



Uhamka
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA

MODUL PRAKTIKUM IMUNOLOGI LANJUTAN

EUIS PURBASARI, M.Biomed.

OKTADIO ERIKARDO, M.Biomed.

PROGRAM STUDI D4 ANALIS KESEHATAN/TLM

FAKULTAS FARMASI DAN SAINS

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA

JAKARTA

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur kehadirat Allah SWT. yang senantiasa melimpahkan rahmat-Nya, sehingga modul praktikum Imunologi Lanjutan ini telah disusun tepat pada waktunya. Modul praktikum ini diharapkan dapat membantu mahasiswa dalam kegiatan praktikum di laboratorium.

Penyusun menyadari bahwa buku modul praktikum ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan. Untuk itu penyusun sangat mengharapkan kritik dan saran guna perbaikan Modul Praktikum Imunologi Lanjutan, dan nantinya untuk dapat lebih disempurnakan.

Semoga Modul Praktikum Imunologi Lanjutan ini dapat bermanfaat adanya.

Jakarta, Februari 2024

Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
TATA TERTIB PRAKTIKUM.....	iv
ISTILAH UMUM DALAM IMUNOLOGI.....	1
SPESIMEN.....	3
PRAKTIKUM 1. PEMERIKSAAN HbsAg.....	9
PRAKTIKUM 2. PEMERIKSAAN HBsAb	11
PRAKTIKUM 3. PEMERIKSAAN ANTI-HCV	13
PRAKTIKUM 4. PEMERIKSAAN ANTI-HAV	15
PRAKTIKUM 5. PEMERIKSAAN HIV	17
PRAKTIKUM 6. ELISA	20
DAFTAR PUSTAKA.....	28

TATA TERTIB PRAKTIKUM

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai **Praktikan**.

Tata tertib Praktikum Imunologi adalah :

1. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, keterlambatan lebih dari 10 menit sejak praktikum dimulai , praktikan dianggap tidak hadir.
2. Jika berhalangan hadir, praktikan harus dapat memberikan keterangan tertulis terkait dengan alasan ketidakhadirannya.
3. Jika akan mengganti hari wajib memberikan keterangan tertulis terlebih dahulu dari koordinator pengampu praktikum.
4. Praktikan memasuki ruang laboratorium dengan telah menggunakan jas laboratorium.
5. Praktikan memakai sepatu tertutup
6. Praktikan wajib membawa laporan, laporan kerja praktikum, serbet, masker, tisu, dan alat-alat yang dibutuhkan pada saat praktikum.
7. Dilarang membawa peralatan yang tidak berhubungan dengan praktikum.
8. Dilarang keluar masuk laboratorium kecuali ada izin ke toilet.
9. Tidak diperbolehkan makan, minum, merokok
10. Dilarang bersik, bercanda, tertawa atau mengganggu teman pada saat praktikum berlangsung.
11. Praktikan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing serta lantai disekitarnya.
12. Bila terjadi kerusakan alat atau alat gelas yang pecah maka praktikan wajib menggantinya segera.
13. Setelah menggunakan reagen, praktikan wajib meletakkan kembali ke tempat semula
14. Dilarang menghamburkan reagen praktikum.

15. Apabila membuang reagen praktikum pada tempat yang telah disediakan.
16. Sewaktu waktu Dosen, asisten jaga dapat melakukan tes untuk materi yang akan atau telah dikerjakan.
17. Praktikan melakukan analisis sesuai dengan materi yang dipraktikkan, mencatat hasilnya pada lembar kerja praktikum serta meminta ACC pada dosen/asisten penjaga

ISTILAH UMUM DALAM IMUNOLOGI

1. Serologi adalah ilmu yang mempelajari tentang reaksi antara antigen dan antibodi di dalam serum (yang berkaitan dengan imunologi)
2. Imunologi adalah ilmu yang mempelajari tentang respon imunitas (system kekebalan tubuh)
3. Imuno-Serologi klinik yaitu bila kemungkinan tersebut berhubungan dengan patologi klinik.
4. Antigen adalah zat asing atau zat yang dianggap asing (mikroba, sel tumor, jaringan, toksin, dan lain-lain) yang dapat mencetuskan respon imun dan pembentukan antibodi. Antigen sering pula disebut sebagai imunogen karena dapat membentuk antibodi tersebut.
5. Antibodi adalah zat anti yang dihasilkan oleh tubuh sebagai respon akibat adanya antigen dalam tubuh tersebut dan bersifat spesifik yang bekerja di luar sel.
6. Afinitas adalah kekuatan reaksi antara satu epitop (antigen) dengan satu sisi pengikat antigen (Ag-binding site antibodi). Bila cocok sekali, maka dapat dikatakan bahwa afinitasnya besar.
7. Aviditas adalah reaksi multiple antara antigen dan antibodi misalnya IgM memiliki *Ag-binding site per molecule* sehingga afinitas yang rendah namun aviditasnya tinggi.
8. Spesifisitas adalah reaksi lengkap atau cocok untuk semua penentu antigen oleh antibodi.
9. Reaksi silang adalah reaksi tidak lengkap.

10. *Prozone Effect* adalah suatu fenomena reaksi negatif palsu akibat antibodi yang berlebihan mengikat antigen yang sedikit.
11. *Postzone Effect* adalah suatu fenomena reaksi negatif palsu akibat antibodi yang sedikit mengikat antigen yang banyak.
12. Pengenceran Serial adalah suatu pengenceran serum dengan larutan isotonic, umumnya NaCl 0,85% (Saline) berkelipatan 2, yaitu $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, dst.
13. Titer adalah pengenceran tertinggi serum yang masih memberikan reaksi terhadap zatantinya.
14. Spesimen masa akut adalah spesimen yang berasal dari pengambilan darah pada saat pasien sedang demam atau pasien masuk rumah sakit.
15. Spesimen masa konvalesen adalah spesimen yang diambil 1-4 minggu setelah pengambilan spesimen masa akut atau pada saat pasien meninggalkan rumah sakit.
16. Spesimen masa akut dan spesimen masa konvalesen harus dikirimkan bersamaan, karena yang akan dinilai adalah peningkatan titer antibodinya.

SPESEMEN

Spesimen yang digunakan untuk tes serologi adalah serum, urin. Tetapi pada umumnya yang banyak digunakan sehari-hari adalah serum.

