

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Human Cytomegalovirus (HCMV) atau *Human Herpesvirus 5* (HHV-5) adalah virus DNA untai ganda dari subfamili *Betaherpesvirinae* dengan spesifisitas inang yang tinggi (Yeo et al., 2020). Virus ini memiliki genom terbesar di antara virus herpes manusia (~235 kb), mengkodekan protein kompleks yang memfasilitasi replikasi di berbagai sel (fibroblas, epitel, endotel) serta evasif imun (Gabrielli et al., 2023; Ross et al., 2022). Karakteristik biologis utamanya adalah kemampuan latensi seumur hidup, terutama pada sel progenitor CD34+ dan garis keturunan mieloid, yang memungkinkan reaktivasi saat imunitas menurun (Collins-McMillen et al., 2023). Infeksi umumnya asimtomatis pada individu imunokompeten, namun menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas signifikan pada populasi rentan seperti neonatus dan pasien *immunocompromised* (termasuk HIV/AIDS) (Fowler & Boppana, 2022; Schattner, 2024).

Secara global, prevalensi CMV berkorelasi kuat dengan status sosial ekonomi. Di negara berkembang, tingkat paparan jauh melampaui negara maju, yang berdampak lurus pada tingginya insidensi infeksi kongenital (Ssentongo et al., 2021; Manicklal et al., 2023). Beban penyakit ini sering kali memicu bias diagnosis (kurang atau berlebih) di tatanan klinis akibat variasi akurasi metode deteksi (Wang et al., 2024; Chioprasert et al., 2022). Di Indonesia, studi Farida et al. (2020) mengonfirmasi kaitan erat infeksi CMV dengan gangguan pendengaran pada anak. Namun, tantangan diagnostik masih persisten; Setyoboedi (2021) menemukan diskrepansi hasil antara serologi dan molekuler pada bayi, menandakan keterbatasan metode konvensional. Dengan seroprevalensi populasi lokal yang ekstrem (>90%), penerapan standar diagnostik presisi di fasilitas kesehatan menjadi kebutuhan mendesak (Sari et al., 2022; Putri et al., 2019).

Transmisi pada anak terjadi secara vertikal maupun horizontal, memicu viremia dan replikasi litik di organ visceral (Sleiman & Rappazzo, 2021; Gabrielli et al., 2023). Kendati respon imun seluler (sel T CD8+ dan NK) berperan krusial menekan infeksi, virus tetap bertahan dalam fase laten dan berpotensi reaktivasi saat pengawasan imun terganggu (Klenerman & Oxenius, 2020; Collins-McMillen et al., 2023). Konsekuensinya, reaktivasi CMV pada anak yang dirawat inap kerap memperberat kondisi klinis penyerta seperti sepsis atau pneumonia, yang secara signifikan memperburuk prognosis (Wang et al., 2024; Lanfermann et al., 2021). Infeksi yang tidak tertangani adekuat dapat berkembang menjadi komplikasi sistemik serius, termasuk *Sensorineural Hearing Loss* (SNHL), defisit neurologis, hepatitis fulminan, hingga kegagalan multiorgan (Marsico et al., 2022; Poole et al., 2020).

Tantangan klinis utama terletak pada penegakan diagnosis infeksi aktif.

Metode serologis (IgM/IgG) yang lazim digunakan di negara berkembang terbukti memiliki keterbatasan signifikan (Bilavsky et al., 2020; Vilibic Cavlek et al., 2021). IgM anti-CMV memiliki spesifisitas rendah karena sifat persistensinya pasca-infeksi primer, serta potensi reaksi silang dengan virus Epstein-Barr (EBV) (Peradotto et al., 2020; Camargo et al., 2022). Studi terbaru menunjukkan korelasi yang lemah antara IgM positif dengan keberadaan DNA virus aktif (viremia), sehingga penggunaan serologi tunggal berisiko tinggi menyebabkan kesalahan diagnosis (Luo et al., 2021).

