

	PEMERIKSAAN RT-PCR SARS-CoV-2 DENGAN REAGEN REAL-Q 2019-nCoV BIOSEWOOM		
	No. Dokumen : OT.02.02/D.XXIII/5506/2024	No. Revisi : 01	Halaman : 1/4
STANDAR PROSEDUR OPERASIONAL	Tanggal Terbit : 12 Juni 2024	Ditetapkan : Direktur Utama RSPON Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta  dr. ADIN NULKHASANAH, Sp.S., MARS	
PENGERTIAN	Pemeriksaan laboratorium kualitatif untuk mendeteksi adanya gen E dan gen RdRp dari SARS-CoV-2 pada spesimen menggunakan reagen Real-Q 2019-nCoV BioSewoom.		
TUJUAN	Memberikan petunjuk kepada pranata laboratorium kesehatan mengenai tata cara pemeriksaan RT-PCR SARS-CoV-2 menggunakan reagen Real-Q 2019-nCoV BioSewoom		
KEBIJAKAN	Keputusan Direktur Utama RSPON Prof. Dr. dr. Mahar Mardjono Jakarta Nomor HK.02.03/D.XXIII/828/2024 tentang Pedoman Pelayanan Instalasi Laboratorium dan Bank Darah		
PROSEDUR	A. Metode <i>Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> B. Prinsip Teknik amplifikasi RNA dengan produk amplifikasi dianalisis pada setiap siklus menggunakan <i>fluorogenic probe</i>. C. Spesimen 1. Jenis : <i>Swab</i> nasofaring dan orofaring 2. Stabilitas : 2-8 °C, selama 5 hari D. Reagen 1. Jenis : Real-Q 2019-nCoV BioSewoom, terdiri dari ➤ <i>2X PCR reaction mixture</i> ➤ <i>nCoV probe & primer mixture</i> ➤ <i>RT-PCR enzyme</i> ➤ <i>Water, sterile, Dnase/RNase free</i> ➤ <i>Positive control</i> 2. Stabilitas : -20 °C E. Langkah Kerja 1. Preparasi <i>master mix</i> ➤ Meletakkan reagensia pada suhu kamar hingga mencair dan homogenisasi sesaat sebelum mengerjakan ➤ Membuat <i>master mix</i> sesuai jumlah reaksi yang dibutuhkan (total dari jumlah spesimen, kontrol positif, kontrol negatif dan <i>pipetting error</i>) di dalam <i>biosafety cabinet</i> ruang <i>master mix</i> dalam kondisi minim cahaya ➤ Volume yang dibutuhkan setiap reaksi (total 20 µL) : a. <i>2X PCR reaction mixture</i> 12.5 µL b. <i>nCoV probe & primer mixture</i> 3 µL c. <i>RT-PCR enzyme</i> 1 µL d. <i>Water, sterile, DNase/RNase free</i> 3.5 µL		

**PEMERIKSAAN RT-PCR SARS-CoV-2
DENGAN REAGEN REAL-Q 2019-nCoV BIOSEWOOM**

No. Dokumen :
OT.02.02/D.XXIII/5506/2024

No. Revisi :
01

Halaman :
2/4

PROSEDUR

- Mencampur dengan lembut kemudian sentrifugasi *master mix* selama 1 detik
- Memasukan *master mix* masing-masing 20 µL pada *well plate* atau *strip* di atas *cold block*.
- Memasukkan *plate mastermix* beserta *cold block* ke ruang ekstraksi dalam kondisi minim cahaya untuk penambahan RNA spesimen hasil ekstraksi dan kontrol positif

2. Penambahan RNA dan kontrol positif ke *master mix*

- Memipet dan mencampur RNA spesimen hasil ekstraksi dan kontrol positif sebanyak 5 µL ke tiap *well plate* atau *strip* sesuai *template* PCR dalam kondisi minim cahaya.
- Menutup *strip* menggunakan *cap strip* dan menutup *plate* dengan *sealing film*, lalu dimasukkan ke ruang PCR untuk di-*running* dengan alat PCR

3. Real-time PCR menggunakan LightCycler 96

- Merujuk pada SPO pengoperasian alat LightCycler 96.
- Program disesuaikan dengan *step* di bawah ini :

Step	Suhu	Waktu	Siklus	Ramp.	Acquisition mode
RT	50°C	30 menit	1	4.4°C/s	None
Denaturasi	95°C	15 menit	1	4.4°C/s	None
Amplifikasi	95°C	15 detik	40	4.4°C/s	None
	62°C	45 detik	40	2.2°C/s	Single Acquisition pada FAM, HEX dan Cy5

- Memasukkan keterangan gen FAM : gen *Helicase*, HEX : gen *RdRp*, Cy5 : gen *RPP30*
- Analisis data menggunakan "*Abs Quant*".

4. Real-time PCR menggunakan cobas z480

- Merujuk pada SPO pengoperasian dan pemeliharaan alat cobas z480
- Program disesuaikan dengan *step* di bawah ini :

Step	Suhu	Waktu	Siklus	Ramp.	Acquisition mode
RT	50°C	30 menit	1	4.4°C/s	None
Denaturasi	95°C	15 menit	1	4.4°C/s	None
Amplifikasi	95°C	15 detik	40	4.4°C/s	None
	62°C	45 detik	40	2.2°C/s	Single Acquisition pada FAM, HEX dan Cy5

- Analisis data menggunakan "*Abs Quant/ 2nd Derivative Max*".

