

Pengembangan Kuantifikasi Virus SARS-CoV-2 Menggunakan In-Vitro Transcribed RNA SARS-CoV-2 yang Menargetkan Gen Nucleocapsid (N) dengan Primer N158 = Development of SARS-CoV-2 Virus Quantification using In-Vitro Transcribed SARS-CoV-2 RNA Targeting Nucleocapsid (N) with N158 Primer

Mila Meilani Putri, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920528304&lokasi=lokal>

Abstrak

Virus SARS-CoV-2 atau Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 adalah virus yang telah menyebabkan penyakit COVID-19. Sampai saat ini tindakan untuk kasus COVID-19 masih dilakukan dengan diagnosis cepat secara kualitatif untuk menilai adanya virus SARS-CoV-2 pada pasien yang ditujukan untuk mencegah penyebaran penyakit tersebut, sehingga dibutuhkan perkembangan diagnosis secara kuantitatif untuk mengetahui jumlah virus SARS-CoV-2 yang dapat bermanfaat untuk menilai respons terapi pada pasien COVID-19 maupun untuk studi penemuan obat antivirus SARS-CoV-2. Pada penelitian ini dikembangkan metode kuantifikasi virus SARS-CoV-2 dengan menggunakan in vitro transcribed RNA SARS-CoV-2 dengan target gen N menggunakan primer N158 yang diketahui dapat mendeteksi varian alpha, beta, delta dan omicron sekuens isolat Indonesia. Metode yang dilakukan yaitu plasmid p-Bluescript yang mengandung gen N158 ditransformasikan ke dalam sel E. coli BL21(DE3), kemudian sel transforman diperbanyak di dalam media pertumbuhan dan dipurifikasi untuk diambil plasmid yang mengandung gen N. Plasmid kemudian dilinearisasi, ditranskripsi dan dipurifikasi untuk memperoleh RNA standar. RNA standar yang diperoleh kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis NanoDrop untuk memperoleh nilai copy number/L dan dilakukan pengenceran serta one-step RT-qPCR untuk memperoleh nilai Ct pada tiap konsentrasi pengenceran. Nilai-nilai tersebut kemudian digunakan untuk membuat kurva standar nilai Ct vs log copy number. Kurva standar RNA diperoleh dengan persamaan $y = -3,29x + 41,34$ ($R^2 = 0,9972$) dan efisiensi PCR sebesar 101,2%. Kurva standar RNA yang dibuat telah memenuhi syarat akseptabilitas kurva standar PCR

.....SARS-CoV-2 or Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 is a virus that causing COVID-19 disease. Until now, the action for COVID-19 cases are being carried by qualitative rapid diagnosis to assess the presence of SARS-CoV-2 virus in patients that lead to prevent the spread of COVID-19 disease, therefore the development of diagnosis is needed to determine the viral load of SARS-CoV-2 which can be useful for assessing response of therapy in COVID-19 patients and for drug screening of antiviral for SARS-CoV-2 studies. This study developed a quantification method for SARS-CoV-2 virus using in vitro transcribed SARS-CoV-2 RNA targeting N gene with N158 primer that known can detect alpha, beta, delta and omicron varian from sequences of Indonesian isolates. The method using pBluescript plasmid that contain N158 gene is transformed to E. coli BL21(DE3) cells, then transformans cell is amplified in growth medium and purified to get the plasmid containing N gene, the plasmid then linearized, transcribed and purified to get standard RNA. Using a Spectrophotometer UV-Vis NanoDrop, the concentration of standard RNA is obtained and the copy number/ L can be calculated. The RNA standard is diluted and quantified by one-step RT-qPCR to know the Ct value at different concentrations. Ct value vs log copy number standard curve is constructed and the equation of RNA standard curve $y = -3,29x + 41,34$ ($R^2 = 0,9972$) is obtained

with percentage of PCR efficiency 101,2%. Thus, the RNA standard curve is qualified PCR standard curve.