Ada 2 jenis serum dalam tes serologi, yaitu serum akut dan serum konvalesen.

1. Cara mendapatkan serum:

- a. Pengambilan Darah Vena menggunakan spuit:
 1. Cuci tangan dengan sabun dan air
 2. Sediakan spuit yang steril, jaga jangan sampai terkontaminasi
 3. Tourniquette diikatkan pada lengan atas sikut dan kencangkan. Periksa peredaran darah vena kemudian raba arteri radialis untuk meyakinkan aliran arteri tidak terhalang. Bila perlu pasien disuruh membuka dan menutup tangannya beberapa kali untuk melancarkan peredaran darah.
 4. Carilah vena dengan perabaan kemudian bersihkan kulit dengan dengan kapas alkohol 70% (*alcohol pads*). Biarkan kering, sebelum dilakukan penusukan janganlah meraba bagian yang sudah dibersihkan.
 5. Spuit diperiksa jangan sampai ada udara. Tangan kiri memegang erat tangan pasien. Kulit ditegangkan dengan ibu jari, tusukkan jarum dengan lubang menghadap ke atas dengan sudut kemiringan $30-45^{\circ}$ terhadap permukaan kulit depan vena. Turunkan spuit dan pindah-sejajarkan jarum dengan vena dan kedalaman tusukan kira-kira 1 cm langsung pada vena dengan hati-hati. Bila venanya baik, darah akan segera masuk pada spuit, sedangkan pada vena yang

sukar dilihat atau dirasakan maka dapat menarik dengan lembut kulit di sekitar pembuluh darah ke arah atas atau sedikit menjauh dari tubuh, terutama jika pembuluh darahnya kecil atau sulit dilihat. Tujuannya adalah untuk membuat pembuluh darah lebih tegang dan terlihat jelas, sehingga memudahkan bagi petugas medis untuk memasukkan jarum suntik ke dalam pembuluh darah dengan tepat dan aman.

6. Peganglah spuit dengan tangan kanan dan tariklah sedikit kulit menggunakan tangan kiri, kemudian tusuk area vena yang terlihat dan tarik piston spuit untuk menghisap darah. Setelah volume darah yang dibutuhkan cukup, lepaskan tourniquet dan letakkan kapas alkohol 70% di bekas tusukan. Biarkan pasien membuka lengan dan tekankan pada kapas bekas tusukan (untuk mengembalikan vena ke posisi semula).
7. Lepaskan bagian jarum pada spuit dan darah dimasukkan ke dalam tabung penampung yang telah disediakan dengan perlahan-lahan/hati-hati untuk mencegah terjadinya lisis.

b. Pengambilan Darah Vena dengan sistem BD VacutainerTM

1. Cuci tangan dengan sabun dan air.
2. Sediakan komponen BD VacutainerTM sistem, seperti *needle, holder, evacuated tubes, dan needle disposal box*.
3. Tourniquet diikatkan pada lengan atas sikut dan kencangkan. Periksa peredaran darah vena kemudian raba arteri radialis untuk meyakinkan aliran arteri tidak terhalang. Bila perlu pasien disuruh membuka dan menutup tangannya beberapa kali untuk melancarkan peredaran darah.

4. Carilah vena dengan perabaan kemudian bersihkan kulit dengan kapas alkohol 70% (*alcohol pads*). Biarkan kering, sebelum dilakukan penusukan janganlah meraba bagian yang sudah di bersihkan.
5. Pegang bagian tutup yang berwarna dengan satu tangan, kemudian putar dan lepaskan bagian yang berwarna putih dengan tangan lainnya.
6. Pegang dengan cara memutar jarum pada holder, biarkan tutup berwarna tetap pada jarum.
7. Persiapkan posisi pungsi vena. Lepaskan tutup jarum yang berwarna.
8. Lakukan pengambilan darah vena seperti biasa dengan posisi lengan kearah bawah dengan sudut 15°
9. Masukkan tabung ke holder. Tempatkan jari ke telunjuk dan tengah pada pinggiran holder dan ibu jari pada dasar tabung, dorong tabung sampai pada ujung holder. Lepaskan Tourniquette saat darah mulai mengalir ke tabung.
10. Bila kevakuman habis, maka aliran darah berhenti, tekan perlahan pinggiran holder dengan ibu jari untuk menempatkan stopper dan holder. Bila membutuhkan sampel lagi ulangi dari tahap vii. Urutkan pemakaian tabung: tabung untuk kultur darah, tabung tanpa zat aditif, tabung dengan zat aditif (sitrat, heparin), tabung EDTA.
11. Setelah sampel darah terkumpul, maka tabung di bolak-balik 5-10 kali secara perlahan untuk mencampur zat aditif dengan sampel darah. Jaringan dikocok (menyebabkan hemolisis). Lepaskan tabung terakhir, sebelum mencabut jarum dari vena.

12. Buanglah jarum bekas pakai kedalam disposal container. Bila ada insiden holder terkontaminasi, dianjurkan untuk dibuang dan diganti dengan yang baru.

c. Pengolahan serum

1. Darah yang sudah berhasil ditampung dibiarkan membeku kira-kira 35 menit.
2. Setelah beku sempurna, darah diputar dengan centrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 2000-3000 rpm.
3. Setelah terpisah sempurna, serum dipindahkan ke dalam tabung lain/microtube/cap sample dan berilah label berdasarkan identitas pasien tersebut dan tanggal pengambilan darah.

d. Aturan untuk mendapatkan serum yang jernih

1. Pengambilan darah sebelum makan (setelah berpuasa 10-14 jam) akan menghilangkan butiran-butiran lemak yang terdapat di darah.
2. Gunakan spuit steril dan peralatan gelas nya.
3. Pisahkan jarum dari spuit dan alirkan darah perlahan-lahan melalui dinding bagian dalam tabung untuk menghindari terjadinya hemolisis.
4. Biarkan pada suhu kamar selama 35 menit agar proses pembekuan berjalan sempurna.
5. Pisahkan serum dari sel darah secepat mungkin.
6. Biarkan serum di dalam lemari es sampai tes dilakukan.
7. Jangan tercampur dengan asam atau basa maupun logam-logam berat seperti air raksa (Hg) dan perak (Ag), karena dapat mendenaturasi protein serum dan berakibat serum tidak dapat dipakai lagi untuk pemeriksaan.

