

Gambaran Nilai Ct Value qRT-Pcr Sars Cov-2 Dengan Metode Ekstraksi Manual Dan Otomatis

Antik Murwani¹, Muhammad Taufiq Qurrohman²

^{1,2} Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Jl. Baki Kwarasan, Sukoharjo, Indonesia

Correspondence to: m.taufiqqurrohman@stikesnas.ac.id

ABSTRACT

Tanggal Submit:
23 Mei 2023

Tanggal Review:
13 November 2023

Tanggal Publish
Online:
1 Desember 2023

Corona Virus Infection Disease (COVID)-19 is a disease caused by a new coronavirus C derivative. The SARS-CoV-2 genome has six main open reading frames (ORFs): ORF 1a and 1b, envelope protein/E genes, membrane protein/M genes, spike protein/S gene, and nucleocapsid protein/N genes. Realtime RT-PCR is a DNA amplification technique in which amplification products can be analyzed at each cycle using fluorogenic probes. The RT-PCR method is used for amplification, isolation, or identification of sequences from RNA cells or tissues. The extraction of nucleic acids in the form of DNA and RNA is the initial process for biomolecular studies. The principle in the extraction of genetic material in the form of DNA and RNA is to break down cells and genetic material in the cell from other cellular components in the form of fats, proteins, carbohydrates, and other substances. The purpose of this study is to find out the picture of the value of CT Value qRT-PCR SARS-CoV-2 using two extraction methods, namely manual and automatic. This study was descriptive using accidental sampling techniques of positive patients confirmed with COVID-19. Swab samples are carried out using manual and automatic extraction methods, then qRT-PCR examination is carried out. The results of descriptive statistical tests obtained the Mean Gene E value of manual extraction 19.1290 and automatic extraction 18.8187, as well as the Mean Gene value of ORF1ab manual extraction 19.1290 and automatic extraction 19.5177.

Keywords : COVID-19, CT Value, Extraction, qRT-PCR

PENDAHULUAN

Fenomena penyakit baru, dikenal sebagai COVID-19, merupakan sindrom penyakit akut sistem pernafasan yang disebabkan oleh virus SARS-CoV-2. Muncul pertama kali di Wuhan, China

pada Desember 2019, COVID-19 kemudian menjadi pandemi global pada Maret 2020 (Suchaya, 2020; Huang *et al.*, 2021). Indonesia melaporkan kasus pertama pada 2 Maret 2020, dengan peningkatan kasus yang signifikan,

khususnya pada pasien berusia 55-64 tahun (Kementerian Kesehatan, 2020). Jawa Tengah mencatat 660.663 kasus terkonfirmasi pada November 2022, dengan RSUD Dr. Moewardi Surakarta mengalami peningkatan kasus, terutama di Instalasi Gawat Darurat, bangsal Rawat Inap, poliklinik Rawat Jalan, dan poliklinik Penampisan (Jateng Tanggap COVID-19, 2022; RSUD Dr. Moewardi., 2022).

COVID-19, disebabkan oleh SARS-CoV-2, memiliki enam open reading frame (ORF) utama, termasuk gen spike protein yang berperan dalam mengikat reseptor sel target manusia (ACE2) (Lee *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Coronavirus SARS-CoV-2, sebagai anggota famili Coronaviridae, menyerang saluran pernapasan dan dapat menyebabkan kerusakan organ (Susilo *et al.*, 2019; Gennaro *et al.*, 2020). Gejala klinis meliputi demam, batuk kering, dispnea, fatigue, nyeri otot, dan sakit kepala (Lapostolle *et al.*, 2020; Lingeswaran *et al.*, 2020).

Pemeriksaan Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) menjadi modalitas utama dalam mendiagnosis infeksi SARS-CoV-2 dengan keunggulan sensitivitas tinggi dan waktu pengerjaan yang lebih cepat (Fraga *et al.*, 2014). Metode ini melibatkan ekstraksi material genetik dari sampel nasofaring dan orofaring, diikuti oleh transkripsi terbalik menjadi

cDNA dan deteksi realtime melalui PCR kuantitatif (Bai *et al.*, 2020; Lippi *et al.*, 2020). CT (*Cycle Threshold*) Value, nomor siklus termal yang terjadi saat fluoresensi melebihi ambang batas deteksi, dapat memberikan indikasi viral load dalam sampel. Hasil positif dibagi menjadi positif kuat, positif, dan positif lemah (<29, 30-37, 38-40) (PAMKI, 2020; Fox *et al.*, 2021; Manurung *et al.*, 2021; Wölfel *et al.*, 2020).

