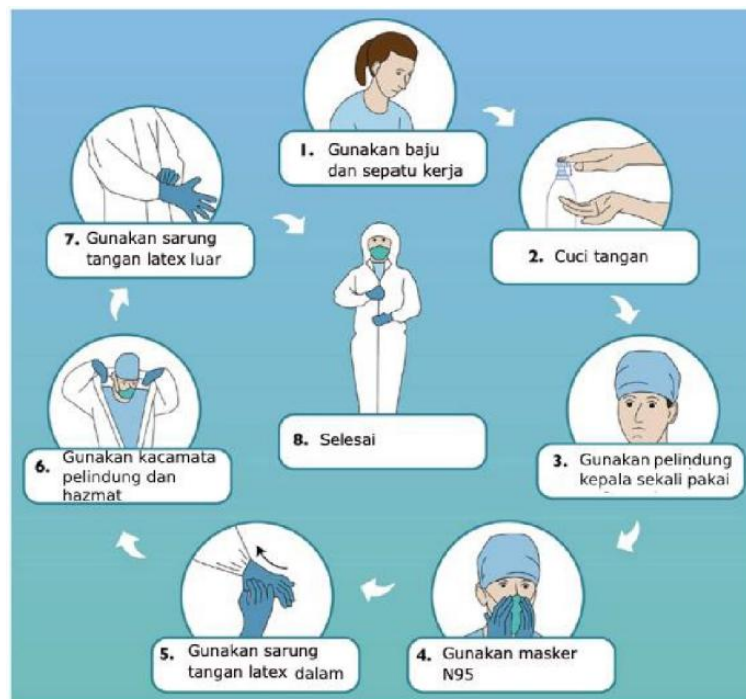
b. Bahan

- Jas Laboratorium (lengan panjang, kancing depan)
- Sarung tangan nitril sekali pakai
- Pelindung mata (*goggles*)
- Pelindung wajah (*face shield*)
- Masker bedah
- Penutup kepala (*hair cap*) dan penutup sepatu (*shoe cover*)
- Larutan disinfektan (misal: larutan hipoklorit 0.5%, alkohol 70%)
- Sabun antiseptik dan air mengalir
- Hand sanitizer
- Air berwarna (untuk simulasi tumpahan)

B. Analitik

1. Prosedur kerja

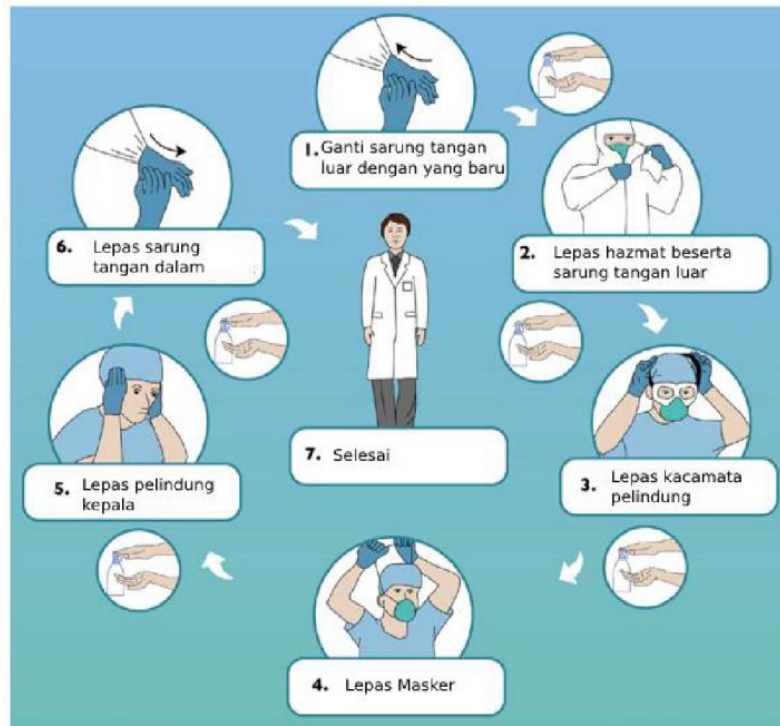
a. Prosedur Memakai APD (Donning):



Gambar 1.8. Tatacara memakai APD Level 3

- 1) Lakukan kebersihan tangan dengan sabun dan air atau hand sanitizer.
- 2) Pakai jas laboratorium dan kancingkan sepenuhnya.
- 3) Pakai masker bedah.
- 4) Pakai pelindung mata (*goggles*) atau *face shield*.
- 5) Pakai sarung tangan. Pastikan sarung tangan menutupi manset jas laboratorium.

- b. **Prosedur Melepas APD (Doffing):** *Urutan ini sangat penting untuk mencegah kontaminasi diri*



Gambar 1.9. Tatacara melepas APD Level 3

- 1) Dekontaminasi sarung tangan dengan disinfektan.
 - 2) Lepaskan jas laboratorium dan sarung tangan secara bersamaan. Gulung jas dengan bagian luar berada di dalam, lalu buang ke kantong biohazard.
 - 3) Lakukan kebersihan tangan.
 - 4) Lepaskan pelindung mata atau *face shield* dengan memegang bagian tali atau gagangnya. Letakkan di area dekontaminasi.
 - 5) Lepaskan masker dengan memegang talinya. Buang ke tempat sampah infeksius.
 - 6) Lakukan kebersihan tangan secara menyeluruh dengan sabun dan air
- c. **Prosedur Pembersihan Tumpahan Cairan Infeksius:**
- 1) Petugas menggunakan APD.
 - 2) Beri tanda untuk menunjukkan area adanya tumpahan.
 - 3) Serap cairan yang tumpah dibersihkan dengan kain perca/ handuk/ tisu/ koran bekas penyerap bersih yang dapat menyerap sampai bersih kemudian buang ke kantong warna kuning (kantong infeksius).
 - 4) Tuangkan cairan detergen kemudian serap dengan kain perca/ handuk/ tisu/ koran bekas masukkan ke kantong warna kuning.

- 5) Lanjutkan dengan cairan klorin 0,5% kemudian serap dan buang ke kantong warna kuning .
- 6) Lepaskan APD sesuai prosedur *doffing* dan lakukan kebersihan tangan.
- 7) Laporkan kejadian pada logbook keamanan laboratorium

d. Prosedur Penanganan Limbah:

- **Limbah Tajam:** Semua benda tajam (jarum, kaca pecah) harus langsung dibuang ke *sharps container* tanpa ditutup kembali (*recapping*).
- **Limbah Infeksius Padat:** Sarung tangan, tisu, tabung plastik, cawan petri, dll., dibuang ke kantong biohazard berwarna kuning/merah.
- **Limbah Infeksius Cair:** Didekontaminasi dengan menambahkan disinfektan dalam volume yang cukup sebelum dibuang ke sistem pembuangan air (jika diizinkan oleh peraturan setempat) atau di autoklaf.
- Semua limbah infeksius harus di-autoklaf sebelum diserahkan kepada pihak pengelola limbah B3.

2. Insiden Kritis

Insiden Kritis dalam konteks ini adalah terjadinya insiden yang membahayakan keselamatan, seperti:

- Tumpahan bahan infeksius di luar BSC.
- Cedera akibat benda tajam yang terkontaminasi (*needlestick injury*).
- Kegagalan fungsi BSC saat sedang digunakan.
- Paparan membran mukosa (mata, mulut) dengan aerosol atau percikan.

3. Perhitungan

C. Post analitik

1. Pelaporan insiden pada topik ini meliputi:

- Mengisi daftar periksa (checklist) kelengkapan APD.
- Membuat laporan insiden jika terjadi tumpahan atau kecelakaan kerja.
- Mencatat log penggunaan dan pemeliharaan alat (misal: BSC, autoklaf).

2. Sumber kesalahan pemeriksaan: Dalam konteks K3, "kesalahan" adalah pelanggaran prosedur yang dapat menyebabkan kecelakaan atau kontaminasi

- Urutan *donning* atau *doffing* APD yang salah.
- Tidak segera menangani tumpahan.
- Membuang limbah infeksius ke tempat sampah non-infeksius.
- Makan, minum, atau menyentuh wajah saat berada di area kerja laboratorium.

Modul Praktikum Virologi

- Bekerja di luar BSC untuk prosedur yang menghasilkan aerosol.
 - Menggunakan APD yang sudah rusak atau sobek.
3. Jaminan mutu pemeriksaan (**Quality Assurance**): Jaminan mutu dalam K3 meliputi:
- **Pelatihan Berkala:** Memastikan semua personel mendapatkan pelatihan K3 secara rutin.
 - **Validasi Keterampilan:** Menguji kompetensi personel dalam memakai/melepas APD dan menangani tumpahan.
 - **Kalibrasi dan Sertifikasi Alat:** Memastikan BSC, autoklaf, dan alat keselamatan lainnya berfungsi dengan baik dan disertifikasi secara berkala.
 - **Audit Internal:** Melakukan inspeksi K3 secara rutin untuk mengidentifikasi potensi bahaya
 - **Ketersediaan Prosedur Operasional Baku (POB):** Menyediakan POB yang jelas untuk semua prosedur kerja dan penanganan darurat

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Modul Praktikum Virologi

Kesimpulan :

Kota,20...

Pembimbing

Praktikan

() ()



Bentuk Evaluasi :

- A. Tugas : Buatlah sebuah diagram alir (flowchart) yang menggambarkan langkah-langkah yang harus Anda ambil jika terjadi tumpahan 1 ml spesimen serum yang berpotensi mengandung Virus Hepatitis B di atas meja kerja.
- B. Tes
 - **Penilaian Kognitif**

1) Skenario:

Seorang ATLM baru saja selesai menangani sampel serum pasien yang diduga terinfeksi virus Dengue di dalam Biological Safety Cabinet (BSC). Ia kemudian berjalan ke area dekontaminasi untuk melepas Alat Pelindung Diri (APD) yang dikenakannya. Urutan tindakan yang dilakukannya adalah sebagai berikut: pertama, ia melepas kaca mata pelindung (goggles) dengan tangannya yang masih memakai sarung tangan, lalu meletakkannya di meja. Kedua, ia melepas masker bedah. Ketiga, ia melepas jas laboratorium dan sarung tangan secara bersamaan, menggulungnya dengan bagian luar di dalam, dan membuangnya ke kantong limbah infeksius. Terakhir, ia mencuci tangan dengan sabun antiseptik.

Pertanyaan:

Berdasarkan prosedur pelepasan APD (doffing) yang benar, manakah kesalahan paling fatal yang dilakukan oleh ATLM tersebut yang berisiko tinggi menyebabkan kontaminasi diri?

- A. Melepas masker bedah sebelum melepas jas laboratorium.
- B. Melepas jas laboratorium dan sarung tangan secara bersamaan.
- C. Melepas kaca mata pelindung dengan tangan yang masih bersarung tangan.
- D. Mencuci tangan sebagai langkah terakhir dalam prosedur.

Jawaban: C

2) Skenario:

Saat melakukan preparasi sampel, seorang ATLM secara tidak sengaja memecahkan sebuah tabung vakutainer kaca berisi plasma yang akan diuji viral load HIV. Pecahan kaca dan tumpahan plasma tersebar di area terbatas di atas meja kerja yang terbuat dari stainless steel. ATLM tersebut segera mengenakan APD lengkap.

Pertanyaan:

Tindakan penanganan limbah yang paling tepat untuk pecahan kaca yang terkontaminasi plasma tersebut adalah...

- A. Memungut pecahan kaca dengan tangan bersarung ganda dan membuangnya ke kantong limbah biohazard kuning.
- B. Menyiram area dengan disinfektan, lalu menyapu pecahan kaca langsung ke dalam pengki untuk dibuang ke tempat sampah umum.
- C. Menggunakan penjepit (forsep) untuk mengambil semua pecahan kaca dan memasukkannya ke dalam sharps container (wadah tahan tusukan).
- D. Menutupi pecahan kaca dengan kertas penyerap tebal, lalu mengangkatnya dan membuangnya ke kantong limbah biohazard.

Jawaban: C

3) Skenario:

Seorang ATLM sedang memindahkan sebuah labu kultur sel (flask) yang berisi media dan virus influenza dari inkubator ke BSC. Di tengah jalan, ia tersandung dan labu kultur tersebut jatuh pecah di lantai laboratorium, menyebabkan tumpahan sekitar 25 ml cairan infeksius dan pecahan plastik. Beberapa rekan ATLM lain sedang bekerja di dekat lokasi tumpahan.

Pertanyaan:

Apakah langkah pertama yang harus segera dilakukan oleh ATLM tersebut sesuai prosedur penanganan tumpahan bahan biologis?

- A. Segera mengambil kertas penyerap dan menutupi area tumpahan untuk mencegah penyebaran lebih lanjut.
- B. Mengambil spill kit dan langsung menuangkan cairan disinfektan (larutan hipoklorit) ke atas tumpahan.
- C. Memberi peringatan secara lisan kepada rekan di sekitar ("Awas ada tumpahan!"), kemudian melapor kepada dosen/supervisor.
- D. Diam-diam membersihkan tumpahan sendirian agar tidak menimbulkan kepanikan di laboratorium.

Jawaban: C

Modul Praktikum Virologi

- **Penilaian Psikomotor**

- a. Mahasiswa diminta untuk mendemonstrasikan prosedur *donning* dan *doffing* APD lengkap. Penilaian dilakukan menggunakan daftar tilik (checklist).
- b. Mahasiswa diminta mendemonstrasikan penanganan tumpahan simulasi sesuai prosedur.

- **Penilaian Afektif**

- Penilaian observasi terhadap sikap mahasiswa selama praktikum, meliputi: ketelitian, kepatuhan terhadap instruksi, kesadaran akan potensi bahaya, dan kerja sama tim

C. Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

- Penilaian Kognitif (Pengetahuan - Bobot 30%)
- Penilaian Psikomotor (Keterampilan - Bobot 50%)
- Penilaian Afektif (Sikap - Bobot 20%)



RINGKASAN

Keselamatan dan Kesehatan Kerja (K3) adalah aspek paling fundamental dalam pekerjaan di laboratorium virologi. Kepatuhan terhadap prosedur standar, penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) yang benar, dan manajemen limbah yang bertanggung jawab bukan hanya melindungi diri sendiri, tetapi juga rekan kerja dan lingkungan. Menguasai keterampilan dasar ini adalah syarat mutlak sebelum melakukan pemeriksaan virologi yang lebih kompleks. Sikap waspada dan disiplin adalah kunci untuk menciptakan lingkungan kerja yang aman dan hasil pemeriksaan yang akurat.



DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. (2020). *Laboratory biosafety manual* (4th ed.). Geneva: World Health Organization.
2. U.S. Department of Health and Human Services. (2020). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (6th ed.). Centers for Disease Control and Prevention & National Institutes of Health.
3. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. (2019). *Medical Microbiology* (28th ed.). McGraw-Hill Education.
4. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia tentang Keselamatan dan Kesehatan Kerja di Laboratorium Kesehatan. (Nomor dan Tahun disesuaikan dengan peraturan terbaru yang berlaku).

BAB 2

KULTUR VIRUS

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu memahami prinsip kultur virus
2. Mahasiswa mampu melakukan Pra analitik, analitik dan pasca analitik pada kultur virus (T4 phage + E. Coli)/ Bakteriofage
3. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil pemeriksaan virus

PENDAHULUAN

Virus agen infeksi sangat kecil hanya dapat berkembang biak di dalam sel hidup, memiliki sistem metabolisme sendiri, sehingga tidak dapat tumbuh pada media nutrisi biasa. Oleh karena itu, untuk mempelajari virus, dibutuhkan teknik khusus yang disebut **kultur virus**, yaitu proses menumbuhkan dan memperbanyak virus dalam sistem inang hidup. Kultur virus memiliki peran penting dalam dunia virologi. Sistem kultur yang umum digunakan antara lain **kultur jaringan (sel)**, **telur ayam berembrio**, dan **hewan laboratorium**, tergantung pada jenis virus yang diteliti.

Fungsi Kultur Virus

1. **Isolasi dan Identifikasi Virus**, digunakan untuk memperbanyak virus agar dapat dikenali dan dianalisis lebih lanjut dalam diagnosa penyakit.
2. **Mengetahui Efek Sitopatik (Cytopathic Effect / CPE)**, mengamati perubahan morfologis pada sel inang yang terinfeksi virus, sebagai indikator aktivitas virus.
3. **Produksi Vaksin**, Banyak vaksin virus, seperti vaksin influenza dan polio, dibuat melalui proses kultur virus dalam sel atau telur ayam berembrio.
4. **Uji Efektivitas Obat Antivirus**, kultur virus memungkinkan pengujian berbagai senyawa antiviral terhadap virus secara langsung di laboratorium.
5. **Penelitian Biologi Molekuler Virus**, membantu memahami mekanisme replikasi, ekspresi gen, dan interaksi virus dengan inang.

Modul Praktikum Virologi

6. **Pendeteksian Mutasi dan Evolusi Virus**, Kultur membantu melacak perubahan genetik virus, yang penting untuk pengawasan varian baru.
7. **Rekayasa Genetika dan Vektor Virus**, Beberapa virus dikultur untuk digunakan sebagai vektor dalam terapi gen atau untuk ekspresi protein tertentu.
8. **Studi Patogenesis**, Kultur virus digunakan untuk memahami bagaimana virus menyebabkan penyakit dan menyerang organ atau sistem tertentu.

Ada tahapan yang perlu diperhatikan dalam melakukan kultur virus, seperti tahap:

- a. **Pra analitik**, mencakup semua tahapan awal sebelum proses kultur dilakukan di laboratorium. Tahapan ini sangat penting karena akan menentukan keberhasilan isolasi dan identifikasi virus. Kesalahan dalam tahap pra-analitik dapat menyebabkan hasil negatif palsu atau tidak akurat. **Tujuan Pra analitik** (a) Memastikan spesimen tetap dalam kondisi optimal (b) Menghindari degradasi virus atau kontaminasi dan (c) Memaksimalkan sensitivitas dan spesifisitas kultur virus.

Tahapan Pra-Analitik Kultur Virus meliputi

- a) **Pemilihan Jenis Spesimen**, Disesuaikan dengan dugaan penyakit dan tropisme virus. Contoh spesimen:
 - Nasofaring (influenza, RSV)
 - Darah (HIV, dengue)
 - Feses (rotavirus)
 - Lesi kulit (herpes simplex)
 - Cairan serebrospinal (enterovirus)
- b) **Teknik Pengambilan Spesimen**, Harus aseptik dan sesuai protokol untuk mencegah kontaminasi. menggunakan alat steril (swab, tabung, syringe) dan media transport yang sesuai.
- c) **Waktu Pengambilan Spesimen**, Idealnya diambil saat fase akut infeksi (ketika viral load tinggi). Misalnya: 1–3 hari setelah timbulnya gejala.
- d) **Media dan Wadah Transportasi Virus**, menggunakan **viral transport media (VTM)** yang mengandung penyangga, protein, dan antibiotik ringan. Wadah harus diberi label dengan jelas (nama, waktu, jenis spesimen).
- e) **Penyimpanan dan Pengiriman**, Spesimen harus disimpan dalam suhu 4°C (**lemari es**) jika akan diperiksa dalam waktu dekat. Untuk pengiriman jarak jauh, bisa dibekukan (-70°C), tergantung jenis virus. Hindari suhu ekstrem dan penundaan waktu pengiriman.
- f) **Pencatatan dan Dokumentasi** : Formulir pengantar harus lengkap: data pasien, waktu pengambilan, gejala klinis, dan jenis spesimen.

b. Metode Kultur Virus adalah ada 3 yakni

- a) Kultur Jaringan (Cell Culture), Metode paling sering digunakan dalam laboratorium modern. Jenis kultur bisa Primer: diambil langsung dari jaringan hewan (contoh: ginjal monyet), Diploid: dari jaringan manusia, bersifat stabil tapi terbatas (contoh: MRC-5, WI-38) dan Sel kontinu (immortal): bisa tumbuh terus-menerus (contoh: HeLa, Vero). Keunggulan: Relatif praktis dan mudah diamati. Dapat diamati efek sitopatik (Cytopathic Effect/CPE). Contoh virus: Influenza, herpes simplex, adenovirus, enterovirus.
- b) Kultur Telur Ayam Berembrio, Menggunakan telur ayam yang sudah dibuahi dan berusia 9–12 hari. Keunggulan: Biaya murah, produksi virus tinggi. Kelemahan: Perlu sterilisasi tinggi, tidak cocok untuk semua virus.
- c) Kultur Hewan Hidup (In Vivo), Digunakan terutama untuk virus yang sulit ditumbuhkan di sel atau telur. Contoh hewan: Mencit, kelinci, primata kecil. Tujuan: Studi patogenesis, produksi antibodi, dan uji vaksin. Contoh virus: Rabies, virus neurotropik. Kelemahan: Etis, mahal, dan teknis lebih kompleks.

Tabel 2.1 Perbandingan ketiga metode Kultur

Metode	Keunggulan	Kekurangan
Kultur Jaringan	Praktis, banyak digunakan, sensitif	Tidak cocok untuk semua virus
Telur Berembrio	Biaya murah, produksi tinggi	Tidak semua virus tumbuh di sini
Hewan Hidup	Studi patogenesis nyata	Etika, mahal, kompleks

Sel yang digunakan kultur virus, kelebihan dan kekurangannya yakni:

1. Embrio Ayam (Chicken Embryo)

• Kelebihan:

- a. Relatif murah dan mudah diperoleh.
- b. Memiliki banyak jenis membran (kantung amnion, alantois, membran korioalantois) yang cocok untuk berbagai jenis virus.
- c. Sering dipakai untuk produksi vaksin (misalnya influenza).

• Kekurangan:

- a. Tidak semua virus bisa tumbuh di embrio ayam.
- b. Membutuhkan keterampilan teknis (sterilisasi, inokulasi).
- c. Tidak mencerminkan kondisi sel manusia sepenuhnya.

Modul Praktikum Virologi

2. Hewan Laboratorium (in vivo)

- **Kelebihan:**
 - a. Beberapa virus hanya dapat tumbuh dalam hewan hidup (contoh: rabies, coxsackie).
 - b. Memberikan gambaran nyata interaksi virus dengan sistem imun.
- **Kekurangan:**
 - a. Etis mahal, memerlukan fasilitas hewan percobaan.
 - b. Tidak praktis untuk kultur rutin.
 - c. Variasi biologis tinggi.

3. Kultur Sel Primer (misalnya Primary Monkey Kidney Cells, fibroblas embrio manusia)

- **Kelebihan:**
 - a. Sangat mirip dengan kondisi alami tubuh karena berasal langsung dari jaringan.
 - b. Dapat mendukung replikasi berbagai virus.
- **Kekurangan:**
 - a. Umur hidup terbatas (tidak bisa dibagi terus menerus).
 - b. Mahal dan butuh jaringan segar.
 - c. Risiko kontaminasi lebih tinggi.

4. Kultur Sel Diploid (misalnya WI-38, MRC-5 fibroblas paru embrio manusia)

- **Kelebihan:**
 - a. Bisa dibagi dalam jumlah terbatas (~50 kali) → lebih stabil daripada sel primer.
 - b. Cocok untuk produksi vaksin (contoh: rubella, rabies).
- **Kekurangan:**
 - a. Tidak bisa dibagi tanpa batas.
 - b. Biaya lebih mahal dibandingkan sel imortal.

5. Kultur Sel Kontinu / Imortal (misalnya HeLa, Vero, HEp-2, BHK-21)

- **Kelebihan:**
 - a. Dapat tumbuh terus-menerus (tidak terbatas).
 - b. Mudah diperoleh, dipelihara, dan tahan lama.
 - c. Cocok untuk penelitian laboratorium dan produksi virus skala besar.
- **Kekurangan:**
 - a. Sering mengalami perubahan genetik (tidak selalu mencerminkan kondisi in vivo).
 - b. Beberapa virus tidak tumbuh baik pada sel kontinu tertentu.
 - c. Risiko tumorigenik (karena sifat imortal).

Modul Praktikum Virologi

c. **Prinsip Kultur Virus** adalah teknik dasar menumbuhkan dan memperbanyak virus dalam lingkungan laboratorium, karena virus bersifat **intraseluler obligat**, maka prinsip utamanya menyediakan **sel hidup yang sesuai** sebagai inang. Berikut adalah prinsip-prinsip utama dalam kultur virus:

- a) Keharusan Memakai Sel Hidup seperti : Sel hewan atau manusia, Telur ayam berembrio dan hewan laboratorium (misalnya tikus, kelinci).
- b) Pemilihan Sistem Kultur yang Sesuai, Jenis sel atau sistem kultur harus sesuai dengan **tropisme virus** (kemampuan virus menginfeksi jenis sel tertentu). Contoh: Virus influenza → telur ayam berembrio; Virus herpes → kultur sel manusia (misalnya Vero cell).
- c). Sterilitas dan Kondisi Optimal, lingkungan kultur harus memiliki suhu, pH, dan kadar CO₂ yang sesuai dan mengandung media nutrisi pendukung sel.
- d). Inokulasi Virus, tergantung jenis sistem:
 - Inokulasi ke kantung amnion/allantois (pada telur berembrio)
 - Adsorpsi virus ke sel dalam kultur (dalam cawan atau flask)
 - Injeksi pada hewan (misalnya intrakranial, intraperitoneal)
- e). Pemantauan Replikasi Virus, Setelah beberapa waktu, virus akan berkembang biak dan ditandai oleh: Efek sitopatik (CPE): perubahan morfologi sel, lisis, fusi sel dan replikasi virus, virus baru yang bisa dideteksi dengan metode: Mikroskop (CPE), Uji hemaglutinasi, T-PCR / PCR, Imunofluoresensi / ELISA
- f). Isolasi dan Identifikasi, setelah berhasil dikultur, virus bisa diisolasi dan diidentifikasi lebih lanjut, misalnya untuk: Diagnostik penyakit, Pembuatan vaksin dan Riset virologi

d. Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel

Tabel 2.2 Jenis spesimen tergantung jenis virus yang dicurigai dan lokasi infeksi

Jenis Virus	Jenis Spesimen
Virus pernapasan (influenza, RSV, adenovirus)	Swab nasofaring, aspirat nasofaring, sputum
Virus saluran cerna (rotavirus, enterovirus)	Feses, rektal swab
Virus darah (HIV, dengue, hepatitis B/C)	Darah (serum/plasma), buffy coat
Virus herpes (HSV, VZV)	Lesi kulit/ulkus (swab atau scraping)
Virus sistem saraf pusat (rabies, enterovirus)	Cairan serebrospinal (CSF), jaringan otak postmortem
Virus saluran kemih/alat kelamin (CMV, HPV)	Urin, swab serviks, swab uretra
Virus sistemik (campak, rubella)	Darah, swab tenggorokan, urine

Modul Praktikum Virologi

Syarat/Kriteria Spesimen untuk Kultur Virus

- a. Dikumpulkan pada Waktu yang Tepat, yakni secepat mungkin setelah timbul gejala, karena konsentrasi virus paling tinggi pada awal infeksi.
- b. Menggunakan Teknik Aseptik, hindari kontaminasi bakteri atau jamur.
- c. Volume Cukup untuk kultur dan uji lanjutan.
- d. Dimasukkan ke Media Transport Virus (VTM). Khusus untuk swab atau cairan tubuh, dimasukkan ke VTM yang mengandung antibiotik & antifungal untuk mempertahankan stabilitas virus. Media Transport yang layak untuk diidentifikasi adalah 1) **CDC Formulation VTM** (Direkomendasikan CDC (USA) untuk transportasi virus respiratori (influenza, RSV, SARS-CoV-2) dengan komponen : Hank's Balanced Salt Solution /HBSS + albumin + antibiotik + antimikotik. 2) **Commercial VTM**, Contoh: Copan Universal Transport Medium (UTM), HiViral Transport Kit, Hardy VTM, ini lebih Siap pakai, steril, stabil, lebih praktis dan terstandar. Sedangkan VTM yang tidak layak untuk identifikasi virus yakni : 1) VTM tanpa protein stabilizer, 2) VTM yang mengandung bahan toksik bagi virus, 3) VTM terkontaminasi bakteri/jamur, 4) VTM kadaluarsa atau disimpan tidak sesuai suhu, Jika disimpan $>8^{\circ}\text{C}$ terlalu lama, atau beku-cair berulang kali.
- e. Suhu Penyimpanan: $2-8^{\circ}\text{C}$ jika dikirim dalam waktu ≤ 48 jam, -70°C jika pengiriman >48 jam (misalnya untuk referal atau riset), Jangan dibekukan jika akan dikirim dalam waktu singkat, karena pembekuan bisa merusak virus tertentu
- f. Label dan Informasi Lengkap, Harus dilabeli dengan jelas: identitas pasien, waktu pengambilan, jenis spesimen, dan dugaan diagnosis.