8. Hindarkan dari panas dan kontaminasi kuman-kuman. Panas yang berlebihan akan menggumpalkan protein serum, sedangkan pertumbuhan bakteri akan menyebabkan pemisahan molekul protein serum. Serum yang sudah dipisahkan dari sel darahnya dapat disimpan selama 72 jam di dalam lemari es. Bila penyimpanan perlu lebih lama lagi serum dimasukkan dalam *freezer*. Kemudian tulis etiket pada *serum cap* sebelum disimpan.

2. Pengiriman Spesimen

Pengiriman spesimen serologi kadang-kadang diperlukan, bagi laboratorium yang ada di daerah, spesimen tersebut (serum, plasma, cairan otak) harus:

- a. Pastikan spesimen (serum, plasma, cairan otak) diambil secara steril.
- b. Kirim spesimen sesegera mungkin setelah diambil.
- c. Jangan kirim darah yang dibekukan (tanpa dilakukan pemisahan serum sebelumnya), kecuali jika diperlukan darah utuh.
- d. Jangan kirim ulang spesimen yang sudah dikirim sebelumnya.
- e. Simpan spesimen dalam lemari es sebelum pengiriman.

PRAKTIKUM 1: PEMERIKSAAN HBsAg

Penyebab hepatitis adalah penyakit sistemik yang terutama berhubungan dengan hati. Kebanyakan penyebab kasus hepatitis akut adalah oleh virus Hepatitis A, Hepatitis B (HBV) atau Virus Hepatitis C. Antigen kompleks ditemukan pada permukaan HBV yang dikenal dengan HbsAg. Model terdahulu disebut Australian atau Au antigen. Adanya HbsAg pada serum atau plasma sebagai indikasi pada infeksi hepatitis B yang aktif, juga infeksi akut atau kronik. Pada tipikal infeksi hepatitis B, HbsAg akan dideteksi 2 sampai 4 minggu sebelum kadar ALT menjadi abnormal dan 3 sampai 5 minggu sebelum gejala atau penyakit kuning berkembang. HbsAg mempunyai 4 subtipe prinsip: *adw, ayw, adr dan ayr.*

Karena faktor heterogenitas antigenik ada 10 serotipe mayor pada virus hepatitis. Tes HbsAg (serum/plasma) pada tes langsung untuk pemeriksaan kualitatif adanya HbsAg pada spesimen serum atau plasma. Tes ini memanfaatkan kombinasi antibodi monoklonal dan poliklonal mendeteksi peningkatan kadar HbsAg pada serum atau plasma. Pemeriksaan HbsAg secara rutin dilakukan pada pendonor darah untuk mengidentifikasi antigen hepatitis B. Transmisi hepatitis B melalui transfusi sudah hampir tidak terdapat lagi berkat screening HbsAg pada darah pendonor. Namun, meskipun insiden hepatitis B terkait transfusi sudah menurun, angka kejadian hepatitis B tetap tinggi. Hal ini terkait dengan transmisi virus hepatitis B melalui beberapa jalur, yaitu parenteral, perinatal, atau kontak seksual. Orang yang berisiko tinggi terkena infeksi hepatitis B adalah orang yang bekerja di sarana kesehatan, ketergantungan obat, suka berganti-ganti pasangan seksual, sering mendapat transfusi, hemodialisa, bayi baru lahir yang tertular dari ibunya yang menderita hepatitis B.

Pemeriksaan HBsAg yang berguna untuk diagnosa infeksi virus hepatitis B, baik untuk keperluan klinis maupun epidemiologi. Skrining darah di unit-unit transfusi darah (UTD PMI), serta digunakan pada evaluasi terapi hepatitis B kronis. Pemeriksaan ini juga bermanfaat untuk menetapkan bahwa hepatitis akut yang diderita disebabkan oleh virus B atau superinfeksi dengan virus lain.

A. Metode : imunokromatografi

B. Prinsip : imunokromatografi dengan prinsip serum yang diteteskan pada bantalan sampel bereaksi dengan partikel yang telah dilapisi dengan anti HBs (antibodi). Campuran ini selanjutnya akan bergerak sepanjang strip membran untuk berikatan dengan antibody spesifik. Pada daerah tes, sehingga akan menghasilkan garis warna.

C. Cara kerja :

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Siapkan serum dalam tabung reaksi
3. Keluarkan strip HBsAg dari kemasannya
4. Celupkan kedalam seru, biarkan selama 15 menit
5. Amati hasil test yang terjadi

D. Interpretasi Hasil

- Positif (+) : terdapat 2 garis merah pada daerah control dan test
- Negatif (-) : terdapat satu garis pada kontrol saja
- Invalid : tidak terbentuk garis merah pada control test atau hanya terbentuk garis merah pada test saja

PRAKTIKUM 2: PEMERIKSAAN HBsAb

Hati merupakan organ yang berperan penting dalam metabolisme, seperti pada metabolisme glukosa. hati dapat berperan dalam penyimpanan glukosa berlebih bersama dengan otot. selain itu hati berperan dalam metabolisme lemak, dan detoksifikasi tubuh terhadap zat toksik. Jenis uji fungsi hati dapat dibagi menjadi 3 besar yaitu penilaian fungsi hati, mengukur aktivitas enzim, dan mencari etiologi penyakit. Pada penilaian fungsi hati diperiksa fungsi sintesis hati, ekskresi, dan detoksifikasi.

