

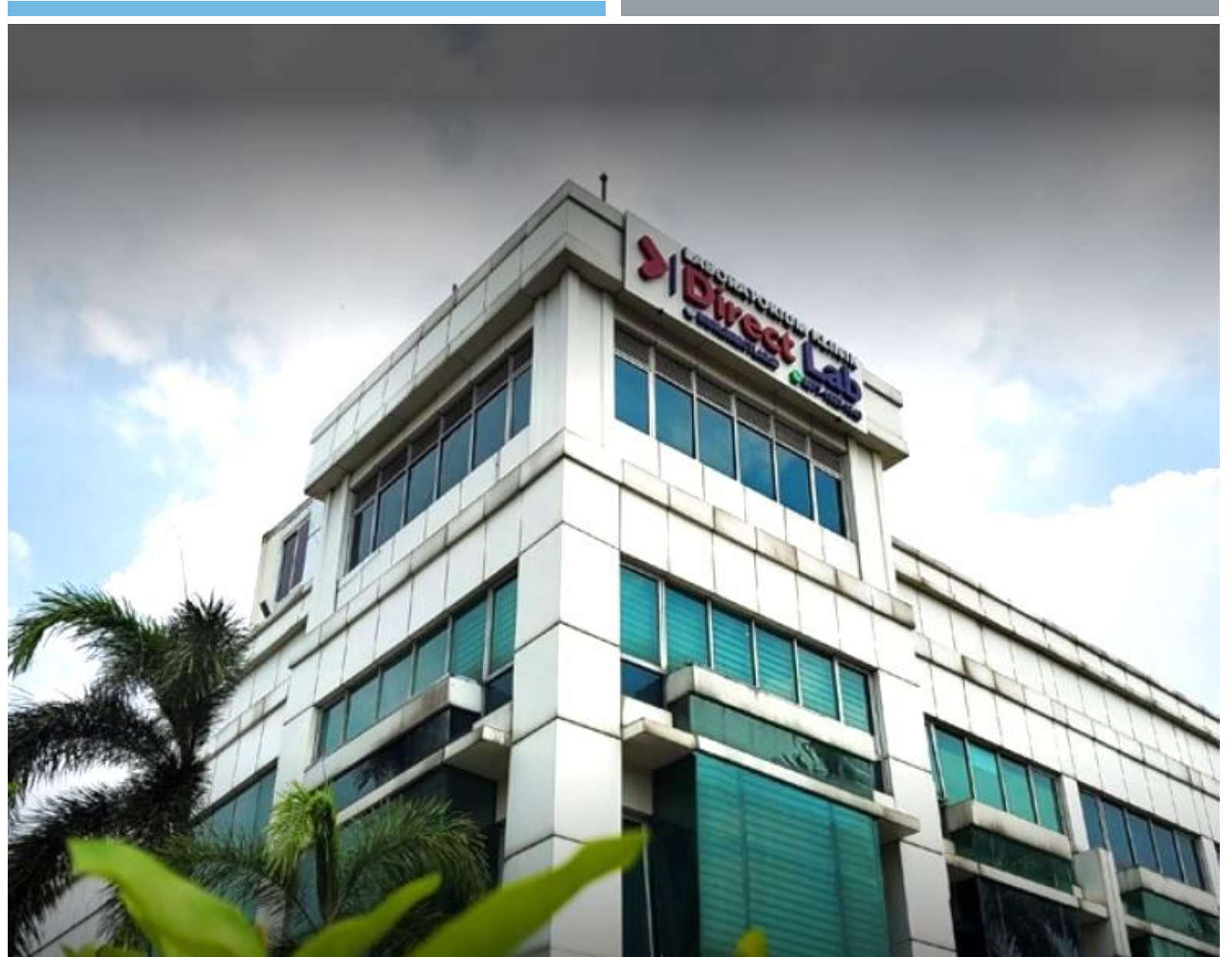


**PROSEDUR  
ANALITIK  
PEMERIKSAAN  
COVID-19  
SECARA  
MOLEKULER**

Eva Selenia Desi, S.Si, M.Si  
Direct Lab Jakarta

## DIRECT LAB

- Laboratorium klinik jejaring kemenkes untuk pemeriksaan spesimen covid19.
- Kapasitas pemeriksaan  $\pm$  500 spesimen dalam 1 hari.
- Melayani pemeriksaan rapid test antigen dan PCR.



**TOPIK**  
**PEMBAHASAN:**

Proses isolasi/ekstraksi materi genetik SARS-COV2.

Pemeriksaan RNA dengan metode RT-PCR.

Output hasil pembacaan RT-PCR.

