

# OPTIMASI DAN UJI SENSITIVITAS PRIMER POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) GEN RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) SARS-COV-2 ASAL INDONESIA

## OPTIMIZATION AND PRIMARY SENSITIVITY TEST OF Polymerase Chain Reaction (PCR) GEN RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ON INDONESIAN SARS-CoV-2

Ata Rofita Wasiati<sup>1\*</sup>, Arif Bimantara<sup>2</sup>, Nosa Septiana Anindita<sup>3</sup>

Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

\*Email: [atta.rofita@gmail.com](mailto:atta.rofita@gmail.com)

### ABSTRACT

The Covid-19 pandemic is caused by SARS-CoV-2 which has proven contagious and is spreading rapidly. Detection of Covid-19 generally uses laboratory tests with the RT-PCR method to get accurate results. Based on the previous phylogenetic analysis, it is known that the Indonesian SARS-CoV-2 has different strains and has been designed specifically for Indonesia. Molecular detection needs to be added for the detection of COVID-19 in Indonesia, using the PCR method with primer-based gene analysis. The mutation caused the Indonesian SARS-CoV-2 strain to be more varied in each region which was then able to create new evolutionary relationships. Therefore, this study aimed to find the optimal PCR conditions and to test the primary sensitivity of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene on Indonesian SARS-CoV-2. This study employed the primary data set of the INARdRp gene which was obtained from previous studies. This study used the size of the amplicon resulting from the INARdRp amplification of 232 bp. This research has been carried out optimization of PCR conditions and primer sensitivity. The PCR annealing temperatures used were 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C and variations in the concentration of positive control were 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, and 0.001 ng. The results of the PCR products were then electrophoresed and the results were analyzed on a UV transilluminator. The results indicated that the optimal annealing temperature was at 54°C and able to detect SARS-CoV-2 plasmid DNA up to a concentration of 0.001 ng. The INARdRp gene primer designed in this study had good sensitivity for the detection of Indonesian SARS-CoV-2. It is hoped that this research will be able to provide a primary reference for the detection of SARS- CoV-2 based on PCR in order to provide optimal results for the detection of COVID-19 in Indonesia.

**Keywords** : Covid-19, RdRp gene, PCR primer optimization, SARS-CoV-2, PCR primer sensitivity.

### ABSTRAK

Pandemi Covid-19 disebabkan oleh SARS-CoV-2 yang telah menular dan menyebar dengan cepat. Deteksi Covid-19 umumnya menggunakan tes laboratorium dengan metode RT-PCR untuk mendapatkan hasil yang akurat. Berdasarkan analisis filogenetik sebelumnya, diketahui bahwa SARS-CoV-2 Indonesia memiliki strain yang berbeda dan telah didesain primer yang spesifik untuk Indonesia. Deteksi molekuler perlu ditambah untuk deteksi COVID-19 di Indonesia, menggunakan metode PCR dengan analisis gen berbasis primer. Mutasi menyebabkan strain SARS-CoV-2 Indonesia lebih bervariasi di tiap daerah yang kemudian mampu menciptakan hubungan evolusi baru. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menemukan kondisi PCR yang optimal dan menguji sensitivitas primer gen *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) pada SARS-CoV-2 Indonesia. Dalam penelitian ini menggunakan

data set primer gen INARdRp yang didapatkan dari penelitian sebelumnya. Penelitian ini menggunakan ukuran amplicon hasil amplifikasi INARdRp yaitu 232 bp. Penelitian ini sudah dilakukan optimasi kondisi PCR dan sensitivitas primer. Suhu annealing PCR yang digunakan adalah 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C dan variasi konsentrasi kontrol positif yaitu 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng. Hasil produk PCR kemudian di elektroforesis dan dianalisis hasilnya pada UV transilluminator. Hasil yang didapat dari penelitian ini yaitu suhu annealing yang optimal pada suhu 54°C dan mampu mendeteksi DNA plasmid SARS-CoV-2 hingga konsentrasi 0,001 ng. Primer gen INARdRp yang didesain dalam penelitian memiliki sensitivitas yang baik pada deteksi SARS-CoV-2 Indonesia. Diharapkan penelitian ini mampu memberikan referensi primer untuk deteksi SARS-CoV-2 berbasis PCR, sehingga mampu memberikan hasil optimal untuk deteksi COVID-19 Indonesia.

