




Optimasi Volume Kit Da An Gene Untuk Deteksi SARS-CoV-2 dengan Real Time RT-PCR	
 Peneliti	 Ringkasan Eksekutif
<p>Ketua : Seprianto, S.Pi, M.Si</p> <p>Anggota :</p> <p>Dr. Henny saraswati, M.Biomed</p> <p>Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si</p> <p>Dr.Titta Novianti S.Si, M.Biomed</p>	<p>SARS-CoV-2 is a new type of corona virus from the Betacoronavirus genus and Coronaviridae family which causes respiratory disease called COVID-19. SARS-CoV-2 is an enveloped virus and has single stranded RNA as its genetic material. The genome structure of this virus consists of two types of protein, first, the gene that encodes non-structural protein such as ORF1a/OR1b, and second, the gene that encodes structural protein such as spike glycoprotein (S), envelope (E), membrane glycoprotein (M), dan nucleocapsid protein (N). Real time RT-PCR test is the most recommended method for SARS-CoV-2 detection because its high specificity and high accuracy results. The test requires samples collected by swab in oropharynx and nasopharynx for further examination in laboratory in, which later the presence of viral RNA becomes a molecule that is assessed for diagnostic results. In this study, volume optimization was carried out on the Da An Kit used for SARS-CoV-2 detection in real time RT-PCR with the objective of saving the use of available kit reagents yet with the optimal and accurate amplification results. There were three samples of SARS-CoV-2 RNA used in this study namely N62, N63 and N79 and three different total volumes were tested from 20 μl, 15 μl and 10 μl. The results of this study showed that these three samples positively contained SARS-CoV-2 with Cq values < 40. Beside that, from these three total volumes that have been tested, it was found a total volume of 20 μl was the optimal volume because produced the lowest Cq values compared to the other two volumes</p> <p>Keyword: <i>SARS-CoV-2, COVID-19, Optimization, Da An Gene Kit, Real time RT-PCR</i></p>
	<div style="background-color: #A9C9D9; padding: 5px; display: inline-block;">  HKI dan Publikasi </div>