Akurasi diagnosis menjadi krusial mengingat risiko terapi. Antivirus standar (gansiklovir/valgansiklovir) memiliki profil toksisitas serius, termasuk neutropenia berat (25-60% kasus), trombositopenia, dan nefrotoksitas (Hwong et al., 2020; Pasternak et al., 2022). Pemberian terapi hanya berdasarkan serologi tanpa konfirmasi molekuler (PCR) sangat tidak disarankan karena berisiko memaparkan anak pada efek toksik obat tanpa indikasi yang kuat (*unnecessary treatment*) (Faure-Bardon et al., 2021).

Temuan klinis di RS Dr. Wahidin Sudirohusodo mengindikasikan perlunya integrasi diagnostik berbasis bukti molekuler. Data tahun 2024 mencatat tingginya beban kasus infeksi CMV pada tahun 2023 (220 kasus) yang ditegakkan secara serologis. Namun, belum tersedia data insidensi infeksi aktif yang terkonfirmasi secara molekuler (PCR) serta gambaran profil klinis pasien yang sesungguhnya mengalami viremia aktif. Mengingat Panduan Praktik Klinis (PPK) setempat masih bergantung pada serologi yang rentan bias diagnostik, peneliti memandang perlu melakukan studi identifikasi molekuler untuk mengidentifikasi keberadaan DNA virus secara definitif. Langkah ini diharapkan menjadi landasan ilmiah bagi penyempurnaan alur diagnosis serta optimalisasi terapi antiviral yang lebih rasional, efektif, dan aman bagi pasien anak di RS Dr. Wahidin Sudirohusodo."

1.2. Rumusan Masalah

"Guna meningkatkan akurasi diagnosis klinis serta memvalidasi hasil pemeriksaan serologi melalui pendekatan molekuler sebagai baku emas (*gold standard*), penelitian ini merumuskan masalah: "Apakah terdapat DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi melalui metode molekuler PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, yang sebelumnya telah didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus* berdasarkan metode serologis?"

1.3. Pertanyaan Penelitian

- 1.3.1 Bagaimanakah distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus* , berdasarkan jenis kelamin anak?
- 1.3.2 Bagaimanakah distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin

Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan kelompok usia anak ?

- 1.3.3 Bagaimanakah distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan status serologi ?
- 1.3.4 Bagaimanakah distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan manifestasi klinik anak?
- 1.3.5 Bagaimanakah distribusi *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode *sequencing* pada DNA *Cytomegalovirus* dari darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus*?

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui adanya DNA *Cytomegalovirus* dengan metode molekuler pada darah anak yang didiagnosis infeksi *Cytomegalovirus* yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang menderita infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan jenis kelamin anak.
2. Untuk mengetahui distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang menderita infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan kelompok usia anak.
3. Untuk mengetahui distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang menderita infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan status serologi.
4. Untuk mengetahui distribusi DNA *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode PCR pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang menderita infeksi *Cytomegalovirus*, berdasarkan manifestasi klinis anak.
5. Untuk mengetahui distribusi *Cytomegalovirus* yang teridentifikasi dengan metode *sequencing* pada DNA *Cytomegalovirus* dari darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang menderita infeksi *Cytomegalovirus*.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat untuk Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya tentang infeksi *Cytomegalovirus* di Makassar.

1.5.2 Manfaat Pelayanan Kesehatan

Sebagai dasar evaluasi berbasis bukti (*evidence-based*) bagi rumah sakit dalam menyusun kebijakan diagnostik yang lebih akurat, khususnya terkait urgensi penerapan metode molekuler (PCR) sebagai standar konfirmasi infeksi CMV pada anak. Hal ini diharapkan dapat mendukung ketepatan pemberian terapi antiviral, mencegah risiko pengobatan yang tidak perlu (*overtreatment*), serta pada akhirnya meningkatkan keselamatan pasien dan menurunkan angka morbiditas di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar.