Sumber kesalahan pemeriksaan

Sumber kesalahan yang umum terjadi selama proses pra-analitik, analitik, dan post-analitik. Kesalahan ini bisa memengaruhi jumlah plak, bentuk plak, atau bahkan kegagalan total kultur.

- a. Tahap Pra-Analitik (Sebelum Kultur) : Bakteri inang tidak dalam fase log, Kontaminasi media atau alat, Pengenceran fag salah menyebabkan terlalu banyak/sedikit plak.
- b. Tahap Analitik (Selama Kultur): Soft agar terlalu panas ($>50^{\circ}\text{C}$) dapat membunuh E.coli, Pencampuran tidak merata, Volume inokulasi tidak tepat, Inkubasi suhu/timing tidak sesuai.
- c. Tahap Post-Analitik (Setelah Kultur) : Salah hitung jumlah plak, Mengabaikan kontaminasi atau morfologi plak abnormal, Interpretasi yang salah

Modul Praktikum Virologi

Cara Mencegah Kesalahan:

- Gunakan *E. coli* dalam fase log (4–6 jam inkubasi). Yaitu 1) **Strain *E. coli* laboratorium non-patogen**, Contoh: *E. coli* **K-12** dan turunannya (DH5 α , JM109, HB101, BL21). 2) Strain *E. coli* khusus produksi protein/virologi Contoh: *E. coli* **C** sering dipakai untuk kultur T4 phage, *E. coli* **B** (termasuk BL21) digunakan untuk kultur T-even phages. 3) *E. coli* yang sesuai dengan fage tertentu seperti **Coliphage λ** biasanya tumbuh di *E. coli* **K-12**, **Coliphage T4, T2, T6 (T-even phages)** cocok di *E. coli* **B**, **Filamentous phage M13** inang utamanya *E. coli* **K-12 F+** (yang memiliki faktor F).
- Pastikan media, alat, dan larutan steril.
- Cek suhu soft agar sebelum digunakan (ideal: 45–50°C).
- Hitung plak hanya pada cawan dengan 30–300 plak (akurasi terbaik).
- Lakukan pengulangan minimal triplo (3 kali) untuk keandalan data.

Jaminan mutu pemeriksaan untuk memastikan hasil yang akurat, konsisten, dan dapat diandalkan.

Tabel 2. 6 Jaminan Mutu Pemeriksaan Kultur

Jaminan Mutu	Komponen	Standar Jaminan Mutu
Pra analitik	Bakteri inang (<i>E. coli</i>)	Harus dalam fase log (aktif membelah), bebas kontaminasi
	Media kultur	Steril, pH sesuai (sekitar 7.0), tidak kadaluarsa
	Larutan fag	Disimpan sesuai suhu (biasanya -20°C atau -80°C), tidak terdegradasi
	Peralatan	Steril, autoklaf bekerja optimal
	Label & dokumentasi	Semua tabung, cawan, dan suspensi harus diberi label jelas
Analitik	Suhu soft agar	Harus 45–50°C sebelum dicampur (agar tidak membunuh fag/bakteri)
	Proses adsorpsi fag-bakteri	Waktu inkubasi 10–15 menit agar fag menempel optimal
	Waktu & suhu inkubasi	18–24 jam pada suhu 37°C
	Volume inokulasi	Ditetapkan dan konsisten (biasanya 0.1 mL)
	Duplikasi	Setiap sampel sebaiknya diuji dalam triplo (3 kali)
Pasca analitik	Jumlah plak yang dihitung	Ideal: 30–300 plak per cawan (akurasi tinggi)
	Plak harus jelas dan terpisah	Tidak menyatu, tidak kabur
	Perhitungan PFU/mL	Menggunakan rumus yang benar dan dokumentasi pengenceran akurat

Modul Praktikum Virologi

	Cross-check hasil	Validasi oleh petugas kedua atau pengulangan sampel
	Pencatatan & pelaporan	Lengkap, mencakup suhu, tanggal, kode sampel, metode, dan hasil akhir
Jaminan Umum	SOP tertulis	Harus tersedia dan digunakan sebagai panduan kerja
	Pelatihan petugas	Semua analis harus dilatih dan kompeten
	Kontrol positif dan negatif	Digunakan untuk validasi kerja (fag aktif dan fag inaktif)
	Audit dan evaluasi rutin	Pemeriksaan ulang terhadap prosedur dan hasil
	Kalibrasi alat	Termasuk inkubator, pipet, autoklaf, dll. dilakukan berkala

Contoh Checklist Jaminan Mutu (Sederhana)

Tabel 2.7 Cek list jaminan mutu sederhana

Aspek	Cek \checkmark
Medium steril dan pH sesuai	
E. coli dalam fase log	
Soft agar bersuhu 45–50°C	
Volume inokulasi sesuai SOP	
Jumlah plak dalam rentang 30–300	
PFU/mL dihitung dan dicatat benar	

Pada Praktikum awal ini akan dilakukan kultur virus pada bakteri yang tidak berbahaya atau memiliki tingkat risiko rendah (biasanya termasuk dalam **Biosafety Level 1 atau 2**), sehingga aman digunakan untuk pembelajaran atau penelitian dasar.



PRAKTIKUM

Bacteriophage (Fag Bakteri)

Kultur virus pada bakteri yang tidak berbahaya atau memiliki tingkat risiko rendah yakni T4 dan *Escherichia coli* atau bakteriofage, Jenis: Virus yang menginfeksi bakteri, bukan manusia sehingga aman, sangat cocok untuk pembelajaran. Kultur virus (bakteriofag), *E. coli* yang dipakai biasanya adalah **strain laboratorium non-patogen seperti K-12, B, atau C**, sesuai dengan jenis fagenya. Misalnya: 1) T4 seperti *E. coli B atau C*, 2) λ seperti *E. coli K-12*, 3) M13 seperti *E. coli K-12 F*. **Metode kultur:** Dibiakkan menggunakan bakteri *E. coli* pada medium agar. Berikut adalah **cara kultur bakteriofag (bacteriophage)** yang umum dan aman dilakukan di laboratorium, terutama untuk fag yang menginfeksi *Escherichia coli* seperti **T4 phage**:

1. Pra analitik

CARA KULTUR BAKTERIOFAG (contoh: T4 phage + *E. coli*)

Tujuan: Untuk memperbanyak (mengkultur) bakteriofag dengan memanfaatkan bakteri inangnya (*E. coli*) sebagai media replikasi.

Alat dan Bahan

- Medium padat (NA/Nutrient Agar) atau LB agar
- Medium cair (NB/Nutrient Broth atau LB broth)
- Kultur *E. coli* aktif (fase log)
- Suspensi fag (misal: fag T4)
- Tabung reaksi/Erlenmeyer
- Cawan petri steril
- Pipet mikropipet dan tip
- Inkubator 37°C
- Air hangat 45–50°C untuk pelunakan agar
- Soft agar (agar lunak 0.7%)

2. Analitik Prinsipnya adalah

- **Adsorpsi:** faga melekat pada reseptor spesifik pada permukaan bakteri.
- **Penetrasi:** materi genetik faga disuntikkan ke dalam sitoplasma bakteri.
- **Replikasi:** genom faga mengarahkan mesin sel inang untuk membuat salinan genom faga dan protein struktural.
- **Perakitan:** komponen faga dirakit menjadi partikel faga lengkap.

Modul Praktikum Virologi

- **Lisis:** enzim faga merusak dinding sel sehingga partikel faga dilepaskan dan dapat menginfeksi sel lain.

1). Persiapan Kultur Bakteri Inang

- Inokulasi *E. coli* ke dalam media cair (NB/LB broth).
- Inkubasi 4–6 jam pada 37°C sampai masuk fase log (pertumbuhan aktif).

2). Infeksi Fag

- Campurkan: 0,1 mL suspensi fag, 0,1 mL kultur *E. coli* log phase
- Diamkan selama 10–15 menit (adsorpsi fag ke bakteri).

3). Campur dengan Soft Agar (nutrien broth atau tryptic soy broth dengan penambahan agar 0,4%-0,7%)

- Tambahkan campuran fag + bakteri ke 3 mL soft agar hangat (45–50°C).
- Segera tuang ke atas permukaan agar padat di cawan petri.
- Ratakan dan diamkan agar membeku.

4). Inkubasi

- Inkubasi cawan pada suhu 37°C selama 18–24 jam.

5.) Hasil yang Diamati

- Akan terbentuk **plak (plaque)**: daerah bening pada agar, menunjukkan tempat di mana fag telah menghancurkan sel *E. coli*.
- Satu plak = satu fag infeksi (PFU, plaque-forming unit).

2. Post analitik

2. Pelaporan hasil

a. Penghitungan kuantitatif

- Menghitung **konsentrasi fag (PFU/mL)** menggunakan rumus:
 - $\text{PFU/mL} = \text{Jumlah Plak} \times \text{Volume yang diinokulasikan} \times \text{Faktor pengenceran}$
- Contoh:** Jika: Jumlah plak = 120; Volume inokulasi = 0.1 mL; Faktor pengenceran = 10^6 , maka konsentrasi fag sebagai berikut:

$$\text{PFU / mL} = \frac{120}{0.1} \times 10^6 = 120 \times 10^9 \text{ PFU/mL}$$

b. Pengamatan Fisik

- **Plak (plaque)** muncul sebagai **zona bening** di atas agar padat (karena sel *E. coli* dihancurkan oleh fag).
- Plak dapat berbeda ukuran dan bentuk, tergantung jenis fag dan kondisi kultur

Tabel 2.4 Parameter Pengamatan Plak

Parameter	Hasil Pengamatan
Warna agar	Keruh, kecuali pada area plak
Jumlah plak	Misalnya: 120 plak
Ukuran plak	1–3 mm diameter
Bentuk plak	Bulat, batas tegas atau menyebar

Interpretasi hasil

Tabel 2. 5 Interpretasi hasil kultur virus T4

Aspek	Interpretasi
Banyak plak	Fag aktif dan berhasil menginfeksi <i>E. coli</i>
Tidak ada plak	Fag tidak aktif, atau <i>E. coli</i> tidak sesuai
Plak menyebar/tidak jelas	Infeksi tidak seragam, kemungkinan kontaminasi
Plak terlalu kecil	Replikasi fag lambat atau kondisi kultur kurang optimal

- Simpan hasil kultur fag dalam freezer (biasanya -20°C hingga -80°C).
- Lanjutkan dengan isolasi DNA fag jika diperlukan untuk analisis molekuler.
- Uji sensitivitas fag terhadap antibiotik atau disinfektan (jika untuk riset antimikroba).

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

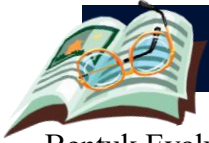
Kesimpulan :

Kota,20...

Pembimbing

Praktikan

() ()



EVALUASI

Bentuk Evaluasi :

A. Tugas

1. Buatlah gambar dan alur kultur T4 dan *Escherichia coli* secara sistematis!

B. Tes

Penilaian Kognitif

1) Skenario:

Laboratorium virologi akan melakukan kultur virus Influenza A. Untuk memastikan pertumbuhan virus yang optimal, sel inang harus disiapkan dengan media yang tepat. Media kultur yang akan digunakan adalah Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) dengan tambahan 2% Fetal Bovine Serum (FBS) dan antibiotik. Mahasiswa perlu melakukan serangkaian langkah untuk menyiapkan media ini sebelum sel diinokulasi.

Pertanyaan:

Sebelum digunakan untuk kultur, mengapa media MEM harus diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator CO₂ selama 24 jam?

Pilihan Jawaban:

- A. Untuk menumbuhkan bakteri kontaminan agar dapat dideteksi.
- B. Untuk memastikan pH media stabil.
- C. Untuk mengaktifkan komponen serum (FBS).
- D. Untuk menguapkan sisa-sisa antibiotik.
- E. Untuk menginduksi pembentukan plak.

Jawaban: A

2) Skenario:

Sebuah laboratorium virologi menerima spesimen dari pasien yang dicurigai terinfeksi Human Papillomavirus (HPV). Mahasiswa analis ditugaskan untuk mengisolasi virus tersebut menggunakan kultur sel. Ia harus memilih lini sel yang paling sesuai untuk tujuan ini.

Pertanyaan:

Manakah pernyataan yang paling tepat mengenai kesulitan isolasi HPV menggunakan metode kultur sel?

Pilihan Jawaban:

- A. HPV dapat tumbuh dengan baik pada lini sel HeLa karena HeLa berasal dari sel serviks manusia.
- B. HPV adalah virus yang bereplikasi dengan lambat, sehingga membutuhkan waktu inkubasi yang sangat panjang.
- C. Isolasi HPV tidak dimungkinkan pada kultur sel karena virus ini membutuhkan sel epitel yang berdiferensiasi penuh untuk bereplikasi.
- D. Lini sel tidak dapat digunakan untuk mengisolasi HPV karena virus ini hanya menginfeksi sel pada organ tertentu, bukan sel yang dikultur.
- E. HPV dapat menginduksi efek sitopatik yang tidak khas, sehingga sulit dideteksi.

Jawaban: C

Penilaian Psikomotor

- Mahasiswa mengisi cek list persiapan kultur hingga memastikan penjaminan mutu hasil pemeriksaan atau pembuatan kultur!
- Mahasiswa membuat kultur T4 dengan pendampingan dari instruktur!.

Penilaian Afektif

- Penilaian observasi terhadap sikap mahasiswa selama praktikum, meliputi: ketelitian, kepatuhan terhadap instruksi, kesadaran akan potensi bahaya, dan kerja sama tim

E. Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

- Penilaian Kognitif (Pengetahuan - Bobot 30%):
- Penilaian Psikomotor (Keterampilan - Bobot 50%):
- Penilaian Afektif (Sikap - Bobot 20%):



RINGKASAN

Kultur virus adalah proses menumbuhkan virus di dalam sistem hidup (seperti sel, jaringan, atau hewan) untuk tujuan penelitian, diagnosis, atau produksi vaksin. Karena virus tidak dapat hidup dan berkembang biak sendiri (bersifat obligat intraseluler), mereka memerlukan sel inang untuk berkembang. Tujuan Kultur Virus: Mendeteksi dan mengidentifikasi jenis virus. Meneliti karakteristik virus. Menguji efektivitas antivirus atau vaksin. Produksi vaksin dalam jumlah besar. Metode Kultur Virus: **Kultur jaringan (cell culture)**, **Kultur embrio ayam (embryonated egg)**, **Kultur hewan hidup (animal inoculation)**. Syarat dan Faktor Penting untuk keberhasilan kultur Spesimen harus segar dan ditangani secara aseptik. Suhu dan pH harus sesuai. Kebersihan dan kondisi sterilisasi harus terjaga.

DAFTAR PUSTAKA



1. Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., & Skalka, A. M. (2020). *Principles of Virology* (5th ed.). ASM Press.
2. Freshney, R. I. (2016). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
3. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. (2019). *Medical Microbiology* (28th ed.). McGraw-Hill Education.
4. Mahy, B. W. J., & Van Regenmortel, M. H. V. (Eds.). (2009). *Desk Encyclopedia of General Virology*. Academic Press.
5. Zuckerman, A. J., Banatvala, J. E., & Schoub, B. D. (2016). *Principles and Practice of Clinical Virology* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
6. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 28th Edition, 2019 – McGraw-Hill Education.
7. Murray, P.R. et al. (2020). *Medical Microbiology*, 9th Edition. Elsevier. Pelczar, M.J. et al. (2001). *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Jilid 2. UI Press.
8. WHO Laboratory Manual for the Diagnosis of Viral Infections (WHO, 2020).
9. Madigan, M.T., Bender, K.S., et al. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Edition. Pearson.

Modul Praktikum Virologi

10. WHO (World Health Organization). (2020). *Guidelines for the collection of clinical specimens for laboratory testing of viral infections*. <https://www.who.int>
11. Manual Teknik Virologi Klinik, Kemenkes RI, Balitbangkes, 2017.

BAB 3

UJI NETRALISASI INFLUENZA

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu memahami pemeriksaan uji netralisasi (influenza)
2. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan uji netralisasi efek sitopatik (influenza)
3. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan uji hemaglutinasi inhibisi (influenza)

PENDAHULUAN

Penyakit flu atau yang terkadang disebut sebagai penyakit influenza, merupakan sebuah penyakit yang menyerang sistem pernapasan dan sangat mudah menular, diakibatkan oleh virus influenza yang menginfeksi saluran pernapasan bagian atas (Wahyudi, dkk., 2021), yang menyerang manusia tanpa mengenal umur, jenis kelamin, dll. Umumnya penyakit flu bisa sembuh dengan sendirinya dengan masa inkubasi rata-rata selama 2-4 hari (BPPSDM Kemenkes RI, 2018). Virus influenza dapat menular dari penderita flu yang bersin atau mengi sehingga mengeluarkan droplet melalui udara, virus influenza juga dapat ditularkan melalui kontak langsung dengan penderita atau kontak dengan permukaan yang sudah terkontaminasi virus (Ravelliani dan Dalman, 2022).

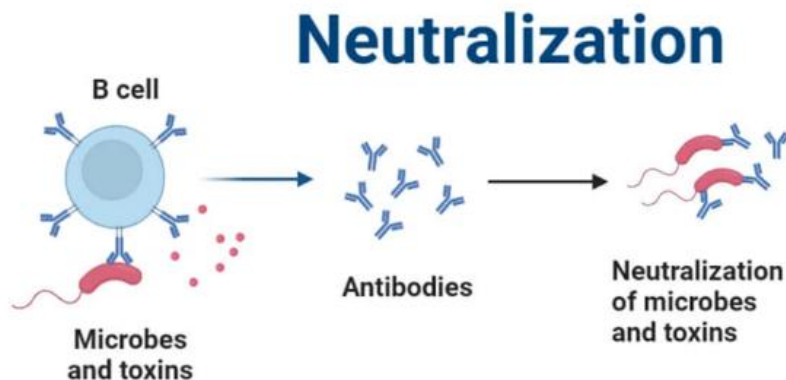
Penyakit influenza yang disebabkan oleh virus RNA famili *orthomyxoviridae*, Orthomyxovirus mempunyai selubung dengan partikel berbentuk bulat atau berfilamen, berukuran 80-120 nm, mengandung genom single stranded RNA dan menunjukkan gambaran simetri helikal. Pada permukaan virus terdapat tonjolan yang mempunyai hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Nukleokapsid helikal berukuran antara 9-15nm dengan RNA plus protein N, sebanyak 8 segmen dengan polimerase terdiri dari 3 jenis protein. Membran lipid terdiri dari 2 lapis. Pematangan virus terjadi pada membran sel dengan cara budding. Semua jenis *Orthomyxovirus* merupakan virus penyebab influenza yang dapat menyerang hewan maupun manusia (BPPSDM Kemenkes RI, 2018).

Modul Praktikum Virologi

Ada tiga tipe virus influenza yakni virus influenza tipe A dari spesies A yang mampu menginfeksi manusia, mamalia, dan burung; virus influenza tipe B hanya ada satu spesies influenza B yang hanya menginfeksi manusia karena hal ini laju mutasi lebih lambat pada influenza tipe B, saat ini yang diketahui hanya tipe B/Yazagata/16/88 dan B/Victoria/2/87 yang telah teridentifikasi. Pada influenza tipe C dengan spesies C dapat menginfeksi manusia dan babi. Berbeda dengan tipe A dan B, influenza tipe C relatif jarang terjadi (Uyaki, et al, 2022). Diagnosis infeksi virus dapat ditegakkan secara serologis melalui adanya peningkatan titer antibodi terhadap virus atau antibodi antivirus kelas IgM. Metode yang digunakan mencakup uji netralisasi (Nt), uji CF uji inhibisi hemaglutinasi (HI), dan uji IF, hemaglutinasi pasif serta imunodifusi (BPPSDM Kemenkes RI, 2018).

Uji netralisasi

Netralisasi adalah merupakan reaksi Ag-Ab yang berperan dalam menghambat efek dari antigen virus atau virus. Pada saat virus menginvasi sel, maka terdapat mekanisme pertahanan tubuh, salah satunya adalah produksi antibodi yang berperan dalam netralisasi, yang disebut juga antibodi netralisasi, yang mempunyai peran khusus untuk menghambat/memblokir virus melakukan pelekatan pada sel target (Forthal, 2014). Prinsip dasar uji netralisasi virus, didasarkan bahwa virus dapat kultur/tumbuhkan melalui inokulasi telur, inokulasi hewan, dan kultur sel, jika terdapat antibodi yang spesifik terhadap virus tersebut yang diinokulasikan pada media, maka pertumbuhan dan replikasi virus dapat dihentikan (Mahy and Kangro, 1996).

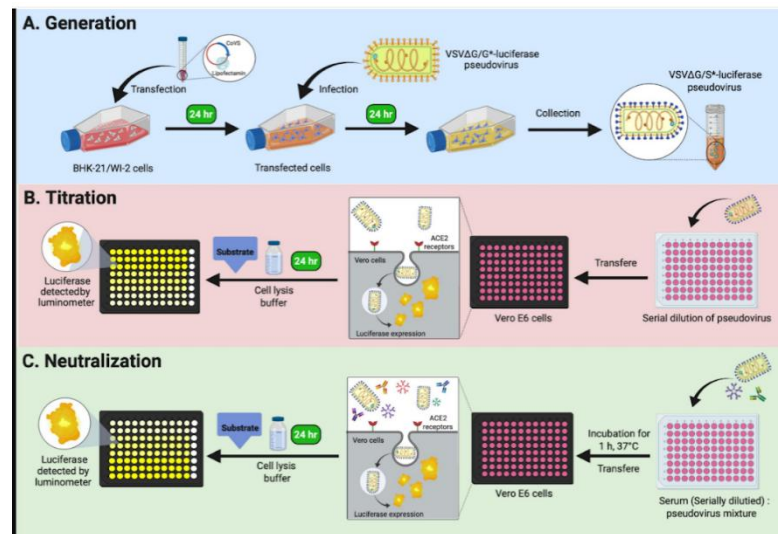


Gambar 3. 1. Antibodi netralisasi (Aryal, 2022).

Terdapat dua uji jenis netralisasi, yaitu: (1) uji netralisasi efek sitopatik; (2) dan uji hemaglutinasi inhibisi. Efek sitopatik (*Cytopathic Effect/CPE*) adalah perubahan yang terjadi pada struktur sel inang/target yang diserang virus. Hal ini dapat mengakibatkan perubahan morfologi dan bahkan kematian pada sel inang/target. Hemaglutinasi inhibisi merupakan suatu proses penggumpalan atau agregasi eritrosit oleh virus. Uji didasarkan pada metode untuk pencegahan pembentukan gumpalan eritrosit. Hemaglutinasi inhibisi dapat digunakan

Modul Praktikum Virologi

untu mengetahui adanya antibodi spesifik terhadap virus dalam sampel serum (Sun., Huang., Xiang., and Nie, 2024; Zukerman., Banatvala., Schoub., Griffiths., and Mortimer, 2009).



Gambar 3.2. Uji netralisasi (Almahboub., et al, 2020)

a. Uji efek sitopatik (*Cytopathic Effect/CPE*)

Uji netralisasi influenza, seperti uji mikroneutralisasi (MN), mengukur kemampuan antibodi dalam serum untuk menetralkan daya infeksi virus influenza. Uji ini biasanya melibatkan inkubasi pengenceran serum secara serial dengan jumlah virus yang diketahui, kemudian menambahkan campuran tersebut ke sel yang rentan (seperti: *Madin-Darby Canine Kidney cells*/sel MDCK), setelah waktu inkubasi, tingkat infeksi virus dinilai, sering kali dengan mencari efek sitopatik (*Cytopathic Effect/CPE*) atau untuk menentukan pengenceran serum yang menghambat infeksi virus dengan persentase tertentu (misalnya, 50% atau 80%) (Cuevas., Kawabata., Krammer., and Carreno, 2022).

1. Persyaratan

Sampel serum, Suspensi virus yang diketahui, Kultur sel yang sesuai untuk virus, Larutan pengencer.

2. Prosedur (Keiser., Anantpadma., Staples., Carrion., and Davey, 2021)

- Disiapkan sel MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) dalam media kultur yang sesuai.
- Disiapkan stok virus influenza dan tentukan titernya (misalnya, menggunakan uji TCID50).
- Dilakukan pengenceran berseri dari serum/sampel yang akan dilakukan uji (misalnya, pengenceran 1/2 kali lipat atau 1/4 kali lipat, dan seterusnya).

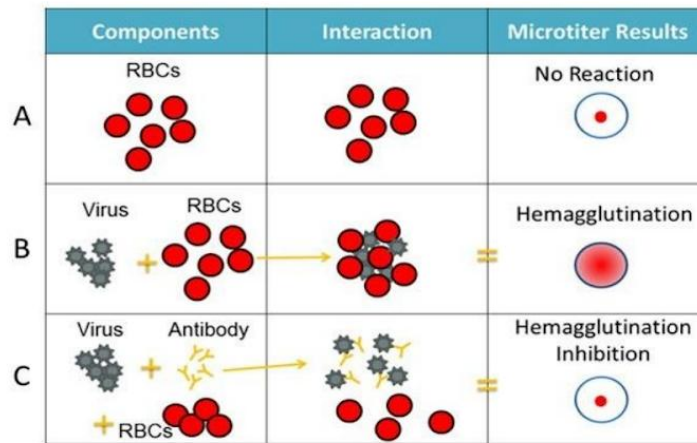
- Dilakukan inkubasi Virus-Serum:
dicaampurkan serum yang telah diencerkan dengan jumlah virus yang telah ditentukan sebelumnya (misalnya, 100-200 TCID₅₀) dalam micro plate 96.
- Dilakukan inkubasi campuran tersebut pada suhu 37°C selama waktu 60 menit (agar antibodi dapat mengikat dan menetralkan virus).
- Ditambahkan campuran virus-serum ke sel MDCK yang telah disiapkan dalam pelat 96 sumur.
- Dilakukan inkubasi sel dengan campuran virus selama 48-72 jam) pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂.
- Diamati sel untuk mencari tanda-tanda infeksi virus (*Cytopathic Effect/CPE*), seperti pembulatan sel, pelepasan, atau lisis.
- Dilakukan kontrol juga disiapkan untuk membandingkan hasilnya.

3. Interpretasi hasil (Cuevas., Kawabata., Krammer., and Carreno, 2022).

Tentukan titer netralisasi, yang merupakan kebalikan dari pengenceran serum tertinggi yang menghambat infeksi dengan persentase tertentu (misalnya, 50% atau 80%). Pada serum yang terdapat mengandung antibodi netralisasi, maka komponen virus akan dinetralkan olehnya dan efek sitopatik tidak akan terlihat setelah pengujian. Ini akan dianggap sebagai hasil positif. Terjadinya efek sitopatik akan menunjukkan hasil negatif.

b. Uji hemaglutinasi inhibisi

Uji hemaglutinasi inhibisi (HI) merupakan prosedur laboratorium klasik untuk klasifikasi atau subtipe virus yang mengalami hemaglutinasi. Untuk virus influenza, uji HI digunakan untuk mengidentifikasi subtipe hemaglutinin (HA) dari isolat yang tidak diketahui atau spesifisitas subtipe HA dari antibodi terhadap virus influenza. Dasar pengujian HI adalah bahwa antibodi terhadap virus tertentu akan mencegah perlekatan virus ke sel darah merah. Oleh karena itu, hemaglutinasi dihambat jika terdapat antibodi (Pedersen, 2014).