 Latar Belakang	 Hasil dan Pembahasan
<p>SARS-CoV-2 merupakan virus dari genus <i>Betacoronavirus</i> dan famili <i>Coronaviridae</i>. Virus ini memiliki materi genetik berupa RNA rantai tunggal. Di bawah pengamatan dengan mikroskop elektron, pada permukaan virus ini terdapat tiga jenis protein yang tertanam pada selubung lipid bilayer-nya yaitu <i>spike glycoprotein</i> (S), <i>membrane glycoprotein</i> (M), <i>nucleocapsid protein</i> (N) dan <i>envelope</i> (E) (Kumar et al., 2020). Struktur genom SARS-CoV-2 bila diurutkan dari ujung 5' ke 3' dibagi menjadi dua bagian, yaitu gen yang menyandi protein non-struktural yang terdiri gen ORF1a/ORF1b, dan gen yang menyandi protein struktural yang terdiri dari <i>spike glycoprotein</i> (S), <i>envelope</i> (E), <i>membrane glycoprotein</i> (M), dan <i>nucleocapsid protein</i> (N) (Hu et al., 2020).</p> <p>Diketahui bahwa <i>natural host</i> dari virus corona khususnya SARS-CoV-2 ini adalah kelelawar dan beberapa hewan liarnya seperti pangolin, tikus, dan musang berperan sebagai <i>intermediate host</i> yang berpotensi menjadi perantara dalam proses penularan virus ini ke manusia (Cui et al., 2019). Hal ini juga diperkuat dengan beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa sekuens genom antara SARS-CoV-2 dengan virus corona kelelawar yang bernama RaTG13 memiliki kemiripan lebih dari 95% (Hu et al., 2020; Yadav & Saxena, 2020; Yuliana, 2020). SARS-CoV-2 yang telah masuk ke dalam inang akan mengenali dan menempel pada reseptor sel inang dengan bantuan protein S yang berbentuk runcing pada permukaan virus yang berfungsi untuk menjadi perantara masuknya virus ke dalam sel inangnya. Reseptor yang dikenali oleh SARS-CoV-2 adalah enzim ACE2 yang umumnya dapat ditemukan di sel epitel hidung, mulut, nasofaring, paru-paru, ginjal, dan hati. Pada paru-paru, reseptor ACE2 sangat berlimpah</p>	<p>Preparasi Sampel RNA SARS-CoV-2 dan Kit Da An Gene</p> <p>Dari 10 sampel RNA SARS-CoV-2 yang sudah diisolasi yang diperoleh dari PT. Ecosains Hayati dipilih 3 sampel untuk digunakan dalam penelitian ini yang terdiri dari sampel N62, N63 dan N79. Pada penelitian ini menggunakan reagen plus sampel dengan total volume 20 μl, 15 μl, dan 10 μl. Baik reagen dan sampel disimpan disuhu -20°C dan apabila ingin digunakan maka terlebih dahulu reagen dan sampel didiamkan pada suhu ruang selama beberapa saat hingga mencair yang kemudian divortex agar homogen. Selain itu, selama proses kerja, reagen dan sampel diletakkan pada ice box. Terdapat 3 sampel dan 3 jenis total volume yang yang diujikan, maka alokasi reagen untuk masing-masing sampel dengan volume 20 μl dibutuhkan total 40,8 μl NC (ORF1ab/N) PCR <i>reaction solution</i> A, sert a total 7,2 μl NC (ORF1ab/N) PCR <i>reaction solution</i> B, Selanjutnya untuk volume 15 μl dibutuhkan total 30,6 μl NC (ORF1ab/N) PCR <i>reaction solution</i> A, serta total 5,4 μl NC (ORF1ab/N) PCR <i>reaction solution</i> B. Sedangkan untuk volume 10 μl dibutuhkan total 20,4 μl NC (ORF1ab/N) PCR <i>reaction solution</i> A, serta total 3,6 μl NC (ORF1ab/N) PCR <i>reaction solution</i> B.</p> <p>Nilai Cq Hasil Amplifikasi</p> <p>Optimasi volume kit Da An Gene dilakukan dengan volume sebanyak 20 μl, 15 μl, dan 10 μl (reagen plus sampel) dengan pengaturan assay yang digunakan ada tiga jenis reporter yaitu FAM (biru), VIC (hijau), dan Cy5 (merah) (Gambar 1). Dari proses amplifikasi yang sudah dilakukan, analisa data hasil kurva amplifikasi dilakukan pada <i>software</i> EcoStudy. Kurva yang muncul menunjukkan hasil positif untuk semua sampel yang diujikan. Sedangkan untuk kontrol positif dan negatif menunjukkan hasil yang valid dan sesuai dengan protokol kit, yaitu untuk kontrol positif dengan nilai Cq FAM dan VIC ≤ 32, sedangkan untuk kontrol negatif ditunjukkan dengan tidak adanya nilai Cq dan kurva yang datar dibawah garis threshold (Gambar 1).</p>

