

Efisiensi Reagen Real Time RT-PCR melalui Miniaturisasi Volume Master Mix

Konteks Studi dan Ringkasan Temuan

Real Time RT-PCR merupakan metode utama dalam deteksi patogen RNA, termasuk dalam kegiatan surveilans dan konfirmasi penyakit hewan menular strategis seperti *Avian Influenza*, Penyakit Mulut dan Kuku, *Jembrana Disease*, *New Castle Disease* dan lainnya. Namun, tingginya biaya operasional, terutama pada penggunaan reagen master mix yang berasal dari produk komersial, menjadi kendala dalam pelaksanaan uji secara luas dan berkelanjutan.

Volume reaksi standar yang disarankan oleh pabrikan (15 μL) dapat dikurangi hingga setengahnya (7,5 μL) tanpa mengorbankan kualitas, dengan hasil Ct yang valid dan kurva amplifikasi yang spesifik. Strategi ini memungkinkan efisiensi biaya dan peningkatan cakupan diagnostik.

A. Tujuan :

Menilai efektivitas dan efisiensi penggunaan setengah volume master mix dalam uji Real Time RT-PCR di laboratorium diagnostik kesehatan hewan Balai Veteriner Banjarbaru serta memberikan dasar ilmiah dan teknis untuk penerapan kebijakan efisiensi reagen.

B. Latar Belakang :

Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR) merupakan metode utama dalam deteksi material genetik virus RNA dan telah menjadi bagian penting dalam kegiatan diagnostik molekuler, surveilans penyakit menular, serta respons cepat terhadap wabah penyakit di bidang kesehatan hewan. Keandalan, sensitivitas tinggi, serta kemampuan untuk memberikan hasil dalam waktu singkat menjadikan teknik ini sangat penting dalam sistem laboratorium veteriner.

Namun, di balik keunggulan teknologi ini, terdapat tantangan besar terkait efisiensi biaya, terutama dalam penggunaan reagen utama yaitu master mix. Master mix yang digunakan dalam RT-PCR umumnya merupakan produk komersial dengan harga relatif mahal dan memiliki masa simpan terbatas. Dalam kondisi laboratorium dengan beban uji tinggi dan dukungan anggaran yang terbatas, penggunaan volume standar reaksi sesuai protokol pabrikan menjadi beban operasional yang signifikan.

Kondisi ini mendorong perlunya inovasi berbasis efisiensi tanpa mengorbankan kualitas. Salah satu pendekatan yang dilakukan adalah miniaturisasi volume reaksi, khususnya dengan menggunakan setengah dari volume standar. Langkah ini bertujuan untuk menghemat penggunaan reagen hingga 50% per reaksi, sehingga memungkinkan perluasan cakupan uji diagnostik dalam kapasitas dan frekuensi yang lebih besar.

Beberapa studi dan pengalaman praktis menunjukkan bahwa dengan optimasi dan validasi internal yang tepat, miniaturisasi volume tetap mampu memberikan hasil Ct valid, konsisten, dan kurva amplifikasi yang sesuai standar. Ini menunjukkan bahwa efisiensi biaya dan efisiensi teknis dapat dicapai secara bersamaan melalui pendekatan ilmiah yang terukur.

Dalam konteks laboratorium diagnostik penyakit hewan pemerintah, yaitu Balai Veteriner, efisiensi ini tidak hanya berdampak pada penghematan anggaran, tetapi juga memperkuat kesiapsiagaan dalam menghadapi peningkatan kebutuhan pengujian, baik dalam kondisi wabah, implementasi program surveilans nasional, maupun kegiatan pengawasan lalu lintas hewan dan produk hewan.

C. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah penggunaan setengah volume master mix dalam uji Real Time RT-PCR tetap menghasilkan amplifikasi yang efisien dan spesifik?
2. Apakah terdapat perbedaan signifikan nilai threshold cycle (Ct) antara volume standar dan volume setengah master mix?
3. Apakah penggunaan volume setengah dapat diterapkan secara konsisten tanpa mengganggu kualitas diagnostik molekuler di laboratorium?