# VARIASI METODE PENGUJIAN SARS-COV2



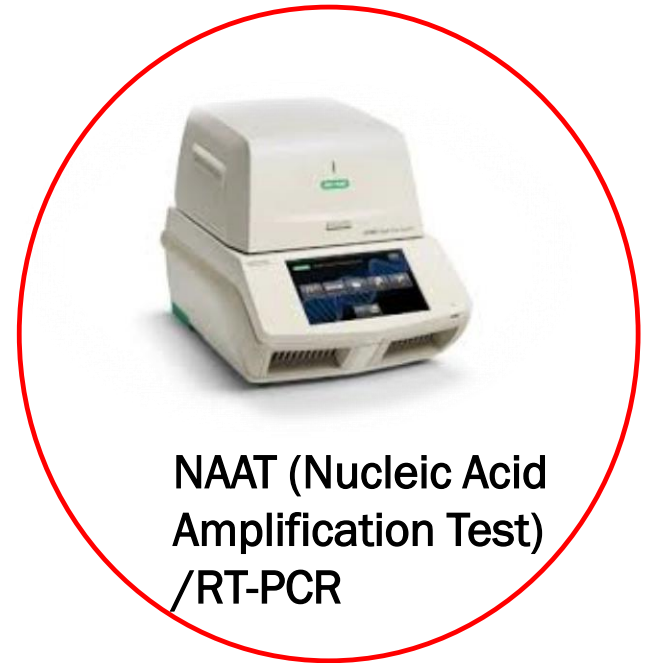
Hematologi



Antibodi



Antigen



NAAT (Nucleic Acid  
Amplification Test)  
/RT-PCR

# TAHAPAN UMUM PEMERIKSAAN SPESIMEN DI LAB MOLEKULER



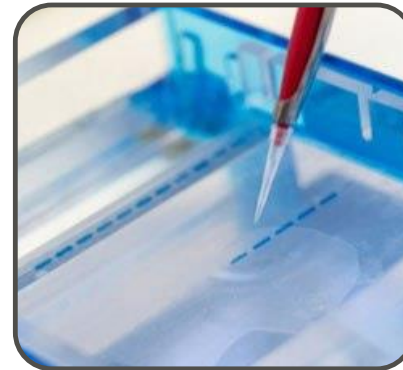
Proses Ekstraksi Materi Genetik

- Automatic
- Manual



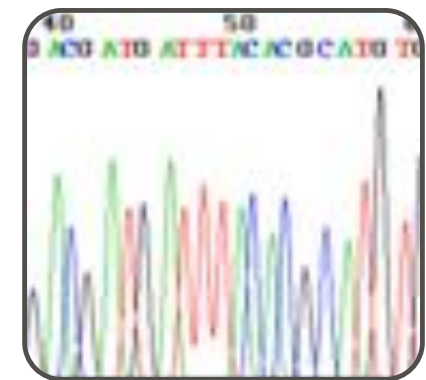
PCR

- PCR Konvensional
- RT-PCR



Elektroforesis

- Agarosa
- SDS-PAGE



Sekuensing

# TAHAP PERSIAPAN

## Pemakaian APD (Alat Pelindung Diri)

- Masker N95 dan Google/Face Shield
- Gloves atau Sarung tangan medis
- Penutup Kepala
- Lab Coat/Lab Gown
- Sepatu Boots/Shoes Cover



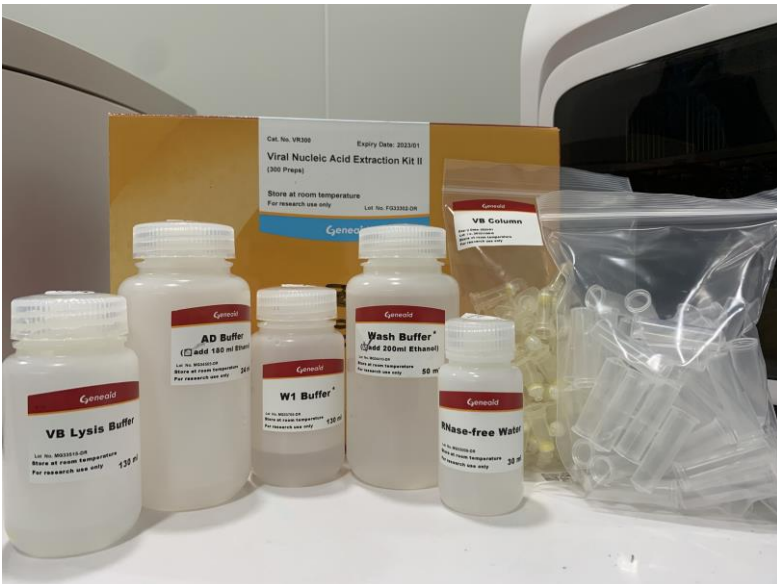
# PROSES ISOLASI/EKSTRAKSI MATERI GENETIK