Jenis Hepatitis	Pemeriksaan serologi	Definisi dan penggunaan
Hepatitis A	Anti-HAV IgM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi IgM terhadap VHA ▪ Penanda infeksi akut VHA, bertahan 4-6 bulan setelah infeksi
Hepatitis B	Anti HAV	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi terhadap VHA bertahan seumur hidup
	HBsAg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antigen <i>surface</i> hepatitis B ▪ Penanda infeksi akut atau kronik VHB, tes penyaring untuk donor darah dan wanita hamil, pemantauan infeksi VHB
	HBeAg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antigen e hepatitis B, berhubungan dengan nukleokapsid VHBs B, menandakan replikasi virus aktif. ▪ Penanda untuk menyatakan seseorang berisiko menularkan infeksi virus hepatitis B
	HBcAg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antigen core hepatitis B
	Anti-HBs	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi terhadap HBsAg. ▪ Penanda infeksi masa lampau atau respons imun setelah vaksinasi hepatitis B
	Anti-HBe	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi terhadap HBe. ▪ Penanda pada pasien terinfeksi VHB dengan risiko rendah menularkan
	Anti-HBc	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi terhadap HBcAg ▪ Penanda infeksi akut, telah sembuh, atau infeksi kronik VHB
	Anti-HBc IgM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi kelas IgM terhadap HBcAg ▪ Penanda infeksi akut VHB, positif selama 4-6 bulan setelah infeksi ▪ Penanda <i>window period</i> dengan HBsAg negative
Hepatitis C	HBV-DNA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA VHB diperiksa menggunakan PCR ▪ Penanda replikasi virus pada stadium awal
	Anti-HCV	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antibodi terhadap VHC

Keterangan :

VHA : virus hepatitis A

VHC : virus hepatitis C

VHB : virus hepatitis B

A. Metode : imunokromatografi

B. Prinsip : Hepatitis B Surface Antigen Test Strip (Serum/Plasma) adalah tes

kualitatif imunologi secara aliran lateral untuk mendeteksi HbsAg pada

serum/plasma. Membran dilapisi dengan anti antibodi HBsAg poliklonal di

garis tes. Selama tes berlangsung spesimen serum atau plasma bereaksi dengan

partikel yang dilapisi dengan anti-HBsAg antibodi monoklonal. Campuran tersebut akan bergerak sepanjang membran secara kapilaritas dan bereaksi dengan anti- HBsAg antibody poliklonal pada membran dan menghasilkan garis berwarna. Munculnya garis berwarna pada garis tes mengindikasikan hasil positif dan jika tidak ada garis berwarna pada garis tes menandakan hasil negatif. Sebagai prosedur kontrol, garis berwarna harus selalu muncul pada garis kontrol yang menandakan volume sampel cukup dan telah mengisi membran.

D. Cara kerja :

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Darah dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
3. Buka strip anti HBs dari kemasannya
4. Celupka strip tersebut kedalam tabung yang berisi serum
5. Biarkan selama 15 menit, angkat dan baca hasilnya

E. Interpretasi Hasil :

- Positif (+) : terdapat 2 garis pada daerah control dan test saja
- Negatif (-) : hanya terdapat 1 garis pada daerah control
- Invalid : tidak terdapat garis pada daerah control dan tes atau hanya terdapat garis pada daerah test saja

PRAKTIKUM 3: PEMERIKSAAN ANTI-HCV

Pemeriksaan Anti-HCV (Antibodi terhadap Virus Hepatitis C) adalah tes diagnostik yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi terhadap virus hepatitis C dalam darah. Virus Hepatitis C adalah virus yang menyebabkan penyakit hepatitis C, yang dapat menyebabkan kerusakan hati serius dan berpotensi fatal. Virus ini ditularkan melalui kontak dengan darah yang terinfeksi, misalnya melalui transfusi darah yang tidak disaring, penggunaan jarum suntik yang terkontaminasi, atau tindakan medis yang tidak steril. Ketika seseorang terinfeksi virus hepatitis C, sistem kekebalan tubuhnya akan merespons dengan memproduksi antibodi untuk melawan virus tersebut. Antibodi Anti-HCV ini adalah penanda infeksi virus hepatitis C dan akan tetap ada dalam darah bahkan setelah infeksi telah diatasi atau menjadi kronis.

Pemeriksaan Anti-HCV biasanya menggunakan metode serologi, yang mendeteksi antibodi terhadap HCV dalam sampel darah. Metode yang umum digunakan adalah Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) atau teknik imunoblot. ELISA bekerja dengan mendeteksi reaksi antara antibodi Anti-HCV dalam sampel darah dan antigen HCV yang diikat pada permukaan piring ELISA. Jika ada reaksi, akan terjadi perubahan warna yang dapat diukur dan diinterpretasikan sebagai positif atau negatif terhadap antibodi Anti-HCV. Hasil positif dari tes serologi perlu dikonfirmasi dengan metode lain seperti tes Western blot untuk memastikan keakuratan diagnosis. Tes konfirmasi akan mengonfirmasi keberadaan antibodi Anti-HCV dalam sampel dan membantu dalam menghilangkan kemungkinan hasil palsu positif.

A. Metode : Imunokromatografi

B. Prinsip : menggunakan rekombinan HCV protein sebagai viral antigen.

C. Reagen : HCV / buffer HCV

D. Cara kerja :

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Tempatkan kemasan strip pada temperature ruangan sebelum dibaca
3. Siapkan serum dalam tabung reaksi kemudian diambil kurang lebih satu tetes serum, lalu masukan strip HCV setelah itu masukan buffer HCV kurang lebih 2 tetes
4. Tunggu sampai muncul garis merah pada strip

E. Interpretasi Hasil :

- Positif (+) : terdapat 2 garis merah pada daerah control dan test
- Negatif (-) : terdapat satu garis pada kontrol saja
- Invalid : tidak terbentuk garis merah pada control test atau hanya terbentuk garis merah pada test saja

PRAKTIKUM 4: PEMERIKSAAN ANTI-HAV

Pemeriksaan Hepatitis A Virus (HAV) didasarkan pada identifikasi antibodi spesifik terhadap virus tersebut dalam sampel darah manusia. HAV adalah virus RNA yang menyebabkan penyakit hepatitis A pada manusia. Virus ini biasanya ditularkan melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh tinja individu yang terinfeksi. Virus masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan dan menyerang hepatosit (sel hati), menyebabkan peradangan dan kerusakan hati. Setelah paparan terhadap HAV, sistem kekebalan tubuh mulai memproduksi antibodi spesifik untuk melawan virus ini.

Dua antibodi utama yang dihasilkan oleh tubuh sebagai respons terhadap infeksi HAV adalah:

- Antibodi IgM (Immunoglobulin M): Antibodi ini muncul lebih awal selama infeksi aktif dan menurun setelah beberapa bulan.
- Antibodi IgG (Immunoglobulin G): Antibodi ini berkembang lebih lambat tetapi dapat bertahan dalam darah jangka panjang, memberikan kekebalan yang berkelanjutan terhadap infeksi masa depan.