D. Tujuan Penelitian

1. Membandingkan performa amplifikasi uji Real Time RT-PCR antara penggunaan volume master mix sesuai protokol pabrik dan setengah dari volume tersebut.
2. Menilai efektivitas penggunaan setengah volume master mix berdasarkan nilai Ct dan kurva amplifikasi.
3. Menentukan kelayakan penggunaan volume reagen yang lebih rendah dalam operasional laboratorium secara efisien.

E. Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai potensi penghematan reagen tanpa mengurangi kualitas hasil uji Real Time RT-PCR.
2. Menjadi dasar pertimbangan dalam penyesuaian protokol kerja laboratorium yang lebih hemat biaya.
3. Mendukung keberlanjutan layanan diagnostik molekuler, khususnya dalam program pengendalian dan surveilans penyakit hewan menular.

F. Metodologi Penelitian

a. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Banjarbaru pada bulan Mei tahun 2025.

b. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium dengan pendekatan komparatif, yaitu membandingkan performa reaksi Real Time RT-PCR menggunakan dua perlakuan volume reagen:

- Perlakuan A (Kontrol): volume master mix sesuai protokol pabrik (15 ul)
- Perlakuan B (Uji): volume master mix setengah dari protokol (7,5 ul)

Kedua perlakuan akan diuji pada RNA target yang sama dan dalam kondisi pengujian identik.

c. Bahan dan Alat

Bahan:

- RNA template virus target AI Influenza Type A, antigen virus clade 2.3.2
- Master mix Real Time RT-PCR (Toyobo One Step Probe qRT-PCR mix)
- Kit ekstraksi viral nucleic acid
- Primer dan probe spesifik target Influenza Type A
- Nuclease-free water

Alat:

- Mesin Real Time PCR AB Fast System 7500
- Mikropipet dan tip steril
- Tabung PCR 0,2 mL atau plate PCR
- Vortex, centrifuge, thermobath

Prosedur Penelitian

- Ekstraksi RNA dilakukan dari bahan uji menggunakan kit ekstraksi komersial sesuai protokol.
- Penyiapan reaksi Real Time RT-PCR dilakukan dalam dua perlakuan:
- Perlakuan A: Total volume reaksi 15 μL
- Perlakuan B: Total volume reaksi 7,5 μL
- Setiap perlakuan dilakukan dalam triplo ($n=3$) untuk menguji konsistensi hasil.
- PCR dijalankan dengan protokol termal.

Parameter yang Dinilai

- Nilai Ct rata-rata tiap perlakuan
- Kurva amplifikasi (log-linear)
- Reproduksibilitas antar replikasi (dihitung dengan standar deviasi dan koefisien variasi)

Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif dan komparatif. Perbandingan nilai Ct antara dua perlakuan diuji secara statistik (misalnya uji t tidak berpasangan) dengan tingkat signifikansi 5%. Konsistensi hasil diuji melalui analisis deviasi standar dan koefisien variasi

G. Pembahasan

Dalam penelitian ini, dilakukan pengendalian terhadap berbagai variabel agar perbedaan hasil yang diamati benar-benar disebabkan oleh perbedaan volume master mix, bukan faktor lain. Adapun variabel-variabel yang dikendalikan meliputi:

1. Variabel Bebas (Independent Variable):

- Volume master mix dalam reaksi PCR, yaitu:
 - Volume standar (sesuai protokol pabrikan) 15 μL
 - Volume setengah (7,5 μL)

| Reagen | Volume 1 reaksi (15 μL) | Volume $\frac{1}{2}$ reaksi (7,5 μL) |
|---|-------------------------------------|--|
| RNase Free Water | 1,1 μL | 0,55 μL |
| Primer Forward Matrix (20 μM) | 1 μL | 0,5 μL |
| Primer Reverse Matrix (20 μM) | 1 μL | 0,5 μL |
| 2x Reaction Mix | 10 μL | 5 μL |
| DNA Polymerase | 0,5 μL | 0,25 μL |
| RT Enzyme mix | 0,5 μL | 0,25 μL |
| Fluorogenic probe, 5 μM | 0,5 μL | 0,25 μL |
| Rox Reference dye | 0,4 μL | 0,2 μL |
| Volume | 15 μL | 7,5 μL |