Diagnostik COVID-19 menggunakan metode qRT-PCR, memiliki keterbatasan terutama dalam teknik ekstraksi asam nukleat yang dapat mempengaruhi sensitivitasnya (Rao *et al.*, 2020; Carter *et al.*, 2020). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstraksi otomatis dapat meningkatkan efisiensi dan kinerja dibandingkan dengan ekstraksi manual (Borlido *et al.*, 2013; McGaughey *et al.*, 2013; van Kasteren *et al.*, 2020). Hasil penelitian Joseph *et al.*, (2022) mendukung bahwa ekstraksi otomatis menghasilkan RNA dengan variasi yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstraksi manual. Selain itu, faktor pasca analitik, seperti kesalahan interpretasi data oleh operator, dapat mempengaruhi hasil pengujian (Joseph *et al.*, 2022). Metode ekstraksi, baik manual maupun otomatis, memainkan peran penting dalam hasil qRT-PCR. Studi literatur yang membandingkan kedua metode ekstraksi

tersebut masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan gambaran nilai CT Value antara ekstraksi manual dan otomatis pada pemeriksaan qRT-PCR SARS-CoV-2 di RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini dengan menggunakan jenis penelitian Deskriptif untuk mengetahui gambaran nilai CT Value pada metode ekstraksi manual dan otomatis pada pemeriksaan qRT-PCR. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomolekuler RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada bulan Desember 2022-Januari 2023 dan telah memperoleh izin etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi dengan nomor: 1.655/XII/HREC/2022. Populasi dalam penelitian ini adalah pasien positif COVID-19 yang diperiksa dengan qRT-PCR SARS-CoV-2 di RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Sampel dalam penelitian ini menggunakan pasien

positif SARS-CoV-2 dengan metode pemeriksaan qRT-PCR periode bulan Desember 2022 sampai dengan bulan Januari 2023.

Sumber data dalam penelitian ini berupa data primer berupa nilai CT (*Cycle Threshold*) pasien positif SARS CoV-2 metode qRT-PCR menggunakan alat Cobas z 480 PCR analyzer. Sementara ekstraksi RNA menggunakan reagen SD Biosensor. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan distribusi CT value, nilai mean dan nilai median hasil pemeriksaan.

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian nilai CT Value qRT-PCR gen ORF1ab dan gen E yang dilakukan secara manual dan secara otomatis didapatkan 30 sampel terkonfirmasi positif Covid-19. Hasil analisis ditunjukkan pada tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Data Statistik Deskriptif Nilai CT Value qRT-PCR Dengan Menggunakan Ekstraksi Manual dan Otomatis

| Variabel | N | Min | Max | Mean | Median | SD |
|--------------------------|----|-------|-------|---------|---------|---------|
| CT Value Otomatis GenE | 30 | 10.83 | 30.23 | 18.8187 | 18.2300 | 5.62814 |
| CT Value Manual GenE | 30 | 9.50 | 36.25 | 19.1290 | 16.7700 | 6.86622 |
| CT Value Otomatis ORF1ab | 30 | 11.71 | 32.13 | 19.5177 | 18.3550 | 5.87648 |
| CT Value Manual ORF 1ab | 30 | 9.50 | 36.25 | 19.1290 | 17.3500 | 6.86622 |
| Valid N (listwise) | 30 | | | | | |

Sumber: data primer, 2023

Hasil pada Tabel 1. menunjukkan bahwa nilai CT Value pada qRT-PCR dengan menggunakan ekstraksi otomatis untuk GenE memiliki

rentang antara 10.83 hingga 30.23, dengan rata-rata sebesar 18.8187 dan median 18.2300. Sementara itu, pada ekstraksi manual untuk GenE, nilai CT

Value berkisar dari 9.50 hingga 36.25, dengan rata-rata sebesar 19.1290 dan median 16.7700. Hal serupa terlihat pada hasil ekstraksi otomatis dan manual untuk ORF1ab, di mana nilai CT Value, rata-rata, dan median menunjukkan perbedaan antara kedua metode ekstraksi.