- Hal yang perlu diperhatikan dalam proses Isolasi/Ekstraksi materi genetik adalah:

1. Sumber sample (Body fluids/Jaringan/Kultur sel/Kultur bakteri)
2. Metode pengerjaannya, manual/otomatis
3. Prinsip kerjanya, trizol based/column based/beads

- Tiga tahap penting proses Isolasi/Ekstraksi:

1. Lisis
2. Pemisahan
3. Pemurnian



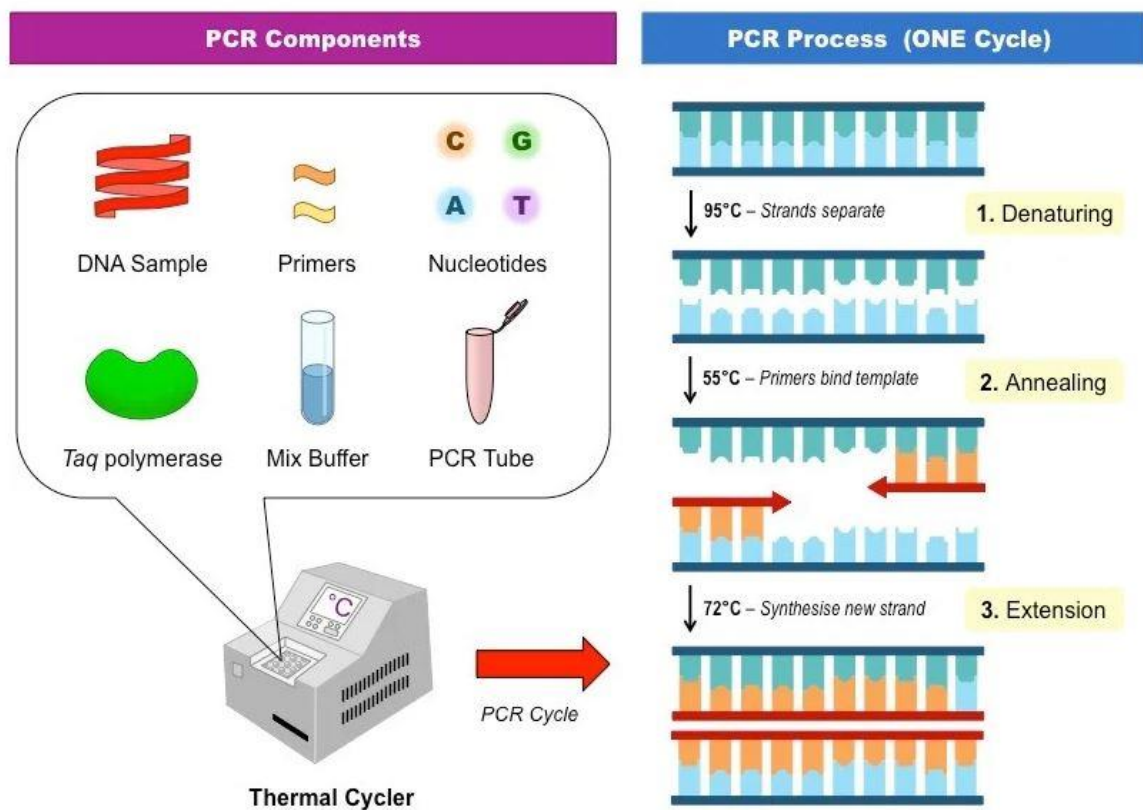
---

# ILUSTRASI PROSES EKSTRAKSI



KINEMASTER