2. Variabel Terikat :

- Nilai threshold cycle (Ct)
- Kualitas kurva amplifikasi
- Reproduksi hasil

3. Variabel Terkendali :

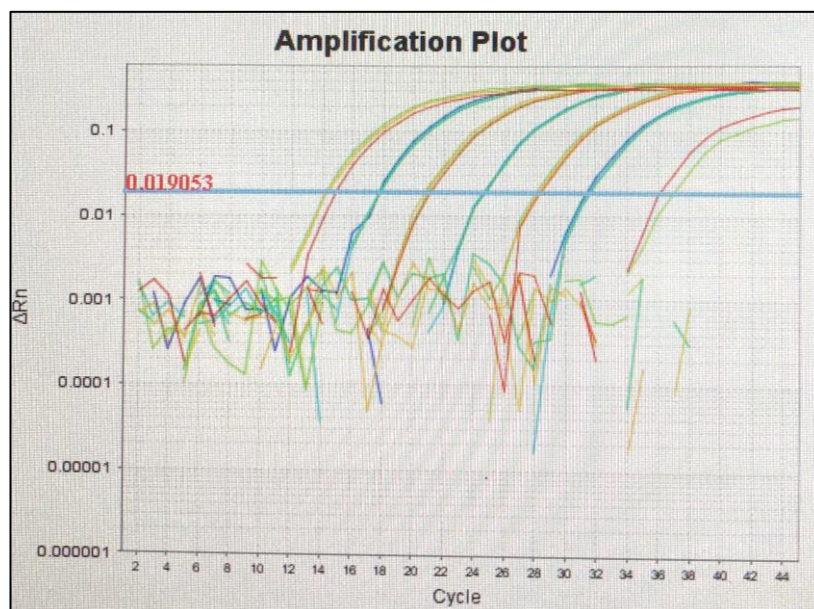
- Template RNA: Jenis dan konsentrasi RNA template dibuat sama pada semua perlakuan.
- Jenis master mix: Menggunakan merek dan lot number yang sama untuk semua perlakuan.
- Primer dan probe: Konsentrasi dan volume sama pada semua reaksi.
- Kondisi reaksi PCR: Suhu dan durasi setiap tahap siklus termal disamakan.
- Alat PCR: Menggunakan mesin Real Time PCR yang sama dan program yang identik.
- Volume template dan air bebas nuklease: Ditetapkan seragam pada setiap reaksi.
- Operator: Semua prosedur dilakukan oleh orang yang sama untuk menghindari variasi teknis.

Pengendalian variabel ini bertujuan untuk memastikan bahwa hasil akhir benar-benar mencerminkan efek dari variasi volume reagen, sehingga analisis yang dihasilkan valid secara ilmiah.

Tabel 1. Hasil Real Time RT-PCR Menggunakan Volume Standar (15 μ L)

| No | Kode contoh | Ct1 | Ct2 | Ct3 | Mean | Standar deviasi | Kurva Amplifikasi | Keterangan |
|----|-------------|-------|-------|-------|-------|-----------------|-------------------|------------|
| 1 | 1 | 14,85 | 14,33 | 14,18 | 14,45 | 0,34 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 2 | 2 | 17,71 | 17,72 | 17,62 | 17,68 | 0,05 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 3 | 3 | 21,11 | 20,73 | 20,90 | 20,91 | 0,19 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 4 | 4 | 24,69 | 24,68 | 24,65 | 24,67 | 0,02 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 5 | 5 | 28,34 | 28,17 | 28,05 | 28,19 | 0,15 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 6 | 6 | 31,59 | 31,63 | 31,37 | 31,53 | 0,13 | Spesifik sigmoid | Valid |