Nilai CT Value untuk ekstraksi manual diperoleh nilai lebih tinggi dan lebih rendah dibanding ekstraksi otomatis, berdasar hal tersebut dapat dijelaskan bahwa proses pemipetan reagen dengan ukuran volume yang kecil dan berulang-ulang pada tahap ekstraksi manual sehingga bisa mempengaruhi jumlah RNA yang dihasilkan. Kualitas dan kuantitas RNA yang diekstraksi yang dipengaruhi oleh RNase eksogen yang dapat berasal dari perangkat yang terkontaminasi atau permukaan lain yang menyebabkan jumlah RNA lebih sedikit. Jumlah pemipetan RNA dan enzim yang diekstraksi pada proses qRT-PCR yang lebih rendah bisa mengakibatkan nilai CT Value lebih tinggi.

PEMBAHASAN

Teknik qRT-PCR telah digunakan untuk mendeteksi genom SARS CoV 2 dalam spesimen biologis, meskipun sensitivitasnya sedang dan spesifitasnya tinggi dan disetujui oleh CDC dan WHO sebagai tes standar emas untuk konfirmasi COVID-19 namun

metode ini masih menunjukkan sejumlah besar hasil negatif palsu yang harus sangat dipertimbangkan. Penyebab kesalahan hasil dalam langkah diagnostik qRT-PCR dipengaruhi oleh tiga fase yaitu fase pre analitik, fase analitik dan fase post analitik. Fase pre analitik meliputi metode pengambilan sampel, lokasi pengambilan sampel, waktu pengambilan sampel, bahan untuk pengambilan sampel, volume sampel, serta penanganan, pengangkutan, dan penyimpanan sampel. Fase Analitik meliputi kualitas dan kuantitas RNA yang diekstraksi, adanya kontaminasi dalam melakukan ekstraksi, kesalahan pemipetan, penggunaan volume sampel yang tidak sesuai untuk sintesis cDNA. Fase pasca analitik meliputi penggunaan primer yang tidak tepat, penggunaan suhu yang tidak sesuai dalam proses PCR, penyimpanan komponen PCR yang tidak tepat, serta salah menginterpretasikan hasil (Rahbari *et al.*, 2021; Sulistyoningsih *et al.*, 2022).

Hasil penelitian Joseph *et al.*, (2022) menyatakan bahwa hasil RNA menggunakan ekstraksi manual menunjukkan variasi yang lebih tinggi dibanding dengan otomatis, yang membuktikan bahwa ekstraksi otomatis lebih standar dan konsisten untuk mendapatkan RNA berkualitas baik. Faktor pasca analitik juga mempengaruhi, salah satu sumber

kesalahan yang paling umum adalah kesalahan interpretasi data oleh operator.

Menurut Rahbari *et al.*, (2021) terdapat kekurangan penelitian yang terjadi pada kesalahan pasca analitik. Kurva amplifikasi penting untuk menentukan baseline dan ambang batas yang tepat. Hasil qRT-PCR untuk Covid-19 positif harus memiliki CT Value kurang dari 36 dan hasil lebih dari 36 harus dianggap sebagai hasil negatif. Pemecahan masalah hasil tanpa kurva bentuk S khas untuk kontrol internal dan hasil positif atau negatif untuk gen target adalah menganalisis ulang proses PCR.