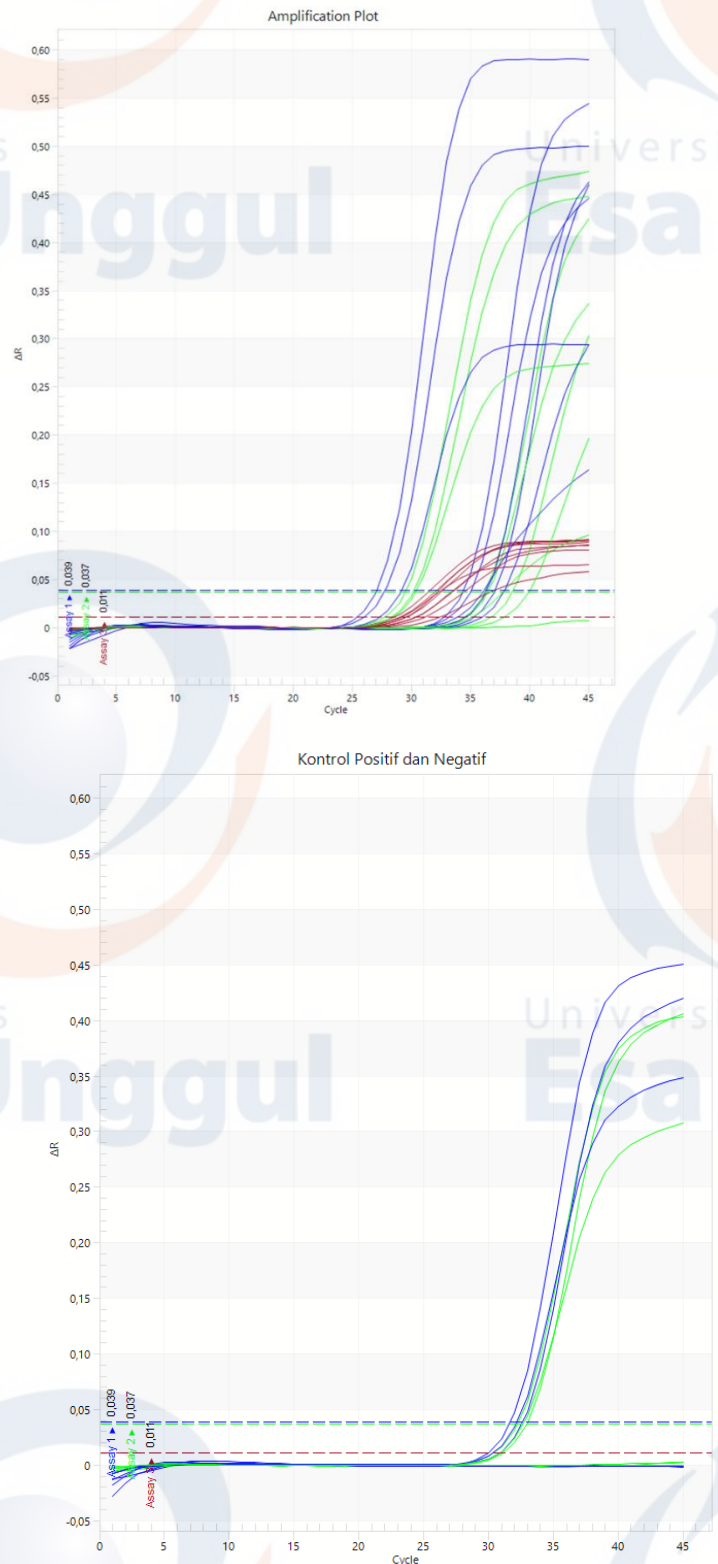
pada bagian alveolus, tepatnya pada sel alveolar tipe II (Kumar et al., 2020; Yadav & Saxena, 2020).

Diagnosis yang akurat merupakan hal yang sangat penting dan krusial untuk mendeteksi SARS-CoV-2. Metode deteksi dengan *real time* RT-PCR merupakan metode deteksi infeksi berbasis uji molekular yang paling direkomendasikan dikarenakan sensitivitas dan keakuratannya yang tinggi (Lu et al., 2020). *Real time* RT-PCR memerlukan pengambilan sampel dengan swab pada orofaring atau nasofaring untuk dilakukan pemeriksaan di laboratorium yang nantinya keberadaan RNA virus menjadi molekul yang dinilai untuk hasil diagnosis (Yanti et al., 2020). RNA virus akan dikonversi menjadi cDNA yang digenerasi oleh enzim *reverse transcriptase* sebelum diamplifikasi dengan mesin PCR. Keberadaan virus akan dideteksi oleh mesin PCR dengan bantuan biomarker berupa *fluorescence* yang berpendar (Yusuf, 2010). Tujuan dari penelitian ini yaitu mengoptimasi volume kit Da An Gene dengan menggunakan volume yang lebih kecil dibandingkan dari protokol kit untuk untuk menghemat penggunaan kit Da An Gene saat deteksi SARS-CoV-2 dengan teknik *real time* RT-PCR.