Metode imunokromatografi memanfaatkan prinsip reaksi antigen-antibodi untuk mendeteksi keberadaan antibodi spesifik dalam sampel. Dalam pemeriksaan HAV, antigen virus hepatitis A yang dimurnikan atau diproses ditempatkan pada strip atau kaset tes. Ketika sampel darah pasien diberikan ke zona uji perangkat tes, jika antibodi anti-HAV hadir dalam darah tersebut, mereka akan bereaksi dengan antigen yang ada di strip tes.

A. Metode: Imunokromatografi

B. Prinsip:

Jika ada antibodi anti-HAV dalam sampel darah, mereka akan membentuk kompleks antigen-antibodi. Kompleks ini kemudian bergerak melintasi strip atau kaset tes, mencapai zona kontrol dan zona pembatal. Jika tes berfungsi dengan baik, garis kontrol akan muncul sebagai tanda bahwa reaksi telah terjadi. Jika ada antibodi anti-HAV dalam sampel, garis uji juga akan muncul, menunjukkan hasil positif.

C. Cara Kerja:

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Tempatkan kemasan strip pada temperature ruangan sebelum dibaca
3. Siapkan serum dalam tabung reaksi kemudian diambil kurang lebih satu tetes serum, lalu masukan strip HCV setelah itu masukan buffer HCV kurang lebih 2 tetes
4. Tunggu sampai muncul garis merah pada strip

D. Interpretasi Hasil :

- Positif (+) : terdapat 2 garis merah pada daerah control dan test
- Negatif (-) : terdapat satu garis pada kontrol saja
- Invalid : tidak terbentuk garis merah pada control test atau hanya terbentuk garis merah pada test saja

PRAKTIKUM 5: PEMERIKSAAN HIV

Pemeriksaan HIV (Human Immunodeficiency Virus) didasarkan pada identifikasi antibodi atau antigen spesifik terhadap virus tersebut dalam sampel darah manusia. Pemeriksaan HIV melibatkan pemahaman tentang virus HIV, respons imun tubuh terhadap infeksi, dan prinsip-prinsip imunologi yang mendasari metode pengujian.

HIV adalah virus yang menyebabkan AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), suatu kondisi yang melemahkan sistem kekebalan tubuh manusia. Virus ini menyerang sel-sel sistem kekebalan tubuh, terutama sel CD4, yang mengakibatkan penurunan fungsi sistem kekebalan tubuh. HIV dapat ditularkan melalui kontak dengan cairan tubuh yang terinfeksi seperti darah, air mani, cairan vagina, dan susu ibu.

Setelah terinfeksi HIV, sistem kekebalan tubuh akan bereaksi dengan memproduksi antibodi terhadap virus tersebut. Antibodi HIV biasanya terdeteksi dalam darah beberapa minggu hingga beberapa bulan setelah infeksi terjadi. Proses ini disertai dengan penurunan jumlah sel CD4 dalam darah dan peningkatan jumlah virus dalam tubuh.

Cara penularan infeksi HIV dapat melalui:

1. Kontak seksual (hubungan seks), merupakan cara penularan paling besar terutama pada kelompok heteroseksual dan homoseksual (laki - laki)
 2. Penularan dari ibu ke anak, terjadi selama kehamilan melalui saluran plasenta, dan setelah melahirkan dari pemberian ASI
 3. Inokulasi pasien oleh darah penderita HIV atau produk darah transfusi dari donor pemakai obat / narkoba melalui jarum suntik dan transfusi darah yang terinfeksi HIV
- Penularan HIV melalui hubungan seksual merupakan jalur yang sangat penting.

Metode pemeriksaan HIV yang paling umum adalah tes serologi, yang mendeteksi antibodi terhadap HIV dalam sampel darah. Tes serologi biasanya menggunakan teknik

Imunokromatografi dan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sebagai langkah skrining awal. ELISA mengidentifikasi keberadaan antibodi HIV dalam sampel darah. Jika hasil ELISA positif, tes konfirmasi seperti Western blot atau tes imunoblot lainnya dapat dilakukan untuk memastikan keakuratan diagnosis.

A. Metode: Imunokromatografi dan ELISA

B. Prinsip:

Pada tes serologi HIV, jika ada antibodi HIV dalam sampel darah, mereka akan bereaksi dengan antigen HIV yang terdapat pada permukaan piring ELISA. Jika ada reaksi antara antibodi dan antigen, akan terjadi perubahan warna yang dapat diukur secara kuantitatif atau secara visual. Hasil tes dikonfirmasi dengan melihat rasio optik atau pola strip pada tes Western blot atau tes imunoblot lainnya. Selain tes serologi, terdapat juga metode pemeriksaan HIV berbasis antigen, yang mendeteksi protein spesifik virus HIV, seperti p24 antigen. Pengujian berbasis nukleotida seperti PCR (Polymerase Chain Reaction) juga dapat digunakan untuk mendeteksi materi genetik virus HIV dalam sampel darah.

C. Cara Kerja

1. Imunokromatografi:

- 1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Tempatkan kemasan strip pada temperature ruangan sebelum dibaca
- 3) Siapkan serum dalam tabung reaksi kemudian diambil kurang lebih satu tetes serum, lalu masukan strip HCV setelah itu masukan buffer HCV kurang lebih 2 tetes
- 4) Tunggu sampai muncul garis merah pada strip

Interpretasi Hasil:

- Reaktif : Jika terdapat 2 garis merah (pada regio kontrol/C dan regio tes/T)
- Non Reaktif : Jika hanya 1 garis merah yang muncul pada regio (C)

2. ELISA:

- 1) Ditandai 3 wells sebagai kontrol negatif (B1, C1, D1), 2 wells untuk kontrol positif (E1 dan F1), dan 1 well untuk Blank (A1).
- 2) Ditambahkan 100 uL positif kontrol, negatif kontrol, dan spesimen ke masing-masing wells yang telah ditentukan sebelumnya (tahap no.1)
- 3) Tutup plate dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C
- 4) Dicuci well selama 30-60 detik sebanyak 5 kali menggunakan Wash Buffer. Pada pencucian terakhir, plate dibalik dan ditempatkan di atas kain atau tissue untuk membersihkan bagian luar yang tersisa.
- 5) Ditambahkan 50 uL chromogen A dan 50 uL chromogen B, termasuk ke dalam blank. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37⁰C di tempat yang terhindar dari cahaya.
- 6) Ditambahkan 50 uL larutan Stop Solution pada masing-masing well dan dihomogenkan / mix secara perlahan.
- 7) Dihitung absorbansi pada panjang gelombang 450 nm. Kalkulasikan nilai Cut-off value dan evaluasi hasilnya. Pembacaan absorbansi dilakukan tidak kurang dari 10 menit setelah penambahan Stop Solution.