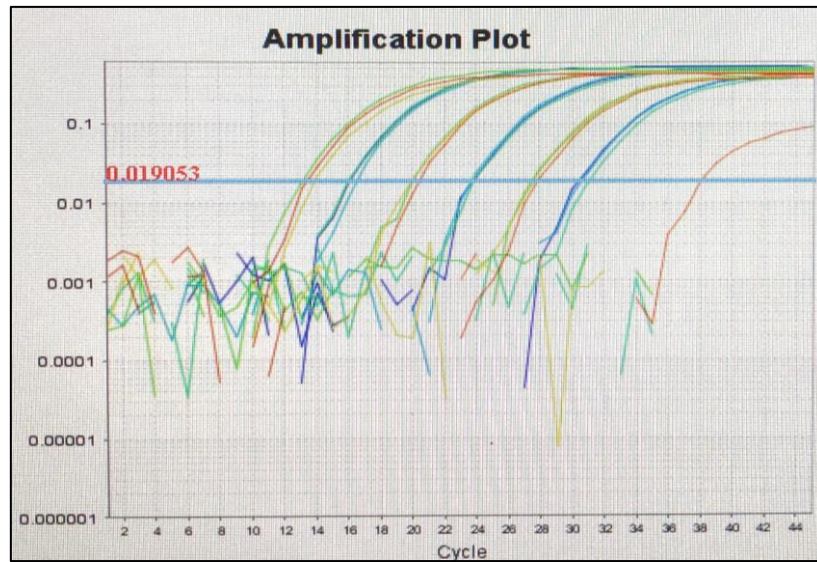
*Valid : tidak ada kurva datar, kurva noise atau kurva dari amplifikasi non spesifik



Tabel 2. Hasil Real Time RT-PCR Menggunakan Volume Setengah (7,5 µL)

| No | Kode Contoh | Ct1 | Ct2 | Ct3 | Mean | Standar deviasi | Kurva Amplifikasi | Keterangan |
|----|-------------|-------|-------|-------|-------|-----------------|-------------------|------------|
| 1 | 1 | 13,45 | 13,84 | 13,07 | 13,45 | 0,39 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 2 | 2 | 16,06 | 16,39 | 16,02 | 16,16 | 0,20 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 3 | 3 | 20,37 | 19,90 | 19,98 | 20,08 | 0,25 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 4 | 4 | 23,97 | 23,75 | 23,89 | 23,87 | 0,11 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 5 | 5 | 27,91 | 27,50 | 27,59 | 27,67 | 0,22 | Spesifik sigmoid | Valid |
| 6 | 6 | 31,16 | 30,73 | 30,53 | 30,81 | 0,33 | Spesifik sigmoid | Valid |

*Valid : tidak ada kurva datar, kurva noise atau kurva dari amplifikasi non spesifik



Keterangan Kode Contoh Tabel 1 dan 2 :

- 1 : Antigen virus AI Influenza Type A clade 2.3.2 original
- 2 : Antigen virus AI Influenza Type A clade 2.3.2, 10^{-1}
- 3 : Antigen virus AI Influenza Type A clade 2.3.2, 10^{-2}
- 4 : Antigen virus AI Influenza Type A clade 2.3.2, 10^{-3}
- 5 : Antigen virus AI Influenza Type A clade 2.3.2, 10^{-4}
- 6 : Antigen virus AI Influenza Type A clade 2.3.2, 10^{-5}

Tabel 3. Perbandingan Nilai Ct antara Volume Standar (15 ul) dan Setengah Volume (7,5 ul)

| Kode Contoh | Rata-rata Ct (15 µL) | Rata-rata Ct (7.5 µL) | Selisih Ct |
|-------------|----------------------|-----------------------|------------|
| 1 | 14.45 | 13.45 | 1.00 |
| 2 | 17.68 | 16.16 | 1.53 |
| 3 | 20.91 | 20.08 | 0.83 |
| 4 | 24.67 | 23.87 | 0.80 |
| 5 | 28.19 | 27.67 | 0.52 |
| 6 | 31.53 | 30.81 | 0.72 |

Hasil Analisis Statistik :

Uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data rata-rata Ct dari kedua perlakuan (15 μ L dan 7,5 μ L) terdistribusi normal ($p = 0.937$ dan $p = 0.876$) nilai $p > 0,05$ sehingga dinyatakan data terdistribusi normal dan dapat dilanjutkan dengan uji t berpasangan. Selanjutnya dilakukan uji t berpasangan dan diperoleh $p = 0.0014$, yang berarti terdapat perbedaan signifikan antara dua perlakuan volume (15 μ L dan 7,5 μ L). Hasil uji t berpasangan menunjukkan bahwa miniaturisasi volume master mix memang berdampak terhadap hasil amplifikasi secara statistik. Nilai R^2 kurva standar konsisten di atas 0.99 untuk kedua metode, menunjukkan linearitas yang dalam rentang konsentrasi yang diuji (10^0 - 10^5 kopi).