Metode

Alat dan Bahan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Gedung Holiq Raus Lt.3, Universitas Esa Unggul, Jakarta Barat. Untuk alat-alat yang digunakan meliputi; mikropipet 2-20 μ L, *mini-centrifuge*, vortex, rak tabung kuning, mesin PCR (*PCRmax Eco 48*), *PCRmax sample loading dock*, *seal*, *ice box*, well PCR dan laptop untuk menjalankan



Gambar 1. Kurva Kontrol Positif dan Negatif

software Eco dan EcoStudy. Lalu untuk bahan-bahan yang digunakan meliputi; tips mikropipet 20 µL, kit PCR COVID-19 Da An Gene (Da An Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University, China) yang terdiri dari beberapa reagen yaitu; NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution A, NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution B, NC (ORF1ab/N) negative control, dan NC (ORF1ab/N) positive control.

Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel RNA virus SARS-CoV-2 yang sudah diisolasi dan diperoleh dari PT Ecosains Hayati. Terdapat tiga sampel yang digunakan, yaitu sampel N62, N63, dan N79.

Amplifikasi dengan *Real-time* PCR

Pada tahap ini terlebih dahulu melakukan preparasi yang diawali dengan meletakkan reagen NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution A dan B pada suhu ruangan terlebih dahulu yang kemudian divortex agar homogen. Kemudian, reagen disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 detik. Setelah selesai, persiapkan 3 sampel + 2 (NC (ORF1ab/N) kontrol positif dan negatif)

Optimasi Kondisi *Real-Time* PCR

Pada tahap ini, optimasi dilakukan pada volume. Volume yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebanyak 20 µl, 15 µl, dan 10 µl (reagen plus sampel). Volume yang digunakan untuk penelitian ini lebih sedikit dari protokol kit, yang dengan total volume reagen plus sampel sebesar 25 µl. Terdapat 3 sampel, kontrol positif dan kontrol negatif untuk setiap volume yang digunakan pada penelitian ini. Optimasi volume ini bertujuan untuk menghemat reagen yang tersedia namun dengan hasil amplifikasi tetap optimal dan akurat

Dari hasil kurva yang muncul, secara keseluruhan nilai Cq dari masing-masing sampel dan volume yang diujikan menunjukkan nilai di < 40 yang dapat diinterpretasikan bahwa, sesuai protokol kit, sampel positif mengandung SARS-CoV-2 (Tabel 4 dan 5).