# PEMERIKSAAN RNA MENGGUNAKAN METODE RT-PCR

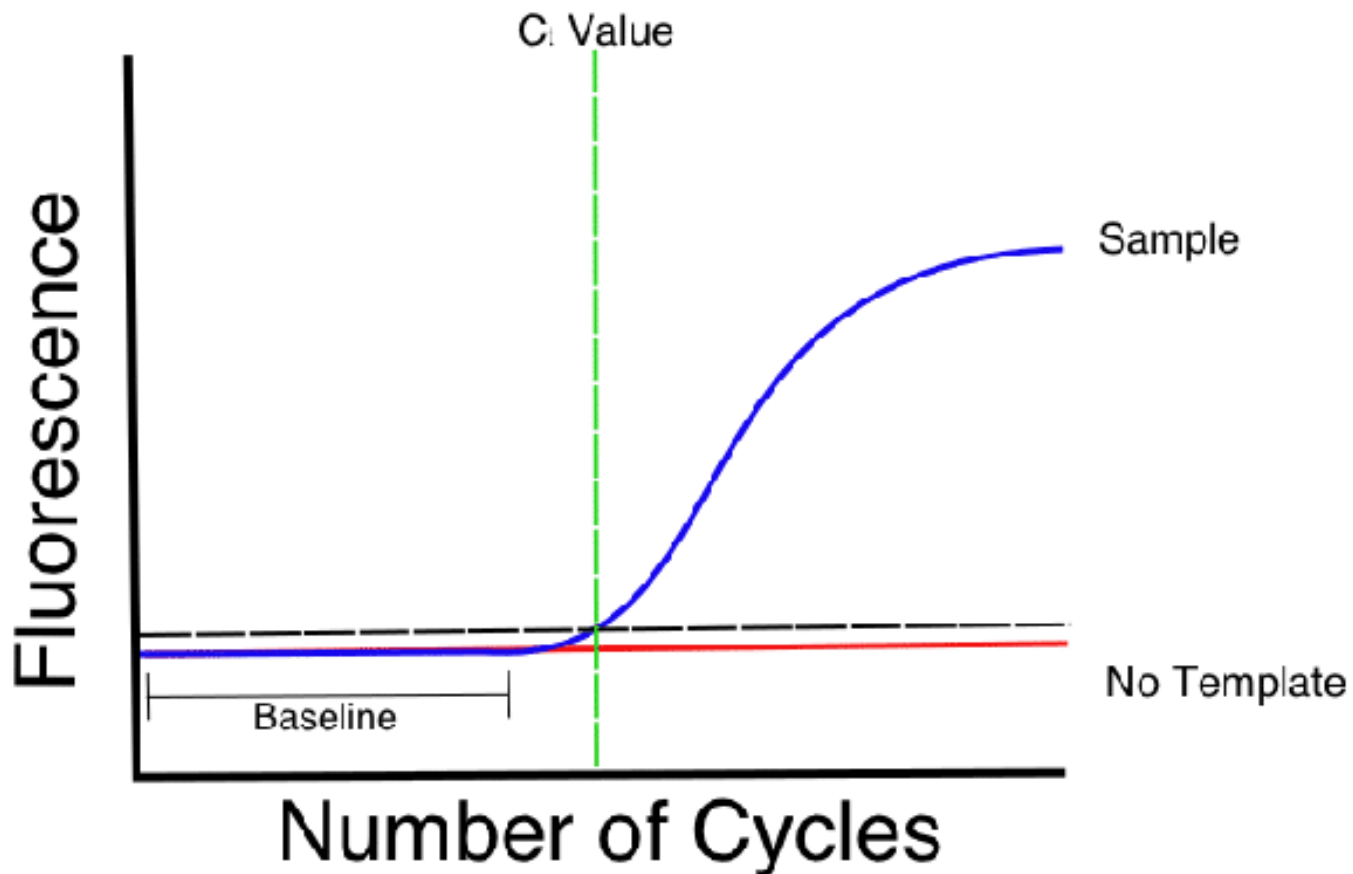


- Materi genetik Sars CoV-2 adalah **RNA** → Perlu diubah dari RNA menjadi cDNA melalui proses reverse transcription. Pemeriksaan diagnostik Sars-COV2 biasanya menggunakan metode **one step PCR** karena cepat.
- Analisis RT-PCR menggunakan 2 tipe flurosens. Dye-based qPCR (Sybr green) dan Probe-based qPCR (Taqman probe).
- Target deteksi umumnya pada gen RdRp, N, E dan S.