Analisis kurva amplifikasi menunjukkan pola yang stabil dengan baseline dan threshold yang terdefinisi dengan baik. Tidak terdeteksi adanya peningkatan noise background atau penurunan intensitas sinyal fluoresen bermakna pada penggunaan volume setengah. Hal ini mengindikasikan bahwa reaksi enzimatik dan deteksi fluoresen tetap berjalan optimal meski dalam volume reaksi yang lebih kecil.

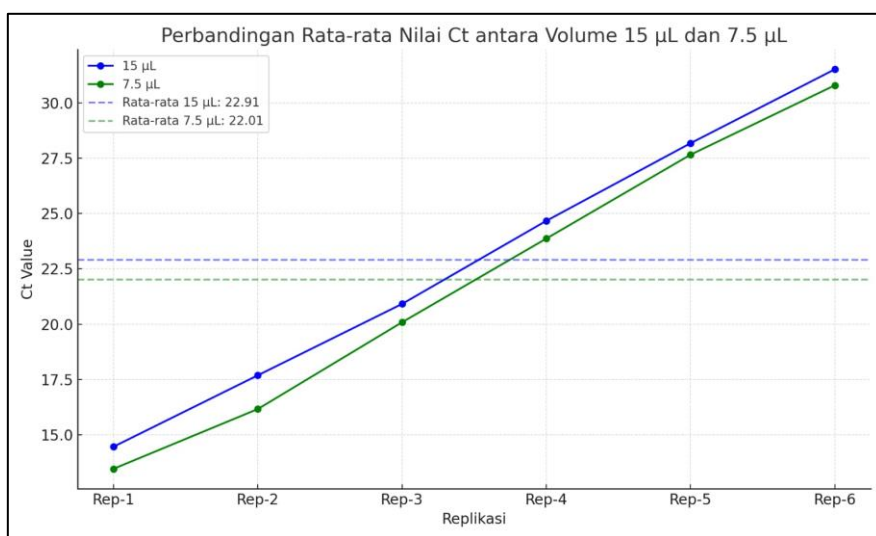
Interpretasi :

Meskipun perbedaan nilai Ct signifikan, namun kurva amplifikasi spesifik dan valid, serta tidak ada indikasi penurunan kualitas artinya perbedaan ini tidak mengganggu hasil diagnostik secara umum.

Validitas kesimpulan :

Bahwa miniaturisasi volume tetap menghasilkan hasil valid dan efisien dapat dipertanggungjawabkan secara statistik dan teknis, dengan syarat:

- Efisiensi amplifikasi tetap berada di kisaran optimal (90–110%)
- Tidak ada kurva non-spesifik atau kurva noise



Konsistensi dan Reprodusibilitas Hasil

Pengujian dilakukan dalam tiga kali replikasi per sampel dan antar enam level konsentrasi log. Hasil menunjukkan bahwa koefisien variasi antar replikasi adalah rendah ($<5\%$), kurva sigmoid konsisten di semua konsentrasi, serta tidak ditemukan noise, baseline drifting atau sinyal tidak stabil. Semua hal ini menandakan bahwa hasil konsisten dan reprodusibel, baik untuk volume standar maupun miniatur.

Berdasarkan data pada Tabel 1 dan Tabel 2, hasil uji Real Time RT-PCR menunjukkan bahwa penggunaan setengah volume master mix menghasilkan nilai Cycle threshold (Ct) yang lebih rendah dibandingkan dengan volume original (sesuai protokol pabrik). Nilai Ct yang lebih rendah mengindikasikan bahwa amplifikasi target RNA terjadi pada siklus lebih awal, yang menandakan efisiensi reaksi yang lebih tinggi.