1.5.3 Manfaat Untuk Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan pengalaman meneliti dan menulis bagi peneliti

1.6 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini mencakup identifikasi molekuler DNA *Cytomegalovirus* menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) pada sampel darah pasien anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar dengan diagnosis klinis atau serologis infeksi CMV.

1.7 Kebaruan Penelitian

Kebaruan penelitian ini terletak pada penerapan metode deteksi molekuler (PCR) sebagai upaya konfirmasi diagnosis pada populasi anak di RS Wahidin Sudirohusodo, yang selama ini belum pernah diidentifikasi secara komprehensif dibandingkan dengan diagnosis konvensional (serologi). Studi ini menawarkan data primer mengenai profil infeksi CMV aktif yang sebelumnya tidak terpetakan, serta memberikan dasar ilmiah baru untuk rasionalisasi penggunaan terapi antivirus guna mencegah risiko *overtreatment* yang belum menjadi fokus utama pada penelitian-penelitian lokal sebelumnya."

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan pendekatan *cross sectional*, yang bertujuan untuk mengetahui adanya DNA *Cytomegalovirus* dengan metode molekular pada darah anak yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang menderita infeksi *Cytomegalovirus*.

2.2. Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1. Waktu Penelitian

Pemilihan subyek dan pengambilan darah serta data subyek penelitian dilakukan mulai pada Desember 2024 sampai Maret 2025 setelah mendapat rekomendasi etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar dan izin penelitian dari Direktur RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, sampai dengan jumlah subyek terpenuhi.

1.1.1. Tempat Penelitian

1. Pemilihan dan pengambilan darah serta data sekunder subyek penelitian dilakukan di ruang perawatan anak RS Wahidin Sudirohusodo Makassar.
2. Identifikasi DNA *Cytomegalovirus* pada darah penderita dengan metode PCR dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSPTN Universitas Hasanuddin Makassar.
3. Identifikasi *Cytomegalovirus* pada DNA *Cytomegalovirus* dengan sequencing dilakukan di Kuala Lumpur, Malaysia.

2.3. Populasi dan Subyek Penelitian

1.1.2. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah anak yang dirawat inap di ruang perawatan anak RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, yang didiagnosis menderita infeksi *Cytomegalovirus* dengan metode serologis.

1.1.3. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah sampel darah vena anak yang dirawat inap di ruang perawatan anak RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, yang didiagnosis menderita infeksi *Cytomegalovirus* dengan metode serologis yang diambil dengan jarum *vacutainer* ke dalam tabung *vacutainer* berisi anti-koagulan yang memenuhi kriteria subyek penelitian.

2.4. Kriteria Penelitian

1.1.4. Kriteria Inklusi Subyek Penelitian

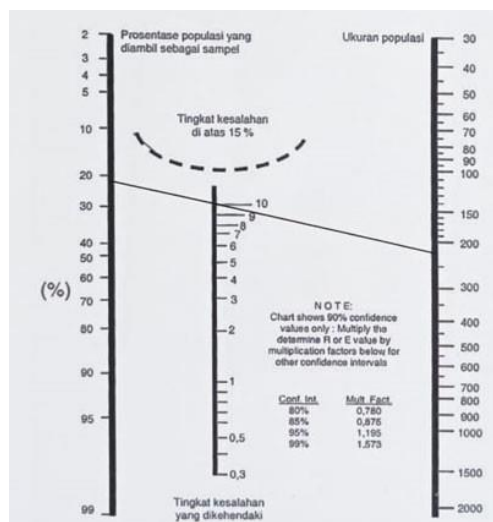
1. Anak yang dirawat inap di ruang perawatan anak RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, yang didiagnosis menderita infeksi *Cytomegalovirus* dengan metode serologis.
2. Anak berjenis kelamin laki-laki dan perempuan
3. Anak berusia antara 0 bulan sampai 17 tahun.
4. Anak disetujui ikut pada penelitian oleh orang tua atau wali dengan persetujuan bertanda tangan.