---

# ILUSTRASI PROSES PCR

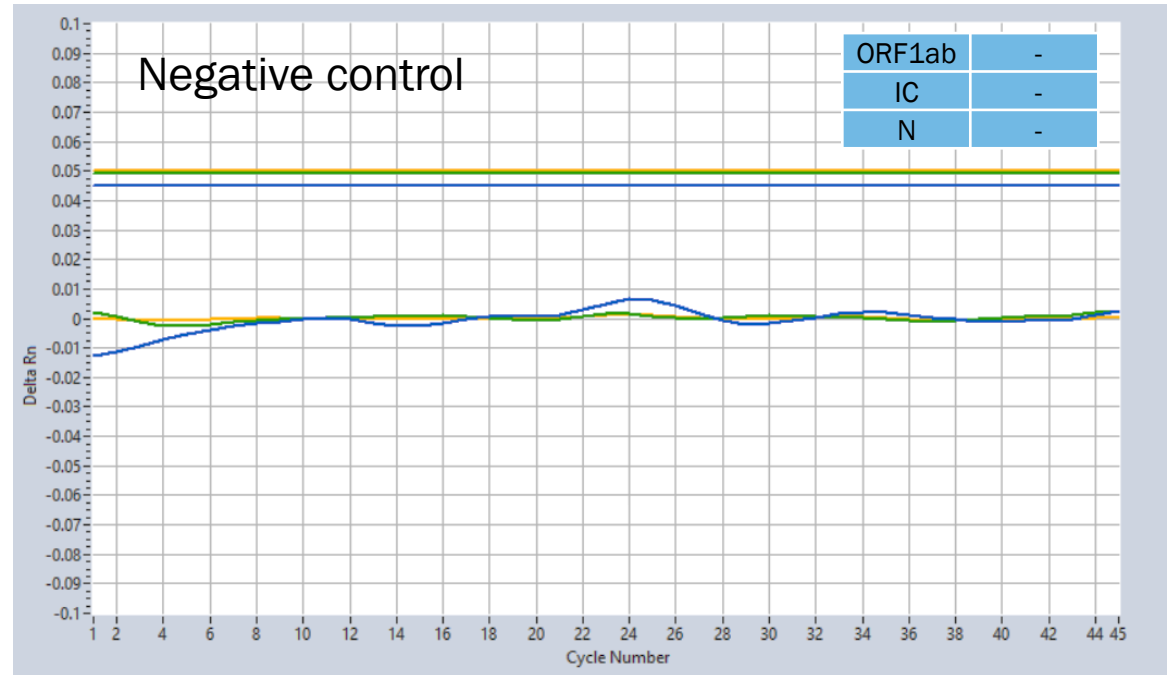
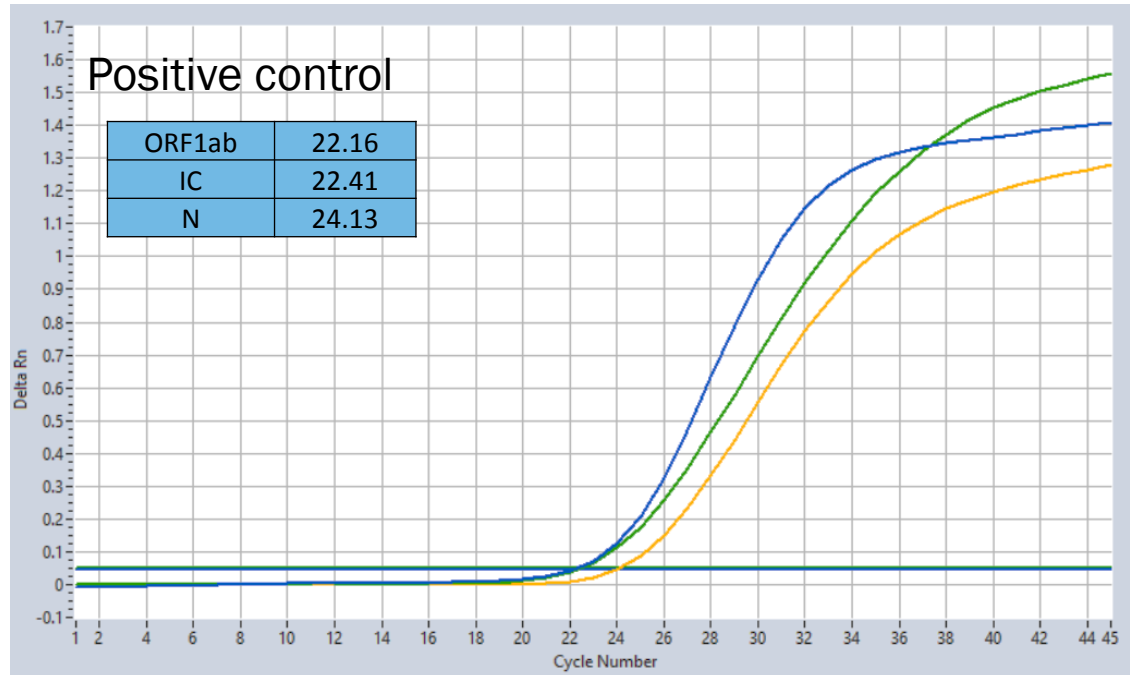
## APA ITU CT VALUE ?



- CT Value (Cycle Threshold) : Data fluoresensi (berupa jumlah siklus) dari PCR yang digunakan untuk mendeteksi secara kuantitatif/kualitatif apakah suatu sampel memang memiliki urutan asam nukleat tertentu.
- CT *value* berbanding terbalik dengan jumlah asam nukleat di dalam tubuh seseorang. Artinya, semakin kecil suatu CT *value*, diasumsikan semakin banyak jumlah asam nukleat dalam tubuh seseorang.
- Pada pemeriksaan covid19, RT-PCR hanya digunakan untuk deteksi secara **KUALITATIF**. Hanya sebagai diagnostik untuk evaluasi terapi/kesembuhan.