PRAKTIKUM 6: ELISA

A. Tujuan : Untuk memahami metode pemeriksaan dengan ELISA

B. Landasan Teori

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) merupakan metode pemeriksaan yang menerapkan prinsip ikatan antigen-antibodi spesifik serta adanya penambahan enzim untuk perubahan warna. Penambahan enzim ini menyebabkan perubahan warna pada deteksi suatu reaksi. Elisa memiliki beberapa tipe yaitu sandwich, *direct*, *indirect* dan *competitive*. Pada elisa sandwich, menggunakan 2 antibodi mengenali antigen yang sama pada epitop berbeda. Antigen dapat dideteksi atau dihitung, antibodi dimobilisasi pada microtiter well. Sampel yang mengandung antigen ditambahkan dan diberikan untuk bereaksi dengan antibodi yang dimobilisasi. Setelah itu dicuci, dan penambahan antibodi spesifik kedua untuk epitop berbeda pada antigen agar dapat beraksi. Setelah itu antibodi sekunder tersebut dicuci (*washing*), ditambahkan substrat dan reaksi warna dihitung. Elisa *indirect* lebih sensitif dibandingkan dengan elisa *direct*. Elisa *competitive* lebih sensitif dibandingkan elisa *indirect*.

Radioimmunoassay (RIA) merupakan metode yang dapat mengukur suatu substansi secara langsung maupun pengukuran pada suatu jaringan biopsi secara tidak langsung. Keuntungan dari RIA yaitu reproduktifitas baik, akurasi, spesifitas, sensitifitas, dapat diterapkan pada spesimen yang sangat kecil. Penggunaan radio aktif menjadi kunci dari metode ini dapat sangat sensitif dapat penerapannya. Meskipun demikian karena penggunaan bahan radio aktif menjadikan pemeriksaan ini sangat mahal dibandingkan dengan metode ELISA dan lebih berbahaya.

ELISA memiliki keunggulan dibandingkan dengan RIA yaitu ELISA dapat memiliki sensitifitas yang sama seperti pada RIA tanpa memanfaatkan ketidakstabilan isotop gamma-emitting. Namun, sebelum sistem ELISA dapat memperoleh penggunaan

luas, sejumlah aspek tes harus dioptimalkan. Hal Ini termasuk persiapan dan penggunaan reagen, sifat fase padat, pilihan enzim, dan metode konjugasi enzim-antibodi. Dengan pemecahan masalah ini, ELISA harus mencapai penggunaan luas untuk diagnosis cepat dari sejumlah besar agen infeksi.

C. Prinsip:

Beberapa prinsip tes ELISA:

1. *Direct*

Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah varian ELISA yang sederhana dan efisien yang melibatkan interaksi langsung antara antibodi terkait-enzim tunggal dan antigen yang diinginkan yang ada dalam sampel.

Dalam ELISA *direct*, langkah pertama adalah menempelkan/melekatkan antigen atau sampel langsung ke permukaan padat, seperti pelat mikrotiter. Hal ini bisa dilakukan dengan cara menempelkan secara fisik atau dengan mengikat secara kovalen antigen ke pelat. Setelah antigen terikat pada pelat, permukaan pelat yang mengandung antigen ini akan menjadi tempat penangkap untuk langkah berikutnya dalam proses ELISA. Dengan kata lain, antigen yang melekat di pelat berfungsi sebagai tempat untuk menangkap atau menyaring antibodi yang mungkin hadir dalam sampel yang diuji.

Setelah antigen diimobilisasi/dilekatkan, antibodi pendeteksi terkonjugasi ditambahkan ke pelat. Antibodi pendeteksi ini biasanya diberi label dengan enzim, seperti peroksidase atau alkali fosfatase. Antibodi pendeteksi secara spesifik berikatan dengan target protein atau antigen yang ada di pelat, membentuk kompleks antigen-antibodi.

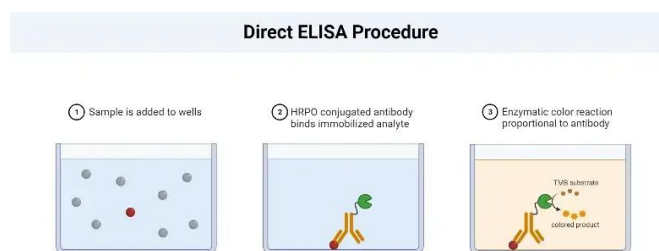
Setelah inkubasi untuk memungkinkan pengikatan antibodi-antigen terjadi, pelat dicuci untuk menghilangkan zat yang tidak terikat atau tidak terikat secara spesifik. Ini dilakukan untuk membersihkan pelat dan memastikan hanya antibodi yang benar-benar

berikatan dengan antigen yang tetap di sana. Proses pencucian ini penting untuk mengurangi gangguan dan memastikan bahwa hasil pengujian spesifik dan akurat.

Setelah pencucian, dilakukan penambahan bahan khusus yang disebut substrat ke dalam pelat. Substrat ini bereaksi dengan enzim yang terikat pada antibodi yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen. Selama reaksi ini terjadi, substrat menghasilkan sinyal yang bisa terlihat, misalnya dengan mengubah warna atau memancarkan cahaya. Intensitas sinyal ini sebanding dengan jumlah antigen dalam sampel: semakin banyak antigen, semakin kuat sinyal yang dihasilkan.

Setelah itu, dengan bantuan alat khusus seperti colorimeter atau pembaca fluoresensi untuk mengukur sinyal yang dihasilkan oleh reaksi enzimatik (Elisa Reader). Alat ini mengukur kekuatan warna atau intensitas cahaya yang dipancarkan. Berdasarkan pengukuran ini, kita bisa mengetahui seberapa banyak antigen ada dalam sampel, karena intensitas sinyal akan berbanding lurus dengan jumlah antigen.