1.1.5. Kriteria Eksklusi

1. Anak dengan jumlah darah yang tidak cukup untuk dipakai pada prosedur PCR.
2. Anak dengan darah yang terkontaminasi
3. Anak dengan darah yang lisis atau menggumpal.
4. Anak dengan darah yang tidak bisa dikenal karena etiket tabung hilang/robek.
5. Anak dengan botol darah yang pecah atau retak

2.5. Jumlah Subyek Penelitian

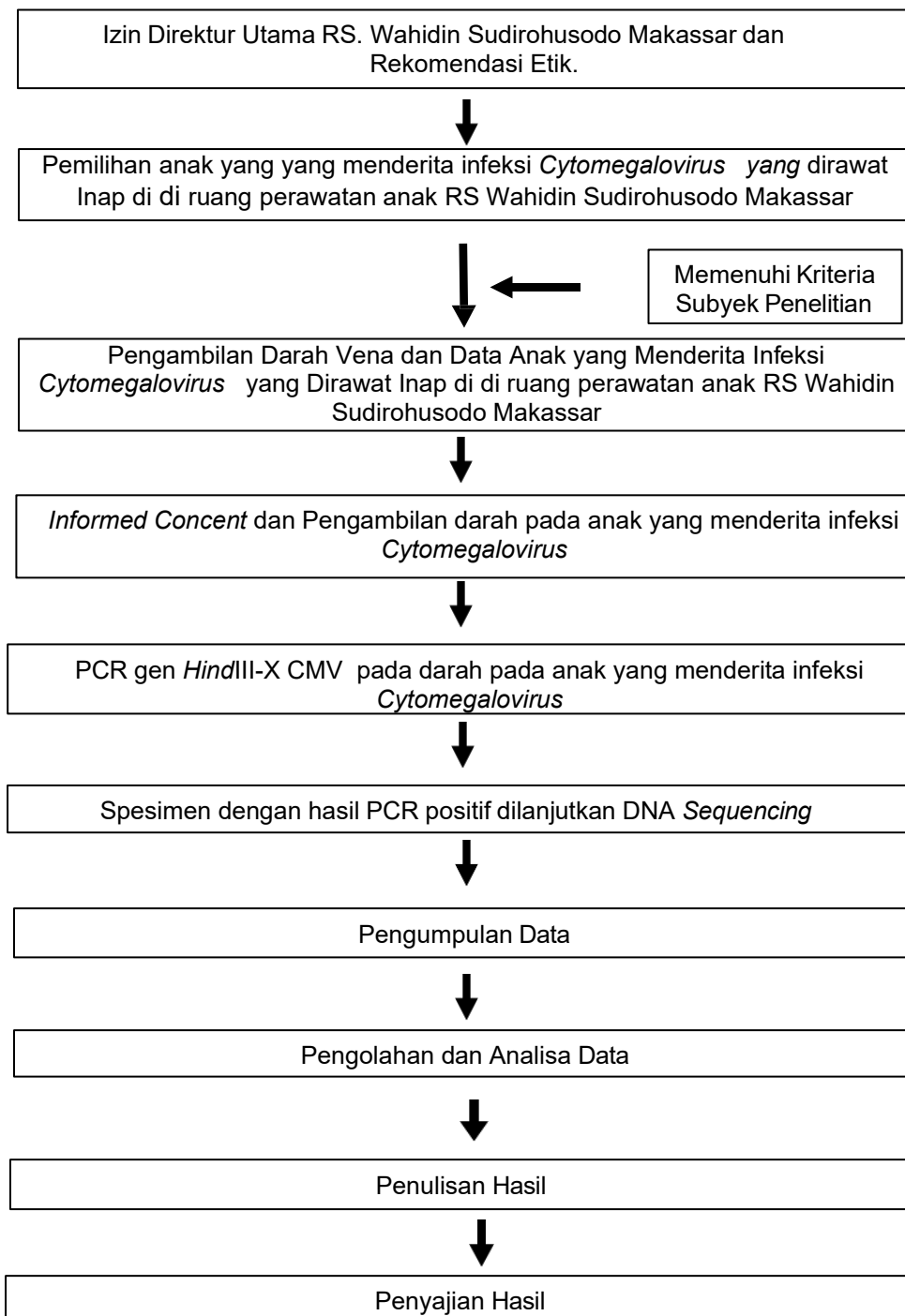
Besar subyek penelitian dihitung menggunakan diagram normogram Harry King. Bila jumlah anak terdiagnosis infeksi CMV yang dirawat inap di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar selama tahun 2023 adalah 220 penderita. Bila kesalahan diambil sebanyak 10%, maka ditarik garis lurus dari 220 melewati titik tingkat kesalahan 10% maka didapatkan persentase subyek adalah 23% dari populasi tahun lalu. Perhitungan jumlah subyek $0.22\% \times 220 = 48.4$ dibulatkan menjadi 49 anak.