PROSEDUR

- F. Interpretasi Hasil
- Amplifikasi spesimen dinyatakan positif apabila nilai CT ≤ 38 untuk RdRP dan E, nilai CT ≤ 35.00 untuk HRP
 - Amplifikasi kontrol dinyatakan positif apabila nilai CT 28 ± 5 (RdRP, E dan HRP)

Bahan	Hasil			Interpretasi
	FAM (RdRP)	HEX (E)	Cy5 (HRP)	
Spesimen	+	+	+/-	Positif SARS-CoV-2
	+	-	+/-	
	-	+	+/-	Presumptive positif SARS-CoV-2.
	-	-	+	Negatif SARS-CoV-2
	-	-	-	Invalid
Kontrol positif	+	+	+	Valid
	Ada 1 atau lebih gen hasil (-)			Invalid
Kontrol negatif	-	-	-	Valid
	Ada 1 atau lebih gen hasil (+)			Invalid

- Hasil *presumptive* positif SARS-CoV-2 dilakukan duplo sesuai arahan DPJLH

- G. Nilai Rujukan
- Negatif, tidak terdeteksi adanya gen E dan gen RdRp dari SARS-CoV-2 pada spesimen.

UNIT TERKAIT

1. Instalasi Rawat Inap
2. Instalasi Rawat Jalan dan Neurodiagnostik
3. Instalasi Gawat Darurat
4. Instalasi Rawat Intensif
5. Instalasi Bedah Sentral

ALUR PEMERIKSAAN RT-PCR SARS-CoV-2
DENGAN REAGEN REAL-Q 2019-nCoV BIOSEWOOM

Preparasi Master Mix

Total reaksi = jumlah spesimen + kontrol positif + kontrol negatif + *pipetting error*.

Volume yang dibutuhkan setiap reaksi :

2X PCR reaction mixture 12.5 μ L

nCoV probe & primer mixture 3 μ L

RT-PCR enzyme 1 μ L

Water, sterile, Dnase/RNase free 3.5 μ L

Master mix dimasukan masing-masing 20 μ L pada *well strip/ plate*.

Penambahan RNA spesimen dan kontrol positif ke *master mix*

Volume RNA spesimen/ kontrol positif = @ 5 μ L

Strip/plate ditutup menggunakan *cap strip/ sealing film*.

Real-time PCR menggunakan LightCycler 96 atau cobas z480

Interpretasi Hasil

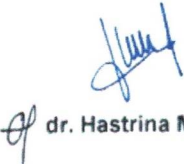
- Spesimen positif : nilai CT $\leq$ 38 untuk RdRP dan E, nilai CT $\leq$ 35.00 untuk HRP
- Kontrol positif : nilai CT 28 ± 5 (RdRP, E dan HRP)

	Rumah Sakit Pusat Otak Nasional Prof. Dr.dr. Mahar Mardjono Jakarta “Formulir Penambahan / Perubahan Dokumen”	No. Dokumen	: OT.02.02/D.XXIII/5506/2024
		Tanggal Efektif	: 12 Juni 2024
		Halaman	: 6 (enam) halaman

Dengan ini kami mengajukan perubahan dokumen yang ada pada Instalasi Laboratorium dan Bank Darah kami, sebagai berikut :

Tanggal : 27 Mei 2024 ☐ Penambahan Dokumen
Nama : dr. Hastrina Mailani, Sp.PA ☒ Perubahan Dokumen
Unit Kerja : Instalasi Laboratorium dan Bank Darah ☐ Pengurangan Dokumen

Beri tanda ☒ pada kotak yang diperlukan

TTD PEMOHON

dr. Hastrina Mailani, Sp.PA

No	Nomor Dokumen (Sebelumnya)	Status Revisi	Dasar Perubahan	Uraian Kondisi Sebelum	Uraian Kondisi Sesudah
1	OT.02.02/XXXIX.1/10864/2018	ke-1	1. SK Direktur Utama RS Pusat Otak Nasional Nomor: HK.02.03/D.XXIII/828/2024 tentang Pedoman Pengorganisasian dan Pelayanan Instalasi Laboratorium.	Ditetapkan Direktur Utama "dr. Mursyid Bustami, Sp.S(K) KIC, MARS"	Ditetapkan Direktur Utama "dr. Adin Nulkhasanah, Sp.S., MARS"
			2. Permenpan Nomor 35 Tahun 2012 tentang Pedoman Penyusunan Standar Operasioal Prosedur Administrasi Pemerintah.	Nomor SK Kebijakan : tidak dicantumkan	Nomor SK Kebijakan : HK.02.03/D.XXIII/828/2024
			3. Karena ketentuan pedoman dalam unit kerja diperlukan agar tugas dan fungsi masing-masing PLK dapat dilaksanakan dengan baik dan benar	Belum terdapat alur	Menambahkan alur (hal.4)
			4. Saat ini status dokumen lama di emisys adalah kadaluwarsa	Kop dan logo lama	Memperbaiki format sesuai logo dan kop baru, revisi prosedur