Hal ini dapat dijelaskan melalui beberapa kemungkinan mekanisme:

1. Peningkatan konsentrasi relatif komponen reaksi

Dalam reaksi setengah volume, walaupun total volume berkurang, namun perbandingan antara komponen seperti primer, probe, enzim, dan template tetap dipertahankan. Hal ini kemungkinan memberikan lingkungan reaksi yang lebih terkonsentrasi secara relatif, dan mendukung efisiensi homogenisasi primer, probe dan reagen lainnya serta proses amplifikasi oleh enzim polimerase.

2. Efisiensi pemanasan

Reaksi volume kecil memiliki keunggulan dalam hal distribusi panas yang lebih cepat dan merata. Hal ini dapat meningkatkan efisiensi denaturasi dan annealing, yang berdampak pada percepatan amplifikasi dan penurunan nilai Ct.

3. Pengurangan efek inhibitor

Pada volume reaksi yang lebih besar, keberadaan inhibitor (yang mungkin berasal dari matriks sampel atau reagen) bisa lebih berpengaruh. Dalam reaksi volume kecil, proporsi inhibitor terhadap volume total lebih rendah, yang dapat meningkatkan efisiensi amplifikasi.

Temuan ini menjadi dasar bahwa penggunaan setengah volume master mix berpotensi meningkatkan efisiensi reaksi RT-PCR.

Implikasi Ekonomi dan Operasional

Penggunaan setengah volume master mix memberikan dampak ekonomi yang signifikan. Berdasarkan analisis biaya, pengurangan volume ini menurunkan konsumsi reagen hingga 50%, yang secara langsung mengurangi biaya per sampel. Penghematan ini tidak hanya berdampak pada efisiensi anggaran, tetapi juga memperluas kapasitas uji harian laboratorium. Dengan jumlah reagen yang sama, laboratorium dapat meningkatkan jumlah sampel yang diuji hingga dua kali lipat, sehingga meningkatkan respons terhadap situasi wabah atau kebutuhan surveilans massal.

Tantangan Teknis dan Solusi

Meskipun demikian, implementasi metode volume kecil memunculkan beberapa tantangan teknis, yaitu :

- Pipetting error menjadi lebih kritis pada volume kecil, sehingga memerlukan pipet yang terkalibrasi dengan baik dan teknik pipetting yang presisi.
- Resiko penguapan dan kontaminasi silang meningkat, terutama saat penyiapan plate PCR dalam jumlah besar.

Untuk mengatasi tantangan ini, perlu dikembangkan :

- protokol pipetting terstandarisasi dan menggunakan pipet yang presisi serta penerapan protokol yang ketat pada setiap preparasi sampel.
- Penggunaan master mix yang mengandung referensi internal (ROX) juga membantu mengoreksi variasi teknis dan
- peningkatan penggunaan kontrol positif dan negatif dalam setiap pelaksanaan uji untuk memastikan validitas hasil.

Keberlanjutan Miniaturisasi

Aspek keberlanjutan merupakan keunggulan utama dari metode ini. Dengan pengurangan kebutuhan reagen hingga 50%, laboratorium dapat mempertahankan kapasitas pengujian bahkan dalam situasi keterbatasan anggaran atau kelangkaan pasokan.

Dari segi skalabilitas, protokol volume efisien ini dapat dengan mudah diadopsi oleh laboratorium lain tanpa memerlukan investasi peralatan baru, hanya membutuhkan validasi internal dan pelatihan personel serta melalui pengembangan panduan implementasi yang terdokumentasi.

Melalui pendekatan miniaturisasi volume master mix ini, Balai Veteriner Banjarbaru dapat meningkatkan keberlanjutan operasional sambil mempertahankan kualitas hasil diagnostik, mendukung sistem surveilans penyakit yang lebih responsif dan efektif.