2.6. Cara Pemilihan Subyek Penelitian

Melakukan pemilihan dengan mengambil semua anak yang dirawat inap di ruang perawatan anak RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis menderita infeksi *Cytomegalovirus* dengan metode serologis (sampel jenuh).

2.7. Alur Penelitian



Gambar 2.7 Alur Penelitian

2.8. Alat dan Bahan Penelitian

2.8.1. Daftar Alat Penelitian

No	Alat	Merek/Spesifikasi	Jumlah
1	Mesin PCR	Biorad	1 unit
2	Gel DOC	Biorad	1 unit
3	Mesin Elektroforesis	Biorad	1 unit
4	Sentrifuge	Biofuge	1 unit
5	Inkubator Shaker	Heidolph	1 unit
6	Bottle	Scott/200 ml	1 buah
7	Gelas Ukur	Pyrex/100ml	1 buah
8	Cetakan Agarose	Biorad	1 unit
9	Laminar Flow	Esco	1 unit
10	Plester	Onemed	1 box
11	Tabung EDTA	Vaculab	1 box
12	Handscoen	Otoro	4 box
13	Tabung Eppendorf	BRAND	2 box
14	Tabung PCR	Corning /0.2 mL	2 pk
15	Yellow tip	Corning	3 pk
16	Blue Tip	Axygen	2 pk
17	BSC Tipe II	Esco	1 unit
18	Mikropipet	Biorad 10µl	1 buah
19	Mikropipet	Biorad 20 µl	1 buah
20	Mikropipet	Biorad 100µl	1 buah
21	Mikropipet	Biorad 1000µl	1 buah

2.8.2. Daftar Bahan Penelitian

No	Bahan	Merek/Spesifikasi	Jumlah
1	Dispo	Onemed/1 atau 3 ml	1 box
2	Alcohol swab	Onemed	2 box
3	Water One	One Med /1 L	1 botol
4	Primer	Hind///-X fragment	1 set
5	Enzim PCR	Go Taq Master <i>Mix</i>	2 set
6	Agarose	Merck	1 botol
7	Ethidium Bromida	-	1 botol
8	TBE	Merck /10x	1 botol
9	Loading Dey	-	-
10	DNA Leader/Marker	100 bp	2 buah

2.9. Prosedur Penelitian

2.9.1. Melakukan Persiapan

Setelah mendapat rekomendasi etik dari Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dan izin penelitian dari Direktur RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, melakukan:

1. Pemilihan anak yang dirawat di ruang perawatan anak RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang didiagnosis menderita infeksi *Cytomegalovirus* dengan metode serologis
2. Memberikan penjelasan tentang penelitian ini kepada orang tua atau wali anak (subyek) dan meminta persetujuan tertulis.