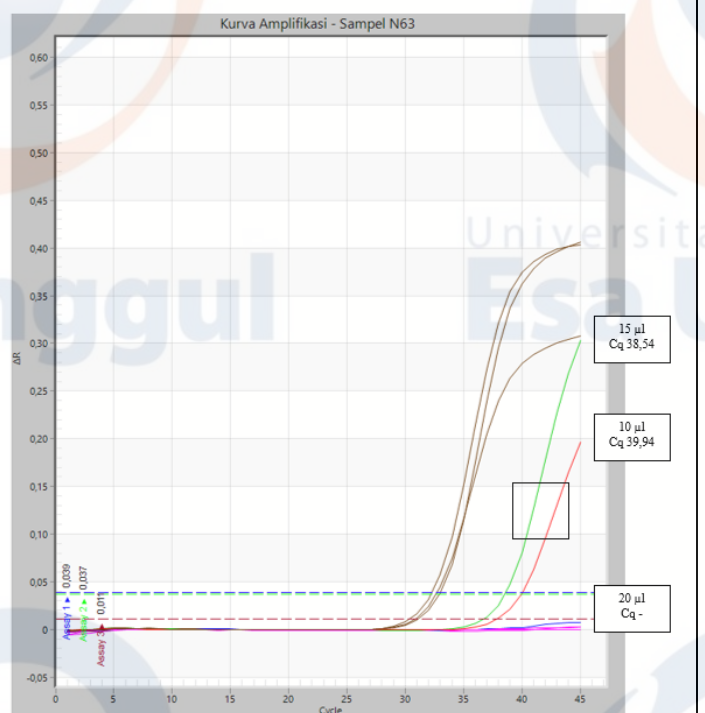
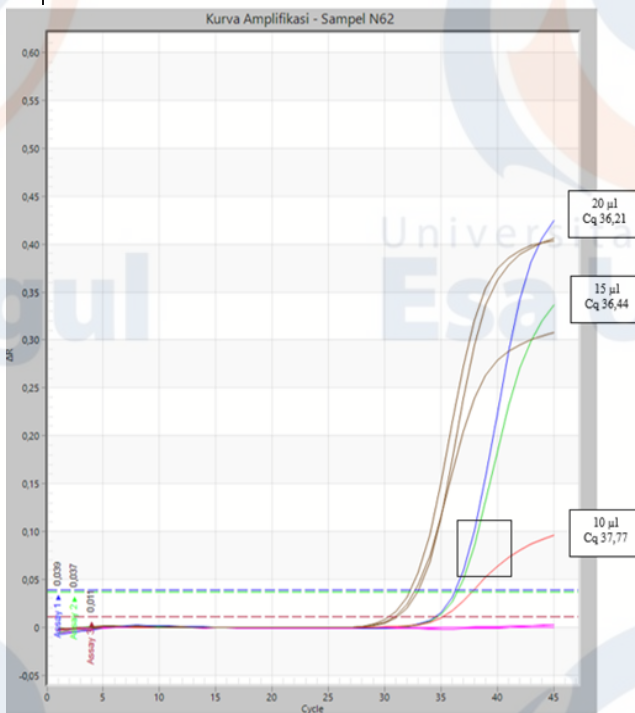
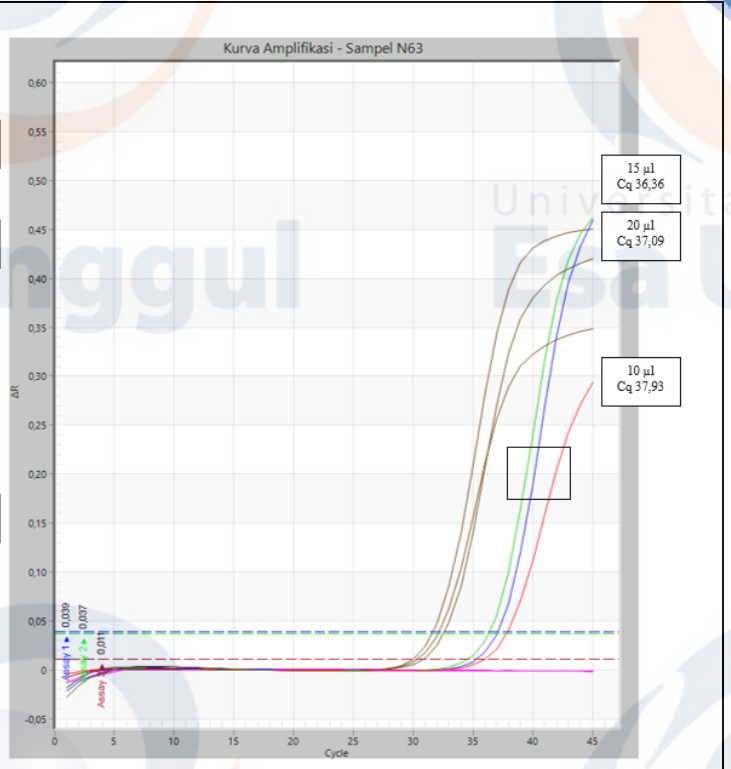
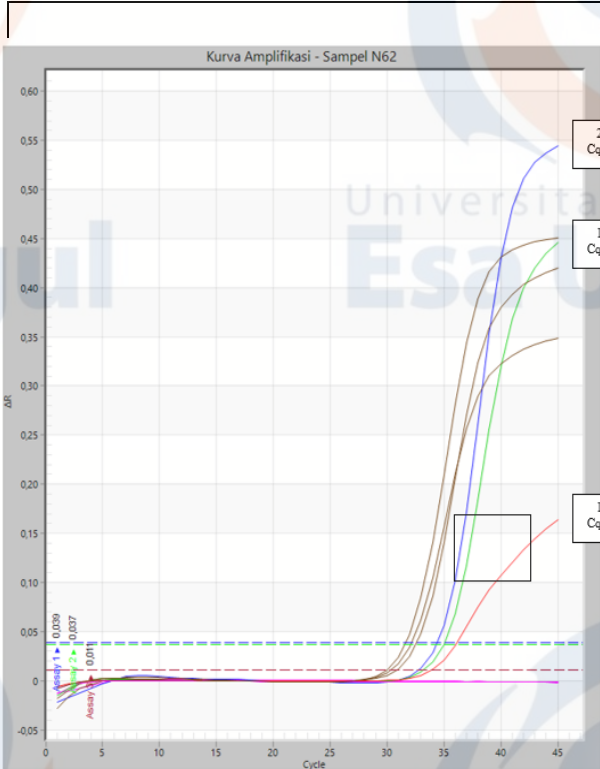
Tabel 4. Nilai Cq dengan Assay FAM

