



Laporan Praktikum Biologi Molekular

## **PROYEK SAINS: DETEKSI SARS-CoV-2 DARI SAMPEL SALIVA MENGUNAKAN METODE RT-qPCR**

**Bimo Hadi Permana\***, M. F. M. Hasibuan, N. K. N. Iman, S. A. P. Talitha

Universitas Indonesia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Departemen Biologi

Desember 2024

### **Abstrak**

Virus SARSCoV-2 merupakan virus bertipe RNA yang menjadi penyebab pandemi pada tahun 2019 di seluruh dunia. Praktikum ini dilakukan untuk mengetahui tahapan-tahapan serta dapat menyimpulkan hasil akhir tes yang dilakukan untuk menguji keberadaan virus SARSCoV-2 dalam tubuh seseorang dengan metode qPCR. Proses pengumpulan saliva sebagai sumber spesimen dilakukan secara alami dari seseorang yang berpuasa 30 menit sebelum tes. Proses qPCR dilakukan menggunakan kit PerkinElmer® SARSCoV- 2 Real-time RTPCR Assay dalam volume reaksi 30uL dengan 10% volume tambahan. Hasil menunjukkan seluruh sampel positif virus SARSCoV-2 namun tidak dapat diinterpretasikan secara valid karena kontrol positif, negatif, dan internal yang tidak sesuai ketentuan kit. Praktikum bertujuan untuk mengisolasi materi genetik virus SARSCoV-2 dari sampel saliva dan mengetahui prinsip deteksi materi genetik SARSCoV-2 dari sampel saliva menggunakan metode qPCR.

Kata kunci: qPCR, saliva, SARSCoV-2, sensitivitas, spesifisitas

## **1. Pendahuluan**

Latar belakang praktikum ini adalah untuk mendeteksi keberadaan virus SARS-CoV-2 yang menjadi penyakit pandemi global, target uji praktikum ini adalah laboran dengan dideteksi melalui alat qPCR dan juga pengenalan terhadap alat qPCR dan mengetahui penggunaan alat qPCR untuk sampel RNA.

Penyakit severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pertama kali dideteksi pada tahun 2019 di Wuhan dan saat ini masa menjadi pandemi. Identifikasi menggunakan gen RNA dependent RNA polymerase (RdRp) menunjukkan SARS-CoV-2 mengalami diversifikasi dari kelompok Betacoronavirus dari kelelawar dan trenggiling. Hal tersebut menunjukkan gen RdRp dapat digunakan sebagai gen penanda yang stabil untuk identifikasi kelompok Betacoronavirus (Kasibhatla dkk. 2020). Selain gen RdRp, terdapat dua (2) gen lain yang menjadi target untuk mengidentifikasi SARS-CoV-2, yaitu gen E dan gen N. Kedua gen tersebut merupakan gen structural yang mengode selubung (E) dan nucleocapsid (N) (Gambar 1.) (Corman dkk. 2020).

Saliva merupakan salah satu sumber DNA yang umum digunakan untuk analisis diagnostik pada manusia. Pengambilan saliva yang lebih mudah membuat metode ini tidak invasif dan tidak membahayakan. Deteksi kanker dapat dilakukan dengan melakukan penapisan genotipe menggunakan materi DNA yang diisolasi dari saliva (Poehls, 2018). Pengembangan diagnostik menggunakan saliva sebagai sumber materi genetik penyakit saat ini terus berkembang dan menjadi salah satu metode yang menjanjikan seperti pada deteksi specimen penderita SARS-CoV-2 (Williams dkk., 2020).

Praktikum qPCR ini bertujuan untuk laboran dapat melakukan isolasi materi genetik virus dari sampel saliva dan laboran mampu mengetahui prinsip deteksi materi genetik SARS-CoV-2 dari sampel saliva menggunakan metode qPCR.

## **2. Metode**

Alat-alat untuk metode ekstraksi DNA dengan kit Promega adalah Mesin qPCR, Mikropipet 0,5-10uL, Mikropipet 10-100uL, Mikropipet 100-100uL, Mesin sentrifugasi, Lemari transfer, Isofreeze, Tube rack 2mL dan Tube rack PCR 0,2mL. Bahan-bahan

yang digunakan adalah Saliva, Kit PerkinElmer® SARSCoV-2 Real-time RT-PCR Assay, Corong, Tabung 2mL, Tabung PCR 0,1mL, Tips Mikropipet 0,5-10uL, Tips Mikropipet 10-100uL, Tips Mikropipet 100-1000uL dan Plastik limbah.