2.9.2. Pegambilan darah

1. Setelah memberikan penjelasan kepada ibu atau wali anak yang dirawat inap di ruang rawat inap anak, RS Wahidin Sudirohusodo Makassar, tentang penelitian ini dan mendapat persetujuan tertulis dari ibu atau wali anak, dilakukan pengambilan darah vena anak yang menderita infeksi *Cytomegalovirus* .
2. Pengambilan darah dilakukan menggunakan *wing needle* yang langsung dimasukkan ke dalam tabung transportasi yang mengandung anti koagulan. Data yang diambil dari rekam medik penderita.
3. Cara pengambilan darah
 - a. Salah satu lengan penderita diposisikan menjadi lurus.
 - b. Lalu penderita diminta untuk mengepalkan tangan.
 - c. *Torniquet* dipasang ± 10 cm diatas lipatan siku.
 - d. Kemudian dipilih bagian vena mediana cubiti dan cepalica.
 - e. Desinfeksi dilakukan pada area kulit yang akan diambil darahnya dan tidak menyentuh area kulit yang sudah di desinfeksi.
 - f. Setelah itu bagian vena ditusuk dengan lubang jarum menghadap ke atas
 - g. Memasukkan tabung ke dalam *holder* sehingga bagian posterior tertancap ke tabung *transport* yang berisi antikoagulan, maka darah akan mengalir masuk ke dalam tabung tersebut.
 - h. Darah diambil sebanyak 1 ml. Lalu tourniquet dilepaskan dan meletakkan *alcohol swab* diatas jarum yang masih tertancap di kulit kemudian ditarik secara perlahan dan pasang plester pada bekas tusukan.

2.9.3. Transportasi dan Penyimpanan Darah

Setelah dilakukan pengambilan darah, sampel segera dibawa ke laboratorium. Selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C sampai dilakukan pemeriksaan PCR.

2.9.4. Pemeriksaan Darah Anak dengan Metode PCR

A. DNA Extraction

1. Preparasi Sampel

Masukkan 200 μ l sampel Cairan Tubuh kedalam tabung ependorf 1,5 ml (Jika volume sampel tdk cukup bisa ditambahkan Larutan PBS hingga volumenya 200 μ l) Tambahkan 20 μ l Proteinase-K lalu mix. inkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit

2. Cell Lysis

Tambahkan 200 μ l GSB Buffer vortex, inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit dimana tiap 5 menit divortex.

3. DNA Binding

Tambahkan 200 μ l Ethanol vortex selama 10 detik. Masukkan kedalam GS Column dalam 2 ml collection Tube. Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 1 menit buang cairan pada collection tube

4. Wash

Tambahkan 400 μ l W1 Buffer, Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik. Buang cairan pada collection tube. Tambahkan 600 μ l Wash Buffer Sentrifuge 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik. Ganti collection tube dengan yang baru, sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selama 3 menit

5. Elution

Pindahkan GS Column ke tabung ependorf steril, tambahkan 100 μ l Elution Buffer yang sebelumnya telah dipanaskan. Sentrifuge dengan kecepatan 14.000 – 16.000 rpm selama 30 detik

6. Buang GS Column.

Cairan yang terdapat pada tabung ependorf merupakan DNA produk yang siap untuk di PCR.

B. Mix PCR

Set 1

Go Taq Master Mix		: 12.5 μ l
Primer <i>HindIII</i> -X CMV (406 bp)	I	
P1 5 GGATCCGCATGGCATTACGTATGT-3 10 UM		: 0.5 μ l
P2 5-GAATTCAGTGGATAACCTGCGGCGA-3 10 UM		: 0.5 μ l
Nuclease Free Water		: 6.5 μ l
DNA Sampel		: 5.0 μ l
Total		: 25 μ l

C. Running

PCR

- Sebanyak x 35 Siklus
 - Step 1 Suhu 94°C selama 1 menit (Proses Denaturasi)