Gambar 3.3. Uji hemaglutinasi dan hemaglutinasi inhibisi (Sano and Ogawa, 2014)

Sumber Kesalahan Pemeriksaan

Prosedur uji netralisasi virus (Virus Neutralization Test - VNT) adalah metode yang kompleks dan sensitif, sehingga rentan terhadap berbagai kesalahan. Kesalahan ini dapat terjadi pada setiap tahap pemeriksaan, yaitu pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik.

- **Pra-Analitik:**

- **Kualitas Sampel:** Sampel serum pasien hemolisis atau terkontaminasi bakteri dapat mengganggu reaksi antigen-antibodi.
- **Penyimpanan Sampel:** Sampel yang tidak disimpan pada suhu yang tepat (4°C untuk jangka pendek, -20°C atau lebih rendah untuk jangka panjang) dapat menyebabkan degradasi antibodi.
- **Pelabelan Sampel:** Kesalahan pada identifikasi atau pelabelan sampel dapat menyebabkan hasil yang salah.

- **Analitik:**

- **Kontaminasi:** Kontaminasi silang antar spesimen atau kontaminasi mikrobial pada kultur sel dapat memalsukan hasil.
- **Kesalahan Pengenceran:** Pengenceran virus atau serum yang tidak akurat dapat menghasilkan titer yang tidak valid. Penggunaan pipet yang tidak terkalibrasi atau teknik pipet yang tidak tepat menjadi sumber utama kesalahan ini.
- **Kondisi Inkubasi:** Suhu dan konsentrasi CO₂ yang tidak stabil di dalam inkubator dapat memengaruhi viabilitas sel dan replikasi virus.

Modul Praktikum Virologi

- **Virus Challenge:** Dosis virus yang tidak sesuai (misalnya, terlalu banyak atau terlalu sedikit) dapat memengaruhi sensitivitas uji.
- **Pembacaan Hasil:** Subjektivitas dalam menginterpretasi efek sitopatik (CPE) atau hemaglutinasi dapat menyebabkan kesalahan pembacaan, terutama jika CPE tidak jelas.
- **Pasca-Analitik:**
 - **Kesalahan Perhitungan:** Kesalahan dalam perhitungan titer virus atau titer antibodi.
 - **Kesalahan Transkripsi:** Salah menulis hasil atau data dari *raw data* ke dalam laporan akhir.

Pemecahan Masalah (Troubleshooting)

Identifikasi masalah pada tahap awal sangat penting untuk memastikan hasil yang valid.

- **Jika ditemukan Kontaminasi Bakteri/Jamur pada Kultur Sel:**
 - **Solusi:** Buang seluruh cawan kultur yang terkontaminasi. Bersihkan dan sterilkan inkubator secara menyeluruh. Siapkan media kultur baru dan ulangi prosedur dengan teknik aseptik yang lebih ketat.
- **Jika Hasil Kontrol Positif Negatif atau Kontrol Negatif Positif:**
 - **Solusi:**
 - Periksa masa kedaluwarsa reagen virus, serum kontrol, dan media kultur.
 - Verifikasi pengenceran virus dan serum. Ulangi prosedur pengenceran dengan hati-hati.
 - Periksa kondisi inkubator (suhu dan CO₂).
- **Jika Terjadi Hemolisis atau Kekeruhan pada Sampel Pasien:**
 - **Solusi:** Minta sampel baru dari pasien dengan prosedur pengambilan darah yang benar. Jika sampel baru tidak dapat diperoleh, catat kondisi sampel yang tidak ideal dalam laporan dan pertimbangkan untuk menggunakan metode pemeriksaan lain yang tidak dipengaruhi oleh hemolisis.

Modul Praktikum Virologi

- **Jika Pembacaan Hasil Tidak Jelas (Weak CPE atau Weak Hemagglutination):**

- **Solusi:** Lakukan pembacaan oleh dua analis yang berbeda untuk membandingkan hasil. Jika hasilnya masih ambigu, ulangi uji dengan sampel yang diencerkan ulang atau gunakan kontrol internal yang lebih ketat untuk validasi.

Jaminan Mutu Pemeriksaan (Quality Assurance)

Penerapan sistem jaminan mutu yang ketat adalah kunci untuk menghasilkan data yang akurat dan dapat dipercaya.

1. Kontrol Kualitas Internal (Internal Quality Control - IQC):

- **Kontrol Virus:** Setiap pengujian harus menyertakan **kontrol virus** dengan dosis yang sudah diketahui untuk memastikan virus yang digunakan viabel dan mampu menginfeksi sel.
- **Kontrol Sel:** Gunakan **kontrol sel tanpa virus** untuk memverifikasi bahwa sel inang tetap sehat dan tidak menunjukkan efek sitopatik (CPE) secara spontan.
- **Kontrol Serum:** Gunakan **serum kontrol positif** dan **kontrol negatif** yang sudah diketahui titernya. Hasil uji harus konsisten dengan titer yang diharapkan. Ini penting untuk memvalidasi performa reagen dan prosedur.

2. Kontrol Kualitas Eksternal (External Quality Control - EQC):

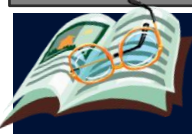
- Berpartisipasi dalam program EQC yang diselenggarakan oleh lembaga independen. Laboratorium akan menerima sampel "buta" yang hasilnya akan dibandingkan dengan hasil laboratorium lain.

3. Standarisasi Prosedur:

- Semua langkah uji harus didokumentasikan dalam **SOP (Standar Operasional Prosedur)** yang jelas. Setiap analis harus mengikuti SOP ini secara konsisten.
- Gunakan alat dan reagen yang sudah terkalibrasi dan divalidasi.

4. Pelatihan dan Kompetensi Staf:

- Staf laboratorium harus mendapatkan pelatihan rutin dan diuji kompetensinya untuk memastikan mereka memiliki keterampilan dan pengetahuan yang diperlukan dalam melakukan uji netralisasi dengan benar.



1. Pra-Analitik

1.1 Tujuan Pemeriksaan Tujuan utama dari Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) adalah untuk mendeteksi dan mengukur titer antibodi spesifik dalam serum pasien yang mampu menetralkan hemaglutinin virus Influenza. Tujuan lainnya adalah:

- Mendukung diagnosis infeksi virus Influenza akut.
- Menentukan tingkat kekebalan (imunitas) individu terhadap virus tertentu.
- Melakukan survei epidemiologi untuk mengetahui penyebaran virus.

1.2 Metode dan Prinsip Pemeriksaan

- **Metode:** Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI).
- **Prinsip:** Uji ini didasarkan pada kemampuan antibodi spesifik dalam serum untuk menghambat (menginhibisi) kemampuan virus Influenza dalam menggumpalkan (hemaglutinasi) sel darah merah. Jika serum mengandung antibodi yang cukup, virus akan terikat pada antibodi tersebut dan tidak dapat menempel pada sel darah merah. Akibatnya, sel darah merah akan mengendap di dasar sumur (*well*), yang menunjukkan hasil **positif inhibisi**. Sebaliknya, jika serum tidak mengandung antibodi yang cukup, virus akan menggumpalkan sel darah merah, membentuk lapisan homogen di dasar sumur, yang menunjukkan hasil **negatif inhibisi**.

1.3 Jenis Spesimen

- Serum: Spesimen yang paling umum digunakan untuk uji HI.

1.4 Alat dan Bahan

- **Alat:**
 - Mikropipet terkalibrasi (25µl dan 50µl).
 - Tip mikropipet sekali pakai.
 - Mikropelat dengan dasar berbentuk "U" (96-sumur).
 - Inkubator suhu kamar.

Modul Praktikum Virologi

- Mikroskop (opsional, untuk konfirmasi pembacaan).

- **Bahan:**

- Sampel serum pasien.
- Suspensi virus Influenza standar (4 Unit HA).
- Suspensi sel darah merah 1% (dari ayam, angsa, atau marmut).
- Larutan pengencer, seperti *Phosphate Buffered Saline* (PBS) atau larutan pengencer lainnya.

1.5 Prosedur Pengambilan, Pelabelan, Transport, dan Pengolahan Spesimen

- **Pengambilan Spesimen:** Ambil spesimen darah vena sekitar 3-5 mL ke dalam tabung tanpa antikoagulan (tutup merah).
- **Pelabelan:** Beri label pada tabung segera setelah pengambilan. Label harus berisi nama pasien, tanggal pengambilan, dan nomor identifikasi unik.
- **Transport:** Transportasikan spesimen ke laboratorium dalam kondisi dingin (2–8°C) dalam kotak pendingin untuk mencegah degradasi.
- **Pengolahan:**
 1. Biarkan darah membeku pada suhu kamar selama 30-60 menit.
 2. Sentrifugasi tabung pada 3.000 rpm selama 10 menit.
 3. Pindahkan serum (lapisan atas yang jernih) ke dalam tabung steril baru.
- **Penyimpanan:**
 - Untuk pemeriksaan segera, simpan serum pada suhu 2–8°C.
 - Untuk penyimpanan jangka panjang, simpan pada suhu –20°C atau lebih rendah untuk menjaga stabilitas antibodi.

2. Analitik

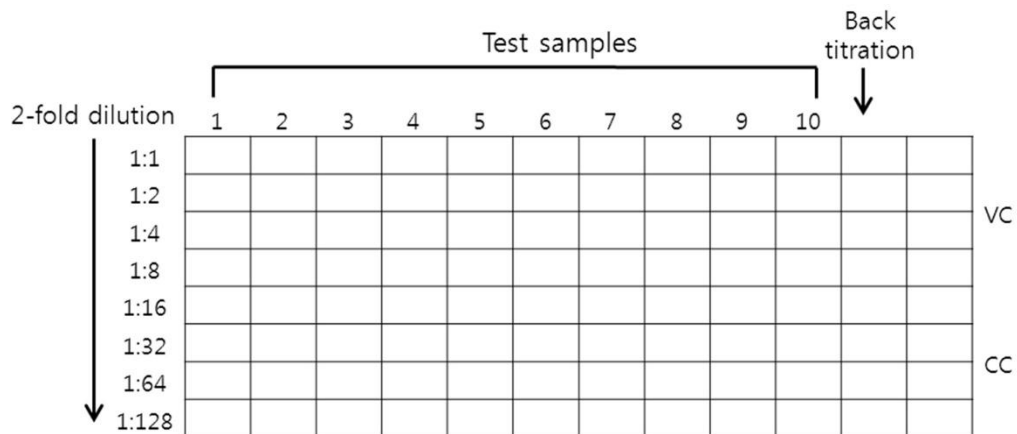
2.1 Prosedur Pemeriksaan (Wu., Cho., Shore., and Song, 2016):

1. Ditambahkan 25µl larutan pengencer pada mikropelat dengan dasar "U", sebanyak 12 sumur.
2. Ditambahkan 25µl serum pada sumur No. 1 dan No. 2, dan dihomogenkan.

Modul Praktikum Virologi

3. Dilakukan pengenceran berseri (*serial dilution*) dari sumur No. 2 sampai dengan sumur No. 10.
4. Ditambahkan 25µl suspensi virus 4 unit HA pada sumur No. 1 sampai dengan sumur No. 11.
5. Ditambahkan 25µl larutan pengencer pada sumur No. 12.
6. Dilakukan homogenisasi (menggoyangkan mikropelat) selama 1 menit.
7. Dilakukan inkubasi selama 30 menit, dengan suhu kamar.
8. Ditambahkan 50µl suspensi sel darah merah 1% pada sumur No. 1 sampai dengan sumur No. 12.
9. Dilakukan homogenisasi (menggoyangkan mikropelat) selama 1 menit.
10. Dilakukan inkubasi selama 30 menit, dengan suhu kamar.
11. Dilakukan pembacaan pada mikropelat, untuk mengamati ada atau tidaknya reaksi aglutinasi sel darah merah.

Untuk pelaksanaan praktikum dapat dilakukan sesuai dengan gambar dibawah ini:



2.2 Nilai Normal dan Nilai Kritis Uji HI tidak memiliki nilai normal dalam pengertian klinis biasa. Hasilnya adalah **titer antibodi**.

- **Nilai Titer:** Merupakan kebalikan dari pengenceran serum tertinggi yang masih menunjukkan inhibisi hemaglutinasi secara penuh.

- **Interpretasi:**

- **Titer rendah ($\leq 1:20$):** Umumnya tidak dianggap protektif, meskipun dapat menunjukkan infeksi lampau.
- **Titer positif ($\geq 1:40$):** Mengindikasikan kemungkinan kekebalan (imunitas) atau infeksi saat ini.
- **Nilai Kritis:** Kenaikan titer **empat kali lipat atau lebih** antara sampel serum akut (diambil saat gejala muncul) dan sampel serum konvalesen (diambil 14-21 hari setelahnya) adalah tanda pasti dari infeksi baru.

2.3 Kontrol Kualitas (QC) Untuk memastikan validitas hasil, kontrol berikut harus disertakan dalam setiap pengujian:

- **Kontrol Serum:**

- **Serum Kontrol Positif:** Serum dengan titer yang sudah diketahui.
- **Serum Kontrol Negatif:** Serum tanpa antibodi Influenza.

- **Kontrol Virus:**

- Hanya berisi virus dan larutan pengencer. Tujuannya adalah untuk memastikan virus memiliki aktivitas hemaglutinasi yang memadai (4 Unit HA).

- **Kontrol Sel Darah Merah:**

- Hanya berisi sel darah merah dan larutan pengencer. Tujuannya adalah untuk memastikan sel darah merah tidak mengalami aglutinasi spontan (auto-aglutinasi).

2.4 Perhitungan Titer HI adalah kebalikan dari pengenceran serum tertinggi yang menunjukkan inhibisi hemaglutinasi secara penuh.

- **Contoh:**

- Jika sumur terakhir yang menunjukkan endapan eritrosit (positif inhibisi) adalah sumur No. 8, dengan pengenceran 1:256, maka **Titer HI** adalah **256**.
- Jika sumur terakhir yang menunjukkan endapan adalah sumur No. 5, dengan pengenceran 1:32, maka **Titer HI** adalah **32**.

3. Pasca-Analitik

3.1 Sumber Kesalahan Pemeriksaan dan Penanganan

- **Kesalahan Pengenceran:** Dapat terjadi karena pipet tidak terkalibrasi, gelembung udara di dalam tip, atau kesalahan teknik.
 - **Penanganan:** Pastikan pipet terkalibrasi dengan baik dan lakukan pengenceran dengan sangat teliti.
- **Kontaminasi Sel Darah Merah:** Terkadang, sel darah merah dapat aglutinasi secara spontan.
 - **Penanganan:** Periksa kontrol sel darah merah. Jika aglutinasi terjadi, ganti suspensi sel darah merah dengan yang baru.
- **Pembacaan Subjektif:** Terutama pada sumur dengan aglutinasi parsial, pembacaan bisa menjadi ambigu.
 - **Penanganan:** Ulangi uji untuk hasil yang meragukan. Pertimbangkan untuk membandingkan pembacaan dengan analisis lain.

3.2 Pelaporan dan Jaminan Mutu Pemeriksaan

- **Pelaporan Hasil:** Laporan harus mencakup:
 - Identitas pasien.
 - Tanggal pemeriksaan.
 - Metode pemeriksaan (Uji HI).
 - Hasil Titer HI.
 - Interpretasi hasil (e.g., "Titer 1:128, mengindikasikan kemungkinan kekebalan terhadap virus Influenza").
- **Jaminan Mutu:**
 - **IQC:** Melakukan kontrol kualitas internal secara rutin dengan menggunakan kontrol positif dan negatif.
 - **EQC:** Berpartisipasi dalam program kontrol kualitas eksternal untuk memverifikasi akurasi hasil laboratorium.
 - **SOP:** Menerapkan Standar Operasional Prosedur yang jelas dan dipatuhi oleh semua analis.

Modul Praktikum Virologi

E. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Modul Praktikum Virologi

Hasil	:	
Interpretasi	:	
Kesimpulan	:	

.....,

20...

Pembimbing

Praktikan

() ()



EVALUASI

Bentuk Evaluasi :

1. Tugas

Tugas Praktikum: Anda diberi mikropelat uji Netralisasi Influenza yang telah diinkubasi. Pada mikropelat tersebut, Anda mengamati bahwa semua sumur (wells) dari serum pasien hingga kontrol virus tidak menunjukkan efek sitopatik (CPE), kecuali pada sumur kontrol sel yang terlihat sehat.

Instruksi:

1. Buatlah diagram alir (*flowchart*) yang menjelaskan setiap langkah prosedur uji netralisasi, mulai dari penyiapan spesimen hingga pembacaan hasil.
2. Berdasarkan pengamatan di atas, identifikasi dua kemungkinan terbesar penyebab kegagalan pada seluruh mikropelat.
3. Jelaskan langkah-langkah pemecahan masalah (*troubleshooting*) yang harus Anda lakukan untuk setiap penyebab yang Anda identifikasi.

2. Tes

1) Skenario:

Seorang mahasiswa melakukan uji netralisasi virus Influenza terhadap serum pasien. Setelah prosedur dan inkubasi, ia mengamati mikropelat di bawah mikroskop. Pada sumur-sumur dengan pengenceran serum hingga 1:64, sel terlihat sehat dan tidak ada efek sitopatik. Namun, pada pengenceran 1:128 dan seterusnya, ia melihat adanya efek sitopatik (CPE). Sumur kontrol virus menunjukkan CPE yang jelas, dan sumur kontrol sel terlihat sehat.

Pertanyaan:

Berapakah titer netralisasi virus (titer antibodi) pada serum pasien ini?

Pilihan Jawaban:

- A. 1:16
- B. 1:32
- C. 1:64
- D. 1:128
- E. 1:256

Kunci Jawaban: C.

2) **Skenario:**

Seorang analis melakukan uji netralisasi virus Influenza pada beberapa sampel serum pasien. Setelah inkubasi, ia membaca hasil dan menemukan bahwa sumur kontrol serum positif tidak menunjukkan netralisasi (terdapat CPE), padahal seharusnya sumur ini menunjukkan hasil netralisasi yang kuat. Sumur kontrol virus dan kontrol sel menunjukkan hasil yang sesuai dengan yang diharapkan.

Pertanyaan:

Berdasarkan pengamatan di atas, manakah sumber kesalahan yang paling mungkin terjadi?

Pilihan Jawaban:

- A. Virus yang digunakan sudah tidak viabel (rusak).
- B. Sel yang digunakan tidak sensitif terhadap virus.
- C. Terjadi kesalahan pada pengenceran virus.
- D. Serum kontrol positif sudah mengalami degradasi.
- E. Kontaminasi bakteri pada semua sumur.

Kunci Jawaban: D. Serum kontrol positif sudah mengalami degradasi.

3) **Skenario:**

Dalam uji netralisasi virus Influenza, prosedur mencakup penambahan virus ke dalam mikropelat yang telah berisi pengenceran serum pasien, diikuti dengan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.

Pertanyaan:

Apa tujuan utama dari tahapan inkubasi 30 menit setelah penambahan virus ke dalam serum?

Pilihan Jawaban:

- A. Untuk memberi waktu virus menginfeksi sel.
- B. Untuk mengaktifkan virus agar siap menempel.
- C. Untuk memberi waktu antibodi pasien berikatan dengan virus.
- D. Untuk menyeimbangkan pH media.
- E. Untuk mengendapkan virus yang tidak aktif.

Kunci Jawaban: C. Untuk memberi waktu antibodi pasien berikatan dengan virus.

Modul Praktikum Virologi

3. Bobot Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

Penilaian akan dilakukan berdasarkan bobot berikut untuk mengukur kompetensi mahasiswa secara menyeluruh.

Aspek Penilaian	Bobot (%)	Kriteria Penilaian
Kognitif	30%	Pemahaman teori dasar, prinsip uji, dan kemampuan menganalisis hasil (diukur melalui tes dan analisis tugas).
Psikomotor	50%	Keterampilan teknis dalam melakukan prosedur laboratorium, mulai dari pengenceran, pipetting, hingga inkubasi dan pembacaan hasil.
Afektif	20%	Sikap selama praktikum, meliputi ketelitian, kedisiplinan, kepatuhan terhadap SOP dan keselamatan kerja, serta kerja sama tim.



RINGKASAN

Uji hemagglutinasi inhibisi (HI) merupakan prosedur laboratorium klasik untuk klasifikasi atau sub tipe virus yang mengalami hemagglutinasi. Untuk virus influenza, uji HI digunakan untuk mengidentifikasi sub tipe hemagglutinin (HA) dari isolat yang tidak diketahui atau spesifisitas sub tipe HA dari antibodi terhadap virus influenza



DAFTAR PUSTAKA

1. Andien Ravelliani dan Salman. Penyakit Influenza Berdasarkan Iklim di Indonesia: Literature Review. *Jurnal Farmasetis*. 2022; 11 (3): 209-14
2. BPPSDM Kemenkes RI. Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medik (TLM): Virologi. 2018.
3. Frans Cuevas, Hisaaki Kawabata, Florian Krammer, and Juan Manuel Carreño. An In Vitro Microneutralization Assay for Influenza Virus Serology. *Curr Protoc*. 2022;2(7)
4. Garry Cross, Hemagglutination inhibition assays. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2002; 11 (1): 15-8
5. Janice C Pedersen. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol*. 2014;1161:11-25
6. Katone Sano and Haruko Ogawa. Hemagglutination (inhibition) assay. *Methods in molecular biology*. *Methods Mol Biol*. 2014;1200:47-52
7. Mahy, B.W.J. and Kangro, H.O. *Virology Methods Manual*. 1996. Academic Press, Cambridge
8. Patrick T Keiser, Manu Anantpadma, Hilary Staples, Ricardo Carrion, and Robert A Davey. Automation of Infectious Focus Assay for Determination of Filovirus Titers and Direct Comparison to Plaque and TCID50 Assays. *Microorganisms*. 2021 Jan 12;9(1):156
9. Sagar Aryal. Neutralization Test- Definition, Principle, Types, Procedure, Results. 2022.
10. Sarah A. Almahboub, Abdullah Algaissi, Mohamed A. Alfaleh, M-Zaki ElAssouli, and Anwar M. Hashem. Evaluation of Neutralizing Antibodies Against Highly Pathogenic Coronaviruses: A Detailed Protocol for a Rapid Evaluation of Neutralizing Antibodies Using Vesicular Stomatitis Virus Pseudovirus-Based Assay. *Front. Microbiol*. 2020; 11

Modul Praktikum Virologi

11. Timothy M Uyeki, David S Hui, Maria Zambon, David E Wentworth, and Arnold S Monto. Influenza. *The Lancet*. 2022; 400 (10353): 693-706
12. Wahyudi, Feby A Putri, Nur Ashilah S Rkt, Septiani Rizka F, dan Karfita Adha. Pola Swamedikasi Influenza Pada Mahasiswa/i di Sumatera Utara. *Jurnal Kesehatan Tambusai*. 2023; 4(4): 6211-21.
13. Yeqing Sun, Weijin Huang, Hongyu Xiang, and Jianhui Nie. SARS-CoV-2 Neutralization Assays Used in Clinical Trials: A Narrative Review. *Vaccines*. 2024; 12(5):554.
14. Ying Wu, Lynn M Almlı, Tao Jiang, Hua Yang, et al. Micro Neutralization (MN) Assay of Influenza Viruses with Monoclonal Antibodies. *Bio-Protocol*. 2016.
15. Zuckerman, A., Banatvala, J., Schoub, B., Griffiths, P., Mortimer, P. *Principles and Practice of Clinical Virology Sixth Edition*. 2009. United Kingdom.

BAB 4

PEMERIKSAAN VIRAL LOAD SARS-COV-2

TUJUAN

1. Mahasiswa mampu memahami pengertian viral load virus SARS-CoV-2
2. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan viral load virus SARS-CoV-2 metode real time RT-PCR
3. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil pemeriksaan qRT-PCR SARS-CoV-2

PENDAHULUAN

SARS-CoV-2 merupakan virus yang menyebabkan penyakit pernapasan pada manusia yang dikenal dengan penyakit *Coronavirus Disease 2019* (Covid-19). Viral load SARS-CoV-2 adalah jumlah salinan materi genetik virus SARS-CoV-2 dalam suatu volume sampel, biasanya dilaporkan sebagai salinan/mL. Pemeriksaan ini sangat penting untuk menilai tingkat infeksi pasien, memantau efektivitas pengobatan (pada kasus khusus), mendukung keputusan klinis, terutama pada pasien immunocompromised. Metode utama untuk pemeriksaan viral load SARS-CoV-2 adalah *Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) dengan pendekatan kuantitatif.

Metode Real Time RT PCR

Real time *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) merupakan metode amplifikasi (perbanyak) DNA yang produk amplifikasi dapat dianalisis pada setiap siklusnya menggunakan *fluorogenic probe*. Pada qRT-PCR digunakan alat *thermal cycler* yang dilengkapi dengan detektor untuk membaca sinyal fluoresensi dan mengubahnya menjadi sinyal digital sehingga dapat dianalisis oleh komputer. Proses elektroforensis untuk interpretasi hasil tidak diperlukan. Kelebihan qRT-PCR adalah memiliki sensitivitas tinggi dan waktu pengerjaan lebih cepat sedangkan kekurangan qRT-PCR memerlukan *thermal cycler* yang dilengkapi kamera detektor serta bahan yang lebih mahal. Probe *fluorogenic* merupakan sekuen oligonukleotida pendek yang didesain untuk berhibridisasi dengan sekuen target.

Modul Praktikum Virologi

Sumber Kesalahan Pemeriksaan

Pemeriksaan *viral load* SARS-CoV-2 dengan metode real-time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) adalah prosedur yang sangat sensitif dan rentan terhadap kesalahan di setiap tahapnya.

- **Pra-Analitik:**

- **Kesalahan Pengambilan Spesimen:** Penggunaan jenis *swab* yang salah (misalnya, *cotton swab*), pengambilan sampel yang tidak adekuat (terlalu sedikit), atau kegagalan menempatkan *swab* ke dalam media transport virus (VTM) dengan benar.
- **Kesalahan Transport dan Penyimpanan:** Media transport virus (VTM) yang digunakan adalah media khusus yang digunakan untuk menjaga stabilitas dan integritas virus, termasuk SARS-CoV-2. VTM umumnya mengandung larutan penyangga seperti *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) atau MEM yang ditambah dengan protein stabilizer (misalnya serum sapi janin atau albumin), serta antibiotik dan antijamur untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme kontaminan. Media ini berfungsi mempertahankan RNA virus agar tetap utuh sehingga dapat terdeteksi dengan metode RT-PCR. Ketidakesesuaian pemilihan media transport merupakan salah satu faktor kesalahan yang dapat mempengaruhi hasil. Selain itu, sampel tidak disimpan pada suhu yang disarankan (2–8°C), penundaan dalam pengiriman ke laboratorium, atau kebocoran tabung yang menyebabkan kontaminasi silang.
- **Spesimen Tidak Sesuai:** Sampel yang terkontaminasi oleh darah, lendir berlebih, atau inhibitor lainnya yang dapat mengganggu proses ekstraksi RNA atau reaksi PCR.

- **Analitik:**

- **Kesalahan Ekstraksi RNA:** Proses lisis (pemecahan sel) yang tidak sempurna, degradasi RNA akibat enzim RNase, atau kehilangan RNA selama proses pencucian.
- **Kontaminasi:** Kontaminasi silang antara sampel positif dan negatif, atau kontaminasi dari produk PCR sebelumnya. Ini merupakan sumber kesalahan paling kritis yang dapat menghasilkan positif palsu.
- **Kesalahan Pipetting:** Volume *reagent* atau sampel yang tidak akurat, terutama saat menyiapkan *master mix* PCR, yang dapat memengaruhi efisiensi amplifikasi.
- **Inhibitor Reaksi:** Keberadaan zat-zat dari spesimen (misalnya, hemoglobin, mukus, atau zat kimia dari media transport) yang dapat menghambat kerja enzim polimerase pada tahap amplifikasi.

Modul Praktikum Virologi

- **Pasca-Analitik:**

- **Kesalahan Perhitungan atau Transkripsi:** Salah memasukkan nilai *Cycle threshold* (Cq) atau salah perhitungan titer *viral load*.
- **Salah Interpretasi Hasil:** Terutama dalam kasus di mana nilai Cq berada di ambang batas (*borderline*), atau jika kontrol internal gagal.