Metode yang dilakukan untuk ekstraksi DNA bakteri gram negatif dengan kit adalah Sampel saliva dikoleksi dari mahasiswa dengan kondisi puasa (tidak boleh makan, minum, dan menggosok gigi serta aktivitas yang terkait rongga mulut) selama 30 menit sebelum pengambilan sampel. Pengeluaran saliva dilakukan secara alami tanpa bantuan apapun dan dikoleksi sebanyak 500uL ke dalam tabung 2mL yang telah disediakan bersama dengan corong koleksi., Sampel saliva kemudian disimpan dalam kotak es sampai dilakukan proses ekstraksi. Ekstraksi sampel saliva dimulai dengan mengeluarkan sampel dari kotak es kemudian didiamkan sampai dengan mencair di suhu ruang. Setelah mencair, sampel kemudian divorteks dan diambil sebanyak 100uL ke tabung 2mL baru steril. Sampel kemudian diinkubasi pada drybath pada suhu 95oC selama 10 menit. Setelah selesai, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000rpm. Supernatan diambil sebanyak 30uL untuk digunakan sebagai template dalam reaksi qPCR. Reaksi qPCR dilakukan menggunakan kit PerkinElmer® SARSCoV- 2 Real-time RT-PCR Assay dalam volume reaksi 30uL dengan 10% volume tambahan tiap reaksi dan komposisi sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi reaksi qPCR untuk deteksi SARS-CoV-2

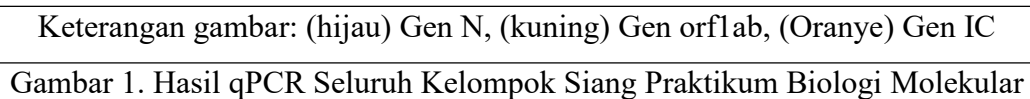
Komponen	Volume (uL)	110% volume (uL)
nCOV Reagent A	7,5	8,25
nCOV Reagent A	1,5	1,65
nCOV Enzyme mix	1	1,1
Template (Positif/negative/sampel)	20	

Profil reaksi qPCR kit PerkinElmer® SARSCoV- 2 Real-time RT-PCR Assay mengikuti tabel berikut:

Tahap	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Jumlah siklus
1	37	120	1
2	50	300	1
3	42	2100	1
4	94	600	1
5	94	10	45
	55	15	
	65	45	

Tabel 3. Interpretasi nilai Ct untuk hasil tes positif dan negatif

### 3. Hasil & Pembahasan



Hasil qPCR yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 1, pada hasil yang didapatkan kelompok D4 pada sampel 1 adalah positif dengan nilai Cq gen N 15,20; nilai Cq gen orflab 4,48; nilai Cq gen IC 17,79 dan pada sampel 2 adalah positif dengan nilai Cq gen N 9,88; nilai Cq gen orflab 13,78; nilai Cq IC 17,68. Namun hasil positif yang didapatkan adalah false positive (%). False positive terjadi saat sampel yang berada pada sampel terjadi saat terdapat masalah pada kontrol, kontrol negatif dan NTC (No Template Control). Kontrol negatif memiliki nilai Cq gen N 6,24; nilai Cq gen orflab 20,45; nilai Cq gen IC 20,51; yang menandakan hasil positif keberadaan virus, sedangkan untuk kontrol negatif berisi TE buffer dan tidak ada sampel virus atau materi genetik. Lalu pada NTC (No Template Control) memiliki nilai Cq gen N 3,57; nilai Cq gen orflab 11,99; nilai Cq gen IC 11,60; yang menandakan gen virus SARS-CoV-2 terindikasi amplifikasi positif, sedangkan pada NTC tidak ada template asam nukleat.

Lalu nilai efisien dari sampel 1 memiliki nilai 1,20 (gen N), 1,20 (gen orflab) dan 1,12 (gen IC) serta untuk sampel 2 memiliki nilai efisiensi 0,25 (gen N), 0,15 (gen orflab) dan 0,22 (gen IC). Hasil pada nilai efisiensi sampel 1 masih dapat diterima, dengan rentang yang seharusnya adalah 80-120% atau 0,8-1,2 (Stephenson, 2016). Lalu untuk sampel 2, memiliki rentang keseluruhan yang lebih rendah dari yang seharusnya, hal ini dapat mengindikasikan bahwa adanya inhibitor dan juga masalah pada primer yang tidak efisien (\*). Pada saat dilakukan pooling dorfman, guna mendapatkan nilai efisiensi saat mengambil sampel dari satu pool, hasil nilai tidak efektif, berikut adalah perhitungannya:

$$P = \text{Jumlah sampel positif} / \text{Jumlah total sampel} \times 100\%$$

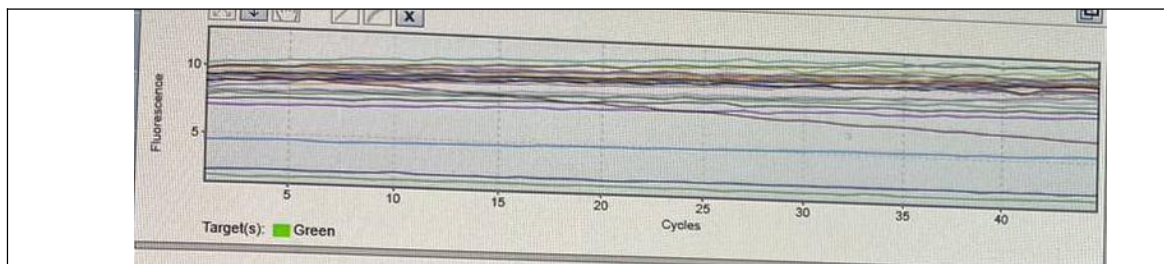
$$P = \frac{28}{28} \times 100\% = 100\%$$

Menurut panduan Perkin Elmer, apabila nilai P di atas 25%, maka nilai efisiensi untuk pengambilan sampel tidak valid pada pooling dorfman. Nilai efisiensi yang ada tidak diperhitungkan.

Setelah itu nilai take-off yang tinggi dapat diketahui bahwa sampel sebelum dilakukan qPCR, memiliki konsentrasi sampel yang tinggi.

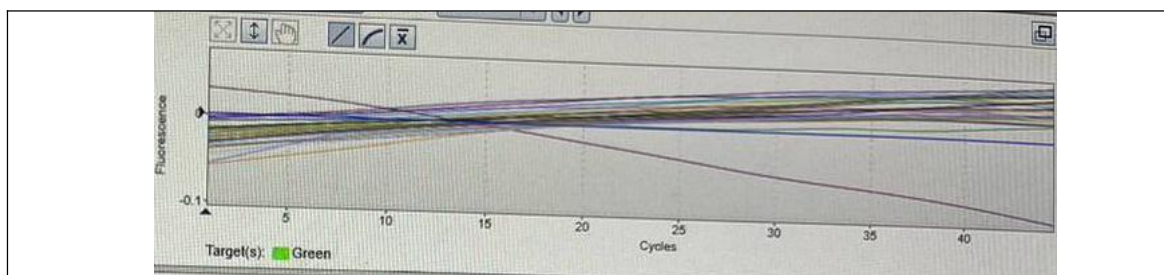
Untuk keseluruhan sampel kelompok siang juga memiliki rentang nilai positif pada pengujian dengan gen N $\leq$ 37, gen ORF1ab $\leq$ 37 dengan nilai gen IC tidak diperlukan saat nilai positif pada sampel. Hal ini berpusat pada acuan kontrol negatif dan NTC yang

seharusnya menunjukkan nilai negatif pada kedua kontrol, sedangkan praktikum ini tidak. Hal ini disebabkan karena sampel memiliki kesalahan pada primer seperti primer yang terdegradasi atau membentuk dimer (nilai fluorescence minus dengan  $C_q=0$ ), yang relevan dengan sudah berkurang atau sedikit sekali kasus COVID-19 dan diasumsikan primer tidak diganti atau dibeli baru sejak tahun 2019/2020 sampai 2024 (sekarang), adanya kontaminasi reagen, kontaminasi alat dan kualitas laboratorium.



Keterangan gambar: (hijau) Gen N/Gen target

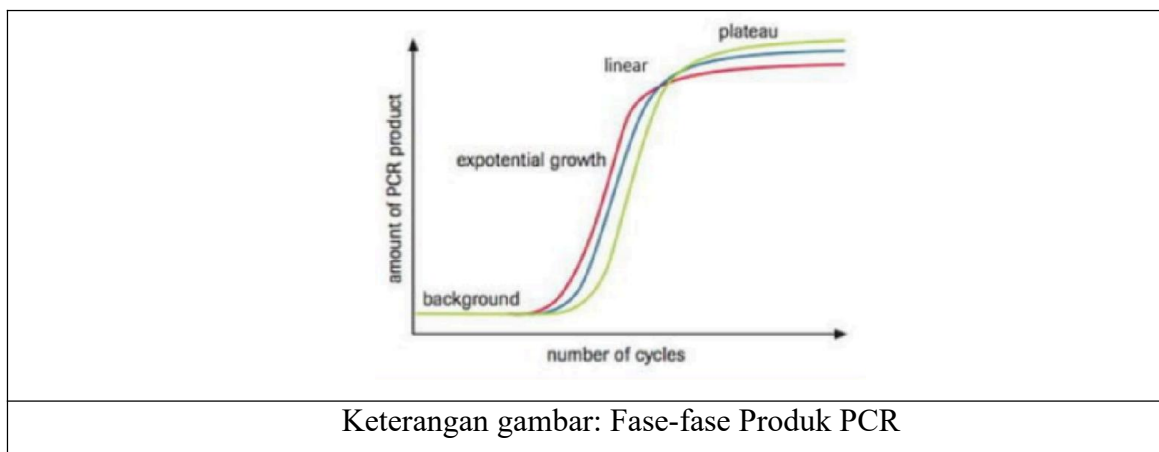
Gambar 2. Grafik Hasil Uji Saliva untuk virus SARS-CoV-2



