

Optimasi Volume Kit Untuk Deteksi SARS-CoV-2 dengan *Real Time* RT-PCR

Muhammad Arreza¹⁾, Seprianto¹⁾, Titta Novianti¹⁾, Febriana Dwi Wahyuni¹⁾, Oktaviani Turnip¹⁾
Roaslein Putri²⁾, Henny Saraswati^{1)*}

¹⁾Prodi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul

²⁾PT Ecosains Hayati, Jakarta Timur

*Corresponding author: hennysaraswati@esaunggul.ac.id

Abstract

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/ORF1b, 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 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 μ l, 15 μ l and 10 μ l. 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 μ l was the optimal volume because produced the lowest Cq values compared to the other two volumes.

Key Words : SARS-CoV-2, COVID-19, Optimization, Da An Gene Kit, Real time RT-PCR

Abstrak

SARS-CoV-2 adalah virus corona jenis baru dari genus *Betacoronavirus* dan famili *Coronaviridae* yang menyebabkan penyakit pernapasan yang disebut COVID-19. Virus ini memiliki selubung dan materi genetik berupa RNA rantai tunggal. Struktur genom dari virus ini dibagi menjadi dua jenis, yaitu gen yang menyandi protein non-struktural yang terdiri dari gen ORF1a/ORF1b dan gen yang menyandi protein struktural yang terdiri dari *spike glycoprotein* (S), *envelope* (E), *membrane glycoprotein* (M), dan *nucleocapsid protein* (N). Metode deteksi SARS-CoV-2 dengan *real time* RT-PCR merupakan metode yang paling direkomendasikan dikarenakan memiliki spesifisitas dan keakuratan yang tinggi. *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. Pada penelitian ini dilakukan optimasi volume pada kit yang digunakan untuk deteksi SARS-CoV-2 dengan *Real time* RT-PCR dengan tujuan untuk menghemat penggunaan reagen dari kit yang tersedia namun dengan hasil amplifikasi tetap optimal dan akurat. Terdapat tiga sampel RNA SARS-CoV-2 yang digunakan yang terdiri dari sampel N62, N63, dan N79 dan tiga jenis total volume yang digunakan yaitu sebesar 20 μ l, 15 μ l, dan 10 μ l. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ketiga sampel positif mengandung SARS-CoV-2 dengan nilai Cq < 40. Kemudian, dari ketiga volume yang diuji coba, didapatkan volume 20 μ l merupakan volume yang optimal dikarenakan menghasilkan nilai Cq terkecil dibandingkan dua volume lainnya.

Kata Kunci : SARS-CoV-2, COVID-19, Optimasi, Da An Gene Kit, *Real time* RT-PCR

PENDAHULUAN

Menjelang akhir tahun 2019, muncul beberapa kasus penyakit pernapasan baru berupa pneumonia yang tidak diketahui penyebabnya di Wuhan, China. Penyakit ini diketahui disebabkan oleh virus corona jenis baru dengan sebutan SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2*) dan penyakitnya diberi nama COVID-19 (*Corona Virus Disease 2019*) (Prastyowati, 2020).

SARS-CoV-2 merupakan virus dari genus *Betacoronavirus* dan famili *Coronaviridae*. 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 *spike glycoprotein* (S), *membrane glycoprotein* (M), *nucleocapsid protein* (N) dan *envelope* (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 *spike glycoprotein* (S), *envelope* (E), *membrane glycoprotein* (M), dan *nucleocapsid protein* (N) (Hu et al., 2020).

Diketahui bahwa *natural host* dari virus corona khususnya SARS-CoV-2 ini adalah kelelawar dan beberapa hewan liarnya seperti pangolin, tikus, dan musang berperan sebagai *intermediate host* 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 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).