Pemecahan Masalah (Troubleshooting)

- **Jika Tidak Terjadi Amplifikasi (Cq tidak muncul) pada Sampel Positif dan Kontrol Positif:**

- **Solusi:** Kemungkinan besar ada masalah dengan *master mix* PCR. Periksa reagen, cek tanggal kedaluwarsa, dan pastikan tidak ada kesalahan dalam penyiapan. Kalibrasi alat PCR juga perlu diperiksa.

- **Jika Terjadi Amplifikasi pada Kontrol Negatif (Positif Palsu):**

- **Solusi:** Ini adalah tanda kontaminasi. Segera hentikan pengujian, desinfeksi seluruh area kerja, ganti semua reagen, dan pisahkan area pra-PCR dan pasca-PCR. Ulangi seluruh pengujian dengan hati-hati.

- **Jika Kontrol Internal (IC) Gagal Beramplifikasi:**

- **Solusi:** Ini menunjukkan adanya masalah pada tahap ekstraksi RNA atau adanya inhibitor dalam sampel. Ekstraksi RNA harus diulang. Jika masalah berlanjut, kemungkinan spesimen mengandung inhibitor kuat.

- **Jika Nilai Cq Sangat Tidak Konsisten antar Sampel:**

- **Solusi:** Latih kembali teknik pipetting. Pastikan setiap sampel terhomogenisasi dengan baik sebelum dipipet.

Jaminan Mutu Pemeriksaan (Quality Assurance)

Penerapan sistem jaminan mutu yang ketat adalah kunci untuk menghasilkan hasil yang akurat dan dapat dipercaya, terutama untuk diagnosis yang penting seperti SARS-CoV-2.

1. Kontrol Kualitas Internal (IQC):

- **Kontrol Positif:** Gunakan standar positif yang mengandung target virus dengan konsentrasi yang diketahui pada setiap *run* untuk memverifikasi bahwa seluruh proses (ekstraksi dan amplifikasi) berjalan dengan benar.
- **Kontrol Negatif:** Gunakan air steril atau larutan pengencer sebagai kontrol negatif untuk memastikan tidak ada kontaminasi reagen atau lingkungan.
- **Kontrol Internal (IC):** Setiap sampel harus memiliki kontrol internal. Ini adalah sekuens asam nukleat non-target yang ditambahkan pada awal ekstraksi. Jika IC berhasil diamplifikasi, itu menunjukkan bahwa ekstraksi berhasil dan tidak ada

Modul Praktikum Virologi

inhibitor dalam sampel, bahkan jika hasil SARS-CoV-2 negatif.

2. Kontrol Kualitas Eksternal (EQC):

- Berpartisipasi dalam program EQC yang disediakan oleh lembaga independen. Laboratorium akan menerima sampel "buta" untuk diuji dan hasilnya akan dibandingkan dengan laboratorium lain.

3. Standarisasi Prosedur dan Validasi:

- Semua prosedur harus mengikuti **SOP (Standar Operasional Prosedur)** yang terperinci dan divalidasi.
- Seluruh alat dan instrumen (seperti mikropipet dan mesin RT-qPCR) harus dikalibrasi secara rutin.
- Personel laboratorium harus mendapatkan pelatihan dan diuji kompetensinya secara berkala.



A. Pengambilan sampel

1. Alat dan bahan dalam pengambilan sampel

a. Spesimen Saluran Pernafasan (*Respiratory Tract*)

- 1) Virus transport media (VTM)
- 2) Flocked swab/dacron swab
- 3) Tongue spatel
- 4) Kontainer steril untuk sputum
- 5) Plastik klip
- 6) Marker datau Label ID

b. Spesimen Darah/Serum

- 1) Tourniquet
- 2) Spuit disposable atau 5 ml system vacutainer
- 3) Kapas alkohol 70%
- 4) Kapas kering
- 5) Vial 1,8 ml atau tabung tutup ulir
- 6) Marker atau label ID

2. Pengambilan sampel Orofaring (nasal)

- a. Memastikan identitas pasien sudah benar dan sesuai
- b. Menjelaskan tindakan swab nasal yang akan dilakukan beserta risiko efek samping
- c. Mencuci tangan dan memakai APD sesuai dengan ketentuan
- d. Memposisikan pasien duduk dengan kepala menengadiah. Pada anak-anak, orang tua dapat membantu dengan memangku anak serta merangkul anak dari belakang
- e. Masukkan seluruh ujung lembut stik swab lurus ke lubang hidung kurang dari 2 cm atau *mid-turbinate* nasal dengan halus
- f. Setelah stik atau aplikator swab masuk, buat gerakan memutar secara halus di seluruh lapang lubang hidung minimal 4 kali putaran. Tindakan ini biasanya hanya membutuhkan waktu 10-15 detik per lubang hidung
- g. Masukkan stik swab ke dalam tabung, kemudian tutup kembali
- h. Pastikan spesimen apusan menyentuh media transport
- i. Berikan label pasien termasuk nama, usia, dan nomor rekam medis
- j. Segera kirim ke laboratorium untuk dilakukan pembacaan hasil swab



Gambar 4.1 Pengambilan sampel Nasofaring

3. Pengambilan sampel orofaring

- a. Memastikan identitas pasien yang hendak dilakukan swab tenggorok sudah sesuai
- b. Menjelaskan tindakan swab nasofaring (tenggorok) yang akan dilakukan beserta risiko efek samping, jelaskan pada pasien bahwa pengambilan sampel akan terasa tidak nyaman dan dapat memicu *gag reflex*
- c. Mencuci tangan dan mengenakan alat perlindungan diri yang sesuai ketentuan
- d. Memosisikan pasien duduk dengan kepala sedikit menengadahkan dan mulut terbuka lebar dengan lidah dijulurkan. Apabila swab dilakukan pada pasien anak, orang tua diminta untuk duduk memangku anak dan merangkul dari belakang
- e. Masukkan aplikator ke dalam orofaring, kemudian rotasikan aplikator secara lembut pada permukaan tonsil, dinding posterior faring, atau keduanya. Apusan perlu difokuskan pada area yang tampak eritema atau mengandung eksudat
- f. Masukkan aplikator ke dalam tabung atau vial plastik, kemudian tutup wadah
- g. Pastikan spesimen bersentuhan dengan media transport atau media kultur
- h. Memberikan label seperti nama, usia, dan nomor rekam medis pasien, kemudian segera kirim ke laboratorium[10,11]



Gambar 4.2 Pengambilan Orofaring

B. Penanganan dan pengiriman sampel

Tata laksana spesimen dengan tujuan diagnostik atau investigasi harus dilakukan sebagai UN3373, yaitu "Substansi Biologis, Kategori B". Spesimen yang membutuhkan pengiriman ke luar daerah, maka dilakukan pengiriman sampel sesuai dengan protokol oleh WHO dan *International Air Transport Association (IATA)*. Pengiriman dilakukan dengan menggunakan tiga lapis (*Three Layer Packaging*). Semua spesimen dikemas untuk mencegah kerusakan dan sampel yang tumpah. Sampel dikirim dengan dikemas 3 lapis yaitu *cryotube* yang tertutup rapat kedap udara, bahan yang menyerap air misalnya tisu, dan lapisan nonrigid yang tahan air seperti plastik

C. Pemeriksaan metode real time RT-PCR

1. Pra analitik

a. Tujuan Pemeriksaan

Tujuan dari pemeriksaan real time RT-PCR ialah mendeteksi RNA dari virus SARS-CoV-2 dan mengukur jumlah materi genetik virus SARS-CoV-2 dalam suatu spesimen,

b. Metode

Metode real time *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR)

c. Prinsip

Pada RT-PCR material genetik RNA diubah menjadi cDNA dengan menggunakan enzim *reverse transcription* (RT). Formasi hibridisasi RNA akan membentuk untai pertama cDNA untuk kemudian akan diamplifikasi pada proses PCR. Amplifikasi RNA virus yang telah diubah menjadi DNA melalui reverse transcription, dengan deteksi secara real-time menggunakan fluorofor.

2. Analitik

a. Ekstraksi RNA

1) Prosedur Ekstraksi

Tabel 4.1 Protokol Kit Ekstraksi (QIAamp Viral RNA Mini Kit Qiagen)

No	Bahan dan Reagen	Kondisi Penyimpanan	Lokasi penyimpanan	Keterangan
1	Carrier RNA (Poly A)	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	Disimpan di suhu -20°C setelah di larutkan dengan 310 µl buffer AVE
2	Buffer AVE	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	
3	Buffer AVL	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	
4	Alkohol absolute	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	

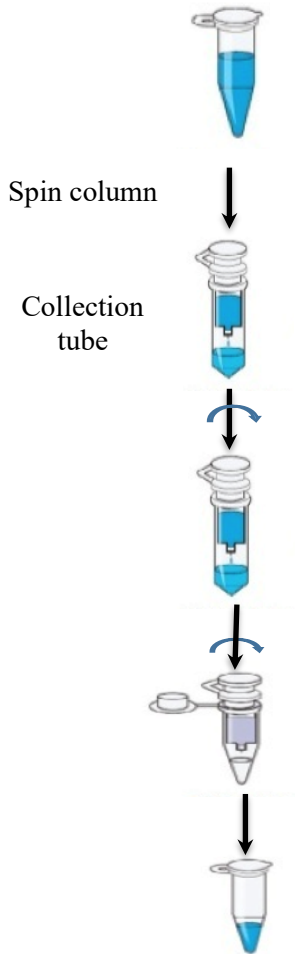
Modul Praktikum Virologi

5	Buffer AW1	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	Tambahkan dengan 25 ml Ethanol Absolut sebelum di pakai
6	Buffer AW 2	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	Tambahkan dengan 30 ml Ethanol Absolut sebelum di pakai
7	QIAamp Mini Spin column	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	
8	Colection tube	Suhu Ruang	Ruangan Mix Reagen	
9	1,5 ml eppendorf tube	Suhu Ruang	Ruangan Ektraksi	
10	Aerosol Barrier Tips (1000 µl, 200 µl,100 µl,20 µl,10 µl)	Suhu Ruang	Ruangan Ektraksi	

2) Peralatan

- 1) Vortex
- 2) Sentrifuge
- 3) Mikropipet (1000 µl, 200 µl,100 µl,20 µl,10 µl)
- 4) BSC Class-II

3) Prosedur manual



1. Mix : 560 µl Lysis Buffer + 140 µl specimen
2. Tambahkan mock (ddH₂O) sebagai control ekstraksi (140 µl)
3. Vortex dan inkubasi suhu ruangan (RT) 10 menit
4. Spin beberapa detik
5. Transfers @ 630 µl ke-2 spin colum
6. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit
7. Ganti collection tube tambahkan 500 µl Buffer AW1
8. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit
9. Ganti collection tube tambahkan 500 µl Buffer AW 2
10. Sentrifuse 14000 rpm selama 3 menit
11. Ganti collection tube
12. Ganti collection tube dengan 1,5 ml eppendorf tube + 60 µl Buffer AVE
13. Diamkan dalam suhu ruang (RT) selama 1 menit
14. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit
15. Buang spin colum dan beri label pada tube
16. Diperoleh RNA murni dalam tube
17. Lakukan Pemeriksaan atau simpan pada suhu -15 s/d -20

Proses ini dilakukan 2x

b. Pemeriksaan metode *real time* RT-PCR (qPCR)

1) **Acuan**, Manual Hand Book Kit MK Cells 2019-nCoV

2) Bahan dan Peralatan

a) Bahan

Tabel 4.2 Bahan mendeteksi RNA dari virus SARS-CoV-2

No	Bahan dan Reagen	Kondisi Penyimpanan	Lokasi penyimpanan	Keterangan
1	SARS-CoV-2 RT-PCR Mix	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
2	Positive Control	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
3	Resuspension Buffer RB	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
4	PCR Grade Water	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
5	Negative Control	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
6	CoV ORF1ab/N Reaction Solution	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
7	CoV ORF1ab/N Enzym Mix	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
8	CoV ORF1ab/NPrimer and Probe Mix	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
9	CoV ORF1ab/NPositive Control	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	
10	Negative Control	Suhu -20°C ~ -15°C	Ruangan Mix Reagen	

b) Bahan Pemeriksaan : RNA Virus

c) Peralatan

- (1) Vortex
- (2) Spindown
- (3) Mikropipet (100 µl, 20 µl, 10 µl)
- (4) BSC-II
- (5) LAF
- (6) Mesin Real Time

3) Prosedur kerja

- a) Siapkan reagen rRT-PCR mix dengan menambahkan komponen di bawah ini ke dalam tabung 1,5 ml sesuai dengan perhitungan jumlah reaksi yang dibuat pada tahap persiapan (table di bawah untuk 1 reaksi)

Modul Praktikum Virologi

Komponen	Volume (μ l)
CoV ORF1ab/N Reaction Solution	17
CoV ORF1ab/N Enzym Mix	1.5
CoV ORF1ab/N Primer and Probe Mix	1.5
Total	20

- b) Tambahkan 20 μ L ke masing-masing PCR Tube/ PCR plate
- c) Tambahkan 5 μ l *negative control* pada well, tutup PCR tube/PCR plate dengan aluminium foil, lalu bawa ke ruang add template
- d) Tambahkan 5 μ l, sesuai dengan *mapping plate* yang telah dibuat
- Mock ekstraksi
 - RNA sampel
 - Positive control
- e) Tutup PCR tube/ PCR plate dengan caps/seal yang sesuai dan sentrifugasi untuk menghilangkan gelembung
- f) Letakkan di dalam mesin real time PCR dengan pengaturan warna multiplex dalam 1 well sebagai berikut :
- **FAM** = gen **ORF1ab**
 - **HEX/VIC** = gen **N**
 - **Cy5** = **kontrol internal**
- g) Program Mesin qPCR sesuai tabel di bawah :

Tabel 4.4 *Cycling Condition*

Program Step	RT Step	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing
<i>Cycles</i>	1	1	40	
Target ($^{\circ}$ C)	50	95	95	58
Time	(7) min	30 detik	2 detik	20 detik

- h) Lakukan pembacaan hasil amplifikasi dengan mencatat nilai Ct, atur threshold di atas garis *noise* untuk masing-masing warna lalu interpretasikan hasil

Tabel 4.5 Kontrol Kualitas

Tipe	Hasil Real Time PCR Gen ORF1ab dan N	Fungsi
Positive Control (PC)	+ (Ct < 35)	Mengontrol kinerja reagensia (enzim, primer, probe)
Negative Control (NC)	- atau Ct = 40	Mengontrol kinerja kontaminasi reagensia dan lingkungan
Kontrol Internal	+ (Ct ≤ 40)	Mengontrol kinerja ekstraksi RNA dan kemungkinan kontaminasi

4) Analisis data dan interpretasi *Cycle threshold* (CT)

(a) Nilai Normal

Tabel 4.6 Nilai Normal

Ct Value	Estimasi Viral Load	Interpretasi
< 20	> 10 ⁷ copies/mL	Sangat tinggi (kritis)
20–25	10 ⁶ – 10 ⁷ copies/mL	Tinggi (potensi kritis)
25–30	10 ⁴ – 10 ⁶ copies/mL	Sedang
> 35	< 10 ³ copies/mL (atau negatif)	Rendah/sisa RNA

(b) Nilai Kritis

- Ct < 25 dan/atau Viral Load > 1 juta copies/mL
- Pasien dalam lingkungan rawan (RS, panti jompo, ICU, ruang tertutup)
- Terjadi lonjakan viral load mendadak
- Kombinasi viral load tinggi dan gejala berat

3. Post analitik

1) Pelaporan hasil

- Format Pelaporan:** Selain informasi dasar pasien dan sampel, harus mencakup: Unit Pengukuran: Misalnya, kopi/mL (copies/mL), IU/mL (International Units/mL), atau Log₁₀ kopi/mL.
- Nilai Kuantitatif:** Angka spesifik *viral load* yang terukur.
- Batas Deteksi (LOD - *Limit of Detection*) dan Batas Kuantifikasi (LOQ - *Limit of Quantification*):** Menyatakan batas terendah yang dapat dideteksi dan diukur secara akurat oleh metode tersebut.

2) Interpretasi Hasil:

- 1) **Terdeteksi dan Terkuantifikasi:** *Viral load* terukur di atas LOQ. Contoh: "SARS-CoV-2 *viral load* = 1.5×10^5 copies/mL".
- 2) **Terdeteksi tapi Tidak Terkuantifikasi:** *Viral load* terdeteksi tetapi berada di antara LOD dan LOQ. Contoh: "SARS-CoV-2 terdeteksi, *viral load* < LOQ". Ini menunjukkan adanya virus, tetapi jumlahnya terlalu rendah untuk diukur secara presisi.
- 3) **Tidak Terdeteksi:** *Viral load* di bawah LOD. Contoh: "Tidak terdeteksi SARS-CoV-2". Penting untuk memastikan kontrol internal berhasil teramplifikasi.

D. Sumber kesalahan pemeriksaan

Sumber kesalahan berlaku untuk kedua metode, namun dampaknya pada hasil *viral load* bisa lebih kritis karena memengaruhi nilai kuantitatif.

1. Fase Pra-Analitik :

a. Pengambilan Sampel :

- 1) **Kualitas Sampel (Kuantitatif) :** Pengambilan sampel yang tidak adekuat (misalnya, swab terlalu kering, tidak cukup sel) akan menghasilkan *viral load* yang lebih rendah dari sebenarnya (*underestimation*) atau bahkan negatif palsu. Untuk *viral load*, konsistensi volume dan teknik sangat penting.
- 2) **Kontaminasi:** Kontaminasi dari lingkungan atau antar sampel dapat menyebabkan positif palsu pada kualitatif, dan *viral load* yang terukur lebih tinggi dari sebenarnya (*overestimation*) pada kuantitatif.

b. **Kesalahan Identifikasi Sampel:** Paling fatal, menyebabkan hasil yang salah dilaporkan ke pasien.

2. Fase Analitik:

a. Kualitas Reagen:

- 1) **Degradasi/Kontaminasi Reagen:** Primer, probe, enzim, atau master mix yang rusak/terkontaminasi akan mengurangi efisiensi amplifikasi, menyebabkan negatif palsu, inkonklusif, atau hasil *viral load* yang tidak akurat.
- 2) **Kurva Standar (Kuantitatif):** Kesalahan dalam preparasi atau kualitas *template* standar untuk kurva kuantifikasi akan secara langsung memengaruhi akurasi nilai *viral load* yang dilaporkan.

b. Kondisi Reaksi PCR:

- 1) **Parameter Termal:** Suhu dan waktu siklus yang tidak optimal pada termosiklus akan mempengaruhi efisiensi amplifikasi.
- 2) **Pipetting Errors:** Ketidakakuratan volume reagen atau sampel (misalnya, akibat pipet tidak terkalibrasi) dapat mengubah konsentrasi komponen reaksi, memengaruhi efisiensi dan akurasi kuantifikasi.

c. **Kontaminasi di Laboratorium:** PCR sangat sensitif. Kontaminasi silang DNA/RNA dari sampel positif sebelumnya atau produk amplifikasi dapat menyebabkan positif palsu pada kualitatif dan *overestimation* pada kuantitatif. Desain alur kerja laboratorium (unidirectional flow), penggunaan area bersih/kotor, dan praktik dekontaminasi yang ketat sangat penting.

3. Fase Pasca-Analitik :

a. Interpretasi Data :

- 1) **Kualitatif :** Salah menginterpretasi kurva amplifikasi atau nilai Ct (misalnya, menganggap artefak sebagai sinyal positif).
- 2) **Kuantitatif :** Kesalahan dalam penentuan baseline dan threshold, pemilihan range untuk kurva standar, atau analisis data lainnya dapat menghasilkan nilai *viral load* yang tidak akurat.

Kesalahan Pencatatan/Transkripsi: Kelalaian saat memasukkan data ke sistem informasi laboratorium (LIS) atau mencatat secara manual.

E. Jaminan mutu pemeriksaan

1. Kontrol Positif: Kualitatif & Kuantitatif

Menggunakan materi genetik virus SARS-CoV-2 dengan konsentrasi target yang diketahui. Untuk kuantitatif, biasanya ada serangkaian kontrol positif dengan konsentrasi berbeda untuk memverifikasi rentang linearitas kurva standar dan presisi pengukuran pada berbagai tingkat *viral load*. Kegagalan kontrol positif mengindikasikan masalah reagen, alat, atau proses.

2. Kontrol Negatif (NTC - No Template Control)

Kualitatif & Kuantitatif: Mengandung semua komponen reaksi PCR kecuali *template* asam nukleat. Amplifikasi pada NTC menunjukkan kontaminasi reagen atau lingkungan dan menginvalidasi hasil pengujian.

3. Kontrol Internal (IC/IPC)

Kualitatif & Kuantitatif: Sangat penting untuk mendeteksi *inhibition* dan efisiensi ekstraksi. Materi genetik non-target (misalnya, gen seluler manusia seperti RNase P, atau

sekuens eksternal yang ditambahkan) diekstraksi dan diamplifikasi bersamaan dengan target virus.

4. Pada *Viral Load*

Kegagalan IC pada sampel dengan hasil negatif atau *viral load* sangat rendah mengindikasikan masalah pada sampel itu sendiri (misalnya, kualitas sampel buruk, adanya inhibitor), bukan berarti virus tidak ada. Jika IC tidak teramplifikasi, hasil tersebut dianggap invalid.

F. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Modul Praktikum Virologi

Hasil	:	Data pasien
Kesimpulan	:	

Pembimbing

, Praktikan 20...

() ()



EVALUASI

Bentuk Evaluasi :

1. Tugas

Tugas Praktikum: Anda adalah seorang analis laboratorium yang sedang melakukan pemeriksaan *viral load* SARS-CoV-2 menggunakan metode RT-qPCR pada 10 sampel spesimen nasofaring. Setelah menjalankan prosedur, Anda mendapatkan hasil sebagai berikut:

- **Sampel Pasien 1-8:** Semua sampel menunjukkan kurva amplifikasi dengan nilai **Cq < 30**.
- **Sampel Pasien 9:** Tidak ada kurva amplifikasi untuk target gen SARS-CoV-2, namun kurva amplifikasi untuk kontrol internal (IC) muncul pada nilai Cq yang diharapkan.
- **Sampel Pasien 10:** Tidak ada kurva amplifikasi untuk target gen SARS-CoV-2 maupun kontrol internal (IC).
- **Kontrol Positif:** Tidak ada kurva amplifikasi.
- **Kontrol Negatif:** Tidak ada kurva amplifikasi.

Instruksi:

1. Berdasarkan data di atas, identifikasi **dua masalah** yang paling mungkin terjadi pada *run* pemeriksaan ini.
2. Jelaskan langkah-langkah **pemecahan masalah (*troubleshooting*)** yang harus Anda lakukan untuk mengatasi setiap masalah tersebut.

2. Tes

1) Skenario:

Seorang analis melakukan pemeriksaan *viral load* SARS-CoV-2 pada dua sampel pasien. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa Sampel A memiliki nilai **Cq 35**, sementara Sampel B memiliki nilai **Cq 22**. Kedua sampel memiliki hasil kontrol internal yang valid.

Pertanyaan:

Berdasarkan hasil tersebut, manakah pernyataan yang paling tepat terkait interpretasi *viral load* kedua sampel?

Pilihan Jawaban:

- A. Sampel A memiliki *viral load* lebih tinggi daripada Sampel B.
- B. Sampel B memiliki *viral load* lebih tinggi daripada Sampel A.
- C. Sampel A dan Sampel B memiliki *viral load* yang sama.
- D. Kedua sampel menunjukkan hasil negatif.
- E. Hanya Sampel B yang memiliki hasil yang valid.

Kunci Jawaban: B. Sampel B memiliki *viral load* lebih tinggi daripada Sampel A.

2) **Skenario:**

Seorang analis mendapatkan hasil "Invalid" untuk sampel pasien. Pemeriksaan menunjukkan bahwa target gen SARS-CoV-2 **tidak terdeteksi**, dan **kontrol internal (IC) juga gagal beramplifikasi**. Sumur kontrol lainnya menunjukkan performa yang normal.

Pertanyaan:

Manakah sumber kesalahan yang paling mungkin terjadi pada kasus ini?

Pilihan Jawaban:

- A. Konsentrasi virus pada spesimen pasien terlalu rendah.
- B. Adanya *inhibitor* dalam sampel pasien.
- C. Reagen yang digunakan telah kedaluwarsa.
- D. Terjadi kontaminasi silang pada area kerja atau reagen.
- E. Ekstraksi RNA tidak berhasil.

Kunci Jawaban: D. Terjadi kontaminasi silang pada area kerja atau reagen.

3) **Skenario:**

Seorang analis mendapatkan hasil "Invalid" untuk sampel pasien. Pemeriksaan menunjukkan bahwa target gen SARS-CoV-2 **tidak terdeteksi**, dan **kontrol internal (IC) juga gagal beramplifikasi**. Sumur kontrol lainnya menunjukkan performa yang normal.

Pertanyaan:

Apakah makna klinis dari hasil ini?

Pilihan Jawaban:

- A. Pasien memiliki *viral load* yang sangat rendah.
- B. Sampel pasien benar-benar negatif SARS-CoV-2.
- C. Terdapat *inhibitor* dalam spesimen yang mengganggu reaksi PCR.
- D. Virus pada sampel telah mengalami degradasi.
- E. Terjadi kesalahan pada saat pengambilan spesimen.

Kunci Jawaban: C. Terdapat *inhibitor* dalam spesimen yang mengganggu reaksi PCR.

Modul Praktikum Virologi

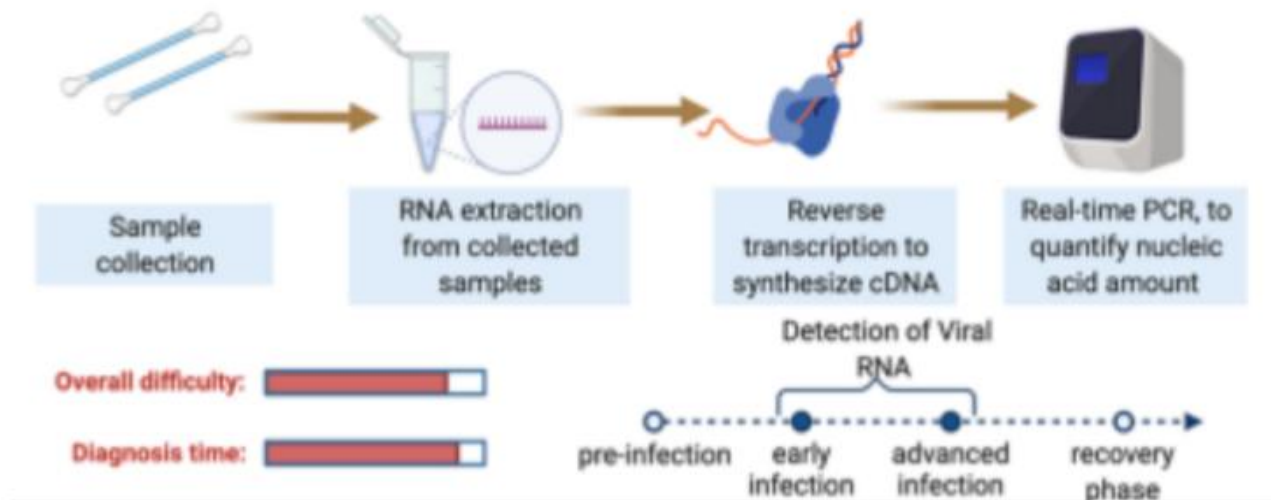
3. Bobot Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

Penilaian akan dilakukan berdasarkan bobot berikut untuk mengukur kompetensi mahasiswa secara menyeluruh.

Aspek Penilaian	Bobot (%)	Kriteria Penilaian
Kognitif	30%	Pemahaman teori dasar, prinsip pemeriksaan, dan kemampuan menganalisis serta menginterpretasi data hasil uji.
Psikomotor	50%	Keterampilan teknis dalam melakukan prosedur laboratorium, termasuk ekstraksi RNA, penyiapan <i>master mix</i> , dan menjalankan mesin RT-qPCR.
Afektif	20%	Sikap selama praktikum, meliputi ketelitian, kedisiplinan, kepatuhan terhadap SOP, serta kesadaran akan keselamatan kerja.



