

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Jakarta dari bulan September – Desember 2022.

B. Instrumen Penelitian

Sampel penelitian ini berupa sampel swab nasofaring dalam VTM pada kasus suspek, kasus *probable*, kasus konfirmasi, kontak erat, pelaku perjalanan, *discarded* dan pasien selesai isolasi yang sudah dilakukan pemeriksaan pada bulan Juli 2022 menggunakan metode *realtime* PCR COVID-19 dan disimpan pada suhu -80°C di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Jakarta. Berdasarkan Standar Pengujian *Post-Market* Produk *Rapid Diagnostic Test* (RDT), sampel yang digunakan meliputi 30 sampel dengan nilai $\text{CT} \leq 25$, 30 sampel dengan nilai $\text{CT} \geq 25$, dan 30 sampel negatif.

Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian uji sensitivitas *Rapid Diagnostic Test Antigen* (RDT-Ag) COVID-19, terdiri dari : Mikropipet, filter tip, alat *realtime* PCR, alat ekstraksi otomatis, *Biosafety Cabinet* (BSC) *Class II*, 0,1 ml *qPCR 96 Well Plate*, *PCR Microseal Film*, VTM (*Viral Transport Medium*), *Dacron Swab*, *Spindown*, *Test Cassetes Merk X* dan *Merk Y* dan Plastik limbah *Biohazard*.

Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian uji sensitivitas *Rapid Diagnostic Test Antigen* (RDT-Ag) COVID-19, terdiri dari swab nasofaring dan orofaring, *Extraction tubes merk X* dan *Y*, reagen PCR COVID-19, reagen ekstraksi otomatis dan Alkohol 70%.

Penelitian ini menggunakan 2 (dua) metode pemeriksaan, yaitu metode *realtime* PCR dan metode *Rapid Diagnostic Test Antigen* (RDT-Ag). Hasil positif pada metode *Rapid Diagnostic Test Antigen* ditandai dengan munculnya 2 (dua) garis pada kaset, sedangkan pada metode *realtime* PCR ditandai dengan adanya

kurva amplifikasi dengan nilai CT berdasarkan reagensia atau kit yang digunakan, seperti yang dijelaskan pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	DOV	Sumber	Satuan
1.	Metode Pemeriksaan	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rapid Diagnostic Test Antigen</i> (RDT-Ag) COVID-19 Merk X dan Merk Y 2. <i>Realtime</i> PCR COVID-19 	Hasil pemeriksaan laboratorium	-
2.	Hasil Pemeriksaan	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hasil pemeriksaan <i>Rapid Diagnostic Test Antigen</i> (RDT-Ag) COVID-19 yang diperoleh dapat dinyatakan dengan positif, negatif dan invalid <ul style="list-style-type: none"> – Positif apabila terdapat dua garis pada kontrol dan test – Negatif apabila terdapat satu garis pada kontrol – Invalid apabila tidak terdapat garis baik pada kontrol. 2. <i>Realtime</i> PCR COVID-19 positif dengan nilai CT <40, negatif dan invalid <ul style="list-style-type: none"> – Positif apabila terdapat kurva amplifikasi pada pewarna jenis FAM, HEX dan Cy5 dengan nilai CT <40 – Negatif apabila tidak terdapat kurva amplifikasi pada pewarna jenis FAM dan HEX, namun terdapat kurva amplifikasi pada pewarna jenis Cy5. – Invalid apabila tidak terdapat kurva amplifikasi pada pewarna Cy5. 	Hasil pemeriksaan laboratorium	-