Penggunaan teknik PCR yang tepat dan sesuai prosedur dapat memberikan hasil yang sesuai harapan. Selain itu juga, perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal dan meminimalisir terjadinya hasil false-positive. Optimasi dapat dilakukan dengan memvariasikan kondisi saat proses PCR, baik jenis *DNA polymerase*, suhu, waktu, buffer PCR, volume reagen dan konsentrasi (Park et al., 2020). Kit PCR COVID-19 terdiri dari reagen-reagen yang digunakan untuk keperluan *In Vitro Diagnostic* (IVD)

dan bertujuan untuk mendeteksi gen yang ada pada SARS-CoV-2 seperti gen N, maupun gen ORF1ab. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengoptimasi volume kit Da An Gene dengan menggunakan volume yang lebih kecil dibandingkan dari protokol kit untuk menghemat penggunaan kit Da An Gene saat deteksi SARS-CoV-2 dengan teknik *real time* RT-PCR. Pada kit Da An Gene terdiri dari reagen-reagen seperti 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.

Belum dijelaskan latar belakang mengapa melakukan optimasi volume, yang seharusnya menjadi latarbelakang adanya penelitian ini

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Gedung Holiq Raus Lt.3, Universitas Esa Unggul, Jakarta Barat. Untuk alat-alat yang digunakan meliputi; mikropipet 2-20 μL , *mini-centrifuge*, vortex, rak tabung kuning, mesin PCR (*PCRmax Eco 48*), *PCRmax sample loading dock*, *seal*, *ice box*, well PCR dan laptop untuk menjalankan *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). Pada kit Da An Gene, protokol alokasi reagen untuk 1 sampel terdiri dari;

Tabel 1. Alokasi Reagen

Volume	NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution A	NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution B	Sampel atau kontrol positif/negatif
25 μl	17 μl	3 μl	5 μl

Namun, pada penelitian ini menggunakan reagen plus sampel dengan total volume 20 μl , 15 μl , dan 10 μl , dengan alokasi reagen sebagai berikut

Tabel 2. Alokasi Reagen Total 20 μl , 15 μl , dan 10 μl

Volume	NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution A	NC (ORF1ab/N) PCR reaction solution B	Sampel atau kontrol positif/negatif
20 μl	13,6 μl	2,4 μl	8 μl
15 μl	10,2 μl	1,8 μl	3 μl
10 μl	6,8 μl	1,2 μl	2 μl

Setelah menentukan banyaknya alokasi reagen yang dibutuhkan untuk ketiga sampel plus ditambah dengan 2 kontrol, kedua reagen reaction solution A dan B kemudian dicampur dalam satu tube sentrifugasi yang baru dan steril. Selanjutnya, tube divortex agar homogen dan disentrifugasi. Setelah selesai, keluarkan tube dan aliquot reagen ke masing-masing well PCR secara merata (total 5 well PCR yang dibutuhkan). Setelah preparasi reagen selesai dilakukan, maka tahap selanjutnya ialah menyampurkan sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif dengan reagen pada well yang sudah dipersiapkan. Setelah itu, dilanjutkan dengan tahap amplifikasi yang dilakukan menggunakan mesin PCR dengan merek *PCRmax Eco 48*. Sebelum memulai proses amplifikasi, terlebih dahulu melakukan pengaturan kondisi siklus sesuai dengan protokol pada *software Eco* sebagai berikut;

Tabel 3. Pengaturan Kondisi Siklus

Tahap	Siklus	Suhu	Durasi
<i>Reverse Transcription</i>	1	50°C	15 menit
<i>Initial Denature</i>	1	95°C	15 menit
<i>Amplification</i>	45	94°C	15 detik
		95°C	45 detik

Kemudian dilanjutkan dengan melakukan pengaturan assay yang terdiri dari: Reporter 1: FAM, Quencher 1: None; Reporter 2: VIC, Quencher 2: None; Reporter 3: Cy5, Quencher 3: None. Setelah selesai, simpan pengaturan, dan proses amplifikasi dapat dilakukan.