Direct ELISA adalah metode langsung dan cepat untuk mendeteksi dan mengukur antigen dalam sampel. Ini melibatkan interaksi langsung antara antibodi terkait-enzim dan antigen target.

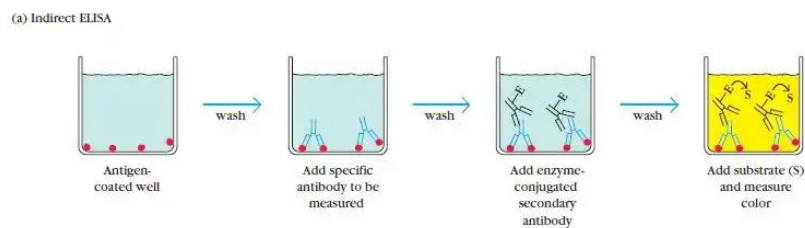


2. *Indirect*

Dalam metode ELISA *Indirect*, langkah pertama melibatkan penggunaan antibodi primer yang khusus menempel pada antigen yang ingin dideteksi. Antibodi primer ini

tidak memiliki label khusus dan tidak terikat dengan enzim apapun. Untuk mengetahui keberadaan antibodi primer tersebut, maka diperlukan bantuan antibodi sekunder. Antibodi sekunder ini telah diberi label dengan enzim seperti peroksidase atau alkali fosfatase. Ketika ditambahkan antibodi sekunder ke dalam sampel, maka akan berikatan dengan antibodi primer yang sudah menempel pada antigen, dan membentuk kompleks antibodi-antibodi.

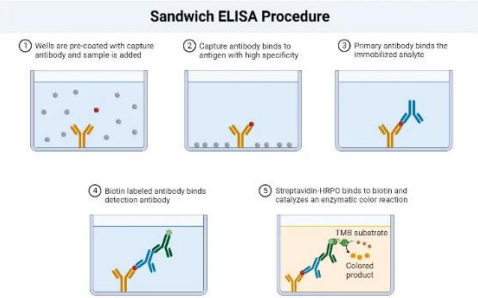
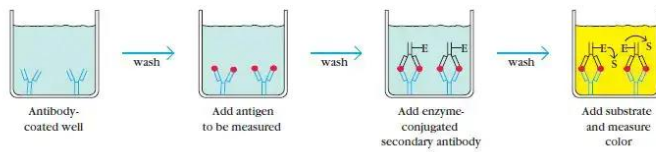
Dengan cara ini, antibodi sekunder yang berlabel enzim bertindak sebagai indikator untuk menunjukkan keberadaan antibodi primer. Ketika reaksi enzimatik dilakukan selama tahap deteksi berikutnya, enzim pada antibodi sekunder akan menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi sehingga membantu untuk mengetahui apakah ada antibodi primer yang terikat pada antigen yang diinginkan di dalam sampel.



3. Sandwich

Metode Sandwich paling sering digunakan dalam bidang klinis atau riset dan biasanya digunakan untuk deteksi antigen. Metode ini diawali dengan tahap *Capture*, yang berperan untuk meningkatkan spesifisitas. Antibodi untuk membantu proses immobilisasi antigen disebut *Capture Antibody* yang ditambahkan ke microwell. *Capture Antibody* akan menangkap dan mengikat antigen spesifik yang ingin dideteksi. Sampel yang mengandung antigen dimasukkan ke dalam well dan akan berikatan dengan *Capture Antibody* yang terikat pada well.

(b) Sandwich ELISA

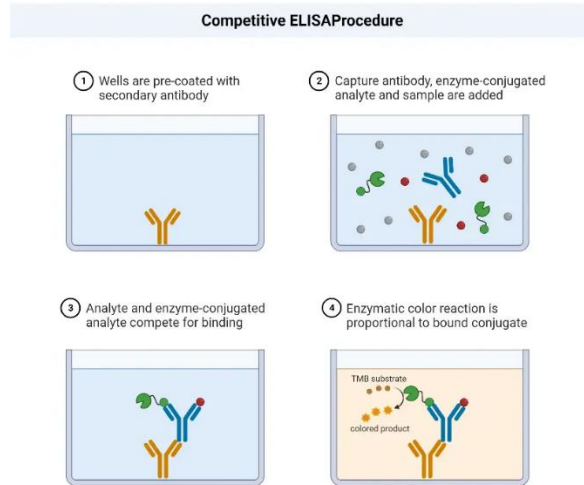


4. Competitive

Prinsip metode ini adalah dengan menambahkan suatu kompetitor ke dalam microplate. Antigen diimobilisasi pada microplate, lalu ditambahkan antibodi anti-A yang sudah terkonjugasi dengan enzim (sebagai inhibitor antigen). Sampel yang berisi antibodi anti-A dimasukkan ke dalam well. Kedua antibodi tersebut akan berkompetisi untuk berikatan dengan antigen yang sudah dilekatkan pada microplate.

Ketika substrat ditambahkan, **tidak akan ada perubahan warna** yang menunjukkan **hasil tes positif** (tidak ada persaingan) untuk antibodi spesifik. Sebaliknya, **jika sampel tidak mengandung antibodi spesifik**, antibodi terkait-enzim akan berikatan dengan antigen, **menyebabkan perubahan warna dan hasil tes negatif** (ada persaingan).

Dalam ELISA ini, antigen atau antibodi dalam sampel bersaing dengan referensi untuk berikatan dengan masing-masing antibodi atau antigen berlabel dalam jumlah terbatas. Intensitas sinyal keluaran akan berbanding terbalik dengan jumlah antigen dalam sampel: semakin tinggi konsentrasi antigen, semakin lemah sinyal keluaran yang dihasilkan.



Komponen-komponen pemeriksaan ELISA:

1. Fase padat

Fase padat dibutuhkan untuk memungkinkan perbedaan yang mana yang terikat dan mana yang beda. Contoh : selulosa, kaca plastic, manik-manik (beads), tabung atau mikroplat (plate microtitter). Protein antibodi dan virus dapat dengan mudah dilabel pada permukaan plastik, seperti *polyvinyl* atau *polystyren* sehingga plastic merupakan pilihan yang bermanfaat untuk fase padat.