C. Cara Kerja

a) Ekstraksi sampel swab COVID-19

- 1) Menyalakan alat dengan menekan tombol di bagian kanan bawah alat.
- 2) Menyalakan monitor dan CPU, tunggu hingga *Windows* selesai melakukan *start up*.
- 3) Membuka *software MagNA Pure 96*, kemudian tekan *Log On*.
- 4) Memasukkan *User ID* dan *Password* kemudian tekan OK.
- 5) Melakukan prosedur pemeliharaan harian serta pengecekan terhadap *system fluid*.
- 6) Kemudian menekan tombol “*next*”
- 7) Menyiapkan sampel COVID-19 yang akan diekstraksi.
- 8) Menyiapkan *processing cartridge*. Dipipet sebanyak 250 μL *External Lysis Buffer*, memasukkan ke masing-masing *well* sesuai kebutuhan.
- 9) Memipet 200 μL sampel kemudian masukkan ke dalam *well processing cartridge* yang sudah berisi *External Lysis Buffer*
- 10) Memasukkan penutup limbah di posisi paling atas rak limbah (rak kuning) dan 3 wadah tip kosong.
- 11) Memasukkan *processing cartridge* berisi sampel dan *Output plate* kosong pada rak purifikasi (rak merah).
- 12) Memasukkan 2 set *Filter Tips* 1000 ul yang baru pada rak tip (rak abu-abu).
- 13) Memasukkan 1 *processing cartridge* di posisi paling atas masing-masing rak reagen (rak biru) dan reagen yang akan digunakan sesuai dengan gambar dilayar.
- 14) Memasukkan botol MGP dan *Internal control* ke dalam rak botol (rak putih). Memastikan *barcode* botol dan *plate* menghadap kiri.
- 15) Membuka panel memasukkan rak dan masukkan semua rak ke dalam panel. Menutup kembali panel, kemudian memasukkan rak dan memastikan gambar pada layar sudah berwarna hijau.
- 16) Masuk ke menu *Workplace- Orders*. Menekan tombol “*open*” kemudian memilih *template* yang akan digunakan.

- 17) Mengisi sampel nama secara manual atau lakukan *scan* pada *barcode* di tabung sampel. Jangan biarkan ada baris yang terlewat.
- 18) Menekan tombol “*save*”, kemudian mengisi *Order name* dengan format COVID-19 *Batch n DDMMYY* klik *save*.
- 19) Menekan tombol *Start* pada bagian kanan atas layar.

b) Pemeriksaan PCR COVID-19

- 1) Reagen PCR COVID-19 dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan pada suhu ruang.
- 2) Melakukan pembuatan master *mix* di dalam *laminar flow*. Menyiapkan *reaction mix* dengan menghitung jumlah sampel yang akan dikerjakan ditambah kontrol (negatif dan positif) dan satu ekstra.
- 3) Mencampurkan semua bahan tanpa *divortex*, kemudian *spin down* beberapa detik.
- 4) Melakukan alikuot masing-masing 15 μ l ke dalam 0,1 ml *qPCR 96 Well Plate*.
- 5) Menambahkan 5 μ l sampel hasil ekstraksi RNA ke setiap well sehingga total volume tiap well sebanyak 20 μ l. Dilakukan dalam *Biosafety Cabinet Class II*.
- 6) Menutup 0,1 ml *qPCR 96 Well Plate* berisi sampel dengan PCR *Microseal Film* sampai rapat, jangan sampai ada gelembung dan celah terbuka untuk menghindari penguapan dan kontaminasi.
- 7) Menambahkan 5 μ l positif kontrol. Tutup well sampel dengan PCR *Microseal Film* sampai rapat, jangan sampai ada gelembung dan celah terbuka untuk menghindari penguapan dan kontaminasi. Kemudian melakukan *spindown*.

c) Pemeriksaan RDT Antigen Merk X dan Y

- 1) Memasukkan sampel swab ke dalam *Extraction tubes* yang berisi *Extraction Buffer*
- 2) Sampel swab kemudian diputar-putar selama 10 detik
- 3) Mengeluarkan swab
- 4) Menyiapkan *Test Cassettes*. Tidak boleh lebih dari 1 jam.
- 5) Meneteskan 3 tetes spesimen yang sudah di ekstraksi ke dalam well (S) untuk merk X dan 4 tetes spesimen untuk merk Y yang sudah di ekstraksi ke dalam well (S).
- 6) Pembacaan hasil dilakukan pada menit ke 15 dan tidak boleh lebih dari 20 menit.

D. Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menghitung sensitivitas dan spesifisitas kit *Rapid Diagnostic Test Antigen* (RDT-Ag) COVID-19 merk X dan Y terhadap nilai CT pemeriksaan *realtime* PCR COVID-19 menggunakan *diagnostic test evaluation* pada *medcalc*. Sedangkan untuk menentukan nilai *cut-off* *Rapid Diagnostic Test* (RDT-Ag) COVID-19 dianalisis menggunakan *Receiver Operating Characteristic* (ROC) pada SPSS.

Penilaian sensitivitas dan spesifisitas *Rapid Diagnostic Test Antigen* (RDT-Ag) COVID-19 berpedoman pada WHO (*World Health Organization*). Berdasarkan pedoman dari WHO, hasil uji dinyatakan baik bila nilai sensitivitas minimal adalah 80% dan nilai spesifisitas minimal adalah 97% (Wahyuni, 2022).