Keterangan gambar: (hijau) Gen N/Gen target

Gambar 3. Grafik Hasil Uji Saliva untuk virus SARS-CoV-2

Grafik yang tersedia (Gambar 2&3), tidak menunjukkan hasil seperti kurva eksponensial dan plateau seperti pada grafik RT-qPCR biasa. Hasil grafik ini memiliki kesalahan sebelumnya. Grafik umum pada hasil RT-qPCR adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Fase-Fase Produk PCR Referensi

#### 4. Kesimpulan

Virus SARS-CoV-2 dapat dideteksi dengan menggunakan alat PCR pada saliva pasien sejak 5 hari pertama gejala muncul. Nilai sensitivitas dan spesifitas yang hampir menyamai dengan sampel nasofaringeal. Digunakan gen N dan gen ORF1ab sebagai gen acuan pada virus SARS-CoV-2 karena gen yang lestari serta ORF1ab yang memiliki gen 2/3 panjang genom. Hasil dari kelompok D4 dan seluruh kelompok siang adalah positif palsu, dengan kontrol negatif dan NTC menunjukkan hasil positif yang seharusnya negatif dan berdampak pada kebanyakan sampel karena tujuan kontrol tersebut mengetahui kesalahan primer (dimer), kontaminasi, kualitas reagen dan alat laboratorium.

#### Daftar Pustaka

- Butler-Laporte G., Lawandi A., Schiller I., Yao M., Dendukuri N., McDonald E. G., & Lee T. C. 2021. Comparison of saliva and nasopharyngeal swab nucleic acid amplification testing for detection of SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med* **181**(3):353-360. doi:10.1001/jamainternmed.2020.8876.
- Corman V.M, Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W, Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C, Haagmans B.L, van der Veer, van den Brink ., Wijsman L., Goderski G., Romette J.-L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans Marion P.G., Drosten C.

Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, **25**(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

- Dawes C. 2003. Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth. *Arch Oral Biol.*, **48**(5):329-36.
- Kasibhatla S.M., Kinikar M., Limaye S., Kale M.M., and Kulkarni-Kale U. 2020. Understanding evolution of SARS-CoV-2: A perspective from analysis of genetic diversity of RdRp gene. *J Med Virol.* **92**:1932–1937.
- Naranbat, D., L. Schneider, R. Kantor, C. G. Beckwith, L. Bazerman, F. Gillani, S. Sahu, K. Rapoza, S. Sam, V. Novitsky, J. Shin, E. Hipolito, I. Diaz, D. Carnevale & A. Tripathi. 2022. DirectDetect SARS-CoV-2 Direct Real-Time RT-PCR Study Using Patient Samples. *ACS Omega* **7**(6): 4945-4955.
- Parker CW, Singh N, Tighe S, Blachowicz A, Wood JM, Seuylemezian A, Vaishampayan P, Urbaniak CHendrickson R, Laaguiby P, Clark K, Clement BG, O'Hara NBCouto-Rodriguez M, Bezdan DMason CE, Venkateswaran K. 2020. End-to-End Protocol for the Detection of SARS-CoV-2. *Built Environments. mSystems* **5**:10.1128/msystems.00771-20.<https://doi.org/10.1128/msystems.00771-20>.
- Poehls U.G., Hack C.C., Ekici A.B., Beckmann M.W., Fasching P.A., Ruebner M. and Huebner H. 2018. Saliva samples as a source of DNA for high throughput genotyping: an acceptable and sufficient means in improvement of risk estimation throughout mammographic diagnostics. *Eur J Med Res*, **23**:20. <https://doi.org/10.1186/s40001-018-0318-9>
- Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. 2020. Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*, **58**:e00776-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-20>.