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.

HASIL PENELITIAN

Preparasi Sampel RNA SARS-CoV-2 dan Kit Da An Gene

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 *reaction solution A*, serta total 7,2 µl NC (ORF1ab/N) PCR *reaction solution B*, Selanjutnya untuk volume 15 µl dibutuhkan total 30,6 µl NC (ORF1ab/N) PCR *reaction solution A*, serta total 5,4 µl NC (ORF1ab/N) PCR *reaction solution B*. Sedangkan untuk volume 10 µl dibutuhkan total 20,4 µl NC (ORF1ab/N) PCR *reaction solution A*, serta total 3,6 µl NC (ORF1ab/N) PCR *reaction solution B*.

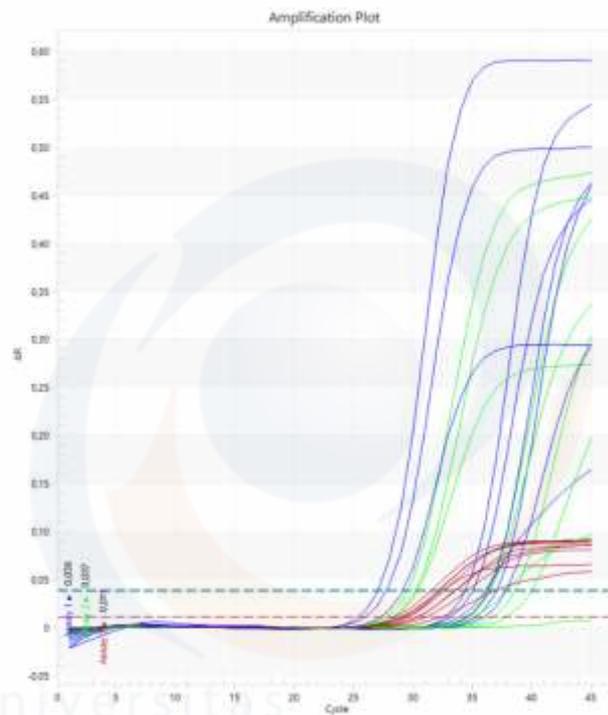
Nilai C_q Hasil Amplifikasi

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

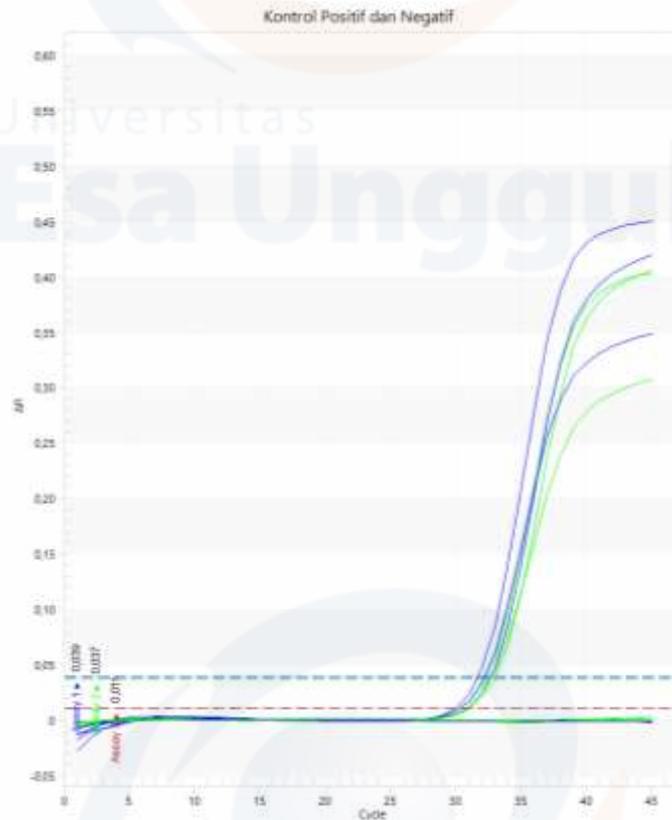
ada tiga jenis reporter yaitu FAM (biru), VIC (hijau), dan Cy5 (merah) (Gambar 1). Dari proses amplifikasi yang sudah dilakukan, analisa data hasil kurva amplifikasi dilakukan pada *software* EcoStudy. Kurva yang muncul menunjukkan hasil positif untuk semua sampel yang diujikan. Sedangkan untuk kontrol positif dan negatif menunjukkan hasil yang valid dan sesuai dengan protokol