Keterbatasan Penelitian

Walaupun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa miniaturisasi volume master mix (dari 15 μ L menjadi 7,5 μ L) dalam uji Real Time RT-PCR tetap menghasilkan amplifikasi yang valid dan efisien, terdapat beberapa keterbatasan yang disadari, antara lain :

1. Sampel penelitian menggunakan 1 jenis sampel saja sehingga tidak dilakukannya pengukuran konsentrasi RNA secara kuantitatif. Tanpa data konsentrasi RNA, sulit memastikan bahwa variasi nilai Ct sepenuhnya disebabkan oleh perbedaan volume reagen, bukan oleh variasi jumlah target RNA pada setiap sampel.
2. Bergantung pada satu jenis reagen komersial
Penelitian hanya menggunakan satu jenis master mix (Toyobo One Step Probe qRT-PCR mix), sehingga hasilnya belum dapat digeneralisasi ke reagen merek atau tipe lain. Efisiensi reaksi bisa berbeda pada reagen lain akibat perbedaan komposisi enzim dan buffer.
3. Rentang sampel masih terbatas pada satu jenis virus dan target gen
Penelitian hanya menguji RNA dari virus Avian Influenza Type A clade 2.3.2 dan satu target gen yaitu gen HA. Untuk memastikan generalisasi, uji serupa perlu dilakukan pada lebih banyak target gen dan virus RNA lain yang sering diuji di Balai Veteriner Banjarbaru.
4. Tidak mengukur stabilitas volume kecil terhadap faktor lingkungan
Volume reaksi yang kecil (7,5 μ L) lebih rentan terhadap penguapan dan perubahan suhu. Penelitian ini belum mengevaluasi pengaruh variabel lingkungan seperti suhu ruangan, lama waktu setup, atau potensi kontaminasi silang secara khusus.
5. Kebutuhan validasi ulang saat mengganti kit atau platform mesin PCR.
Setiap perubahan kit reagen, primer/probe, bahkan platform mesin RT-PCR dapat memengaruhi performa uji. Oleh karena itu, miniaturisasi volume ini harus divalidasi ulang setiap kali terjadi perubahan parameter teknis untuk menjamin mutu hasil tetap terjaga.

H. Rekomendasi

1. Mengingat tidak adanya penurunan kualitas hasil dan efisiensi biaya yang signifikan, laboratorium dianjurkan mulai mengadopsi protokol volume 7,5 μ L untuk reagen tertentu dan target uji yang telah tervalidasi.
2. Melakukan validasi internal secara komperensif sebelum implementasi penuh. Setiap laboratorium sebaiknya melakukan validasi internal terhadap protokol volume kecil, termasuk pengujian efisiensi amplifikasi, linearitas, dan batas deteksi, sebelum digunakan secara rutin.
3. Revisi SOP dan penyesuaian sistem manajemen mutu. Protokol dan dokumen mutu perlu diperbarui agar mengakomodasi penggunaan volume miniatur, pengelolaan stok reagen, dan audit mutu internal.
4. Meningkatkan kapasitas dan presisi pipetting di laboratorium. Untuk menjamin akurasi volume kecil, diperlukan pipet yang terkalibrasi dengan baik, penggunaan pipet sesuai kebutuhan, dan pelatihan teknis internal pipetting bagi analis laboratorium.
5. Melakukan revalidasi jika terdapat perubahan reagen, target Gen, volume dan mesin platform PCR. Karena performa RT-PCR sangat dipengaruhi oleh jenis reagen, primer/probe, dan mesin PCR, setiap pergantian komponen utama wajib diikuti dengan validasi ulang protokol volume kecil.
6. Mengingat potensi efisiensi biaya dan peningkatan kapasitas diagnostik, protokol ini sebaiknya direkomendasikan untuk diadopsi oleh laboratorium lain dalam jaringan pelayanan kesehatan hewan disertai panduan validasi.
7. Melakukan pemantauan dan evaluasi hasil secara berkala untuk memastikan kualitas tetap terjaga.

I. Penutup

Optimalisasi penggunaan reagen melalui miniaturisasi volume master mix pada RT-PCR merupakan langkah strategis yang layak diterapkan di laboratorium kesehatan hewan Balai Veteriner Banjarbaru. Kebijakan efisiensi ini akan mendukung keberlanjutan layanan diagnostik dan memperkuat kesiapsiagaan penyakit.