RINGKASAN



Gambar 4.3 Tahapan Pemeriksaan SARS-CoV-2

Pemeriksaan beban viral SARS-CoV-2 terdiri dari tiga tahap utama, yaitu tahap pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik. Tahap pra-analitik mencakup pengambilan sampel (misalnya swab nasofaring atau orofaring), penyimpanan dalam media transport virus (VTM), dan pengiriman sampel ke laboratorium dengan suhu standar. Tahap analitik mencakup ekstraksi RNA virus dari sampel, kemudian materi genetik virus diidentifikasi dan diukur melalui metode RT-PCR. Tahap pasca-analitik mencakup interpretasi hasil, pelaporan dan dokumentasi data, di mana hasil dinyatakan positif atau negatif berdasarkan ambang Ct tertentu serta mempertimbangkan kualitas sampel dan kontrol pemeriksaan.



DAFTAR PUSTAKA

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel.
2. Centers For Disease Control and Prevention. Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens for COVID-19. 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.

Modul Praktikum Virologi

3. Centers For Disease Control and Prevention. How to collect an anterior nasal swab specimen for COVID-19 testing. 2021. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/testing/How-To-Collect-Anterior-Nasal-Specimen-for-COVID-19.pdf>
4. Corman, V. M., et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance*, 25(3): 2000045.
5. La Scola, B., et al. (2020). Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.
6. Louisiana Department of Health Public Health. COVID-19 sample collection nasopharyngeal and nasal swab. 2020. https://ldh.la.gov/assets/oph/Center-PHCH/Center-CH/infectious-epi/CV19/COVID19_Sample_Collection_Nasopharyngeal_and_NasalSwab.pdf.
7. Pondaven-Letourmy S, Alvin F, Boumghit Y, Simon F. How to perform a nasopharyngeal swab in adults and children in the COVID-19 era. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2020 Sep;137(4):325-327. doi: 10.1016/j.anorl.2020.06.001.
8. Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes. Penatalaksanaan dan pemeriksaan spesimen COVID-19. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. https://persi.or.id/wp-content/uploads/2020/03/penatalaksanaan_spesimen_COVID19.pdf.
9. Rhoads, D., Peaper, D. (2020). Shedding Light on SARS-CoV-2 RT-PCR Cycle Threshold Values. *Clinical Chemistry*, 66(9): 1187–1189.
10. QIAGEN. 2020. QIAamp Viral RNA Mini Handbook', (July), pp. 26–29. *QIAamp® Viral RNA Mini Handbook For Purification of Viral RNA from Plasma, Serum, Cell-free Body Fluids, and Culture Supernatants*. [Online] Available at: <https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en> [Accessed 09 Juni 2025]
11. World Health Organization. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019– 2020. Geneva, World Health Organization, 2019.
12. World Health Organization (WHO). (2020). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. <https://www.who.int>

BAB 5

PEMERIKSAAN VIRAL LOAD HCV

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu memahami prinsip pemeriksaan Viral Load HCV
2. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan Viral Load HCV
3. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil pemeriksaan Viral Load HCV

PENDAHULUAN

Hepatitis C Virus (HCV) merupakan virus RNA untai tunggal (single-stranded RNA) dari famili Flaviviridae, genus Hepacivirus, yang menginfeksi hepatosit dan dapat menyebabkan penyakit hati kronis yang serius seperti sirosis dan hepatokarsinoma (Simmonds, 2017; RoboScreen GmbH, 2022). Penularan HCV terjadi terutama melalui kontak darah, termasuk melalui transfusi darah yang tidak disaring dengan baik, penggunaan jarum suntik bersama, dan prosedur medis invasif yang tidak steril (World Health Organization, 2017). Infeksi HCV bersifat asimtomatik pada banyak kasus awal, namun dapat berkembang menjadi infeksi kronis yang berlangsung selama puluhan tahun tanpa gejala yang nyata sebelum komplikasi serius muncul (Messina JP, 2015).

Dalam tatalaksana klinis, diagnosis infeksi HCV biasanya diawali dengan deteksi antibodi terhadap HCV (anti-HCV), yang menunjukkan adanya paparan virus. Namun demikian, keberadaan antibodi tidak serta-merta mengindikasikan infeksi aktif, karena antibodi dapat tetap terdeteksi meskipun virus telah dieliminasi dari tubuh. Oleh karena itu, pemeriksaan konfirmasi yang dapat mendeteksi dan mengukur keberadaan RNA HCV di dalam darah sangat penting, khususnya dalam menilai replikasi aktif virus serta respons terhadap terapi (Ansaldi F, 2014).

Pemeriksaan Viral Load HCV atau kuantifikasi RNA HCV adalah metode molekuler berbasis Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yang memungkinkan deteksi sekaligus kuantifikasi secara langsung materi genetik virus dalam darah pasien. Pemeriksaan ini memainkan peran penting dalam berbagai aspek klinis, termasuk:

Modul Praktikum Virologi

1. Menentukan status infeksi aktif,
2. Menilai tingkat replikasi virus,
3. Memonitor efektivitas terapi antiviral,
4. Memprediksi keberhasilan pengobatan jangka panjang (sustained virological response/SVR),
5. Dan mendeteksi terjadinya relaps atau kegagalan terapi (Baleriola C., 2011; RoboScreen GmbH, 2022).

Prinsip dasar dari RT-PCR untuk deteksi HCV RNA melibatkan ekstraksi RNA virus dari serum atau plasma, sintesis DNA komplementer (cDNA) melalui proses transkripsi balik (reverse transcription), dan amplifikasi target menggunakan primer dan probe spesifik terhadap wilayah konservatif gen HCV, khususnya di bagian untranslated region (5' UTR) (RoboScreen GmbH, 2022). Proses amplifikasi ini disertai dengan deteksi sinyal fluoresensi yang sebanding dengan jumlah salinan RNA HCV yang teramplifikasi, sehingga memungkinkan kuantifikasi secara real-time.

Salah satu keunggulan dari metode RT-PCR dibandingkan metode molekuler lainnya seperti branched DNA (bDNA) adalah sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, serta kemampuan untuk mendeteksi konsentrasi virus yang sangat rendah. Dalam praktiknya, sensitivitas deteksi dapat mencapai batas bawah 10–20 IU/mL tergantung platform dan metode ekstraksi RNA yang digunakan. Batas linieritas pengukuran biasanya berkisar dari 50 IU/mL hingga 4×10^{10} IU/mL, memungkinkan pemantauan rentang viral load yang sangat luas (RoboScreen GmbH, 2022).

Untuk memastikan hasil pemeriksaan yang akurat dan dapat diandalkan, setiap tahap dalam pemeriksaan kuantifikasi RNA HCV harus memenuhi prinsip jaminan mutu laboratorium, termasuk pengendalian kualitas internal (internal control) dan penggunaan standar kuantifikasi yang telah dikalibrasi terhadap standar internasional seperti WHO International Standard for HCV RNA (NIBSC 96/790 atau edisi terbaru) (Ansaldi F, 2014; RoboScreen GmbH, 2022). Internal control digunakan untuk mendeteksi kegagalan pada tahap ekstraksi atau adanya inhibitor PCR yang dapat menghasilkan hasil negatif palsu.

Dalam konteks penatalaksanaan terapi, pemeriksaan viral load dilakukan sebelum pengobatan dimulai untuk menetapkan baseline, kemudian secara periodik selama terapi (biasanya pada minggu ke-4, minggu ke-12, dan akhir terapi), serta beberapa minggu setelah terapi berakhir untuk menilai keberhasilan pengobatan jangka panjang. Penurunan viral load secara signifikan dalam beberapa minggu awal terapi menjadi indikator positif terhadap respon virologis yang berkelanjutan (Baleriola C., 2011; Ansaldi F, 2014).

Sumber Kesalahan Pemeriksaan

Pemeriksaan *viral load* HCV menggunakan metode RT-qPCR adalah prosedur yang sangat sensitif dan memerlukan presisi tinggi. Kesalahan dapat terjadi di setiap tahap, yang berpotensi menghasilkan hasil yang tidak akurat.

- **Pra-Analitik:**

- **Kualitas Spesimen:** Sampel darah yang hemolisis, ikterik (bilirubin tinggi), atau lipemik (lemak tinggi) dapat mengandung inhibitor yang mengganggu reaksi PCR.
- **Kesalahan Pengambilan Spesimen:** Pengambilan sampel darah yang tidak sesuai prosedur dapat menyebabkan lisis sel dan degradasi RNA virus.
- **Kesalahan Transportasi dan Penyimpanan:** RNA virus HCV sangat sensitif. Suhu yang tidak tepat selama transportasi atau penyimpanan dapat menyebabkan degradasi RNA, yang berujung pada hasil *viral load* yang lebih rendah atau negatif palsu.

- **Analitik:**

- **Kesalahan Ekstraksi RNA:** Proses ekstraksi yang tidak efisien dapat menghasilkan perolehan RNA yang rendah, yang memengaruhi hasil kuantifikasi.
- **Kontaminasi:** Ini adalah sumber kesalahan paling kritis. Kontaminasi dapat terjadi dari sampel dengan *viral load* tinggi, produk PCR sebelumnya (amplikon), atau lingkungan kerja yang tidak steril. Kontaminasi dapat menghasilkan hasil positif palsu.
- **Kesalahan Pipetting:** Volume reagen atau sampel yang tidak akurat dapat memengaruhi efisiensi reaksi amplifikasi, menghasilkan nilai Cq yang tidak valid atau kuantifikasi yang salah.
- **Inhibitor Reaksi:** Beberapa zat dalam sampel (misalnya, heparin, EDTA, atau sisa reagen ekstraksi) dapat menghambat aktivitas enzim polimerase, menyebabkan kurva amplifikasi yang tidak optimal atau kegagalan amplifikasi.

- **Pasca-Analitik:**

- **Kesalahan Perhitungan atau Transkripsi:** Salah memasukkan data hasil (nilai Cq) ke dalam perangkat lunak analisis atau salah menginterpretasi grafik.
- **Kesalahan Interpretasi:** Hasil ambang batas (*borderline*) yang tidak dibaca dengan benar dapat menyebabkan misklasifikasi *viral load* pasien.

Pemecahan Masalah (Troubleshooting)

- **Jika Kontrol Positif Gagal Beramplifikasi:**
 - **Solusi:** Hentikan pengujian. Ini menunjukkan ada masalah dengan reagen *master mix* PCR atau kondisi mesin. Periksa tanggal kedaluwarsa, pastikan reagen dicairkan dan dicampur dengan benar, dan verifikasi kalibrasi mesin PCR.
- **Jika Kontrol Negatif Menunjukkan Amplifikasi (Positif Palsu):**
 - **Solusi:** Ini adalah tanda kontaminasi. Hentikan pengujian segera. Lakukan dekontaminasi menyeluruh pada area kerja, ganti semua reagen, dan pisahkan area pra-PCR dari pasca-PCR. Ulangi seluruh proses dengan reagen baru dan teknik aseptik yang ketat.
- **Jika Kontrol Internal (IC) Gagal Beramplifikasi:**
 - **Solusi:** Ini menunjukkan adanya *inhibitor* dalam sampel atau kegagalan proses ekstraksi RNA. Ulangi ekstraksi RNA. Jika masalah berlanjut, pertimbangkan untuk mengencerkan sampel (jika *viral load* diperkirakan tinggi) atau menggunakan metode ekstraksi yang lebih efektif dalam menghilangkan inhibitor.
- **Jika Nilai Cq Sangat Beragam antar Sampel yang Sama:**
 - **Solusi:** Evaluasi teknik pipetting. Pastikan sampel dan reagen dicampur dengan baik sebelum dipipet. Lakukan kalibrasi ulang pada pipet jika perlu.

Jaminan Mutu Pemeriksaan (Quality Assurance)

Penerapan sistem jaminan mutu yang ketat adalah kunci untuk menghasilkan data *viral load* HCV yang akurat dan dapat dipercaya, yang sangat penting untuk manajemen klinis pasien.

1. Kontrol Kualitas Internal (IQC):

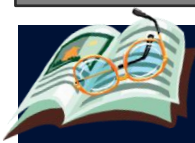
- **Kontrol Positif:** Gunakan standar yang mengandung sekuens gen HCV dengan konsentrasi yang sudah diketahui pada setiap *run* untuk memvalidasi performa reagen dan mesin.
- **Kontrol Negatif:** Gunakan larutan pengencer steril atau air bebas nuklease sebagai kontrol negatif untuk memantau kontaminasi reagen atau lingkungan.
- **Kontrol Internal (IC):** Setiap sampel harus memiliki IC yang berfungsi untuk memverifikasi keberhasilan ekstraksi RNA dan untuk mendeteksi adanya inhibitor PCR.

2. Kontrol Kualitas Eksternal (EQC):

- Berpartisipasi dalam program uji profisiensi (EQC) yang diselenggarakan oleh lembaga eksternal. Laboratorium akan menerima sampel "buta" untuk diuji, dan hasilnya akan dibandingkan dengan laboratorium lain untuk memastikan akurasi dan presisi.

3. Standarisasi Prosedur dan Validasi:

- Semua prosedur harus didokumentasikan dalam **Standar Operasional Prosedur (SOP)** yang jelas dan dipatuhi oleh semua personel.
- Semua alat dan instrumen, terutama mikropipet dan mesin PCR, harus dikalibrasi secara rutin.
- Personel laboratorium harus mendapatkan pelatihan berkala dan diuji kompetensinya dalam teknik PCR.



A. Pra analitik

1. Tujuan Pemeriksaan

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengkuantifikasi jumlah RNA HCV dalam plasma atau serum pasien, terutama untuk memantau respon terapi antivirus pada pasien dengan infeksi HCV kronis (RoboScreen GmbH, 2022).

2. Metode

Pemeriksaan menggunakan metode *Real-Time PCR* berbasis teknik TaqMan® (Simmonds, 2017; RoboScreen GmbH, 2022).

3. Prinsip

Deteksi dan kuantifikasi RNA HCV dilakukan melalui amplifikasi target RNA menggunakan primer dan probe spesifik. Fluoresensi dihasilkan saat enzim polimerase memecah probe yang terikat pada target, yang sebanding dengan jumlah RNA HCV yang teramplifikasi dalam setiap siklus PCR (Simmonds, 2017; RoboScreen GmbH, 2022).

4. Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel

- a. Jenis spesimen: plasma EDTA atau sitrat, serta serum.
- b. Volume minimum: 400 μ L.
- c. Hindari penggunaan plasma heparin karena dapat menghambat reaksi PCR.
- d. Sampel harus diproses dalam 5 hari jika disimpan pada suhu 2–8 °C, atau disimpan beku pada suhu -20 °C hingga -70 °C untuk penyimpanan jangka panjang (Baleriola C., 2011; World Health Organization, 2017; RoboScreen GmbH, 2022)

5. Alat dan bahan

- a. Alat ekstraksi RNA (manual/otomatis)
- b. Termosiklus real-time PCR
- c. Pipet dan tip bebas Rnase
- d. Tabung mikro (1.5 mL/2.0 mL)
- e. Centrifuge
- f. Vortex dan termomixer
- g. Reagen PCR grade water, enzim RT-PCR, dan standar kuantifikasi RNA HCV (Roboscreen GmbH, 2022)

B. Analitik

1. Prosedur kerja

- a. Ekstraksi RNA dari plasma/serum.
- b. Penambahan kontrol internal selama ekstraksi.
- c. Penyiapan reagen master mix dan penambahan RNA hasil ekstraksi.
- d. Real-time PCR dengan pengaturan suhu:
 - 1) Reverse Transcription: 47 °C, 15 menit
 - 2) Denaturasi: 95 °C, 2 menit
 - 3) Siklus PCR: 95 °C 15 detik, 57 °C 1 menit (45 siklus)
- e. Deteksi fluoresensi di saluran FAM (untuk HCV RNA) dan saluran Cy5/VIC (untuk kontrol internal) (Roboscreen GmbH, 2022).
- f. Interpretasi hasil:
 - 1) Hasil dilaporkan dalam bentuk Ct (Cycle threshold) atau IU/mL (International Unit per milliliter), tergantung metode kalibrasi alat.
 - 2) Jika alat dilengkapi dengan standard curve, hasil dapat dikonversi dari nilai Ct menjadi IU/mL.
 - 3) Nilai Ct yang rendah menunjukkan kadar RNA tinggi, sedangkan Ct tinggi menunjukkan kadar RNA rendah.

2. Nilai Normal (Roboscreen GmbH, 2022)

- a. Negatif: HCV DNA tidak terdeteksi (tidak ada sinyal pada kanal FAM).
- b. Nilai normal pada populasi sehat adalah tidak terdeteksinya HCV DNA.

3. Nilai Kritis

Nilai $> 4 \times 10^{10}$ IU/mL melebihi batas linear alat dan harus diencerkan ulang untuk kuantifikasi akurat (Roboscreen GmbH, 2022).

4. Perhitungan

Konsentrasi RNA HCV (IU/mL) dihitung berdasarkan kurva standar dari 4 standar kuantifikasi (400 IU/mL hingga 40 juta IU/mL), menggunakan nilai Ct yang dihasilkan oleh perangkat PCR (Roboscreen GmbH, 2022).

C. Post analitik

1. Pelaporan hasil

Hasil dilaporkan dalam satuan IU/mL. Jika di bawah batas deteksi, dilaporkan sebagai "< LOD". Bila > batas linear, disarankan dilakukan pengenceran ulang (Roboscreen GmbH, 2022).

Modul Praktikum Virologi

2. Penanganan hasil tidak valid

Jika sistem memberikan hasil “invalid”, “error”, atau “no result”, maka perlu dilakukan langkah-langkah berikut:

- a. Periksa kontrol internal (IC):
 - a. Jika sinyal IC tidak muncul → kemungkinan ada inhibitor PCR atau gagal ekstraksi RNA.
 - b. Ulangi ekstraksi dan amplifikasi menggunakan sisa sampel atau lakukan re-ekstraksi dari spesimen baru.
- b. Periksa kondisi alat dan cartridge:
 - 1) Pastikan cartridge atau reagen kit masih dalam masa berlaku dan tersimpan sesuai suhu yang disarankan.
 - 2) Lakukan maintenance alat bila muncul error code spesifik (mengacu pada panduan pabrikan).
- c. Catat dan laporkan hasil sebagai “Invalid – perlu pemeriksaan ulang” dalam lembar hasil sementara, sampai hasil pengulangan diperoleh.

3. Sumber kesalahan pemeriksaan

- a. Inhibitor dalam sampel (misal lipid tinggi)
- b. Penggunaan plasma heparin
- c. Kesalahan pipet atau kontaminasi silang
- d. Perangkat tidak terkalibrasi
- e. Reagen yang tidak tersimpan sesuai suhu yang direkomendasikan (Roboscreen GmbH, 2022)

4. Jaminan mutu pemeriksaan

- a. Gunakan kontrol positif dan negatif setiap run
- b. Kontrol internal harus terdeteksi untuk memastikan validitas ekstraksi dan amplifikasi
- c. Nilai R^2 dari kurva standar harus ≥ 0.98 dan slope antara -3.10 hingga -3.60 (Roboscreen GmbH, 2022)

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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



EVALUASI

Bentuk Evaluasi :

1. Tugas

Tugas Praktikum: Anda adalah seorang analis laboratorium yang sedang melakukan pemeriksaan *viral load* HCV menggunakan metode RT-qPCR pada 5 sampel plasma pasien. Setelah menjalankan prosedur, Anda mendapatkan hasil sebagai berikut:

- **Sampel Pasien 1:** Kurva amplifikasi target HCV muncul dengan nilai **Cq 30**, dan kontrol internal (IC) berhasil diamplifikasi.
- **Sampel Pasien 2:** Tidak ada kurva amplifikasi untuk target HCV, dan kontrol internal (IC) juga tidak teramplifikasi.
- **Sampel Pasien 3:** Kurva amplifikasi target HCV muncul dengan nilai **Cq 38**, dan kontrol internal (IC) berhasil diamplifikasi.
- **Sampel Pasien 4:** Tidak ada kurva amplifikasi untuk target HCV, tetapi kontrol internal (IC) berhasil diamplifikasi.
- **Sampel Pasien 5:** Kurva amplifikasi target HCV muncul dengan nilai **Cq 24**, dan kontrol internal (IC) berhasil diamplifikasi.
- **Kontrol Positif (CP):** Kurva amplifikasi muncul pada nilai Cq yang diharapkan.
- **Kontrol Negatif (CN):** Tidak ada kurva amplifikasi.

Instruksi:

1. Berdasarkan data di atas, interpretasikan hasil pemeriksaan untuk setiap sampel pasien (positif/negatif, valid/invalid).
2. Jelaskan kesimpulan Anda mengenai performa *run* pemeriksaan ini. Apakah ada masalah yang perlu diatasi? Jika ya, sebutkan dan jelaskan solusinya.

2. Tes

1) Skenario:

Seorang analis melakukan pemeriksaan *viral load* HCV. Setelah proses RT-qPCR selesai, ia memeriksa hasilnya. Semua sampel pasien yang diuji (yang sebelumnya terdeteksi positif) dan kontrol positif menunjukkan kurva amplifikasi yang sangat baik. Namun, kontrol negatif menunjukkan kurva amplifikasi yang juga jelas, dengan nilai Cq 28.

Pertanyaan:

Apa kemungkinan terbesar penyebab munculnya hasil positif pada kontrol negatif?

Pilihan Jawaban:

- A. Adanya *inhibitor* dalam sampel kontrol.
- B. Virus pada sampel pasien memiliki *viral load* yang sangat tinggi.
- C. Terjadi kontaminasi silang pada reagen atau area kerja.
- D. Reagen PCR yang digunakan telah kedaluwarsa.
- E. Proses ekstraksi RNA tidak optimal.

Kunci Jawaban: C. Terjadi kontaminasi silang pada reagen atau area kerja.

2) Skenario:

Seorang analis menerima sampel plasma pasien untuk pemeriksaan *viral load* HCV. Secara visual, ia melihat sampel tersebut berwarna kuning pekat dan keruh (ikterik dan lipemik). Analis tetap melanjutkan pemeriksaan. Hasil RT-qPCR menunjukkan bahwa target gen HCV **tidak terdeteksi**, dan **kontrol internal (IC) gagal beramplifikasi**. Kontrol lainnya menunjukkan hasil yang valid.

Pertanyaan:

Mengapa kontrol internal (IC) pada sampel ini gagal beramplifikasi?

Pilihan Jawaban:

- A. Virus HCV tidak ada dalam sampel.
- B. Proses ekstraksi RNA tidak dilakukan dengan benar.
- C. Mesin RT-qPCR mengalami kerusakan.
- D. Adanya zat *inhibitor* dalam sampel pasien.
- E. Konsentrasi virus HCV terlalu rendah.

Kunci Jawaban: D. Adanya zat *inhibitor* dalam sampel pasien.

3) Skenario:

Dua pasien, A dan B, menjalani pemeriksaan *viral load* HCV. Pasien A memiliki hasil **10.000 IU/mL**, sedangkan Pasien B memiliki hasil **1.500.000 IU/mL**. Kedua pasien akan memulai terapi antivirus.

Pertanyaan:

Apa implikasi klinis yang paling signifikan dari perbedaan *viral load* kedua pasien ini?

Pilihan Jawaban:

- A. Pasien B lebih mungkin mengalami kegagalan terapi daripada Pasien A.
- B. Pasien B memiliki risiko penularan yang lebih tinggi daripada Pasien A.
- C. Pasien A memiliki infeksi akut, sedangkan Pasien B memiliki infeksi kronis.

Modul Praktikum Virologi

- D. Pasien B membutuhkan dosis obat yang lebih rendah daripada Pasien A.
- E. Kualitas spesimen Pasien A lebih baik daripada Pasien B.

Kunci Jawaban: B. Pasien B memiliki risiko penularan yang lebih tinggi daripada Pasien A.

3. Bobot Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

Penilaian akan dilakukan berdasarkan bobot berikut untuk mengukur kompetensi mahasiswa secara menyeluruh.

Aspek Penilaian	Bobot (%)	Kriteria Penilaian
Kognitif	30%	Pemahaman teori dasar, prinsip pemeriksaan, dan kemampuan menganalisis serta menginterpretasi data hasil uji.
Psikomotor	50%	Keterampilan teknis dalam melakukan prosedur laboratorium, termasuk ekstraksi RNA, penyiapan <i>master mix</i> , dan menjalankan mesin RT-qPCR.
Afektif	20%	Sikap selama praktikum, meliputi ketelitian, kedisiplinan, kepatuhan terhadap SOP, serta kesadaran akan keselamatan kerja.

RINGKASAN

Pemeriksaan kuantifikasi RNA HCV merupakan pemeriksaan esensial yang tidak hanya berperan dalam diagnosis dan monitoring infeksi hepatitis C, tetapi juga dalam pengambilan keputusan klinis, pemantauan respons terapi, dan evaluasi keberhasilan pengobatan. Dengan adanya perkembangan teknologi molekuler, pemeriksaan ini kini menjadi standar emas (gold standard) dalam penilaian infeksi HCV aktif dan manajemen pasien secara keseluruhan (Messina JP, 2015; RoboScreen GmbH, 2022).

DAFTAR PUSTAKA



1. Ansaldi F., et al. (2014) “Hepatitis C Virus in the New Era: Perspectives in Epidemiology, Prevention, Diagnostics and Predictors of Response to Therapy,” *World J Gastroenterol*, 20(29), pp. 9633–9652.
2. Baleriola C., et al. (2011) “Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Plasma Samples after Long-Term Storage at -20°C and -70°C ,” *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3163–3167.
3. Messina J.P., et al. (2015) “Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes,” *Hepatology*, 61(1), pp. 77–87.
4. RoboScreen GmbH (2022) *Manual RoboGene HCV RNA Quantification Kit 3.0 Rev. 6*. Leipzig, Germany: RoboScreen GmbH.
5. Simmonds, et al. (2017) “ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae,” *Journal of General Virology*, pp. 2–3.
6. World Health Organization (2017) *Guidelines on Hepatitis B and C Testing*.

BAB 6

PEMERIKSAAN VIRAL LOAD HBV

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu memahami prinsip pemeriksaan Viral Load HBV
2. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan Viral Load
3. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil pemeriksaan Viral Load

PENDAHULUAN

Hepatitis B adalah penyakit infeksi sistemik yang menyerang hati dan disebabkan oleh virus hepatitis B (HBV), sebuah virus DNA kecil yang termasuk dalam famili Hepadnaviridae. Virus ini memiliki kemampuan untuk menyebabkan infeksi akut maupun kronis. Infeksi akut dapat sembuh secara spontan, namun dalam sebagian kasus berkembang menjadi infeksi kronis yang dapat berlangsung selama bertahun-tahun dan meningkatkan risiko komplikasi serius, seperti sirosis hati dan hepatoseluler karsinoma (kanker hati primer). Menurut data Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), sekitar 296 juta orang hidup dengan infeksi hepatitis B kronis, dan hampir 820.000 kematian terjadi setiap tahun akibat komplikasinya (World Health Organization, 2017; Roboscreen GmbH, 2022).

Manajemen klinis hepatitis B tidak hanya bergantung pada deteksi keberadaan virus, tetapi juga pada kuantifikasi jumlah virus (viral load) yang beredar dalam darah pasien. Untuk itulah pemeriksaan HBV DNA viral load sangat diperlukan. Viral load mengacu pada jumlah materi genetik (DNA) HBV dalam satuan tertentu darah, biasanya dinyatakan dalam IU/mL (International Units per milliliter). Pemeriksaan ini menjadi indikator utama untuk menilai tingkat replikasi virus dan potensi infektivitas pasien (Roboscreen GmbH, 2022).