kit, yaitu untuk kontrol positif dengan nilai C_q FAM dan VIC ≤ 32 , sedangkan untuk kontrol negatif ditunjukkan dengan tidak adanya nilai C_q dan kurva yang datar dibawah garis *threshold* (Gambar 2).

Diberi penjelasan FAM, warna biru untuk gen apa, dsb



Gambar 1. Kurva Hasil Amplifikasi



Gambar 2. Kurva Kontrol Positif dan Negatif

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) gen ?		
	20 μ l	15 μ l	10 μ l
N62	34,38	35,05	36,15
N63	37,09	36,36	37,93
N79	27,09	27,79	29,16

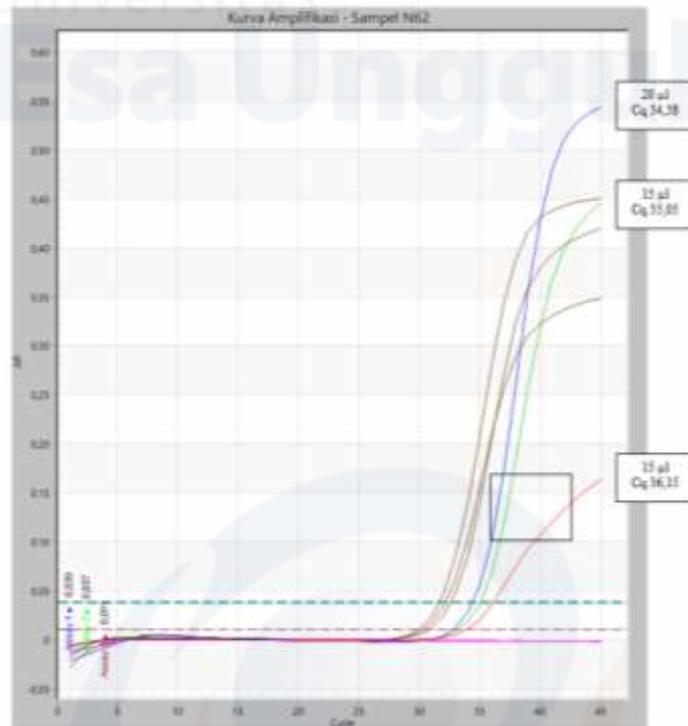
Tabel 5. Nilai Cq dengan Assay VIC

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

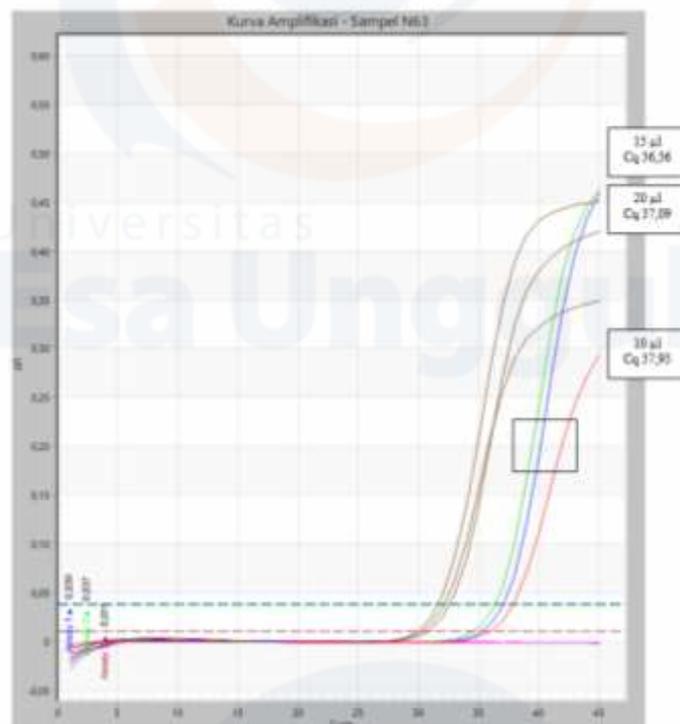