**Kata kunci:** Covid-19, Gen RdRp, Optimasi Primer PCR, SARS-CoV-2, Sensitivitas Primer PCR.

## PENDAHULUAN

Pandemi Coronavirus Disease 19 (COVID-19), disebabkan oleh Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) yang menyebar dengan cepat di seluruh dunia. SARS-CoV-2 dilaporkan pertama kali di Wuhan, China pada 1 Desember 2019 dan diidentifikasi sebagai Betacoronavirus yang tidak diketahui sebelumnya (Pedersen & Ho, 2020). COVID-19 menyebabkan sebanyak 5% pasien mengalami pneumonia parah yang dapat berpotensi terjadinya disfungsi multiorgan dan tingkat kematian mencapai 1,4% (Guan et al., 2020). Indonesia memiliki beberapa pemeriksaan laboratorium untuk deteksi COVID-19 diantaranya metode Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) dan pemeriksaan rapid test antibody untuk deteksi respons antibody terhadap SARS-CoV-2. Berdasarkan literatur diketahui bahwasanya target gen yang dapat digunakan untuk deteksi COVID-19 metode RT-PCR antara lain gen N, E, ORF1a/b, dan RdRp (Agustina & Fajrunni'mah, 2020).

Deteksi molekuler COVID-19 yang akurat perlu dilakukan dan menjadi tantangan tersendiri bagi banyak laboratorium mikrobiologi klinis. (Ateng, 2020). Pemeriksaan diagnosis laboratorium COVID-19 yang cepat dan sensitif masih terus dikembangkan. Berdasarkan hasil penelitian World Health Organization (WHO) menetapkan bahwa Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) merupakan standar utama (gold standard) dalam mendeteksi COVID-19 (Damo et al., 2021). Sensitivitas metode ini memiliki nilai yang cukup tinggi yaitu sekitar 95%. Metode ini digunakan secara internasional untuk mendeteksi apakah sampel swab yang diperoleh dapat menunjukkan hasil Covid-19 yang negatif maupun positif (Arianto & Sutrisno, 2021). RT-PCR memiliki kelebihan yaitu dapat

mendeteksi antigen dengan konsentrasi yang rendah, namun memiliki kekurangan antara lain membutuhkan petugas laboratorium dengan keahlian khusus, waktu pengerjaan lama, risiko paparan tinggi, peralatan dan biaya pemeriksaan yang mahal (Agustina & Fajrunni'mah, 2020).

Deteksi cepat menjadi kunci penting dalam penanganan pandemi COVID-19. Primer memegang peran penting dalam menjalankan proses PCR. Berdasarkan analisis kekerabatan filogenomik, strain SARS-CoV-2 Indonesia terdapat perbedaan dengan strain negara lain. Primer INARdRp didesain dari daerah gen RdRp dan sudah diuji secara *in silico* (Nabila et al., 2022). Primer perlu dilakukan pengujian secara *in vitro*, sehingga berpotensi dapat digunakan dalam protokol deteksi molekuler SARS-CoV-2 di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi dan menguji sensitivitas primer gen RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) pada SARS-CoV-2 Indonesia melalui Polymerase Chain Reaction (PCR).

## **BAHAN DAN METODE**

### **Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari penyusunan proposal hingga hasil akhir penelitian yaitu dimulai sejak bulan November 2021 hingga Maret 2022 di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.