# QUALITY CONTROL RT-PCR

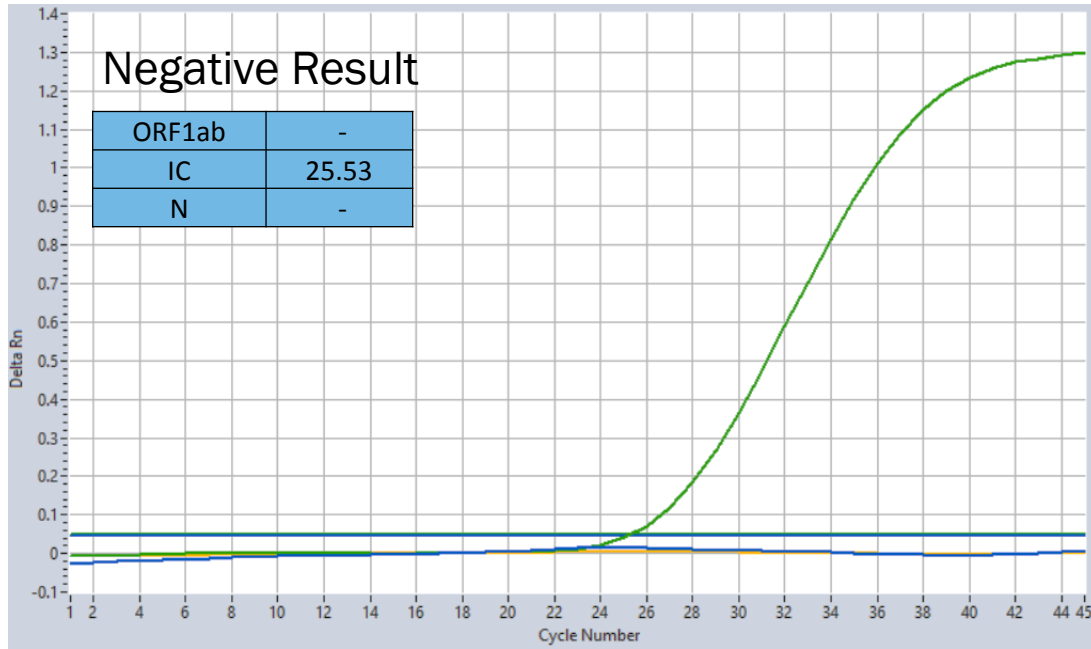
- **Kontrol positif PCR** berupa template DNA/RNA sintetik SARS CoV dalam bentuk fragmen atau genom utuh : mengindikasikan batas deteksi dan performa assay.
- **Kontrol negatif PCR** menunjukkan tidak adanya kontaminasi selama proses ekstraksi dan proses PCR. Kontrol negatif menggunakan cairan non template (RNase freewater, ddH2O steril, kontrol negatif yang disediakan oleh kit PCR masing-masing).