Sampel	Nilai Cq (FAM)		
	20 µl	15 µl	10 µl
N62	34,38	35,05	36,15
N63	37,09	36,36	37,93
N79	27,09	27,79	29,16

Tabel 5. Nilai Cq dengan Assay VIC

Sampel	Nilai Cq (VIC)		
	20 µl	15 µl	10 µl
N62	36,21	36,44	37,77
N63	-	38,54	39,94
N79	29,45	30,14	30,32

Selain itu, pada kurva hasil amplifikasi pada sampel N62, N63, dan N79 baik dengan assay FAM (Gambar 3; 4; 5) dan VIC (Gambar 6; 7; 8) dengan volume 20 µl ditunjukkan dengan kurva berwarna biru, untuk volume 15 µl ditunjukkan dengan kurva berwarna hijau, sedangkan untuk volume 10 µl ditunjukkan dengan kurva berwarna merah. Kemudian untuk kontrol positif ditunjukkan dengan warna coklat dan kontrol negatif ditunjukkan dengan warna pink





Pembahasan

Metode deteksi SARS-CoV-2 dengan *real time* RT-PCR merupakan metode deteksi berbasis uji molekular yang memiliki spesifisitas dan keakuratan yang tinggi sehingga menjadi metode deteksi yang paling direkomendasikan (Lu et al., 2020). Metode ini mendeteksi keberadaan gen pada RNA virus yang ada pada penderita. Dalam prosesnya, RNA akan dikonversi menjadi cDNA yang digenerasi oleh enzim *reverse transcriptase* dan disalin secara berulang dengan siklus temperatur tertentu dan selanjutnya menggunakan *biomarker fluorescence* sebagai sinyal yang dibaca oleh mesin PCR untuk mendeteksi keberadaan virus. Beberapa gen yang menjadi target deteksi seperti gen N, S, E, ORF1ab, maupun RdRP (Park et al., 2020; Yanti et al., 2020).

Setelah melakukan pengaturan kondisi siklus sesuai protokol kit (Tabel 3), dilanjutkan dengan pemilihan assay atau mode deteksi probe yang digunakan yang terdiri dari tiga jenis, yaitu FAM untuk mendeteksi keberadaan gen N, lalu VIC untuk mendeteksi keberadaan gen ORF1ab, dan Cy5 yang berperan sebagai internal standard. Gen *nucleocapsid protein* atau gen N merupakan salah satu gen struktural pada SARS-CoV-2 yang berperan pada proses replikasi virus dan pengemasan genom. Sedangkan gen ORF1ab merupakan gen non-struktural yang berperan untuk mengkode poliprotein pp1a dan pp1ab untuk proses replikasi dan transkripsi (Hu et al., 2020; Kumar et al., 2020).

FAM dan VIC adalah jenis label pewarna (*dye*) *reporter* yang merupakan bagian dari probe TaqMan. Pada probe TaqMan sendiri didesain untuk menempel pada sekuens DNA tertentu saat tahap *annealing* berlangsung untuk memberikan sinyal berupa *fluorescence* yang berpendar yang nantinya akan dibaca oleh mesin PCR. Probe TaqMan terdiri dari dua jenis komponen molekul pada setiap ujungnya, yaitu *reporter* dan *quencher*. *Reporter* terletak pada ujung 5' probe yang secara spesifik berfungsi untuk memberikan sinyal berupa *fluorescence* yang berpendar yang nantinya akan dibaca oleh mesin PCR. Sinyal yang dibaca ini dapat diukur intensitasnya seiring kondisi siklus berjalan, dimana semakin besar intensitasnya maka semakin banyak DNA yang