Pemeriksaan viral load HBV dilakukan dengan menggunakan teknologi molekuler, yaitu Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR). Metode ini bekerja dengan cara mengamplifikasi fragmen DNA spesifik dari genom HBV, biasanya dari gen S atau pre-core, menggunakan primer dan probe yang dirancang khusus. Sinyal fluoresensi yang dihasilkan selama proses amplifikasi diukur secara real time dan dikonversi menjadi jumlah DNA virus melalui kurva standar. Teknik ini memiliki sensitivitas tinggi, mampu mendeteksi viral load serendah 9 IU/mL dan

Modul Praktikum Virologi

secara linier dapat mengukur hingga $2,5 \times 10^9$ IU/mL atau lebih tergantung alat dan metode yang digunakan (Roboscreen GmbH, 2022). Tujuan utama dari pemeriksaan ini adalah untuk:

1. Menilai apakah infeksi HBV sedang dalam fase aktif atau tidak aktif.
2. Menentukan perlunya memulai atau menghentikan terapi antivirus.
3. Memonitor respons terhadap terapi, termasuk deteksi virologis awal dan keberhasilan pengobatan jangka panjang.
4. Mengidentifikasi risiko transmisi, terutama pada populasi risiko tinggi seperti ibu hamil atau pasien dengan ko-infeksi HIV (Mauss S, 2018).

Hasil pemeriksaan viral load menjadi dasar dalam pedoman klinis internasional, seperti AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) dan WHO, dalam penatalaksanaan hepatitis B. Misalnya, pasien dengan kadar HBV DNA di atas 2000 IU/mL disertai peningkatan enzim hati (ALT) secara persisten atau gambaran kerusakan hati pada biopsi berisiko lebih tinggi mengalami progresivitas penyakit dan dianjurkan untuk mendapat terapi antivirus (Mauss S, 2018; Roboscreen GmbH, 2022).

Selain itu, pemeriksaan viral load memiliki nilai prognostik. Pasien dengan viral load tinggi secara konsisten memiliki risiko lebih besar mengalami sirosis dan kanker hati dibandingkan pasien dengan viral load rendah atau tidak terdeteksi. Oleh karena itu, pengukuran kuantitatif HBV DNA secara berkala menjadi langkah esensial dalam pemantauan jangka panjang pasien hepatitis B (Roboscreen GmbH, 2022). Dari sisi teknis laboratorium, pelaksanaan pemeriksaan ini memerlukan tahap yang ketat mulai dari pemilihan dan penanganan sampel, prosedur ekstraksi asam nukleat, peracikan reagen PCR, hingga analisis dan interpretasi data. Validasi dan kontrol mutu menjadi komponen penting untuk menjamin akurasi hasil, mengingat peran strategis viral load dalam pengambilan keputusan klinis (Roboscreen GmbH, 2022). Dengan kompleksitas dan pentingnya peran pemeriksaan viral load HBV, laboratorium harus menjamin bahwa metode yang digunakan telah tervalidasi secara klinis, memiliki akurasi dan presisi yang tinggi, serta didukung oleh prosedur mutu yang ketat. Hal ini menjadikan pemeriksaan viral load bukan hanya sebagai alat diagnostik, tetapi juga sebagai fondasi dalam strategi pengobatan dan pencegahan komplikasi infeksi HBV (Roboscreen GmbH, 2022).

Kemungkinan kesalahan dapat terjadi pada berbagai tahap:

- a. Pra-analitik: 1) Penggunaan jenis sampel yang tidak sesuai (misal: plasma heparin). 2) Penyimpanan sampel tidak benar (suhu, waktu).
- b. Analitik: 1) Kesalahan pipet atau kontaminasi silang. 2) Reagen rusak karena penyimpanan yang tidak sesuai. 3) Program PCR tidak sesuai. 4) Inhibitor dalam sampel (misal: lipemik, hemolitik).

Modul Praktikum Virologi

- c. Post-analitik: 1) Interpretasi kurva tidak akurat. 2) Salah penetapan threshold Ct atau kurva standar tidak valid.

Jaminan mutu pemeriksaan (Roboscreen GmbH, 2022) untuk menjaga mutu hasil pemeriksaan:

- a. Lakukan kontrol internal (IC) pada setiap sampel untuk mendeteksi kegagalan ekstraksi atau adanya inhibitor PCR.
- b. Gunakan kontrol positif dan negatif dalam setiap batch pemeriksaan.
- c. Validasi run PCR dilakukan dengan memeriksa: Slope kurva standar: $-3,1$ sampai $-3,6$. Dan R^2 (koefisien regresi): $\geq 0,98$.
- d. Lakukan kalibrasi berkala pada alat PCR dan pipet.
- e. Dokumentasikan semua langkah pemeriksaan dan hasil kontrol mutu.



PRAKTIKUM

A. Pra analitik

1. Tujuan Pemeriksaan

Pemeriksaan ini bertujuan untuk menentukan jumlah DNA virus Hepatitis B (HBV) dalam darah pasien secara kuantitatif (Roboscreen GmbH, 2022). Pemeriksaan digunakan dalam:

- a. Pemantauan klinis pasien hepatitis B kronis.
- b. Evaluasi respons terhadap terapi antivirus, dengan melihat perubahan jumlah virus.
- c. Menilai kemungkinan respon virologis yang berkelanjutan.
- d. Menentukan perlunya terapi antivirus berdasarkan tingkat replikasi virus

2. Metode

Metode yang digunakan adalah Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) berbasis TaqMan®, suatu teknik molekuler yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi dan mengukur DNA virus secara kuantitatif (Roboscreen GmbH, 2022).

3. Prinsip

Pemeriksaan berbasis prinsip amplifikasi DNA target (gen HBV) menggunakan primer dan probe spesifik yang dilabeli dengan zat fluoresen. Ketika DNA HBV hadir, sinyal fluoresen akan meningkat secara proporsional dengan jumlah DNA yang diamplifikasi, memungkinkan kuantifikasi secara langsung selama siklus PCR berlangsung (Roboscreen GmbH, 2022).

Modul Praktikum Virologi

4. Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel (Baleriola C., 2011; World Health Organization, 2017)
 - a. Jenis sampel: Plasma (EDTA atau sitrat) dan serum.
 - b. Volume darah: 5–10 mL.
 - c. Kriteria pengambilan dan penyimpanan:
 - 1) Gunakan tabung koleksi standar.
 - 2) Untuk serum, biarkan darah menggumpal ± 30 menit sebelum disentrifugasi pada $1.000\text{--}2.000 \times g$ selama 10 menit.
 - 3) Untuk plasma, lakukan sentrifugasi segera setelah pengambilan.
 - 4) Hindari penggunaan antikoagulan heparin karena dapat menghambat PCR.
 - 5) Simpan pada suhu $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk jangka pendek (maksimal 5 hari), atau beku pada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk penyimpanan lebih lama.
 - 6) Hindari pembekuan dan pencairan berulang.
5. Alat dan bahan (Roboscreen GmbH, 2022)
 - a. Alat:
 - 1) Instrumen Real-Time PCR (berbagai platform kompatibel).
 - 2) Pipet dan tip filter steril.
 - 3) Mikrosentrifus dan centrifuge pelat.
 - 4) Vortex dan thermal mixer.
 - 5) Tabung mikro 1,5 mL dan 2,0 mL.
 - b. Bahan:
 - 1) Reagen ekstraksi asam nukleat (manual atau otomatis).
 - 2) Enzim DNA polimerase.
 - 3) Primer dan probe spesifik untuk gen S HBV.
 - 4) Standar kuantifikasi DNA HBV (dikalibrasi terhadap standar WHO).
 - 5) Kontrol internal (internal control) untuk mendeteksi kegagalan ekstraksi atau inhibisi PCR.
 - 6) Kontrol positif (HBV DNA terstandarisasi).
 - 7) Kontrol negatif (plasma/serum bebas HBV).

B. Analitik

1. Prosedur kerja (Baleriola C., 2011; World Health Organization, 2017)
 - a. Ekstraksi DNA
 - 1) Volume sampel: 400 μ L serum atau plasma.
 - 2) Tambahkan kontrol internal (IC) ke dalam sampel untuk memantau efisiensi ekstraksi dan mendeteksi inhibitor.
 - 3) Lakukan ekstraksi DNA menggunakan metode manual atau otomatis, sesuai instruksi kit ekstraksi asam nukleat.
 - b. Persiapan Reaksi PCR
 - 1) Siapkan Master Mix yang mengandung enzim polimerase, primer dan probe spesifik gen HBV, serta buffer PCR.
 - 2) Tambahkan 10 μ L DNA hasil ekstraksi ke dalam 15 μ L Master Mix (total volume 25 μ L per reaksi).
 - 3) Sertakan standar kuantifikasi (4 tingkat), kontrol negatif (NTC), dan kontrol positif.
 - c. Protokol PCR (Real-Time)
 - 1) Reverse Transcription: 47 $^{\circ}$ C, 15 menit
 - 2) Aktivasi Enzim: 95 $^{\circ}$ C, 2 menit
 - 3) 45 siklus: Denaturasi: 95 $^{\circ}$ C, 15 detik dan Annealing/Elongasi: 57 $^{\circ}$ C, 1 menit (dengan akuisisi data fluoresensi)
 - d. Interpretasi Hasil
 - 1) Kanal fluoresensi FAM: mendeteksi DNA HBV
 - 2) Kanal VIC/JOE/Cy5: mendeteksi kontrol internal
 - 3) Hasil dalam bentuk Ct (Cycle threshold) akan dikonversi ke IU/mL menggunakan kurva standar.
2. Nilai Normal (Roboscreen GmbH, 2022)
 - a. Negatif: HBV DNA tidak terdeteksi (tidak ada sinyal pada kanal FAM).
 - b. Nilai normal pada populasi sehat adalah tidak terdeteksinya HBV DNA.
3. Nilai Kritis (Roboscreen GmbH, 2022)

Nilai $> 2,5 \times 10^9$ IU/mL: Melebihi batas linier alat, perlu dilakukan dilusi ulang dan pemeriksaan kembali.

Modul Praktikum Virologi

4. Perhitungan (Roboscreen GmbH, 2022)

- a. Kuantifikasi dilakukan otomatis oleh perangkat lunak PCR berdasarkan kurva standar.
- b. Empat standar digunakan dengan konsentrasi:
 - 1) STD1 = 25.000.000 IU/mL
 - 2) STD2 = 250.000 IU/mL
 - 3) STD3 = 2.500 IU/mL
 - 4) STD4 = 250 IU/mL
- c. Konsentrasi DNA HBV ditentukan dari kurva regresi log-linear antara nilai Ct dan log konsentrasi standar.

C. Post analitik

1. Pelaporan hasil (Roboscreen GmbH, 2022)

- a. Satuan hasil: IU/mL (International Units per milliliter).
- b. Hasil dilaporkan secara kuantitatif jika berada dalam rentang linear (9 IU/mL – $2,5 \times 10^9$ IU/mL).
- c. Jika hasil:
 - 1) Tidak terdeteksi → dilaporkan sebagai “HBV DNA tidak terdeteksi”.
 - 2) < LLOQ (Limit of Quantification) → “HBV DNA terdeteksi, namun di bawah batas kuantifikasi”.
 - 3) > ULOQ (Upper Limit of Quantification) → “Konsentrasi melebihi batas atas kuantifikasi, dianjurkan dilusi sampel dan uji ulang”.
- d. Hasil valid jika kontrol internal menunjukkan amplifikasi normal dan kurva standar memenuhi kriteria validasi (slope –3,1 s/d –3,6 dan $R^2 \geq 0,98$).

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Hasil	: Data pasien

Yogyakarta,

20...

Pembimbing

Praktikan

(

)

(

)



EVALUASI

Bentuk Evaluasi :

1. Tugas

Tugas Praktikum: Anda adalah seorang analis laboratorium yang sedang melakukan pemeriksaan *viral load* HBV menggunakan metode RT-qPCR pada 5 sampel plasma pasien. Setelah menjalankan prosedur, Anda mendapatkan hasil sebagai berikut:

- **Sampel Pasien 1 & 2:** Kurva amplifikasi target HBV muncul dengan nilai **Cq 32**, dan kontrol internal (IC) berhasil diamplifikasi.
- **Sampel Pasien 3:** Kurva amplifikasi target HBV muncul dengan nilai **Cq 20**, dan kontrol internal (IC) berhasil diamplifikasi.
- **Sampel Pasien 4:** Tidak ada kurva amplifikasi untuk target HBV, namun kurva amplifikasi untuk kontrol internal (IC) muncul pada nilai Cq yang diharapkan.
- **Sampel Pasien 5:** Tidak ada kurva amplifikasi untuk target HBV maupun kontrol internal (IC).
- **Kontrol Positif (CP):** Kurva amplifikasi muncul pada nilai Cq yang diharapkan.
- **Kontrol Negatif (CN):** Tidak ada kurva amplifikasi.

Instruksi:

1. Berdasarkan data di atas, interpretasikan hasil pemeriksaan untuk setiap sampel pasien (positif/negatif, valid/invalid).
2. Jelaskan kesimpulan Anda mengenai performa *run* pemeriksaan ini. Apakah ada masalah yang perlu diatasi? Jika ya, sebutkan dan jelaskan solusinya.

2. Tes

1) Skenario:

Seorang analis melakukan pemeriksaan *viral load* HBV. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa Sampel A memiliki nilai **Cq 30**, sementara Sampel B memiliki nilai **Cq 18**. Kedua sampel memiliki hasil kontrol internal yang valid.

Pertanyaan:

Berdasarkan hasil tersebut, manakah pernyataan yang paling tepat terkait interpretasi *viral load* kedua sampel?

Modul Praktikum Virologi

Pilihan Jawaban:

- A. Sampel A memiliki *viral load* lebih tinggi daripada Sampel B.
- B. Sampel B memiliki *viral load* lebih tinggi daripada Sampel A.
- C. Sampel A dan Sampel B memiliki *viral load* yang sama.
- D. Kedua sampel menunjukkan hasil negatif.
- E. Hanya Sampel A yang memiliki hasil yang valid.

Kunci Jawaban: B. Sampel B memiliki *viral load* lebih tinggi daripada Sampel A.

2) **Skenario:**

Setelah selesai melakukan pemeriksaan RT-qPCR, seorang analis memeriksa hasilnya. Semua sampel pasien yang diuji (yang sebelumnya terdeteksi positif) dan kontrol positif menunjukkan kurva amplifikasi yang sangat baik. Namun, kontrol negatif menunjukkan kurva amplifikasi yang juga jelas, dengan nilai Cq 28.

Pertanyaan:

Apa kemungkinan terbesar penyebab munculnya hasil positif pada kontrol negatif?

Pilihan Jawaban:

- A. Adanya inhibitor dalam sampel kontrol.
- B. Virus pada sampel pasien memiliki *viral load* yang sangat tinggi.
- C. Terjadi kontaminasi silang pada reagen atau area kerja.
- D. Reagen PCR yang digunakan sudah tidak valid atau kedaluwarsa.
- E. Proses ekstraksi DNA tidak optimal.

Kunci Jawaban: C. Terjadi kontaminasi silang pada reagen atau area kerja.

3) **Skenario:**

Seorang analis mendapatkan hasil "Invalid" untuk sampel pasien. Pemeriksaan menunjukkan bahwa target gen HBV **tidak terdeteksi**, dan **kontrol internal (IC) juga gagal beramplifikasi**. Sumur kontrol lainnya menunjukkan performa yang normal.

Pertanyaan:

Apa makna klinis dari hasil ini?

Pilihan Jawaban:

- A. Pasien memiliki *viral load* yang sangat rendah.
- B. Sampel pasien benar-benar negatif HBV.
- C. Terdapat zat *inhibitor* dalam spesimen yang mengganggu reaksi PCR.
- D. Virus pada sampel telah mengalami degradasi.
- E. Terjadi kesalahan pada saat pengambilan spesimen.

Kunci Jawaban: C. Terdapat zat *inhibitor* dalam spesimen yang mengganggu reaksi PCR.

Modul Praktikum Virologi

3. Bobot Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

Penilaian akan dilakukan berdasarkan bobot berikut untuk mengukur kompetensi mahasiswa secara menyeluruh.

Aspek Penilaian	Bobot (%)	Kriteria Penilaian
Kognitif	30%	Pemahaman teori dasar, prinsip pemeriksaan, dan kemampuan menganalisis serta menginterpretasi data hasil uji.
Psikomotor	50%	Keterampilan teknis dalam melakukan prosedur laboratorium, termasuk ekstraksi DNA, penyiapan <i>master mix</i> , dan menjalankan mesin RT-qPCR.
Afektif	20%	Sikap selama praktikum, meliputi ketelitian, kedisiplinan, kepatuhan terhadap SOP, serta kesadaran akan keselamatan kerja.



RINGKASAN

Kompleksitas dan pentingnya peran pemeriksaan viral load HBV, laboratorium harus menjamin bahwa metode yang digunakan telah tervalidasi secara klinis, memiliki akurasi dan presisi yang tinggi, serta didukung oleh prosedur mutu yang ketat. Hal ini menjadikan pemeriksaan viral load bukan hanya sebagai alat diagnostik, tetapi juga sebagai fondasi dalam strategi pengobatan dan pencegahan komplikasi infeksi HBV.



DAFTAR PUSTAKA

1. Baleriola C., et al. (2011) 'Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Plasma Samples after Long-Term Storage at -20°C and -70°C ', *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3163–3167.
2. Mauss S., et al. (2018) *Hepatology – A Clinical Textbook. 9th ed.* 9th edn. Düsseldorf: Flying Publisher.
3. Roboscreen GmbH (2022) *Instruction for use: HBV DNA Quantification Kit 3.0 (Rev. 3)*. Leipzig, Germany: Roboscreen GmbH.
4. World Health Organization (2017) *Guidelines on Hepatitis B and C Testing*.

BAB 7

PEMERIKSAAN VIRAL LOAD HIV

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu memahami pengertian viral load virus HIV
2. Mahasiswa mampu memahami dan melakukan pemeriksaan viral load virus HIV metode real time RT-PCR
3. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil pemeriksaan qRT-PCR HIV

PENDAHULUAN

HIV menjadi masalah infeksi serius yang dialami dunia, terutama di Indonesia. Dalam beberapa tahun terakhir, upaya terpadu melalui kampanye pencegahan HIV dan peningkatan aksesibilitas terapi antiretroviral telah berhasil menekan insiden infeksi HIV (Ngo-Malabo et al. 2017, Christopherson et al. 2000). Meskipun demikian, kasus HIV baru terus muncul setiap hari. Oleh karena itu, diagnosis dini dan pengobatan infeksi HIV sangat penting untuk mengurangi *Viral load* (VL) secepat mungkin, dan dengan demikian membantu mengurangi penularan virus, morbiditas, dan mortalitas (Parekh et al. 2018, WHO 2018). Terutama pada neonatus yang terinfeksi HIV, diagnosis dini dapat berdampak langsung pada perkembangan penyakit karena sistem kekebalan mereka masih berkembang. Intervensi waktu yang tepat dengan terapi antiretroviral (ART) meningkatkan kesehatan langsung anak, memastikan kualitas hidup yang lebih tinggi dan prognosis jangka panjang yang lebih baik (Palmer et al. 2008).

Beberapa teknik berbasis imunologi telah banyak digunakan untuk diagnosis HIV. Tes generasi ketiga yang banyak digunakan saat ini dapat memberikan hasil negatif palsu sekitar 2–3 minggu setelah infeksi karena mendeteksi ada atau tidaknya antibodi IgG dan IgM HIV (Lewin & Rouzioux 2011, Chomont et al. 2009). Kit uji diagnostik HIV generasi keempat yang disetujui FDA, yang menyertakan antigen HIV p24 dalam pengujiannya, telah mengurangi periode jendela negatif uji menjadi 2 minggu (Eisele et al. 2012). Keterlambatan

deteksi ini sangat signifikan bagi neonatus, yang respons imunnya mungkin kurang berkembang, sehingga menyebabkan periode jendela yang lebih panjang.

Teknik yang memiliki performa lebih baik, berbasis molekuler telah dikembangkan untuk penerapan sensitivitas dari kelemahan deteksi antigen/antibodi. RNA HIV dapat dideteksi sekitar 7 hari sebelum peningkatan antigen p24, dan sekitar 12 hari sebelum deteksi antibodi (Vandergeeten et al. 2014). Saat ini, VL digunakan untuk memprediksi perkembangan infeksi HIV-1, dan juga telah digunakan untuk konfirmasi infeksi HIV baru dengan ambang batas yang lebih baik daripada jalur pengujian HIV standar (Laird et al. 2016). Sedangkan penggunaan RNA genomik atau NAAT harus didorong secara luas untuk deteksi HIV dini. Pemeriksaan RNA HIV ini menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang secara prinsip bertujuan untuk mengamplifikasi molekul RNA/DNA virus HIV (Kibirige et al. 2022).

Metode Real Time RT PCR

Real-Time PCR juga dikenal sebagai PCR kuantitatif, adalah modifikasi dari strategi PCR yang memungkinkan pemantauan kemajuan PC itu sendiri dengan cara proses enzimatik yang digunakan secara *in vitro* untuk amplifikasi daerah DNA yang dipilih melalui beberapa siklus, menghasilkan ribuan hingga jutaan salinan segmen DNA tertentu. Bahan-bahan yang dibutuhkan meliputi DNA cetakan (sampel), primer, nukleotida (dNTP), dan DNA polimerase termostabil (Arya et al. 2005, Artika et al. 2020). Selain peningkatan akurasi, sensitivitas, dan kecepatan, salah satu keuntungan utama RT PCR dibandingkan PCR dasar adalah bahwa teknik ini menyediakan hubungan kuantifikasi yang andal antara jumlah nukleotida awal (sebelum amplifikasi dengan PCR) dan jumlah ampikon yang terakumulasi dalam siklus PCR tertentu (Arya et al. 2005). Hal ini sangat penting untuk kuantifikasi asam nukleat target yang tepat dan untuk kuantifikasi mRNA dalam analisis ekspresi gen (Rocha et al. 2016) juga penentuan viral load dari spesimen klinis (Riswari et al. 2016). Selain itu, proses RT-PCR tidak memerlukan proses pasca-PCR (elektroforesis), sehingga meminimalkan kemungkinan kontaminasi silang akibat ampikon sebelumnya (Arya et al. 2005). Oleh karena itu, teknik RT-PCR ini telah memajukan teknik deteksi dan kuantifikasi asam nukleat target sehingga telah digunakan untuk berbagai macam aplikasi (Deepak et al. 2007).

Sumber kesalahan pemeriksaan, Sumber kesalahan dapat terjadi pada fase pra-analitik, analitik maupun pasca analitik. Dampak kesalahan sangat berpengaruh terhadap hasil.

1. Fase Pra-Analitik :

a. Pengambilan Sampel :

- 1) **Kualitas Sampel (Kuantitatif):** Pengambilan sampel yang tidak adekuat (misalnya, swab terlalu kering, tidak cukup sel) akan menghasilkan *viral load* yang lebih rendah dari sebenarnya (*underestimation*) atau bahkan negatif palsu. Untuk *viral load*, konsistensi volume dan teknik sangat penting.
- 2) **Kontaminasi:** Kontaminasi dari lingkungan atau antar sampel dapat menyebabkan positif palsu pada kualitatif dan *viral load* yang terukur lebih tinggi dari sebenarnya (*overestimation*) pada kuantitatif.

b. **Kesalahan Identifikasi Sampel:** Kesalahan ini sangat fatal, menyebabkan hasil yang salah dilaporkan ke pasien.

2. Fase Analitik:

a. Kualitas Reagen:

- 1) **Degradasi/Kontaminasi Reagen:** Primer, probe, enzim, atau master mix yang rusak/terkontaminasi akan mengurangi efisiensi amplifikasi, menyebabkan negatif palsu, inkonklusif, atau hasil *viral load* yang tidak akurat.
- 2) **Kurva Standar (Kuantitatif):** Kesalahan dalam preparasi atau kualitas *template* standar untuk kurva kuantifikasi akan secara langsung memengaruhi akurasi nilai *viral load* yang dilaporkan.

b. Kondisi Reaksi PCR:

- 1) **Parameter Termal:** Suhu dan waktu siklus yang tidak optimal pada termosiklus akan mempengaruhi efisiensi amplifikasi.
- 2) **Pipetting Errors:** Ketidakakuratan volume reagen atau sampel (misalnya, akibat pipet tidak terkalibrasi) dapat mengubah konsentrasi komponen reaksi, memengaruhi efisiensi dan akurasi kuantifikasi.

c. **Kontaminasi di Laboratorium:** Kontaminasi silang DNA/RNA dari sampel positif sebelumnya atau produk amplifikasi dapat menyebabkan positif palsu pada kualitatif dan *overestimation* pada kuantitatif. Desain alur kerja laboratorium (*unidirectional flow*), penggunaan area bersih/kotor, dan praktik dekontaminasi yang sesuai standar sangat penting.

3. Fase Pasca-Analitik :

a. Interpretasi Data :

- 1) **Kualitatif** : Salah menginterpretasi kurva amplifikasi atau nilai Ct (misalnya, menganggap artefak sebagai sinyal positif).
- 2) **Kuantitatif** : Kesalahan dalam penentuan baseline dan threshold, pemilihan range untuk kurva standar, atau analisis data lainnya dapat menghasilkan nilai *viral load* yang tidak akurat.
- 3) **Kesalahan Pencatatan/Transkripsi**: Kelalaian saat memasukkan data ke sistem informasi laboratorium (LIS) atau mencatat secara manual.

Jaminan mutu pemeriksaan, saat jaminan mutu pemeriksaan hal yang diperhatikan adalah sebagai berikut:

1. **Kontrol Positif: Kualitatif & Kuantitatif**, menggunakan materi genetik virus HIV dengan konsentrasi target yang diketahui. Untuk kuantitatif, biasanya ada serangkaian kontrol positif dengan konsentrasi berbeda untuk memverifikasi rentang linearitas kurva standar dan presisi pengukuran pada berbagai tingkat *viral load*. Kegagalan kontrol positif mengindikasikan masalah reagen, alat, atau proses.
2. **Kontrol Negatif (NTC - No Template Control), Kualitatif & Kuantitatif**: Mengandung semua komponen reaksi PCR kecuali *template* asam nukleat. Amplifikasi pada NTC menunjukkan kontaminasi reagen atau lingkungan dan hasil pengujian tidak valid.
3. **Kontrol Internal (IC/IPC), Kualitatif & Kuantitatif**: Sangat penting untuk mendeteksi *inhibition* dan efisiensi ekstraksi. Materi genetik non-target (misalnya, gen seluler manusia seperti RNase P, atau sekuens eksternal yang ditambahkan) diekstraksi dan diamplifikasi bersamaan dengan target virus.
4. **Pada Viral Load**, Kegagalan IC pada sampel dengan hasil negatif atau *viral load* sangat rendah mengindikasikan masalah pada sampel itu sendiri (misalnya, kualitas sampel buruk, adanya inhibitor), bukan berarti virus tidak ada. Jika IC tidak teramplifikasi, hasil tersebut dianggap invalid.



A. Pemeriksaan VL HIV ini menggunakan kit HIV Quantitative Real-Time PCR Kit dari DNA-Technology, Moscow, Russia

B. Pengambilan sampel

1. Alat dan bahan dalam pengambilan sampel

b. Spesimen Darah/Serum

- 1) Tourniquet
- 2) Spuit disposable atau 5 ml system vacutainer
- 3) Kapas alkohol 70%
- 4) Kapas kering
- 5) Vial 1,8 ml atau tabung tutup ulir
- 6) Marker atau label ID
- 7) Tabung EDTA 2.0 mg/ml (Tabung sodium citrate juga diperbolehkan, tetapi tidak diizinkan dengan tabung heparin)

2. Pengambilan sampel darah

- a. Memastikan identitas pasien sudah benar dan sesuai.
- b. Menjelaskan tindakan swab nasal yang akan dilakukan beserta risiko efek samping.
- c. Mencuci tangan dan memakai APD sesuai dengan standar operasional (SOP).
- d. Memposisikan pasien duduk
- e. Pengambilan darah dengan volume berkisar antara 2.0 – 4.0 mL

3. Penyimpanan sampel darah

- a. Penyimpanan tidak diizinkan melebihi 6 jam
- b. Penyimpanan dan pemindahan sampel darah harus dalam suhu 2 - 8°C
- c. Darah tidak boleh dalam keadaan beku

C. Pemeriksaan metode real time RT-PCR

1. Pra analitik

a. Tujuan Pemeriksaan

Tujuan dari pemeriksaan real time RT-PCR ialah mendeteksi RNA dari virus HIV dan mengukur jumlah materi genetik virus SARS-CoV-2 dalam suatu spesimen,

b. Metode

Metode real time *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR)

c. Prinsip

Pada RT-PCR material genetik RNA diubah menjadi cDNA dengan menggunakan enzim *reverse transcription* (RT). Formasi hibridisasi RNA akan membentuk untai pertama cDNA untuk kemudian akan diamplifikasi pada proses PCR. Amplifikasi RNA virus yang telah diubah menjadi DNA melalui reverse transcription, dengan deteksi secara *real-time* menggunakan fluorofor.