Perbandingan metode ekstraksi manual dan ekstraksi otomatis yaitu pada ekstraksi manual mempunyai kelebihan antara lain dapat mengerjakan sampel dalam jumlah yang sedikit dan tidak menggunakan bahan kimia berbahaya seperti fenol, kloroform dan isoamil alkohol. Kekurangan ekstraksi manual yaitu memerlukan tenaga Laboratorium yang sangat terlatih, Personel Laboratorium melakukan proses ekstraksi pertahap dengan mengikuti manual kit, memerlukan harga kit yang mahal jika sampel ekstraksi sangat banyak. Ekstraksi otomatis mempunyai kelebihan antara lain memerlukan waktu yang singkat dalam mengerjakan ekstraksi, memerlukan petugas Laboratorium yang sedikit, Tidak

menggunakan bahan kimia berbahaya, bisa mengerjakan sampel dalam jumlah banyak dalam satu kali proses. Kelemahan ekstraksi otomatis yaitu memerlukan biaya reagen atau kit ekstraksi yang sangat mahal dan memerlukan biaya instrumen yang mahal sehingga tidak cocok untuk laboratorium berskala kecil atau menengah (Nugroho *et al.*, 2022).

Penelitian ini memiliki keterbatasan dan kekurangan yaitu dalam mengerjakan ekstraksi dan pemeriksaan qRT-PCR hanya dikerjakan oleh satu petugas laboratorium sehingga tidak bisa mem *follow up* hasil yang dikerjakan petugas laboratorium lainnya. Selain itu analisis data dilakukan secara deskriptif sehingga evaluasi lebih lanjut atau uji statistik yang lebih lanjut dapat diperlukan untuk mengonfirmasi signifikansi perbedaan antara metode ekstraksi otomatis dan manual pada qRT-PCR ini.

KESIMPULAN

Berdasarkan uji statistik deskriptif untuk variabel nilai CT Value ekstraksi otomatis Gen E diperoleh nilai mean 18.8187. Untuk variabel nilai CT Value ekstraksi manual gen E diperoleh nilai mean 19.1290. Pada variabel nilai CT Value ekstraksi otomatis gen ORF1ab diperoleh nilai mean adalah 19.5177. Untuk nilai CT Value ekstraksi

manual ORF1ab diperoleh nilai mean adalah 19.1290. Berdasar hasil nilai mean diatas artinya untuk nilai mean antara ekstraksi otomatis dan nilai mean ekstraksi manual terdapat gambaran nilai CT Value yang tidak jauh berbeda dengan selisih nilai mean untuk gen E adalah 0.3103 serta selisih nilai mean gen ORF 1ab adalah 0.3887.

DAFTAR PUSTAKA

- Bai, H., Cai, X. and Zhang, X. 2020. A comparison of PCR vs Immunoassay vs Crispr-Based test. doi: 10.13581/j.cnki.rm.2019.04.007 diakses tanggal 25 Oktober 2022.
- Borlido, L. et al. (2013) 'Magnetic separations in biotechnology', *Biotechnology Advances*, 31(8), pp. 1374–1385. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.009>.
- Carter, L.J. et al. (2020) 'Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis', *ACS Central Science*, 6(5), pp. 591–605. Available at: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>.
- Fox-Lewis A, Fox-Lewis S, Beaumont J, Drinkovic D, Harrower J, Howe K., et al., 2021. SARS-CoV-2 viral load dynamics and real-time RT-PCR cycle threshold interpretation in symptomatic nonhospitalised individuals in New Zealand: a multicentre cross sectional observational study. *Pathology*. Vol 53(4): 530– 535.
- Fraga, D., Meulia, T., and Fenster, S. 2014. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08> diakses tanggal 26 Oktober 2022.
- Gennaro, F. Di, Pizzol, D., Marotta, C., Antunes, M., Racalbutto, V., Veronese, N., and Smith, L. 2020. Coronavirus Diseases (COVID-19) Current Status and Future Perspectives: A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol 17(2690): 1–11.
- Huang, C., Huang, L., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Gu, X., *et al.* 2021. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *The Lancet*, Vol 397 (10270): 220–232.
- Jateng Tanggap Covid-19. 2022. Statistik Kasus Covid-19 Jawa Tengah. <https://corona.jatengprov.go.id/d> ata diakses tanggal 25 November 2022.
- Joseph, N., Bahtiar, N., Mahmud, F., Hamid, K, H., Raman, R., Hui, Y, C., *et al.* 2022. Perbandingan Kit Ekstraksi Asam Nukleat Virus Otomatis dan Manual Untuk Deteksi Covid-19 Menggunakan qRT-PCR. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Malaysia*. Vol 18(1):14-19.