- Step 2 Suhu 55°C selama 2 menit (Proses Annealing)
- Step 3 Suhu 72°C selama 3 menit (Proses Extension)

D. Gel Elektroforesis

1. Buat gel
 - a. Ditimbang 2 gr agarose dan dilarutkan dalam 100 ml TBE Buffer 0,5x untuk mendapatkan larutan agarose 2%.
 - b. Campuran agarose dan TBE Buffer 0,5x dipanaskan hingga larut kemudian ditunggu hingga agak dingin kemudian ditambah 5µl Ethidium Bromida.
 - c. Larutan agar ose dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga beku.
2. Pembuatan DNA Marker
 - a. Sebanyak 25 µl DNA 100 bp ladder dimasukkan ke dalam tube berisi 1 ml Blue Juice Loading Dye, dan dicampur untuk marker.
 - b. Label tube dicopot dan diganti menjadi marker.
3. Persiapan Running Elektroforesis
 - a. Gel yang telah beku dimasukkan ke dalam elektroforesis dan direndam dalam larutan TBE 0,5x.
 - b. Sebanyak 8 µl amplicon hasil PCR (Kontrol Positif, Kontrol negatif, sampel) ditambah dengan 2 µl Blue Juice Loading Dye (tanpa marker), dicampur dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel sebanyak 10 µl.
 - c. Pada Lubang pertama tambahkan 10 ul DNA leader 100 bp dimasukkan ke dalam sumur di dekat control positif
4. Running Elektroforesis
 - a. Elektroforesis dihidupkan dan dijalankan dari muatan negative (katode) ke muatan positif (anode) pada 100 A dan 60 menit
 - b. Setelah elektroforesis dilihat pita yang terbentuk. Apabila pita sejajar dengan control positif berarti hasil positif.
5. Prosedur Kerja Gel Doc

Cara menggunakan alat Gel Doc dibagi menjadi 4 tahap, yaitu :

 1. Menyalakan Alat Gel Doc
 2. Mengatur posisi gel
 3. Mengatur gambar
 4. Save dan Print gambar
6. Menyalakan Alat Gel Doc
 1. Nyalakan Gel Doc dengan menekan tombol ON pada bagian belakang sebelah kiri alat
 2. Nyalakan komputer
 3. Buka software Quantity One dengan cara Double Klik pada ikon Quantity One

4. Pilih Gel Doc XR dari menu File
6. Mengatur Posisi Gel
 1. Pintu alat Gel Doc dibuka
 2. Tekan tombol Epi White (On) jika diperlukan/optional
 3. Letakkan Gel pada dibagian tengah kemudian pintu alat ditutup
 4. Iris, zoom, dan focus diatur dengan melihat ke layar monitor pada software Quantity One
 5. Pintu alat dibuka kembali dan posisi gel diatur kembali jika diperlukan
7. Mengatur Image
 1. Setelah pengaturan gel selesai, Tekan tombol Trans UV (On). Pada kondisi ini, lampu UV akan mati secara otomatis apabila pintu dibuka kecuali tombol Hold ditekan
 2. Pilih Auto Expose apabila ingin mengambil gambar secara otomatis atau pilih Manual expose apabila ingin mengambil gambar manual dengan menaikkan atau menurunkan waktu exposure (Exposure Time)
 3. Apabila gambar yang diinginkan sudah terlihat dengan baik dan jelas, Klik Freeze
 4. Untuk memberikan tulisan pada gambar, pilih Annotate
8. Save dan Print Gambar

Setelah selesai di edit, kemudian gambar dapat di save dan kemudian klik Print untuk mendapatkan hasil dalam bentuk fo.