2. Analitik

a. Ekstraksi RNA

1) Kit

HIV Quantitative Real-Time PCR Kit dari DNA-Technology, Moscow, Russia.

2) Peralatan

- 1) Vortex
- 2) Sentrifuge
- 3) Mikropipet (1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l)
- 4) BSC Class-II

3) Prosedur manual

1. Untuk memperoleh plasma, putar tabung berisi darah pada 800-1600 x g (setara dengan 3000 rpm pada Sentrifus Eppendorf 5424) selama 20 menit pada suhu ruangan (antara 18 °C dan 25 °C).
2. Ambil fraksi atas (plasma) dengan alat pengambil sampel otomatis dan masukkan ke dalam tabung 1,5 mL yang baru. Plasma darah dapat disimpan pada suhu minus 18 °C hingga minus 22 °C selama tidak lebih dari 3 bulan.
3. Tandai 1,5 mL tabung baru dengan 2 tabung per sampel yang akan diujikan, 1 tabung untuk control negative, 3 tabung untuk ST1, dan 3 tabung untuk ST2. Sebagai contoh, untuk 10 sampel, tandai sebanyak 27 tabung (20 untuk sampel, 1 untuk control negative, 3 untuk ST1, dan 3 untuk ST2)
4. Tambahkan 10 μ l premixed RNA-internal control untuk setiap tabung (kecuali ST1 dan ST2)
5. Tambahkan 300 μ l lysis buffer
6. Tambahkan 100 μ l plasma darah sampel ke dalam tabung. Jangan menambahkan sampel dengan control negative, ST1, ST2.
7. Tambahkan 100 μ l control negative, ST1, ST2 ke masing-masing tabungnya.
8. Vorteks tabung secara maksimal 3-5 detik, kemudian spin down selama 3-5 detik.

Modul Praktikum Virologi

9. Inkubasi tabung selama 15 menit pada 65°C, spin down pada 16000 x g selama 30 detik.
10. Tambahkan 400 µl precipitation buffer ke dalam setiap tabung. Vorteks secara maksimal selama 3-5 detik sebanyak 2 kali.
11. Sentrifus tabung pada 16000 x g selama 15 menit.
12. Buang supernatant
13. Tambahkan 500 µl washout solution No 1 pada endapan. Vorteks tabung selama 3-5 detik. Invert (bolak-balik) tabung.
14. Sentrifus tabung pada 16000 x g selama 5 menit.
15. Buang supernatant.
16. Tambahkan 300 µl washout solution No 2 pada endapan. Vorteks secara perlahan.
17. Sentrifus tabung pada 16000 x g selama 5 menit pada suhu ruang.
18. Buang supernatant.
19. Keringkan endapan dengan membuka tabung pada 65 C selama 5 menit.
20. Tambahkan 16,5 µl dilution buffer pada endapan. Spin down selama 3-5 detik.
21. Inkubasi tabung selama 10 menit pada 65 C.
22. Spin down pada 16000 x g selama 30 detik.

b. Prosedur Transkripsi Balik

1) Acuan

HIV Quantitative Real-Time PCR Kit dari DNA-Technology, Moscow, Russia

2) Prosedur kerja

- a) Siapkan reagen reverse transkripsi dengan campuran sebagai berikut

Komponen	Volume (µl)
RT-Buffer	2
RT-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV	1
Reverse transkriptase	0,5
Total	3,5

- b) Vorteks campuran RT (RT mix) dan *spin down* selama 3-5 detik pada suhu ruang.
- c) Tambahkan 3,5 µl RT Mix ke tabung yang berisi RNA sampel dan C-, ST1, ST2. Kemudian vorteks tabung dan spin down.

Modul Praktikum Virologi

- d) Masukkan tabung ke mesin termostat (dapat juga mesin PCR) selama 30 menit pada suhu 40 °C, kemudian 5 menit pada suhu 95 °C.
- e) Spin down dengan sentrifus tabung pada 16000 x g selama 30 detik.
- f) cDNA siap untuk dilakukan PCR.

c. Prosedur RT-PCR

1) Kit

HIV Quantitative Real-Time PCR Kit dari DNA-Technology, Moscow, Russia

2) Prosedur kerja

- a) Siapkan reagen RT-PCR sebagai berikut

Komponen	Volume (µl)
PCR Buffer	10
TECHNO Taq-polymerase	0,5
Total	10,5

- b) Vorteks campuran PCR (PCR mix) dan spin down selama 3-5 detik pada suhu ruang.
- c) PCR mix hanya dapat disimpan maksimal 1 jam pada suhu 2-8 °C.
- d) Masukkan 10 µl PCR Mix ke dalam tabung, kemudian masukkan 20 µl mineral oil, vorteks
- e) Masukkan 5 µl cDNA sampel ke masing-masing tabung berisi campuran di atas. Vorteks dan spin down.
- f) Masukkan reaksi RT-PCR ke dalam mesin PCR dengan kondisi sebagai berikut

Cycling	Temperature	Hold Time	Cycle Repeats
Cycling	80 °C	300 sec	1 time
Cycling 2	94 °C	10 sec	50 times
	54 °C	5 sec	
	58 °C ¹	25 sec	
	64 °C	20 sec	

g) Berikut adalah interpretasi hasil untuk kontrol negatif, kontrol positif, dan internal kontrol

Control	The controlled step	Result		Interpretation
		Specific signal is present	Specific signal is absent	
C+	PCR	+	+	Valid
		-	-	Invalid
C-	PCR, RT and RNA extraction	+	+	Invalid
		-	-	Valid
RNA-IC	PCR, RT and RNA extraction	+	+	Valid
		-	-	Valid
			-	Invalid

3) Analisis data dan interpretasi *Cycle threshold (CT)*

(a) Nilai Normal

Tabel 7.1 Nilai Normal Ct Value

Ct Value	Estimasi Viral Load	Interpretasi
< 20	> 10 ⁷ copies/mL	Sangat tinggi (kritis)
20–25	10 ⁶ – 10 ⁷ copies/mL	Tinggi (potensi kritis)
25–30	10 ⁴ – 10 ⁶ copies/mL	Sedang
> 35	< 10 ³ copies/mL (atau negatif)	Rendah/sisa RNA

(b) Nilai Kritis

- Ct < 25 dan/atau Viral Load > 1 juta copies/mL
- Pasien dalam lingkungan rawan (RS, panti jompo, ICU, ruang tertutup)
- Terjadi lonjakan viral load mendadak
- Kombinasi viral load tinggi dan gejala berat

Berikut adalah interpretasi hasil pada manual

Detection channel		Interpretation
Fam/Green copies/mL	Hex/Yellow Cp (Ct) ²	
Test samples		
$5.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^8$	Not considered	Positive with specified viral load (copies/mL)
Less than 5.0×10^2	Not considered	Positive with notification «Less than 500 copies/mL» (no specified value)
More than 1.0×10^8	Not considered	Positive with notification «More than 1.0×10^8 copies/mL» (no specified value)
Not specified (for iQ N/A)	Cp 29-34 (for iQ5 Ct 29-34, for Rotor-Gene Ct ≤ 36)	Negative
Not specified (for iQ N/A)	Not specified (for iQ N/A, for Rotor-Gene N/A or Ct > 36)	Uncertain
C+		
$2.0 \times 10^5 - 9.0 \times 10^5$ *	Not considered	Positive with specified viral load (copies/mL)
C-		
Not specified (for iQ N/A)	Cp 29-34 (for iQ5 Ct 29-34, for Rotor-Gene Ct < 36)	Negative

3. Post analitik

1) Pelaporan hasil

- a) **Format Pelaporan:** Selain informasi dasar pasien dan sampel, harus mencakup: Unit Pengukuran: Misalnya, kopi/mL (copies/mL), IU/mL (International Units/mL), atau Log₁₀ kopi/mL.
- b) Nilai Kuantitatif: Angka spesifik *viral load* yang terukur.
- c) Batas deteksi (LOD - *Limit of Detection*) dan batas kuantifikasi (LOQ - *Limit of Quantification*): Menyatakan batas terendah yang dapat dideteksi dan diukur secara akurat oleh metode tersebut.

2) Interpretasi Hasil:

- 1) **Terdeteksi dan Terkuantifikasi:** *Viral load* terukur di atas LOQ. Contoh: "HIV *viral load* = 1.5×10^5 copies/mL".
- 2) **Terdeteksi tapi Tidak Terkuantifikasi:** *Viral load* terdeteksi tetapi berada di antara LOD dan LOQ. Contoh: "HIV terdeteksi, *viral load* < LOQ". Ini menunjukkan adanya virus, tetapi jumlahnya terlalu rendah untuk diukur secara presisi.
- 3) **Tidak Terdeteksi:** *Viral load* di bawah LOD. Contoh: "Tidak terdeteksi HIV". Penting untuk memastikan kontrol internal berhasil teramplifikasi.

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Modul Praktikum Virologi

Hasil	:	Data pasien
Kesimpulan	:	

Pembimbing

Praktikan

20...

() ()



EVALUASI

A. Tugas

Seorang ATLM sedang melakukan pemeriksaan *viral load* HIV menggunakan metode RT-qPCR pada 4 sampel plasma pasien. Setelah menjalankan prosedur, ATLM mendapatkan hasil sebagai berikut:

- **Sampel Pasien 1:** Kurva amplifikasi target HIV muncul dengan Ct 17
 - **Sampel Pasien 2:** Kurva amplifikasi target HIV muncul dengan Ct 22
 - **Sampel Pasien 3:** Kurva amplifikasi target HIV muncul dengan Ct 27
 - **Sampel Pasien 4:** Kurva amplifikasi target HIV muncul dengan Ct 32
 - **Kontrol Positif (CP):** Kurva amplifikasi muncul pada nilai Ct yang diharapkan.
 - **Kontrol Negatif (CN):** Tidak ada kurva amplifikasi.
1. Berdasarkan data di atas, interpretasikan hasil pemeriksaan untuk setiap sampel pasien (positif/negatif, valid/invalid).
 2. Jelaskan kesimpulan Anda mengenai performa *run* pemeriksaan ini. Apakah ada masalah yang perlu diatasi? Jika ya, sebutkan dan jelaskan solusinya.

B. Tes

Seorang ATLM menerima sampel darah pasien terjangkit HIV pada pemantapan mutu eksternal menggunakan metode RT-PCR. ATLM tersebut mendapati hasil dari viral load sampel tersebut adalah 200 salinan/ml

Pertanyaan:

Apa makna klinis dari hasil ini?

Pilihan Jawaban:

- A. Tidak terdeteksi
- B. Terdeteksi dengan kondisi kritis
- C. Terdeteksi dengan kondisi sedang
- D. Internal control bermasalah
- E. Terjadi kesalahan pada saat pengambilan spesimen

Modul Praktikum Virologi

C. Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)

Penilaian akan dilakukan berdasarkan bobot berikut untuk mengukur kompetensi mahasiswa secara menyeluruh.

Aspek Penilaian	Bobot (%)	Kriteria Penilaian
Kognitif	30%	Pemahaman teori dasar, prinsip pemeriksaan, dan kemampuan menganalisis serta menginterpretasi data hasil uji.
Psikomotor	50%	Keterampilan teknis dalam melakukan prosedur laboratorium, termasuk ekstraksi DNA, penyiapan <i>master mix</i> , dan menjalankan mesin RT-qPCR.
Afektif	20%	Sikap selama praktikum, meliputi ketelitian, kedisiplinan, kepatuhan terhadap SOP, serta kesadaran akan keselamatan kerja.



RINGKASAN

Diagnosis dini dan pengobatan infeksi HIV sangat penting untuk mengurangi *Viral load* (VL) secepat mungkin, dan dengan demikian membantu mengurangi penularan virus, morbiditas, dan mortalitas. Intervensi waktu yang tepat dengan terapi antiretroviral (ART) meningkatkan kesehatan langsung anak, memastikan kualitas hidup yang lebih tinggi dan prognosis jangka panjang yang lebih baik. VL digunakan untuk memprediksi perkembangan infeksi HIV-1, dan juga telah digunakan untuk konfirmasi infeksi HIV baru dengan ambang batas yang lebih baik daripada jalur pengujian HIV standar.



DAFTAR PUSTAKA

1. Artika, I.M.; Wiyatno, A.; Ma'roef, C.N. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect. Genet. Evol.* 2020, 81, 1–14.
2. Arya, M.; Shergill, I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H.R.H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005, 5, 209–219.
3. Chomont, N. et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893–900 (2009).
4. Christopherson, C. et al. PCR-based assay to quantify human immunodeficiency virus type 1 DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Microbiol.* (2000).
5. Deepak, S.A.; Kottapalli, K.R.; Rakwal, R.; Oros, G.; Rangappa, K.; Iwahashi, H.; Masuo, Y.; Agrawal, G.K. Real-time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr. Genom.* 2007, 8, 234–251.
6. Eisele, E. & Siliciano, R. F. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* 37, 377–388 (2012).
7. Kibirige CN, Manak M, King D, Abel B, Hack H, Wooding D, Liu Y, Fernandez N, Dalel J, Kaye S, Imami N, Jagodzinski L, Gilmour J. Development of a sensitive, quantitative assay with broad subtype specificity for detection of total HIV-1 nucleic acids in plasma and PBMC. *Sci Rep.* 2022 Jan 28;12(1):1550. doi: 10.1038/s41598-021-03016-1. Erratum in: *Sci Rep.* 2022 Feb 1;12(1):1980. doi:

- 10.1038/s41598-022-06286-5. Erratum in: *Sci Rep.* 2022 Jul 11;12(1):11792. doi: 10.1038/s41598-022-16308-x
8. Laird, G. M., Rosenbloom, D. I. S., Lai, J., Siliciano, R. F. & Siliciano, J. D. Measuring the frequency of latent HIV-1 in resting CD4+ T cells using a limiting dilution coculture assay. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1354 239–253 (Humana Press Inc., 2016).
 9. Lewin, S. R. & Rouzioux, C. HIV cure and eradication: How will we get from the laboratory to effective clinical trials?. *AIDS* 25, 885–897 (2011).
 10. Ngo-Malabo, E. et al. HIV drug resistance testing in a resource limited setting with high viral diversity: The first twenty eight months experience. *Curr. HIV Res.* 15, 297–305 (2017).
 11. Palmer, S. et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800050105> (2008).
 12. Parekh, B. S. et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus. *Infection* <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-18> (2018).
 13. Riswari, S.F.; Ma'roef, C.N.; Djauhari, H.; Kosasih, H.; Perkasa, A.; Yudhaputri, F.A.; Artika, I.M.; Williams, M.; van der Ven, A.; Myint, K.S.; et al. Study of viremic profile in febrile specimens of chikungunya in Bandung, Indonesia. *J. Clin. Virol.* 2016, 74, 61–65.
 14. Rocha, A.J.; Miranda, R.d.S.; Sousa, A.J.S.; da Silva, A.L.C. Guidelines for successful quantitative gene expression in real-time qPCR assays. In *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*; InTech: London, UK, 2016.
 15. Vandergeeten, C. et al. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.00609-14> (2014).
 16. WHO. Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection interim guidelines HIV treatment. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-HIV-18.51> (2018).

BAB 8

PEMERIKSAAN ANTIBODI ANTI HSV, ANTI CMV, ANTI RUBELLA, (PANEL VIROLOGI TORCH)

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa memahami tujuan, prinsip, dan pentingnya pemeriksaan antibodi TORCH (anti-HSV, anti-CMV, dan anti-Rubella).
2. Mahasiswa mampu menyiapkan dan menangani spesimen sesuai standar pra-analitik serta menerapkan keselamatan kerja dan etika laboratorium.
3. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan antibodi dengan metode yang sesuai dan menginterpretasikan hasil berdasarkan profil IgM dan IgG.
4. Mahasiswa mampu menyusun laporan hasil dan mengevaluasi mutu pemeriksaan pada semua tahap (pra-analitik, analitik, pasca-analitik).

PENDAHULUAN

Infeksi TORCH (Toxoplasmosis, Others [sifilis, hepatitis B], Rubella, Cytomegalovirus, dan Herpes simplex) merupakan kelompok penyakit infeksi yang berpotensi menular dari ibu ke janin, baik melalui transplanta, kontak darah, cairan vagina, maupun ASI. Agen penyebabnya terdiri dari berbagai patogen seperti *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, virus hepatitis B, rubella, CMV, dan HSV. Beberapa referensi juga memasukkan HIV dan virus Zika dalam kategori ini (Jaan and Rajnik, 2025).

Setiap patogen TORCH memiliki karakteristik yang berbeda dalam hal struktur, transmisi, dan dampaknya pada kehamilan. *Toxoplasma gondii* adalah satu-satunya parasit non-virus yang berbahaya bagi janin, terutama jika infeksi terjadi saat kehamilan. *Rubella virus* (RV) sangat menular dan dapat mengganggu perkembangan janin, khususnya jika infeksi terjadi pada trimester pertama. *Cytomegalovirus* (CMV) adalah penyebab utama infeksi kongenital, dengan gejala yang sering kali tidak tampak sejak lahir. Sementara *Herpes Simplex Virus* (HSV), terutama tipe 2, ditularkan secara seksual dan dapat menetap secara laten dalam jaringan saraf (Naseem *et al.*, 2025).

Infeksi TORCH dikaitkan dengan berbagai komplikasi kehamilan, seperti keguguran, cacat bawaan, hidrosefalus, katarak, hingga sindrom rubella kongenital. Penelitian menunjukkan bahwa wanita dengan riwayat obstetrik buruk memiliki tingkat seropositif antibodi IgM antara 3,41–22,64% dan IgG antara 19,2–70,51% (Patel *et al.*, 2024). Oleh karena itu, manajemen TORCH menekankan pentingnya skrining prenatal, deteksi dini, dan terapi yang tepat. Serologi untuk mendeteksi IgG sangat penting untuk menilai status imun ibu dan membedakan antara infeksi primer dan sekunder (Warnecke *et al.*, 2020).

Pembentukan antibodi terhadap TORCH merupakan dasar utama dalam diagnosis serologis. IgM muncul lebih awal sebagai penanda infeksi akut, sedangkan IgG bertahan seumur hidup sebagai penanda infeksi lama. Pada HSV dan CMV, IgM harus dikonfirmasi dengan uji aviditas IgG karena prevalensi IgG yang tinggi di populasi umum. Untuk rubella, interpretasi IgM juga harus mempertimbangkan kemungkinan hasil positif palsu akibat vaksinasi. Oleh karena itu, kombinasi IgM, IgG, dan uji aviditas IgG sangat penting dalam menilai risiko terhadap janin dan memastikan diagnosis tepat selama kehamilan (Batra, 2020).

Pemeriksaan serologis TORCH melibatkan pengukuran antibodi IgM dan IgG. IgM mengindikasikan infeksi primer atau akut, sedangkan IgG menandakan infeksi lama atau kekebalan. Pada kasus tertentu seperti toksoplasmosis dan CMV, uji aviditas IgG digunakan untuk membedakan infeksi baru (avidity rendah) dari infeksi lama (avidity tinggi). Metode deteksi yang umum digunakan mencakup ELISA, CLIA, CMIA, IFA, lateral flow rapid test, dan *bead-based assay* (Meridian Bioscience, 2025).

Lateral Flow Assay (LFA) memiliki keunggulan berupa prosedur yang cepat, mudah digunakan, murah, serta cocok untuk skrining di lapangan (*point-of-care*) tanpa memerlukan peralatan mahal. Namun, LFA hanya memberikan hasil kualitatif atau semi-kuantitatif dengan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih rendah dibandingkan metode laboratorium seperti ELISA, CLIA, atau CMIA yang lebih presisi. Dibandingkan dengan IFA, LFA lebih sederhana dan tidak memerlukan mikroskop khusus, meskipun IFA menawarkan sensitivitas yang lebih tinggi (Li *et al.*, 2023). Sementara itu, *bead-based multiplex assay* seperti Luminex jauh lebih akurat dan mampu mendeteksi banyak target sekaligus secara kuantitatif, tetapi mahal serta membutuhkan instrumen khusus dan operator terlatih. Oleh karena itu, LFA tetap unggul untuk skrining awal di fasilitas terbatas, meskipun hasilnya perlu dikonfirmasi dengan metode laboratorium yang lebih akurat (Koczula and Gallotta, 2016).

Uji Titer TORCH sering dilakukan dalam bentuk panel antibodi IgG terhadap beberapa patogen dengan metode Lateral Flow Assay (LFA). Meskipun titer tinggi dapat menunjukkan infeksi masa lalu, pemeriksaan ini tidak cukup spesifik untuk mendiagnosis infeksi kongenital

Modul Praktikum Virologi

secara langsung. Evaluasi lanjutan terhadap patogen tertentu perlu dilakukan jika ada indikasi klinis (Jaan and Rajnik, 2025).

Sumber kesalahan pemeriksaan (Chávez, 2019), meliputi

a. Pra-analitik

Kesalahan pada tahap pra-analitik dapat memengaruhi validitas hasil pemeriksaan secara keseluruhan. Beberapa kesalahan umum meliputi:

- Penggunaan sampel yang tidak memenuhi syarat, seperti sampel hemolitik, lipemik, atau terkontaminasi.
- Penyimpanan spesimen yang tidak sesuai (misalnya suhu penyimpanan tidak stabil, pembekuan dan pencairan berulang) dapat merusak antibodi dan menyebabkan hasil tidak akurat.

b. Analitik

Kesalahan pada tahap ini berpengaruh langsung terhadap akurasi pembacaan hasil:

- Proses inkubasi yang tidak konsisten (kurang dari 10 menit atau melebihi 15 menit) dapat menyebabkan hasil yang salah.
- Volume reagen (sampel dan diluen) yang tidak tepat, baik kelebihan atau kekurangan, dapat mengganggu reaksi antigen–antibodi.
- Pencucian tidak sempurna (jika menggunakan metode berbasis plate ELISA atau rapid format dengan multiple steps) dapat menyebabkan false positive (nilai terlalu tinggi) atau false negative (nilai terlalu rendah).

c. Pasca-analitik

Tahapan ini berfokus pada bagaimana hasil dilaporkan dan ditindaklanjuti. Kesalahan yang sering terjadi antara lain:

- Interpretasi hasil yang tidak mempertimbangkan kondisi klinis pasien, seperti status kehamilan, riwayat vaksinasi, atau gejala infeksi.
- Tidak dilakukan pengujian ulang atau konfirmasi lanjutan terhadap hasil borderline atau mencurigakan, yang dapat menyesatkan penegakan diagnosis.

Sedangkan untuk Jaminan mutu pemeriksaan, meliputi:

- a. Garis kontrol (C) wajib muncul. jika tidak, hasil tidak valid dan harus diulang.
- b. Gunakan kontrol positif dan negatif saat lot baru, alat diragukan, atau hasil mencurigakan.
- c. Simpan alat uji pada suhu 2–30°C, jangan dibekukan dan hindari kemasan rusak.
- d. Jangan gunakan alat uji kedaluwarsa.
- e. Baca hasil tepat pada menit ke-10, tidak lebih dari 15 menit.
- f. Pemeriksaan hanya oleh petugas yang terlatih.



PRAKTIKUM

A. Pra analitik (CTK Biotech, Inc., 2020)

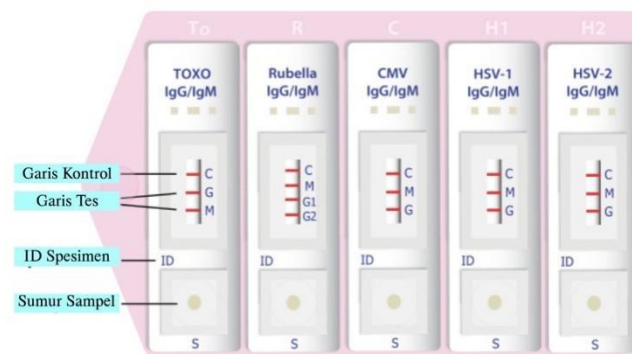
1. Tujuan Pemeriksaan

1. Melatih mahasiswa melakukan pemeriksaan antibodi IgG dan IgM TORCH dengan metode rapid test.
2. Memahami prinsip kerja immunochromatography dalam deteksi antibodi spesifik.
3. Menginterpretasikan hasil reaktif dan non-reaktif berdasarkan garis M (IgM) dan G (IgG).
4. Melatih ketepatan teknis pengambilan, penanganan, dan pengujian sampel.
5. Menyusun laporan hasil pemeriksaan TORCH secara sistematis dan ilmiah.

2. Metode

Lateral Flow Chromatographic Immunoassay (Rapid Test)

3. Prinsip Pemeriksaan (CTK Biotech, Inc., 2020)



Gambar 8.1 Panel Pemeriksaan IgG/IgM TORCH (CTK Biotech, Inc., 2020)

Pemeriksaan ini bekerja berdasarkan prinsip imunokromatografi aliran lateral, dimana antibodi IgG dan IgM yang terdapat dalam spesimen akan bereaksi secara spesifik dengan antigen virus yang terkonjugasi pada strip uji. Kompleks yang terbentuk antara antigen dan antibodi tersebut akan bergerak secara kapiler di sepanjang membran, lalu ditangkap oleh antibodi anti-IgG atau anti-IgM yang telah terfiksasi pada area uji. Hasil pemeriksaan ditunjukkan melalui garis berwarna pada strip: garis M menandakan antibodi IgM terdeteksi, garis G menandakan antibodi IgG terdeteksi, dan garis C (kontrol) wajib muncul sebagai indikator bahwa proses pemeriksaan berjalan dengan benar.

Modul Praktikum Virologi

4. Jenis dan kriteria specimen/syarat sampel

Spesimen yang digunakan dalam pemeriksaan ini dapat berupa serum, plasma dengan antikoagulan seperti EDTA, sitrat, atau heparin, serta darah utuh yang diperoleh melalui vena atau tusukan kapiler. Agar hasil pemeriksaan optimal, spesimen harus memenuhi kriteria tertentu, yaitu tidak hemolitik dan tidak lipemik, karena kondisi tersebut dapat mengganggu interpretasi hasil. Setelah pengambilan, spesimen dapat disimpan pada suhu 2–8°C maksimal selama 5 hari. Untuk penyimpanan lebih dari 5 hari, spesimen harus dibekukan pada suhu -20°C. Sementara itu, jika digunakan darah utuh, pemeriksaan harus dilakukan dalam waktu kurang dari 24 jam sejak pengambilan untuk menghindari degradasi komponen darah yang dapat mempengaruhi hasil.

5. Alat dan bahan

- Kit TORCH Panel
- Pipet/dropper
- Sample diluent
- Tabung EDTA
- Timer
- APD: sarung tangan, masker, jas lab

B. Analitik (CTK Biotech, Inc., 2020)

1. Prosedur kerja

1. Persiapan Spesimen dan Alat

Semua komponen pemeriksaan dan spesimen dibawa ke suhu ruang (15–30°C). Bila spesimen dibekukan, dibiarkan mencair dan dicampur hingga homogen sebelum digunakan.

2. Persiapan Alat Uji

Kaset uji dikeluarkan dari kemasan foil pada saat siap digunakan dan diletakkan di permukaan datar yang bersih. Kaset kemudian diberi label dengan ID spesimen.

3. Penetesan Spesimen

Spesimen diambil menggunakan dropper dan diteteskan 1 tetes ($\pm 10 \mu\text{L}$ serum/plasma atau $\pm 15 \mu\text{L}$ darah utuh) ke lubang sampel (S) di masing-masing panel. Gelembung udara dihindari saat penetesan.