- Kasteren, P.B. Van et al. (2020) 'Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information', *Journal of Clinical Virology*, 128(January), pp. 1–5.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. *Pedoman Pencegahan dan Pengendalian Coronavirus Disese (COVID-19)* Edisi5. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Lapostolle, F., Schneider, E., Vianu, I., Dollet, G., Roche, B., Berdah, J., et al. 2020. Clinical Features of 1487 COVID-19 Patients with Outpatient Management in the Greater Paris: the COVID - Call Study. *Internal and Emergency Medicine*. Vol 15: 813-817.
- Lee, C.Y.P, Lin, R.T.P, and Renia, L. 2020. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Frontiers in Immunology*, Vol 11: 1-7.
- Lingeswaran, M., Goyal, T., Ghosh, R., Suri, S., Mitra, P., Misra, S., and Sharma, P. 2020. Inflammation, Immunity and Immunogenetics in COVID-19: A Narrative Review. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Vol 35(3): 260–273.
- Lippi, G., Mattiuzzi, C., Bovo, C., and Plebani, M. 2020. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomedica*. Vol 91(2): 137–145.
- Manurung, J. J., Sukohar, A.2021. Hubungan Antara CT Value pada Test RT-PCR Terhadap Parameter Klinis Pasien COVID-19 Relationship Between CT Value on RT-PCR Test and Clinical Parameters of COVID-19 Patients. *Medula*. Vol 11(1):119–124.
- McGaughey, K.D. et al. (2019) 'Correction: Comparative evaluation of a new magnetic bead-based DNA extraction method from fecal samples for downstream next-generation 16S rRNA gene sequencing(PLoS ONE (2018) 13:8 (e0202858) DOI: 10.1371/journal.pone.0202858)' , PLoS ONE, 14(2), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212712>.
- Nugroho, K., Satyawan, D., Tasman, I.M., dan Lestari, P. 2022. Ekstraksi DNA Genomik: Tahap Kritis dalam Kegiatan Analisis Molekuler Tanaman. *Jurnal AgroBiogen*. Vol 18(1):33-34.
- PAMKI. 2020. Apakah Arti Klinis Nilai CT Cycle Threshold Pada Pemeriksaan *real-time* RT-PCR. *Perhimpunan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik*. Available from: <https://pamki.or.id/wp-content/uploads/2020/08/ARTI-KLINIS-NILAICT.pdf> diakses pada tanggal 22 Oktober 2022.
- Rahbari, R., Moradi, N., b.Abdi,M. 2021. rRT-PCR Untuk SARS-CoV-2: Pertimbangan Analitis. *Clinica Chimica Acta*. Vol 516 (2001):1-7.

- Rao, S. N., Manissero, D., Steele, V. R., and Pareja, J. 2020. A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther.* Vol 9:573-586.
- RSUD Dr. Moewardi. 2022. SIM RS Laporan Hasil Pemeriksaan Laboratorium. Surakarta: RSUD Dr. Moewardi Surakarta.
- Sucahya, P. K. 2020. Barriers to Covid-19 RT-PCR Testing in Indonesia: A Health Policy Perspective. *Journal of Indonesian Health Policy and Administration*, Vol 5(2): 36–42.
- Sulistiyowatiningsih., Wijayanti, C.D.W., and Halik, W. 2022. Evaluasi Penyebab Hasil Invalid Pada Pemeriksaan RT-PCR Pasien Covid-19. *Jurnal SainHealth.* Vol.6(1):1-7.
- Susilo, A., Rumende, C. M., Pitoyo, C. W., Santoso, W. D, and Yulianti, M. 2020. Coronavirus Disease 2019: Tinjauan Literatur Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia.* Vol 7(1): 45.
- Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., *et al.* 2020. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, Vol 581(7809): 465–469.
- Zhou, C., Gao, C., Xie, Y., Xu M. 2020. COVID-19 with spontaneous pneumomediastinum. *Lancet Infect Dis.* Vol (20): 3099-30156.