# INTERPRETASI DATA RT-PCR

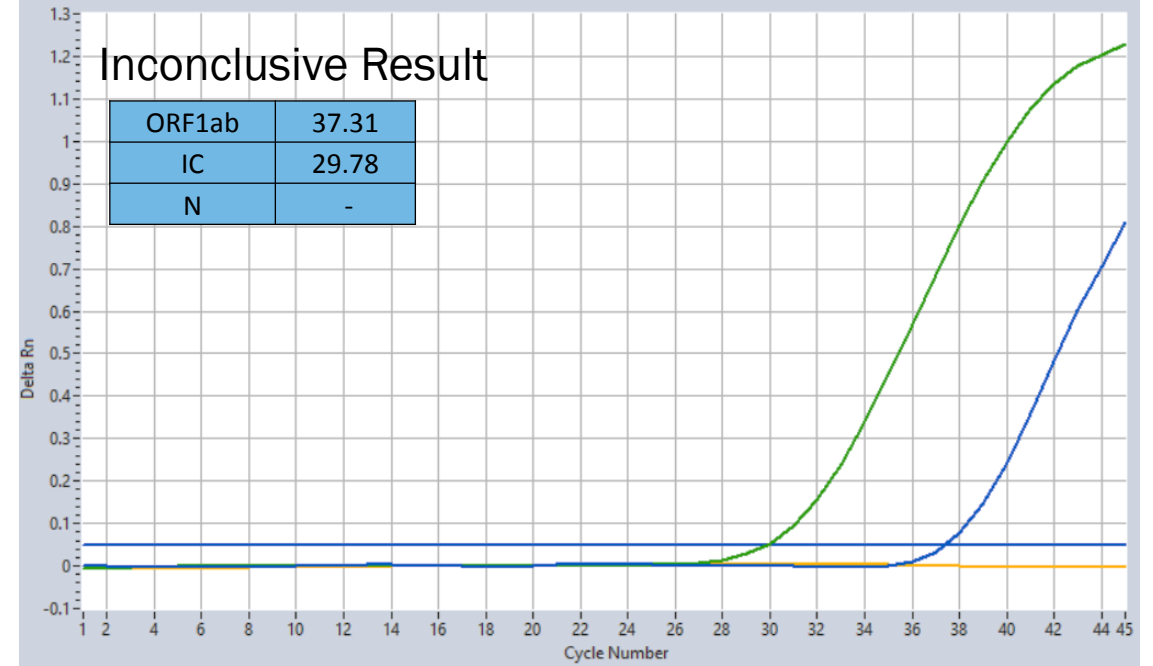
## Negative Result

ORF1ab	-
IC	25.53
N	-



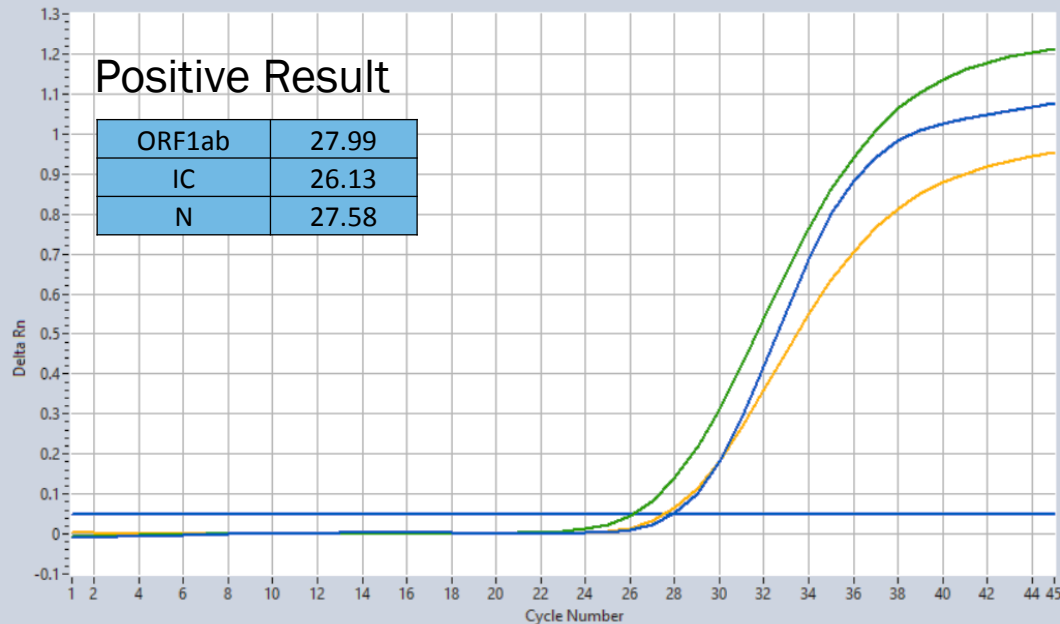
## Inconclusive Result

ORF1ab	37.31
IC	29.78
N	-



## Positive Result

ORF1ab	27.99
IC	26.13
N	27.58



Interpreting Test Results		FAM (ORF1ab)	
		$C_T \leq 38$	No $C_T$ or $C_T > 38$
TEXAS	$C_T \leq 38$	<b>Positive</b>	<i>Test Again, and if repeated: Positive</i> <i>If not: Negative</i>
RED/ROX (N gene)		<i>Test Again, and if repeated: Positive</i> <i>If not: Negative</i>	<b>Negative</b>

\*No requirement for HEX/VIC channel test results, if the sample is extracted from virus culture.