Selain itu, pada kurva hasil amplifikasi pada sampel N62, N63, dan N79 baik dengan assay FAM (Gambar 3; 4; 5) dan VIC (Gambar 6; 7; 8) dengan volume 20 μ l ditunjukkan dengan kurva berwarna biru, untuk volume 15 μ l ditunjukkan dengan kurva berwarna hijau, sedangkan untuk volume 10 μ l ditunjukkan dengan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

Jangan lupa bahas nilai IC, karena IC juga sangat penting untuk mengetahui valid atau

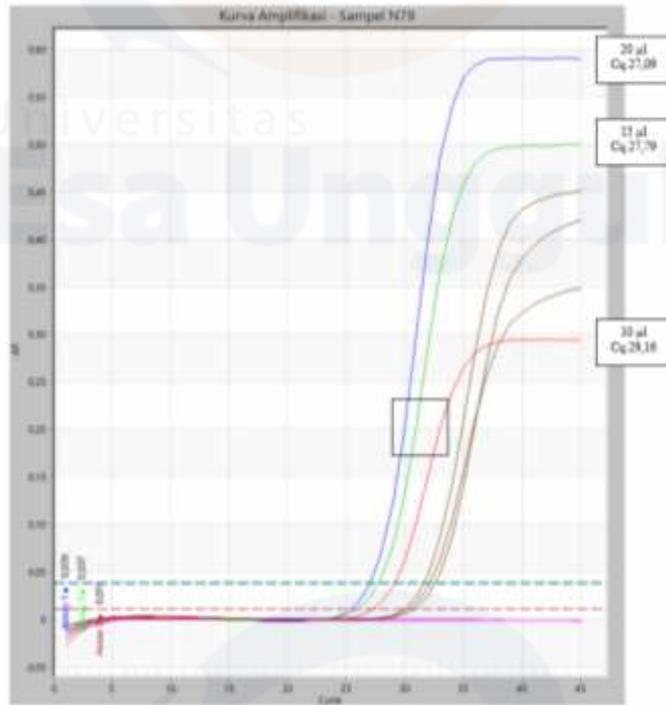
tidaknya hasil running. Juga ditambahkan fungsi gen IC ini



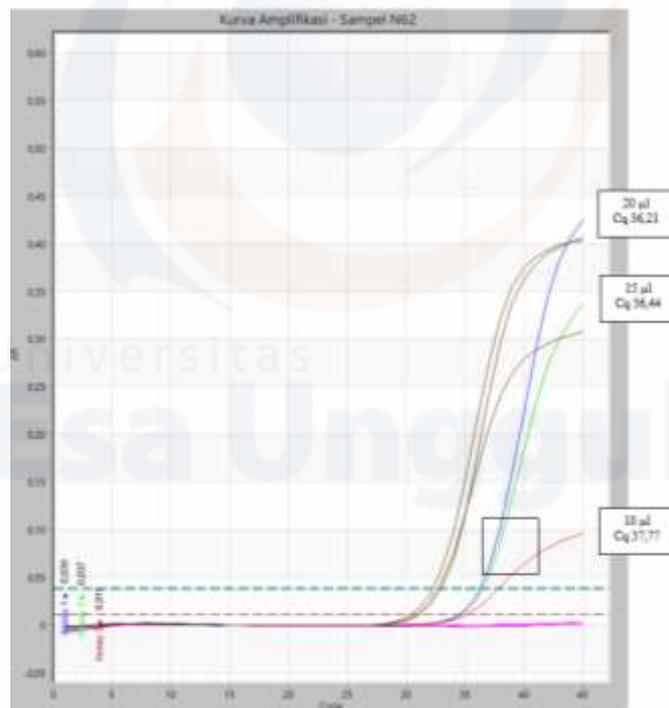
Gambar 3. Kurva Hasil Amplifikasi Sampel N62 (FAM)