4. Penambahan Diluen

Sebanyak 2 tetes ($\pm 60\text{--}80 \mu\text{L}$) diluen segera ditambahkan ke lubang sampel, dengan posisi botol ditegakkan secara vertikal.

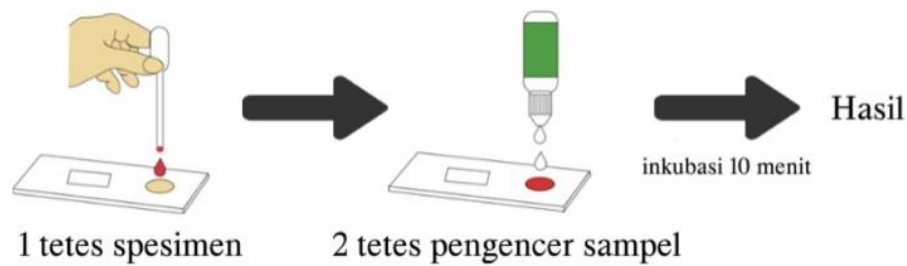
Modul Praktikum Virologi

5. Inkubasi

Timer diatur selama 10 menit. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang tanpa gangguan.

6. Pembacaan Hasil

Hasil dibaca tepat pada menit ke-10. Bila garis kontrol (C) tidak muncul, maka hasil dianggap tidak valid dan harus diulang. Hasil yang dibaca di luar rentang 10–15 menit tidak boleh digunakan.



Gambar 8.2 Prosedur Pemeriksaan IgG/IgM TORCH (CTK Biotech, Inc., 2020)

2. Nilai Normal

Nilai normal pada pemeriksaan panel TORCH ditandai dengan tidak terdeteksinya antibodi IgM dan/atau IgG terhadap patogen yang diperiksa. (IgG dan IgM negatif ditandai dengan hanya garis kontrol [C] yang muncul).

3. Nilai Kritis

Nilai kritis dalam pemeriksaan TORCH umumnya ditandai dengan IgM positif dan IgG negatif, yang mengindikasikan infeksi primer akut pada individu yang belum memiliki kekebalan.

4. Perhitungan

Tidak ada; hasil kualitatif

C. Post analitik (CTK Biotech, Inc., 2020)

Pelaporan hasil

Tabel 8.1 Rangkuman Pelaporan Hasil Pemeriksaan

Panel / Patogen	IgM	IgG	Pelaporan Hasil
Rubella Virus	Negatif	Negatif	Pasien belum memiliki kekebalan terhadap Rubella (rentan).
	Negatif	Positif	Pasien memiliki kekebalan protektif terhadap Rubella.
	Positif	Negatif	Infeksi Rubella akut tanpa kekebalan → nilai kritis .
Toxoplasma gondii	Positif	Positif	Infeksi Rubella aktif dengan kekebalan parsial atau kuat.
	Negatif	Negatif	Pasien belum terinfeksi dan masih rentan terhadap Toxoplasma.
	Negatif	Positif	Pasien pernah terinfeksi Toxoplasma dan sudah memiliki kekebalan.
HSV-1	Positif	Negatif	Infeksi primer Toxoplasma → nilai kritis .
	Positif	Positif	Infeksi aktif atau reaktivasi Toxoplasma.
	Negatif	Negatif	Belum terinfeksi HSV-1, masih rentan terhadap infeksi.
HSV-2	Negatif	Positif	Pernah terinfeksi HSV-1, menunjukkan kekebalan.
	Positif	Negatif	Infeksi primer HSV-1 aktif → nilai kritis .
	Positif	Positif	Infeksi aktif atau reaktivasi HSV-1.
HSV-2	Negatif	Negatif	Belum terinfeksi HSV-2, masih rentan terhadap infeksi.
	Negatif	Positif	Pernah terinfeksi HSV-2, menunjukkan kekebalan.
	Positif	Negatif	Infeksi primer HSV-2 aktif → nilai kritis .
	Positif	Positif	Infeksi aktif atau reaktivasi HSV-2.

Catatan Umum Tambahan :

- Jika garis kontrol (C) tidak muncul, maka hasil tidak valid, tidak boleh dilaporkan, dan pemeriksaan harus diulang.
- Jika IgM positif dan IgG negatif, maka hasil termasuk nilai kritis, harus segera dilaporkan ke klinisi, dan dianjurkan pemeriksaan lanjutan (ELISA, PCR, atau uji konfirmasi lain).

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Modul Praktikum Virologi

Hasil : Data pasien																																																
<table border="1"><thead><tr><th>No.</th><th>Nama Panel / Patogen</th><th>Hasil IgM</th><th>Hasil IgG</th><th>Interpretasi</th><th>Validitas (Garis C)</th><th>Tindak Lanjut / Catatan</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Rubella Virus</td><td></td><td></td><td></td><td>Muncul / Tidak Muncul</td><td></td></tr><tr><td>2</td><td>Toxoplasma gondii</td><td></td><td></td><td></td><td>Muncul / Tidak Muncul</td><td></td></tr><tr><td>3</td><td>CMV (opsional)</td><td></td><td></td><td></td><td>Muncul / Tidak Muncul</td><td></td></tr><tr><td>4</td><td>HSV-1</td><td></td><td></td><td></td><td>Muncul / Tidak Muncul</td><td></td></tr><tr><td>5</td><td>HSV-2</td><td></td><td></td><td></td><td>Muncul / Tidak Muncul</td><td></td></tr></tbody></table>							No.	Nama Panel / Patogen	Hasil IgM	Hasil IgG	Interpretasi	Validitas (Garis C)	Tindak Lanjut / Catatan	1	Rubella Virus				Muncul / Tidak Muncul		2	Toxoplasma gondii				Muncul / Tidak Muncul		3	CMV (opsional)				Muncul / Tidak Muncul		4	HSV-1				Muncul / Tidak Muncul		5	HSV-2				Muncul / Tidak Muncul	
No.	Nama Panel / Patogen	Hasil IgM	Hasil IgG	Interpretasi	Validitas (Garis C)	Tindak Lanjut / Catatan																																										
1	Rubella Virus				Muncul / Tidak Muncul																																											
2	Toxoplasma gondii				Muncul / Tidak Muncul																																											
3	CMV (opsional)				Muncul / Tidak Muncul																																											
4	HSV-1				Muncul / Tidak Muncul																																											
5	HSV-2				Muncul / Tidak Muncul																																											
Kesimpulan :																																																

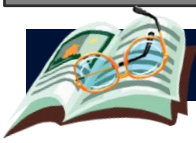
Jakarta,

20...

Pembimbing

Praktikan

() ()



Bentuk Evaluasi :

A. Tugas

Soal Kasus 1

Seorang ibu hamil trimester pertama melakukan pemeriksaan TORCH dengan hasil:

- Rubella IgM (+), Rubella IgG (-)
- Toxoplasma IgM (-), Toxoplasma IgG (+)

Pertanyaan:

1. Jelaskan interpretasi dari masing-masing hasil pemeriksaan!
2. Hasil mana yang tergolong nilai kritis dan mengapa?
3. Rekomendasi tindak lanjut apa yang perlu dilakukan oleh laboratorium dan klinisi?

Soal Kasus 2

Pasien pria usia 30 tahun datang dengan keluhan demam dan limfadenopati servikal.

Pemeriksaan TORCH menunjukkan:

- CMV IgM (+), CMV IgG (+)
- HSV-1 IgM (-), HSV-1 IgG (+)

Pertanyaan:

1. Jelaskan fase infeksi CMV pada pasien tersebut!
2. Apa kemungkinan status infeksi HSV-nya?
3. Sebutkan dua kesalahan pra-analitik yang dapat memengaruhi keakuratan hasil pemeriksaan antibodi TORCH!

Soal Kasus 3

Hasil pemeriksaan TORCH pada seorang bayi baru lahir:

- HSV-2 IgM (+), IgG (-)
- Garis kontrol (C): muncul

Modul Praktikum Virologi

Pertanyaan:

1. Bagaimana interpretasi hasil pemeriksaan tersebut?
2. Mengapa hasil ini perlu segera dilaporkan sebagai nilai kritis?
3. Uji konfirmasi apa yang direkomendasikan untuk menegakkan diagnosis?

B. Tes

Dilaksanakan setelah praktikum dalam bentuk:

- Tes teori (10–15 soal pilihan ganda & 3–5 soal essay) mencakup:
 - Teori dasar TORCH
 - Prinsip kerja rapid test TORCH panel
 - Interpretasi hasil
 - Sumber kesalahan pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik
 - Konsep jaminan mutu Pemeriksaan antibodi anti HSV, anti CMV, anti rubella (Panel virologi TORCH) (Pra Analitik, Analitik, Pasca Analitik)
- Tes praktik (praktikum ulang sebagian proses pemeriksaan dengan pengawasan dosen).

C. Penilaian

Penilaian dilakukan terhadap 3 aspek:

No	Aspek	Kriteria Penilaian	Skor
1	Kognitif	Hasil tes teori & laporan praktikum	0–100
2	Psikomotor	Ketepatan dalam persiapan spesimen, prosedur pemeriksaan, pembacaan hasil, dan pengisian laporan	0–100
3	Afektif	Sikap, ketepatan waktu, kerapihan, kerja sama, etika laboratorium, dan kepatuhan terhadap K3	0–100

Bobot Nilai:

- Kognitif: 40%
- Psikomotor: 40%
- Afektif: 20%



RINGKASAN

TORCH adalah kelompok infeksi kongenital yang terdiri dari Toxoplasmosis, Rubella, CMV, dan HSV, yang dapat menyebabkan komplikasi serius pada kehamilan dan janin, sehingga deteksi dini melalui pemeriksaan antibodi IgM dan IgG sangat penting dalam upaya skrining prenatal. Pemeriksaan menggunakan metode rapid test berbasis imunokromatografi (lateral flow) membutuhkan ketepatan pada tahap pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik, termasuk dalam penanganan spesimen, prosedur uji, interpretasi hasil, dan jaminan mutu untuk menjamin keakuratan diagnosis dan tindak lanjut klinis.



DAFTAR PUSTAKA

1. Batra, P. (2020) 'Epidemiology of TORCH Infections and Understanding the Serology in Their Diagnosis'.
2. Chávez, V. (2019) 'Sources of pre-analytical, analytical and post-analytical errors in the microbiology laboratory', in *Accurate Results in the Clinical Laboratory*. Elsevier, pp. 377–384. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813776-5.00024-8>.
3. CTK Biotech, Inc. (2020) 'OnSite TORCH Panel Rapid Test - (Serum / Plasma / Whole Blood)'. CTK Biotech, Inc. Available at: <https://ctkbiotech.com/product/torch-panel-rapid-test/> (Accessed: 29 June 2025).
4. Jaan, A. and Rajnik, M. (2025) 'TORCH Complex', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560528/> (Accessed: 25 June 2025).
5. Koczula, K.M. and Gallotta, A. (2016) 'Lateral flow assays', *Essays in Biochemistry*. Edited by P. Estrela, 60(1), pp. 111–120. Available at: <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
6. Li, G. *et al.* (2023) 'Lateral flow immunoassays for antigens, antibodies and haptens detection', *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, p. 125186. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125186>.
7. Meridian Bioscience (2025) 'ToRCH IgG/IgM Assay Development'. Meridian Bioscience. Available at: <https://www.meridianbioscience.com/LifeScience/>.
8. Naseem, M. *et al.* (2025) 'ToRCH pathogens-induced histopathological changes in placental tissues and associated post obstetric complications', *Acta Tropica*, 261, p. 107466. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107466>.
9. Patel, N. *et al.* (2024) 'TORCH (Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus) Infection and the Enigma of Anomalous Fetal Development: Pregnancy Puzzles', *Cureus* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.51534>.

Modul Praktikum Virologi

10. Warnecke, J.M. *et al.* (2020) 'Seroprevalences of antibodies against ToRCH infectious pathogens in women of childbearing age residing in Brazil, Mexico, Germany, Poland, Turkey and China', *Epidemiology and Infection*, 148, p. e271. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0950268820002629>.

BAB 9

ANALISIS EFEK SITOPATOGENIK

TUJUAN PEMBELAJARAN

1. Mahasiswa mampu menggunakan mikroskop inverter.
2. Mahasiswa mampu mengidentifikasi virus secara klasik

PENDAHULUAN

Isolasi dan identifikasi virus secara klasik bergantung pada kemampuannya untuk tumbuh dalam sistem inang yang hidup, seperti biakan sel (*cell culture*). Ketika virus menginfeksi sel yang rentan, proses replikasi virus sering kali mengganggu metabolisme sel, merusak struktur, dan akhirnya menyebabkan kematian sel. Perubahan morfologis yang dapat diamati secara visual pada sel inang akibat infeksi virus ini disebut **Efek Sitopatik** atau **Cytopathic Effect (CPE)**.

Pengamatan CPE menggunakan mikroskop inverter adalah salah satu metode fundamental dalam virologi untuk:

1. **Deteksi Virus:** Adanya CPE pada biakan sel yang diinokulasi dengan spesimen klinis mengindikasikan keberadaan virus yang aktif bereplikasi.
2. **Identifikasi Awal Virus:** Jenis CPE yang muncul (misalnya, pembulatan sel, fusi sel, atau lisis total) dapat memberikan petunjuk awal mengenai jenis virus yang menginfeksi. Sebagai contoh, *Herpes simplex virus* sering menyebabkan sel membulat dan menggelembung, sedangkan *Respiratory Syncytial Virus (RSV)* khas dengan pembentukan sel raksasa multinukleat (*syncytia*).
3. **Kuantifikasi Virus:** Tingkat kerusakan sel dapat digunakan untuk menitrasi atau menghitung jumlah partikel virus infeksius dalam suatu sampel, sering kali diekspresikan sebagai **TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50%)**.

Modul Praktikum Virologi

Jenis-jenis CPE yang umum diamati meliputi:

- a. **Pembulatan dan Pengelompokan Sel:** Sel kehilangan bentuk normalnya, menjadi bulat, dan berkumpul seperti buah anggur.
- b. **Lisis atau Luruhnya Sel:** Sel-sel hancur dan terlepas dari permukaan wadah kultur, meninggalkan "lubang" pada lapisan sel (*monolayer*).
- c. **Pembentukan Syncytia:** Fusi membran sel-sel yang berdekatan, menghasilkan sel besar dengan banyak inti.
- d. **Pembentukan Badan Inklusi:** Agregat partikel virus atau komponen virus di dalam sitoplasma atau nukleus sel, yang terkadang dapat dilihat dengan pewarnaan khusus.

Dalam praktikum ini, mahasiswa akan membandingkan morfologi biakan sel normal (tidak terinfeksi) dengan biakan sel yang telah diinfeksi virus untuk mengidentifikasi dan mendeskripsikan CPE

Sumber kesalahan pemeriksaan adalah sebagai berikut:

- a. **Kontaminasi Bakteri/Jamur:** Dapat merusak sel dan disalahartikan sebagai CPE.
- b. **Kondisi Biakan Sel yang Buruk:** Sel yang sudah tua atau "stres" karena nutrisi kurang dapat terlepas dari permukaan dan menyerupai lisis.
- c. **Artefak pada Wadah Kultur:** Goresan atau cacat pada plastik dapat mengganggu pengamatan.
- d. **Kesalahan Penggunaan Mikroskop:** Fokus yang tidak tepat atau pencahayaan yang buruk dapat menyebabkan salah interpretasi.
- e. **Subjektivitas Pengamat:** Penilaian derajat CPE bisa bervariasi antar pengamat.

Hal-hal yang mempengaruhi Jaminan mutu pemeriksaan (**Quality Assurance**) adalah sebagai berikut:

- a. **Penggunaan Kontrol Negatif:** Wajib menggunakan kontrol sel pada setiap pengamatan untuk memastikan kondisi awal sel baik dan sebagai pembanding.
- b. **Pemeliharaan Strain Sel:** Menggunakan strain sel yang sehat, bebas kontaminasi Mycoplasma, dan pada nomor *passage* yang rendah.
- c. **Kalibrasi dan Perawatan Mikroskop:** Memastikan mikroskop bersih dan berfungsi optimal.
- d. **Kompetensi Personel:** Pelatihan reguler untuk memastikan pengamat dapat mengenali berbagai jenis CPE dan membedakannya dari artefak



A. Pra analitik

1. Tujuan Pemeriksaan

- Mahasiswa mampu menjelaskan definisi dan prinsip dasar dari Efek Sitopatik (CPE).
- Mahasiswa mampu mengoperasikan mikroskop inverter dengan benar untuk mengamati biakan sel.
- Mahasiswa mampu membedakan penampilan morfologi sel normal (kontrol negatif) dengan sel yang menunjukkan CPE.
- Mahasiswa mampu mengidentifikasi dan mendeskripsikan jenis-jenis CPE yang diamati.
- Mahasiswa mampu mendokumentasikan hasil pengamatan CPE melalui gambar atau deskripsi tertulis.

2. Metode: Observasi mikroskopis (menggunakan mikroskop inverter).

3. Prinsip:

Virus yang infeksius akan bereplikasi di dalam sel inang yang rentan. Proses replikasi ini mengganggu fungsi normal sel dan menyebabkan perubahan morfologi yang dapat diamati dengan mikroskop. Perubahan ini (CPE) menjadi bukti visual adanya infeksi virus.

4. Alat dan bahan

a. Alat

- Mikroskop Inverter
- Kamera mikroskop (opsional, untuk dokumentasi)
- Spidol permanen

b. Bahan (Virus herpes simpleks)

- Biakan sel dalam cawan petri/labu kultur (*flask*) yang menunjukkan CPE.
- Biakan sel normal (kontrol negatif) dalam cawan petri/labu kultur.
- Buku catatan/lembar kerja praktikum.
- Disinfektan (Alkohol 70%).

B. Analitik

1. Prosedur kerja

- a. Siapkan mikroskop inverter. Pastikan lensa okuler dan objektif bersih. Nyalakan sumber cahaya.
- b. Ambil biakan sel kontrol (tidak terinfeksi). Letakkan di atas meja objek mikroskop.
- c. Lakukan pengamatan dimulai dari perbesaran terendah (misal: 10x). Fokuskan hingga lapisan sel (*monolayer*) terlihat jelas.
- d. Amati morfologi sel normal. Perhatikan bentuk sel, kejernihan sitoplasma, dan bagaimana sel-sel tersebut tumbuh merata membentuk lapisan tunggal yang rapat (*confluent monolayer*).
- e. Gambarkan atau foto morfologi sel normal pada lembar kerja sebagai referensi.
- f. Singkirkan biakan sel kontrol. Bersihkan meja objek dengan disinfektan jika perlu.
- g. Ambil biakan sel yang terinfeksi virus. Letakkan di atas meja objek.
- h. Amati dengan perbesaran yang sama (10x). Bandingkan dengan penampakan sel normal.
- i. Identifikasi area yang menunjukkan perubahan morfologi (CPE).
- j. Ganti ke perbesaran lebih tinggi (misal: 20x atau 40x) untuk melihat detail CPE.
- k. Deskripsikan jenis CPE yang teramati (misalnya: sel membulat, mengelompok, lisis, membentuk syncytia).
- l. Perkirakan persentase sel yang terdampak CPE pada lapangan pandang (misal: 25%, 50%, 75%, 100%).
- m. Gambarkan atau foto sel yang menunjukkan CPE pada lembar kerja. Beri label pada bagian-bagian penting.
- n. Setelah selesai, matikan mikroskop dan rapikan kembali alat dan bahan.

2. Nilai Normal : Penampakan biakan sel kontrol (tidak terinfeksi) adalah “nilai normal” ciri-cirinya adalah:

- Seluruh permukaan wadah kultur tertutup oleh lapisan sel tunggal yang rapat (*confluent monolayer*).
- Sel memiliki morfologi yang seragam sesuai jenisnya (misal: sel Vero berbentuk *fibroblast-like*).
- Sitoplasma jernih dan batas sel terlihat jelas.
- Tidak ada sel yang mengambang atau lisis.

3. Nilai Kritis:

"Nilai Kritis" atau temuan signifikan dalam konteks ini adalah **terdeteksinya CPE pada biakan sel yang diinokulasi**, yang menandakan adanya infeksi virus. Tingkat keparahan CPE dapat dinilai secara semi-kuantitatif:

- **1+:** 1-25% sel menunjukkan CPE.
- **2+:** 26-50% sel menunjukkan CPE.
- **3+:** 51-75% sel menunjukkan CPE.
- **4+:** 76-100% sel menunjukkan CPE, terjadi destruksi total pada lapisan sel.

4. Perhitungan (konsep)

Konsep utama terkait kuantifikasi CPE adalah **TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50%)**. Ini adalah pengenceran virus yang mampu menginfeksi dan menghasilkan CPE pada 50% dari biakan sel yang diinokulasi. Penentuannya memerlukan seri pengenceran virus dan perhitungan statistik (misalnya menggunakan metode Reed-Muench), yang akan dibahas lebih lanjut pada topik virologi kuantitatif.

C. Post analitik

Pelaporan hasil: Hasil pengamatan CPE dilaporkan secara deskriptif, mencakup:

- **Identitas Sampel:** (misal: Sel Vero + Virus X).
- **Hasil Kontrol Sel:** Normal, *confluent monolayer*.
- **Hasil Sampel Uji:** Positif CPE.
- **Deskripsi CPE:** (misal: "Teramati sel-sel yang membulat dan mengelompok seperti buah anggur, sebagian sel lisis dan terlepas dari permukaan kultur").
- **Derajat CPE:** (misal: 3+ atau ~75% sel terdampak).
- **Dokumentasi:** Gambar tangan berlabel atau foto mikroskopis

Modul Praktikum Virologi

D. Jurnal Praktikum/laporan sementara

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

Modul Praktikum Virologi

Hasil	: Data pasien
Kesimpulan	:
Kota,20...	
Pembimbing	Praktikan
()	()



Bentuk Evaluasi :

1. Tugas : Berdasarkan hasil pengamatan Anda, buatlah perbandingan visual dalam bentuk tabel antara sel normal dan sel yang terinfeksi. Sertakan gambar (sketsa) dan deskripsi morfologi untuk keduanya.
2. Tes
 - **Penilaian Kognitif**
 - Apakah yang dimaksud dengan Efek Sitopatik (CPE)?
 - Jelaskan mengapa penggunaan kontrol sel (negatif) sangat penting dalam pengamatan CPE!
 - Sebutkan dan jelaskan 2 jenis CPE yang berbeda!
 - Apa yang dimaksud dengan TCID₅₀?
 - **Penilaian Psikomotor**
 - Mahasiswa diminta untuk memfokuskan mikroskop pada biakan sel dan mengidentifikasi area yang menunjukkan CPE. Penilaian menggunakan daftar tilik (kemampuan fokus, identifikasi, deskripsi).
 - **Penilaian Afektif**
 - Penilaian observasi terhadap ketelitian, kesabaran dalam mencari lapangan pandang yang representatif, dan objektivitas dalam mendeskripsikan hasil.
3. Penilaian (Kognitif, Psikomotor, Afektif)
 - Penilaian Kognitif (Pengetahuan - Bobot 30%):
 - Penilaian Psikomotor (Keterampilan - Bobot 50%):
 - Penilaian Afektif (Sikap - Bobot 20%):



RINGKASAN

Analisis Efek Sitopatik (CPE) adalah teknik virologi klasik yang tetap relevan hingga kini. Kemampuan untuk mengenali perubahan morfologis sel akibat infeksi virus merupakan keterampilan dasar yang esensial bagi seorang analis laboratorium medis di bidang virologi. Pengamatan CPE tidak hanya berfungsi untuk mendeteksi keberadaan virus, tetapi juga memberikan informasi awal untuk identifikasi dan merupakan dasar untuk metode kuantifikasi virus. Penguasaan teknik ini memerlukan pemahaman tentang morfologi sel normal, kejelian dalam pengamatan mikroskopis, dan kemampuan untuk membedakan CPE asli dari artefak atau kontaminasi.



DAFTAR PUSTAKA

1. Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., & Skalka, A. M. (2020). *Principles of Virology* (5th ed.). ASM Press.
2. Freshney, R. I. (2016). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
3. Mahy, B. W. J., & Van Regenmortel, M. H. V. (Eds.). (2009). *Desk Encyclopedia of General Virology*. Academic Press.
4. Zuckerman, A. J., Banatvala, J. E., & Schoub, B. D. (2016). *Principles and Practice of Clinical Virology* (7th ed.). Wiley-Blackwell.

BIODATA PENULIS



Dr. Annita, S.ST, M. Biomed lahir di Padang, 26 Desember 1990. Jenjang pendidikan penulis meliputi DIV Analis Kesehatan Universitas Perintis, S2 Biomedik Universitas Andalas dan S3 Ilmu Biomedik Universitas Andalas.

Saat ini penulis merupakan pengajar di D4 Teknologi Laboratorium Medik Universitas Syedza Sainika.

Email : annitat67@gmail.com



Erni Yohani Mahtuti, S.Pd., M.Kes lahir di Semarang, 15 Juli 1974. Jenjang pendidikan penulis meliputi S1 FKIP MIPA Biologi Universitas Muhammadiyah Malang, S2 Universitas Airlangga Surabaya Peminatan Mikrobiologi.

Saat ini penulis merupakan pengajar di D3 Teknologi Laboratorium Medik Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Maharani.

Email : yohanierni@gmail.com



Siti Nuryani, S.Si. M.Sc. lahir di Magelang, 25 Maret 1965. Jenjang pendidikan penulis meliputi Akademi Analis Bandung, S1 Biologi UNY, dan S2 Ilmu Kedokteran Dasar UGM

Saat ini penulis merupakan pengajar di Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta

Email : siti.nuryani@poltekkesjogja.ac.id



Noor andryan ilsan, Ph.D lahir di Bogor pada 8 Mei 1991, merupakan anak pertama dari tiga bersaudara. Penulis menyelesaikan sekolahnya di SDN Curug 4, SMPN 7 Depok, SMAN 2 Depok. Tahun 2008-2012 melanjutkan studi S1 di Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Negeri Jakarta, S2 di jurusan Mikrobiologi, Institut Pertanian Bogor pada tahun 2013-2016. Diakhiri dengan melanjutkan studi S3 di jurusan International PhD Program in Medicine, Taipei Medical University, Taiwan. Saat ini penulis merupakan staf pengajar pada prodi Teknologi Laboratorium Medik, STIKes Mitra Keluarga.

Email: noor.andryan@stikesmitrakeluarga.ac.id



Munawir Umakaapa, S.Si, M.Biomed lahir di Ambon, pada 29 September 1989. Ia tercatat sebagai lulusan S1 pada Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar. Studi S2 diselesaikan pada Program Magister Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta Pusat. Saat ini juga merupakan staf pada jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Maluku.

Email : munawir@poltekkes-maluku.ac.id



Heri Setiyo Bkti, S.ST., M.Biomed. Lahir di Surabaya, pada tanggal 02 Juni 1985. Pendidikan, meliputi DIV Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Surabaya, dan S2 Ilmu Biomedik (Peminatan Imunologi) di Universitas Indonesia. Pada saat ini aktif sebagai staff pengajar di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar

email: herisetiyob7@gmail.com



Maria Eka Suryani, SKM., STr.Kes., M.Sc. lahir di Saripoi, 09 Maret 1988. Jenjang pendidikan penulis meliputi DIII Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur, S1 Kesehatan Masyarakat Universitas Mulawarman, Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta, dan S2 Ilmu Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur.

Email : mariaeka@poltekkes-kaltim.ac.id



Suryanata Kesuma, S.ST, M.Si lahir di Samarinda, pada 24 Mei 1991. Penulis merupakan alumni DIII Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur, DIV Poltekkes Kemenkes Yogyakarta, Magister Institut Teknologi Bandung (Bioteknologi Farmasi).

Penulis merupakan staf pengajar DIII Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur. Konsentrasi keilmuan penulis adalah biologi molekuler, bioteknologi, virologi, imunologi, imunoserologi, serta manajemen mutu laboratorium.

Email : suryanatakesuma@gmail.com