	<p>diampilifikasi. Sedangkan <i>quencher</i> terletak pada ujung 3' probe yang secara spesifik berfungsi untuk mencegah berpendarnya reporter sebelum dipotong oleh aktivitas enzim <i>Taq DNA polymerase</i> saat proses <i>extension</i> yang dimana memisahkan bagian reporter dengan <i>quencher</i>. Secara teknis, apabila <i>reporter</i> dan <i>quencher</i> masih dalam kondisi menyatu, maka saat <i>reporter</i> tereksitasi, yang terjadi adalah energinya akan berpindah ke <i>quencher</i>. Kejadian ini disebut FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>). Oleh karena itu, untuk reporter dapat memberikan sinyal maka harus dalam kondisi berpisah dari <i>quencher</i> (Navarro et al., 2015; Soheili & Samiei, 2005)</p>
<p> Ucapan Terima Kasih Skema Penelitian Mandiri</p>	<p> Kesimpulan Berdasarkan hasil yang sudah didapatkan, optimasi volume kit Da An Gene untuk deteksi SARS-CoV-2 dengan tiga perlakuan volume yaitu 20 µl, 15 µl, dan 10 µl. Ketiga total volume ini mampu mendeteksi keberadaan SARS-CoV-2 dengan nilai Cq < 40. Namun, dari ketiga total volume tersebut, volume 20 µl merupakan volume yang paling optimal dikarenakan menghasilkan nilai Cq terkecil dibandingkan dengan dua total volume yang lain dan dapat menghemat penggunaan reagen kit Da An Gene.</p>

DAFTAR PUSTAKA

- Butler, J. M. (2012). DNA Quantitation. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*, 49–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00003-8>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Faíco-Filho, K. S., Passarelli, V. C., & Bellei, N. (2020). Is higher viral load in SARS-CoV-2 associated with death? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(5), 2019–2021. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0954>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, December. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>
- Kampf, G., Lemmen, S., & Suchomel, M. (2021). Ct values and infectivity of SARS-CoV-2

- on surfaces. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(6), e141. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30883-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30883-5)
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In *Springer*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa455>
- Life Technologies. (2012). Real-time PCR handbook. *Realtime PCR Handbook*, 1–68. <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Lu, Y., Li, L., Ren, S., Liu, X., Zhang, L., Li, W., & Yu, H. (2020). Comparison of the diagnostic efficacy between two PCR test kits for SARS-CoV-2 nucleic acid detection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(10), 1–5. <https://doi.org/10.1002/jcla.23554>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR Detection Chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.10.017>
- Park, M., Won, J., Choi, B. Y., & Lee, C. J. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(6), 963–977. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0452-7>
- Prastyowati, A. (2020). Mengenal Karakteristik Virus SARS-CoV-2 Penyebab Penyakit COVID-19 Sebagai Dasar Upaya Untuk Pengembangan Obat Antivirus Dan Vaksin. *BioTrends*, 11(1), 1–10.
- Soheili, Z., & Samiei, S. (2005). Real Time PCR: Principles and Application. *Hepatitis Monthly*, 83–87.
- Wink, P. L., Volpato, F., Lima-Morales, D. de, Paiva, R. M., Wilig, J. B., Bock, H., Paris, F. de, & Barth, A. L. (2021). *RT-qPCR half reaction optimization for the detection of SARS-CoV-2*.
- Yadav, T., & Saxena, S. K. (2020). Transmission Cycle of SARS-CoV and SARS-CoV-2. In S. K. Saxena (Ed.), *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* (pp. 33–42). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_4
- Yanti, B., Ismida, F. D., & Sarah, K. E. S. (2020). Perbedaan uji diagnostik antigen, antibodi, RT-PCR dan tes cepat molekuler pada Coronavirus Disease 2019. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 20(3), 172–177. <https://doi.org/10.24815/jks.v20i3.18719>
- Yuliana. (2020). Corona Virus Disease (Covid-19); Sebuah Tinjauan Literatur. *WELLNESS AND HEALTHY MAGAZINE*, 2(February), 187–192. <https://doi.org/10.2307/j.ctvzxxb18.12>
- Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5(6).