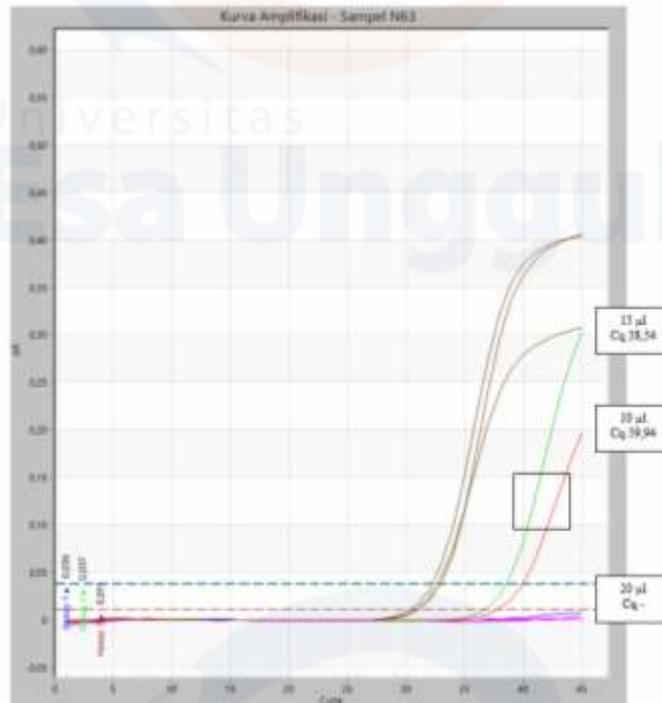
Gambar 4. Kurva Hasil Amplifikasi Sampel N63 (FAM)



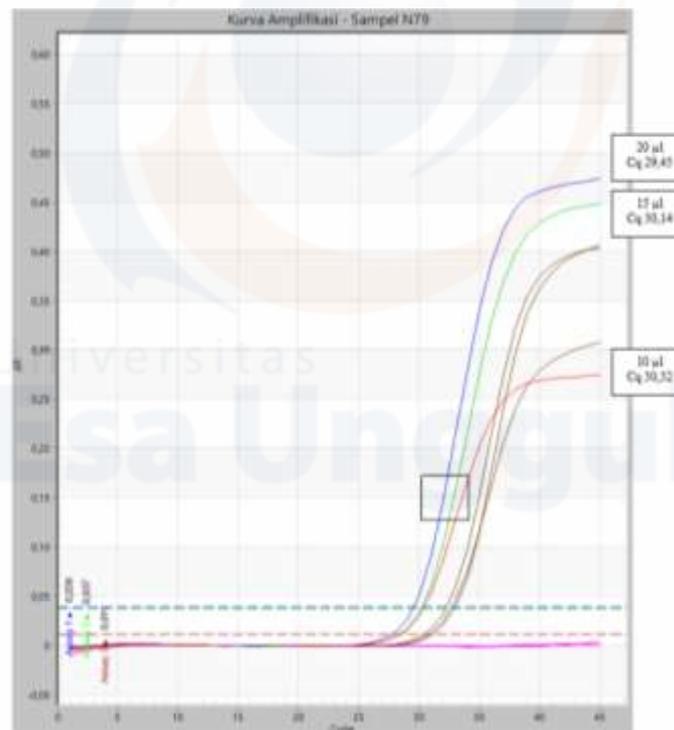
Gambar 5. Kurva Hasil Amplifikasi Sampel N79 (FAM)