2.9.5. Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA

Sekuencing DNA tidak dilakukan secara langsung di laboratorium ini, melainkan dilakukan oleh laboratorium penyedia jasa *sekuencing* DNA komersial (misalnya Macrogen Inc., Korea atau laboratorium rujukan lainnya). Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Persiapan Sampel DNA untuk Dikirim:

- a. DNA template dimurnikan dari hasil PCR menggunakan metode purifikasi kolom (misalnya dengan QIAquick PCR Purification Kit atau metode sejenis).
- b. Kualitas dan kuantitas DNA template dicek menggunakan spektrofotometer (misalnya NanoDrop) untuk memastikan konsentrasi minimal 20–50 ng/μl, volume akhir minimal 10–20 μl.
- c. Primer yang akan digunakan untuk *sekuencing* juga dipersiapkan secara terpisah dalam tabung lain, dengan konsentrasi sekitar 5–10 pmol/μl, volume akhir 5–10 μl.
- d. Baik DNA maupun primer dikemas dalam tabung PCR steril dan diberi label yang jelas (kode sampel dan nama primer).

2. Pengiriman Sampel ke Laboratorium *Sekuencing*:

- a. Sampel DNA dan primer dikirim menggunakan es kering atau cold pack untuk menjaga stabilitas selama pengiriman.
- b. Formulir permintaan *sekuencing* dan daftar sampel diisi lengkap sesuai format laboratorium tujuan (biasanya tersedia secara daring).
- c. Sampel dikirim ke alamat laboratorium di 1st BASE Laboratories Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia, melalui jasa kurir terpercaya untuk dilakukan analisis *sekuencing* gen *HindIII*-X fragment

3. Proses Sekuensing oleh Laboratorium Tujuan:

- a. Di laboratorium penyedia jasa, sekuensing dilakukan menggunakan sistem Automated DNA Sequencer (misalnya ABI PRISM 3730XL atau alat setara).
- b. Metode sekuensing yang digunakan umumnya adalah Sanger *sequencing* berbasis dye-terminator menggunakan BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.
- c. Laboratorium akan melakukan cycle *sequencing*, purifikasi, dan electrophoresis kapiler untuk membaca sekuen DNA.

4. Penerimaan dan Analisis Data Sekuensing:

- a. Hasil sekuensing dikirim dalam format digital (file .ab1 dan .seq) melalui email atau sistem unggah daring.
- b. File ab1 dianalisis menggunakan software seperti Chromas, FinchTV, atau BioEdit untuk memastikan kualitas puncak fluoresensi dan validitas sekuen.

Sekuen DNA selanjutnya dibandingkan dengan database publik seperti BLASTN (NCBI) atau FASTA (EBI) untuk identifikasi homologi atau pencocokan urutan gen.

a. Mengumpulkan Data

Setelah mendapat rekomendasi etik, dan izin penelitian dari Direktur Umum RS Wahidin Sudirohusodo Makassar maka peneliti mulai melakukan pengambilan subyek penelitian dengan terlebih dahulu memberikan penjelasan dan meminta persetujuan ibu untuk mengikutkan anaknya pada penelitian ini. Jika ibu penderita setuju, maka peneliti mulai melakukan pengambilan data pada rekam medis penderita dan mengambil darah penderita untuk dilakukan identifikasi CMV dengan metode molekuler .

b. Pengolahan dan Analisa Data

i. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan dengan memasukkan semua data ke dalam program excel

ii. Analisa Data

Analisa data dilakukan secara analisa deskriptif sederhana menggunakan uji distribusi frekuensi dan disajikan dalam bentuk tabel.

c. Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini tidak mempunyai masalah pelanggaran etika penelitian, karena penelitian ini:

1. Mendapat rekomendasi etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.
2. Mendapat izin dari Direktur RS Wahidin Sudirohusodo Makassar
3. Mendapat persetujuan orang tua atau wali anaknya ikut penelitian anaknya secara tertulis dengan bertanda tangan, setelah mendapat penjelasan lengkap tentang penelitian ini
4. Menyertakan sitasi penulis dan tahun terbit referensi pada semua informasi yang dirujuk
5. Menyajikan semua data secara anonim