### **Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin PCR Konvensional (*Multigene Optimax*), mikropipet (*Dragon Lab 0,5-10 µl*), mikropipet (*Dragon Lab 10-100 µl*), mikro tip, mikrotube, tube PCR, rak tube PCR, *coldbox*, *sentrifuge (Hermle)*, *Magnetic stirrer (Dragon Lab)*, *Laminar Air Flow (LAF)*, *vortex*, elektroforesis (*Bluegel*), dan kertas parafilm. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol positif berupa DNA Plasmid gen INARdRp, DNA Ladder 100bp (SMOBIO), *master mix GoTaq® Green* (Promega), *loading dye*, *TE Buffer*, *FluoroVue*, *Nuclease Free Water (NFW)*, agarose, *alcohol 70%*, masker, *gloves*, dan primer INARdRp. Primer gen INARdRp untuk SARS-CoV-2 yang digunakan dalam penelitian yaitu TTGTGTATGCTGCTGACCCT

(*forward*) dan GCTCAGGATGGTAATGCTGC (*reverse*). Primer INARdRp\_F dan Primer INARdRp\_R berdasarkan dari hasil desain primer spesifik (Nabila *et al.*, 2022) yang telah diuji kualitasnya secara *in silico* dan dipesan di PT. Genetika Science selama 2 minggu (Lampiran 1).

## Metode

### a. Persiapan Reagen

#### 1) Pengenceran Primer

Primer yang digunakan dalam penelitian adalah Primer INARdRp\_F dan Primer INARdRp\_R. Kemudian, masing-masing primer dilarutkan menjadi konsentrasi 100 M. Penambahan TE Buffer sebagai pelarut disesuaikan dengan keterangan *datasheet* primer dengan mengalikan berat molekul (nmol) yang tertera pada tabung primer dengan faktor pengali 10. Untuk primer INARdRp-F, TE Buffer yang ditambahkan adalah 256 uL. Untuk primer INARdRp\_R, TE Buffer yang ditambahkan adalah 208 uL (Setyawati & Zubaidah, 2021). Kemudian, primer diencerkan menjadi konsentrasi 10  $\mu$ M. Penyimpanan primer setelah didapatkan konsentrasi akhir adalah pada suhu -20 °C. Berikut merupakan informasi terkait primer disajikan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Primer INARdRp

#### 2) Pengenceran Kontrol Positif

Kontrol positif memiliki konsentrasi 1000ng. Kemudian diencerkan menggunakan TE Buffer sebanyak 100  $\mu$ l menjadi konsentrasi 100 ng. Setelah itu, dilakukan pengenceran bertingkat dari konsentrasi 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng. Pengenceran bertingkat dilakukan dengan cara mengambil 10  $\mu$ l dari konsentrasi 10 ng dan ditambahkan 90  $\mu$ l TE Buffer sehingga menjadi konsentrasi 1 ng. Dari larutan pengenceran 1 ng yang sudah homogen diambil sebanyak 10  $\mu$ l

menggunakan mikropipet secara aseptis ke dalam mikrotube berisi TE Buffer 90  $\mu$ l, dan *vortex* hingga larutan benar-benar homogen. Pengenceran ini dilakukan hingga konsentrasi 0,001 ng (Setyawati & Zubaidah, 2021). Berikut merupakan informasi terkait kontrol positif yang disajikan dalam Gambar 6.



Gambar 6. Kontrol Positif

### b. Optimasi Suhu Primer

Optimasi suhu *annealing* primer INARdRp yang digunakan berkisar antara 52°C hingga 57°C sesuai protokol kit yang menyebutkan *range* optimasi berada 5°C dibawah  $T_m$  yang tertera pada tabung primer. Disiapkan 7 mikrotube yang sudah dilabeli menggunakan pena marker yaitu 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, NTC, dan NFW. Dalam membuat larutan dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF) untuk menjaga kesterilan alat dan media. Kontrol negatif disiapkan dengan menambahkan NFW sebagai template *Non Template Control* (NTC) dan *Nucelase Free Water* (NFW) tanpa adanya campuran PCR *mixture*. Kontrol negatif digunakan untuk memastikan agar tidak adanya kontaminasi pada reagen. Setelah itu, membuat PCR *mixture* dengan komposisi antara

lain *GoTaq® Green Mastermix* 12,5 uL, *Nuclease Free Water (NFW)* 9,5 uL, Primer INARdRp\_F 1uL, Primer INARdRp\_R 1uL, dan DNA *template* 1 uL. Total volume dalam tube PCR adalah 25 uL. DNA template yang ditambahkan mengandung 1 ng DNA Plasmid gen RdRp. Selanjutnya, reagen di *sentrifuge* pada suhu 20°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Setelah itu, reagen dimasukkan ke dalam mesin PCR Konvensional (*Multigene Optimax*) dengan pengaturan suhu *pre-denaturasi* pada suhu 94°C selama 2 menit, *denaturasi* 94°C selama 30 detik, *annealing* 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 15 detik, dan *final extension* 72°C selama 5 menit. Variasi suhu *annealing* ini menggunakan pengaturan gradien. *Microtube* diberi kode dengan menggunakan pena marker. Pada proses pembuatan PCR mixture, reagen untuk PCR ini di letakkan di atas es.