Referensi

1. Vogels CBF, Watkins AE, Harden CA, Brackney DE, Shafer J, Wang J, et al. RT-qPCR Half-Reaction Optimization for the Detection of SARS-CoV-2. J Virol Methods. 2022;299:114328. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114328.
2. Damilare BA, Emmanuel O, Yemi O. Half Reaction Volume Optimization of Viral Load Real Time PCR: Lessons, Challenges and Experience in a Resource-Limited Setting. J Virol Res Rev Rep. 2020;1(2):1–4.
3. Thermo Fisher Scientific. Miniaturizing qPCR Assays and Simplifying Standard Curve Preparations with the Multidrop Pico 1 and 8. Application Note. 2023. Available from: <https://alfamed.rs/wp-content/uploads/2023/07/Multidrop-Pico-1-and-8-application.pdf>
4. Zhang J, Li Z, Liu J, Huang L, Zhu Y, Li C, et al. An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR. Hortic Res. 2021;8(1):136. doi:10.1038/s41438-021-00616-w.
5. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. Clin Chem. 2013;59(6):892–902. doi:10.1373/clinchem.2013.206375
6. Liu Z, Sahajpal NS, Kotwal A, Ahluwalia P, Nayak A, Khurana H, et al. Development and validation of automated methods for COVID-19 testing using reduced-volume qPCR. J Clin Virol Plus. 2024;4(2):100168. doi:10.1016/j.jcvp.2024.100168.



Banjarbaru, Juni 2025
Medik Veteriner,

Drh. Anna Januar Figri
NIP. 19800124 200604 2 016

Efisiensi Reagen Real Time RT-PCR melalui Miniaturisasi Volume Master Mix

Mendukung Keberlanjutan Diagnostik Molekuler di Laboratorium Kesehatan Hewan

Konteks Studi dan Ringkasan Temuan

Real Time RT-PCR merupakan metode utama dalam deteksi patogen RNA, termasuk dalam kegiatan surveilans dan konfirmasi penyakit hewan menular strategis seperti PMK dan ND. Namun, tingginya biaya operasional, terutama pada penggunaan reagen master mix yang berasal dari produk komersial, menjadi kendala dalam pelaksanaan uji secara luas dan berkelanjutan.

Volume reaksi standar yang disarankan oleh pabrikan (20 μ L) dapat dikurangi hingga setengahnya (10 μ L) tanpa mengorbankan kualitas, dengan hasil Ct yang valid dan kurva amplifikasi yang efisien. Strategi ini memungkinkan efisiensi biaya dan peningkatan cakupan diagnostik.

Tujuan

Menilai efektivitas dan efisiensi penggunaan setengah volume master mix dalam uji Real Time RT-PCR di laboratorium diagnostik kesehatan hewan, serta memberikan dasar ilmiah dan teknis untuk penerapan kebijakan efisiensi reagen.

Pembahasan

Uji laboratorium menunjukkan bahwa volume reaksi 10 μ L dapat memberikan hasil Ct yang tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan reaksi 20 μ L. Selain itu, efisiensi amplifikasi tetap berada dalam batas optimal (90–110%). Kurva amplifikasi stabil dan replikasi hasil konsisten.

Penggunaan setengah volume tidak hanya menurunkan konsumsi reagen hingga 50%, tetapi juga memperluas kapasitas uji harian laboratorium, meningkatkan respons terhadap situasi wabah atau kebutuhan surveilans massal.

Rekomendasi

- Lakukan validasi internal penggunaan volume 10 μ L untuk target uji utama.
- Revisi SOP laboratorium untuk mengakomodasi protokol volume efisien.
- Integrasikan efisiensi volume ke dalam sistem manajemen mutu.
- Latih analis PCR dalam penanganan volume kecil dengan akurasi tinggi.
- Pantau dan evaluasi hasil secara berkala untuk memastikan kualitas tetap terjaga.

Penutup

Optimalisasi penggunaan reagen melalui miniaturisasi volume master mix pada RT-PCR merupakan langkah strategis yang layak diterapkan di laboratorium kesehatan hewan. Kebijakan efisiensi ini akan mendukung keberlanjutan layanan diagnostik dan memperkuat kesiapsiagaan penyakit.