Gambar 6. Kurva Hasil Amplifikasi Sampel N62 (VIC)



Gambar 7. Kurva Hasil Amplifikasi Sampel N63 (VIC)



Gambar 8. Kurva Hasil Amplifikasi Sampel N79 (VIC)

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 diamplifikasi. Sedangkan *quencher* terletak pada ujung 3' probe yang secara spesifik berfungsi untuk mencegah berpendarnya *reporter* sebelum dipotong oleh aktivitas enzim *Taq DNA polymerase* saat proses *extension* yang dimana memisahkan bagian *reporter* dengan *quencher*. Secara teknis, apabila *reporter* dan *quencher* masih dalam kondisi menyatu, maka saat *reporter* tereksitasi, yang terjadi adalah energinya akan berpindah ke *quencher*. Kejadian ini disebut FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Oleh karena itu, untuk *reporter* dapat memberikan sinyal maka harus dalam kondisi berpisah dari *quencher* (Navarro et al., 2015; Soheili & Samiei, 2005).

Dalam proses amplifikasi, setelah RNA SARS-CoV-2 dikonversi menjadi cDNA dan menjadi DNA beruntai ganda saat siklus pertama, pada siklus selanjutnya probe akan menempel pada DNA target secara spesifik pada tahap *annealing*. Probe nantinya akan dipotong oleh aktivitas enzim *Taq DNA polymerase* saat proses *extension* yang dimana memisahkan komponen *reporter* dengan *quencher*. Penggunaan probe sebagai *fluorescence* yang memiliki kelebihan yang mendeteksi produk PCR secara spesifik dan probe yang dapat diberi label dengan pewarna *reporter* yang berbeda (Navarro et al., 2015; Soheili & Samiei, 2005).

Terdapat tiga sampel yang digunakan, yaitu sampel N62, N63, dan N79. Pada penelitian ini menggunakan reagen plus sampel dengan total volume 20 µl, 15 µl, dan 10 µl. Pada sampel N62 (FAM) didapatkan nilai Cq terkecil pada volume 20 µl dengan nilai 34,48. Hal yang sama juga didapatkan pada assay VIC dimana nilai Cq terkecil yaitu pada volume 20 µl dengan nilai 36,21. Sedangkan pada sampel N63 dengan assay FAM pada volume 15 µl memiliki nilai Cq terkecil

dengan nilai 36,36, sedangkan pada volume 20 µl hanya didapatkan nilai Cq 37,09. Kemudian pada sampel yang sama dengan assay VIC pada volume 20 µl sayangnya tidak didapatkan nilai Cq dan pada kurvanya juga datar. Selanjutnya untuk sampel N79 dengan assay FAM didapatkan nilai Cq terkecil pada volume 20 µl yaitu dengan nilai 27,09, sedangkan untuk assay VIC juga didapatkan nilai Cq terkecil pada volume 20 µl yaitu dengan nilai 29,45. Secara keseluruhan, dari ketiga volume yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada sebagian besar sampel dengan volume total reagen plus sampel sebesar 20 µl menghasilkan nilai Cq terkecil, sehingga merupakan volume yang optimal. dari hasil pengujian yang dilakukan diharapkan dapat menghemat penggunaan reagen untuk deteksi SARS-CoV-2. Pada penelitian Wink et al., 2021 dikemukakan bahwa terlepas dari dapat diandalkannya hasil pengujian deteksi infeksi SARS-CoV-2 dengan volume reagen plus sampel yang sudah dioptimasi, pengujian ini dapat menghemat penggunaan reagen yang tersedia.