2. Enzim

Enzim yang digunakan dalam konjugat di mana enzim ini dapat dilabelkan pada antibodi atau antigen.

3. Substrat

Dengan enzim Horse Radish Peroxidase (HRP) ada beberapa substrat kromogen yang dapat digunakan, di antaranya adalah:

- α -Naftol
- *Toluidin, 5 amino salisilat*
- *Azino-benzo-thiazolidin-sulfat (ABTS)*
- *Orthophenyldiamine (OPD)*

- 3,3,5,5 Tetra Methyl Benzidine (TMB)

ELISA untuk diagnosis virus terdiri dari beberapa tahapan, yaitu:

1. Suatu antibodi spesifik diabsorpsi pada sumur-sumur mikroplat plastic berlabel khusus.
2. Ditambahkan spesimen yang akan dites, bila terdapat antigen atau virus, maka antigen/virus tersebut akan diikat oleh antibodi, antigen yang berlebihan akan disingkirkan melalui pencucian.
3. Konjugat, yang terdiri dari antibodi anti virus yang terikat pada enzim ditambahkan. Bila virus telah terikat mikroplat, bagian konjugat akan melekat. Konjugat yang tidak terikat akan disingkirkan melalui pencucian.
4. Ditambahkan substrat enzim, dan substrat ini akan dihidrolisis dengan menghasilkan zat yang berwarna yang dapat diukur dengan spektrofotometer/fotometer. Hasil pembacaan adalah sebanding dengan jumlah enzim yang terikat pada mikroplat yang selanjutnya berhubungan dengan jumlah antigen atau virus dalam spesimen tadi.

CONTOH KIT ELISA

The image shows a screenshot of the Labome website. The header includes the Labome logo and the tagline "The world of laboratories". Below the header, there is a breadcrumb trail: "home > Santa Cruz Biotechnology > RBP (C-4) Antibody". The main content area is titled "product summary" and contains a form for requesting information. The form includes a text input field for "request information" and a button labeled "email address". Below the form, there is a table of product details:

company name :	Santa Cruz Biotechnology
product type :	antibody
product name :	RBP (C-4) Antibody
catalog :	sc-48384
quantity :	200 µg/ml
price :	279 USD
clonality :	monoclonal
host :	mouse
reactivity :	human, dog, rat, mouse
application :	immunohistochemistry - paraffin section, western blot, ELISA, immunoprecipitation, immunohistochemistry, immunocytochemistry
publications citing this reagent :	1. Kutasy B, Gosemann J, Doi T, Fujiwara N, Friedmacher F, Puri P. Nitrofen interferes with trophoblastic expression of retinol-binding protein and transthyretin during lung morphogenesis in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia model. <i>Pediatr Surg Int.</i> 2012;28:143-8 pubmed

At the bottom of the form, there is a link for "more info or order" pointing to the Santa Cruz Biotechnology product webpage.

D. Cara Kerja

Prosedur pemeriksaan ELISA harus mengikuti prosedur kerja yang terdapat di dalam insert kit. Berikut ini hanyalah salah satu contoh prosedur kerja pemeriksaan ELISA:

1. Ditandai 3 wells sebagai kontrol negatif (B1, C1, D1), 2 wells untuk kontrol positif (E1 dan F1), dan 1 well untuk Blank (A1).
2. Ditambahkan 100 uL positif kontrol, negatif kontrol, dan spesimen ke masing-masing wells yang telah ditentukan sebelumnya (tahap no.1)
3. Tutup plate dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C
4. Dicuci well selama 30-60 detik sebanyak 5 kali menggunakan Wash Buffer. Pada pencucian terakhir, plate dibalik dan ditempatkan di atas kain atau tissue untuk membersihkan bagian luar yang tersisa.
5. Ditambahkan 50 uL chromogen A dan 50 uL chromogen B, termasuk ke dalam blank. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37⁰C di tempat yang terhindar dari cahaya.
6. Ditambahkan 50 uL larutan Stop Solution pada masing-masing well dan dihomogenkan / mix secara perlahan.
7. Dihitung absorbansi pada panjang gelombang 450 nm. Kalkulasikan nilai Cut-off value dan evaluasi hasilnya. Pembacaan absorbansi dilakukan tidak kurang dari 10 menit setelah penambahan Stop Solution.

DAFTAR PUSTAKA

- Karnen Garna. 2010. *Imunologi II*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Marsetio Donosepoetra. 2003. *Imunoasai Terapan Pada Beberapa Penyakit Infeksi*. Airlangga University Perss.
- Meyer-Hermann M, Figge MT, Straub RH (2009). "Mathematical modeling of the circadian rhythm of key neuroendocrine-immune system players in rheumatoid arthritis: a systems biology approach". *Arthritis Rheum*. 60 (9):2585–94.
- Puspa Wardhani, Prihatini, Probohesodo, M.Y. 2012. Kemampuan Uji Tabung Widal Menggunakan Antigen Import dan Antigen Lokal. *Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair/RSU Dr Soetomo Surabaya*.
- Risky Vitria Prasetyo, Ismoedijanto. 2012. Metode Diagnostik Demam Tifoid Pada Anak. *Divisi Tropik dan Penyakit Infeksi. Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Anak FK UNAIR/RSU Dr. Soetomo Surabaya*
- Siti Boedina K. 2010. *Imunologi: Diagnosa dan Prosedur Laboratorium*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Mayo Foundation for Medical Education and Research. C-reactive protein test. Diakses pada 18 Agustus 2013.
- Marsetio Donosepoetra. 2003. *Imunoasai Terapan Pada Beberapa Penyakit Infeksi*. Airlangga University Perss. Pentingnya Pemeriksaan Apo B & hsCRP, *Laboratorium Klinik Prodia*. Diakses pada 18 Agustus 2013.
- Gambino R. 2003. C-Reactive Protein. Undervalued, Underutilized. *Clinical Chemistry*: 43, No. 11. *Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association*, Pearson TA, et al. 2003. *Circulation* 107:499-511.
- R. H. Yolken. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. *Yale J Biol Med*, 53(1):85–92.
- Anhalt JE. 1975. Radioimmunoassay. *West J Med*, 123(4):300.