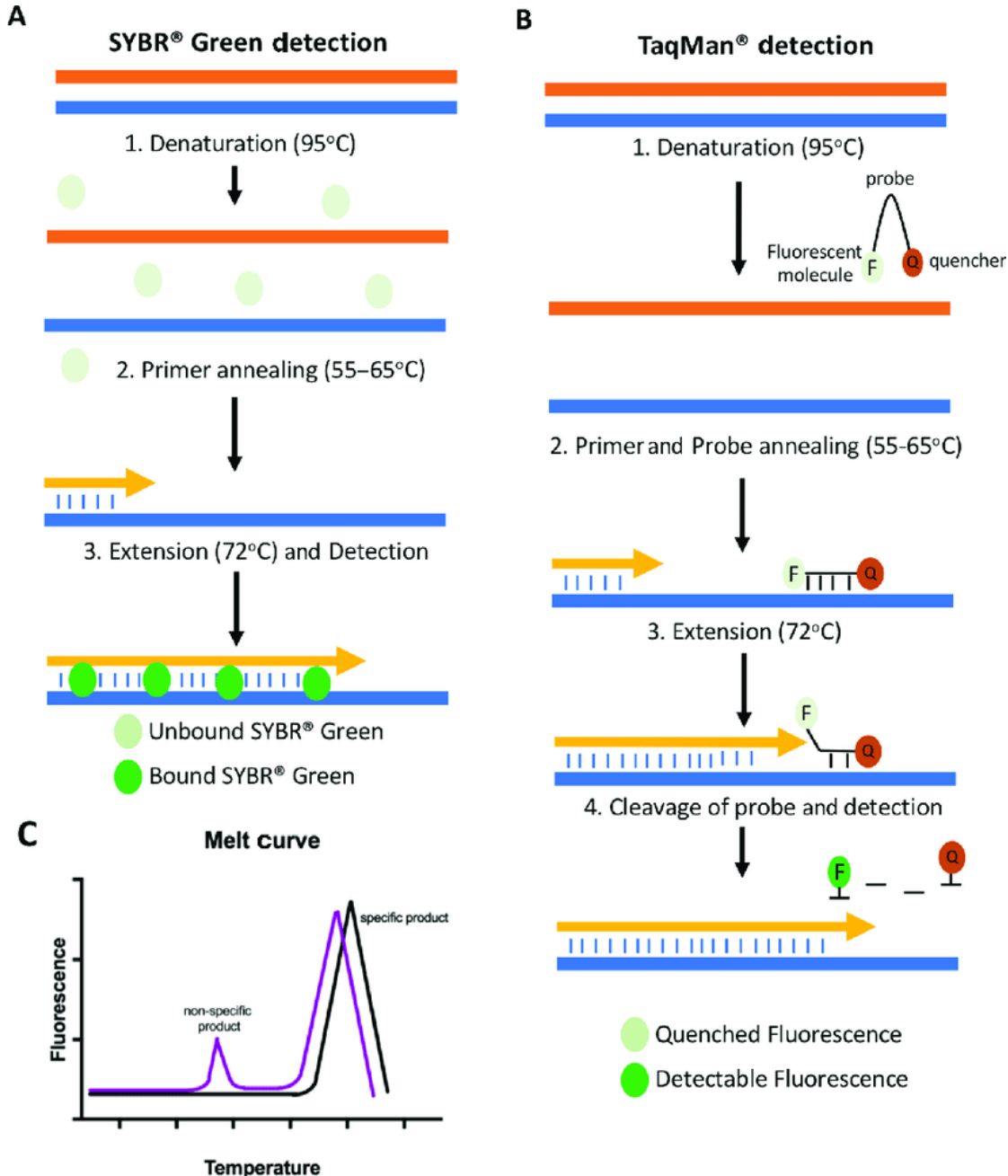
# QUALITY CONTROL PCR

- Kontaminasi pada kontrol negatif (negatif menjadi positif), bentuk grafik kontrol positif tidak sigmoid atau hanya muncul single gene, menunjukkan bahwa test tidak valid. Maka perlu dilakukan test ulang. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya :
  - > Kontaminasi pada ruang ekstraksi maupun PCR -> Perlu dilakukan dekontaminasi ruangan
  - > Degradasi sample -> Gunakan sumber sample baru
  - > Reagen kadaluarsa -> Cek berkala ED kit dan lakukan penggantian reagen jika sudah mendekati ED.
- Hasil negatif **tidak** selalu berarti tidak ada infeksi covid19. Namun bisa juga disebabkan oleh :
  - > Kualitas dan penanganan sample yang tidak tepat
  - > Proses ekstraksi tidak sempurna -> Dikendalikan dengan membuat kontrol ekstraksi untuk mendeteksi housekeeping gene
  - > Sample diambil tidak dalam rentang jendela inkubasi virus, sehingga load virus masih sedikit.
  - > Terjadi mutasi pada virus yang mempengaruhi sensitivitas dan spesifisitas deteksi.



**TERIMA KASIH**

For further question, feel free to contact me via email : [directlab.analis01@gmail.com](mailto:directlab.analis01@gmail.com)



## PERBEDAAN DYE-BASED QPCR & PROBE-BASED QPCR

- Gambar A adalah dye-based qPCR, tipe dye yang digunakan adalah SYBR Green. SYBR Green akan menempel pada DNA untai ganda.
- Gambar B adalah probe-based qPCR, tipe dye ini memiliki peredam (Quencher) dan pemancar (Reporter). Probe akan memancarkan sinyal ketika bagian dari quencher terlepas dari reporter.
- Tipe reporter : FAM, VIC, ROX, CY5, TEXAS RED

LALU, TIPE FLUORESCENT APAKAH YANG DIGUNAKAN UNTUK DETEKSI COVID19?