Meskipun nilai Cq dari ketiga sampel dan ketiga volume yang pengujian menunjukkan nilai < 40 dan dianggap positif mengandung SARS-CoV-2, namun sebagian besar nilai Cq-nya > 25 yang dapat diartikan muatan virus pada sampel rendah (Faíco-Filho et al., 2020; Kampf et al., 2021). Selain itu, tidak munculnya nilai Cq dan kurva yang datar pada sampel N63 (VIC) dengan volume 20 µl bisa disebabkan oleh beberapa faktor meliputi human error saat proses preparasi sampel seperti adanya gelembung yang terbentuk di dalam well saat pipetting, atau bisa juga dikarenakan faktor eksternal dengan beberapa contoh seperti adanya kontaminasi, reagen yang tidak tercampur dengan sampel, atau tidak terbaca oleh

mesin PCR (Jalali et al., 2017; Life Technologies, 2012).

Nilai Cq sendiri adalah singkatan dari *Cycle quantity*, yang dimana pada hasil kurva amplifikasi merupakan titik perpotongan antara kurva amplifikasi sampel yang diuji coba dengan garis threshold. Selain itu, nilai Cq pada siklus amplifikasi PCR menunjukkan titik dimana tingkat *fluorescence* melebihi batas *threshold*. Pada beberapa protokol, nilai Cq dapat ditulis dengan Ct yang merupakan singkatan dari *Cycle threshold*. Nilai Cq memberikan informasi mengenai pada siklus keberapa mesin PCR dapat mendeteksi sinyal dari *fluorescence* yang berpendar saat proses PCR berlangsung, dimana apabila semakin kecil nilai Cq, maka semakin banyak jumlah salinan DNA yang ada pada sampel. Sehingga pada penelitian ini, dapat diartikan bahwa apabila semakin kecil nilai Cq, maka jumlah virus yang pada sampel semakin banyak (Faíco-Filho et al., 2020). Kemudian untuk nilai *threshold* pada kurva amplifikasi merupakan batas terkecil dimana mesin PCR dapat membedakan sinyal dari *fluorescence* dengan *noise background* (Butler, 2012). Analisis data hasil kurva amplifikasi dilakukan pada *software* EcoStudy. Nilai *threshold* dapat diubah sesuai kebutuhan, namun pada penelitian ini nilai *threshold* tidak dilakukan perubahan apapun serta nilainya ditetapkan secara otomatis oleh *software* EcoStudy. **Sebaiknya diletakkan sebelum hasil nilai ct keluar**

Kurangnya data nilai Cq dengan volume total reagen plus sampel sebanyak 25 µl (sesuai protokol kit) bisa masuk sebagai tujuan, bahwa ada beberapa alat PCR yang total volumenya kurang dari 25µL menjadi kendala dikarenakan kapasitas maksimal volume reagen pada well mesin PCR sehingga tidak adanya data pembandingan untuk data nilai Cq dari

volume yang sudah dioptimasi. Pada protokol kit Da An Gene, total volume reagen plus sampel yang digunakan yaitu 25 µl, sedangkan mesin PCR (*PCRmax Eco 48*) yang digunakan pada penelitian ini pada masing-masing well-nya hanya mampu menampung reagen plus sampel hingga maksimal 20 µl. Oleh karenanya, dengan kondisi seperti itu dapat juga menjadi alasan untuk melakukan optimasi volume pada kit sehingga tetap dapat melakukan deteksi SARS-CoV-2.

Pada pembahasan tidak dijelaskan mengapa terdapat perbedaan nilai ct di berbagai volume padahal sampelnya sama. Serta tidak ada literatur pendukungnya

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.

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.2014.1>

0.017

2

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>

Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5(6).

Note : perbaikan hanya pada konten skripsinya saja, untuk perbaikan penulisan dapat disesuaikan dengan aturan di Esa Unggul

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.ctvzxxb18.1>