### c. Uji Sensitivitas Primer

Sensitivitas primer dikonfirmasi dengan mengamplifikasi dari variasi konsentrasi DNA yaitu 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng. Dalam membuat larutan dilakukan di *Laminar Air Flow (LAF)* untuk menjaga kesterilan alat dan media. Selanjutnya, disiapkan 6 mikrotube yang sudah dilabeli menggunakan pena marker yaitu 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng NTC, dan NFW. Kontrol negatif disiapkan dengan menambahkan NFW sebagai template *Non Template Control (NTC)* dan *Nuclease Free Water (NFW)* tanpa adanya campuran PCR *mixture*. Setelah itu, membuat PCR *mixture* dengan komposisi antara lain *GoTaq® Green Mastermix* 12,5 uL, *Nuclease Free Water (NFW)* 9,5 uL, Primer INARdRp\_F 1uL, Primer INARdRp\_R 1uL, dan DNA *template* 1 uL. Total volume dalam tube PCR adalah 25 uL DNA template yang ditambahkan mengandung 1 ng DNA Plasmid gen RdRp. Selanjutnya, reagen di *sentrifuge* pada suhu 20°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Kemudian dimasukkan ke mesin PCR Konvensional (*Multigene Optimax*) dengan menggunakan pengaturan suhu *pre-denaturasi* 94°C selama 2 menit, *denaturasi* 94°C selama 30 detik, *annealing* 54°C selama 30 detik, *extension*, 72°C selama 15 detik, dan *final extension* 72°C selama 5 menit. Suhu *annealing* yang digunakan adalah sesuai hasil optimasi sebelumnya.

#### d. Elektroforesis dan Visualisasi Hasil Amplifikasi

Tahap selanjutnya adalah pembuatan gel agarose untuk elektroforesis. Konsentrasi gel agarose yang digunakan dalam elektroforesis adalah 2%. Cara pembuatan gel agarose adalah disiapkan larutan *TE buffer* sebanyak 25 ml dan agarose sebanyak 0,5 gram. Gel agarose dilarutkan dengan *magnetic stirrer*. Setelah larutan agarose bening, kemudian ditambahkan pewarna menggunakan *fluorovue* sebanyak 2  $\mu$ l. Penambahan pewarna dilakukan pada saat larutan hangat dan tidak langsung dimasukkan setelah pemanas dimatikan. Gel agarose dituangkan ke dalam bak elektroforesis dan ditunggu sampai gel agarose mengeras. Setelah gel agarose mengeras, *TE Buffer* dimasukkan ke dalam bak elektroforesis hingga gel agarose terendam dan gel siap digunakan untuk elektroforesis.

Selanjutnya, DNA ladder 100bp, kontrol positif, kontrol negatif, dan sampel sebanyak 5 $\mu$ l dan ditambahkan 1 $\mu$ l *loading dye*. Reagen dicampurkan menggunakan mikropipet (*Dragon Lab* 0,5-10  $\mu$ l). Setelah homogen, reagen dimasukkan ke dalam sumuran. Kemudian, elektroforesis dengan kekuatan listrik 100-150 volt selama 30 menit dan gel agarose diamati dengan menggunakan sinar *blue light transiluminator* untuk melihat visualisasi pita DNA. Hasil elektroforesis dibandingkan berat molekul target dengan marker yang digunakan dan didokumentasikan (Setyawati & Zubaidah, 2021).

#### e. Analisis data

Data dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil visualisasi sinar UV transiluminator. Kondisi optimal PCR dianalisis berdasarkan suhu *annealing*, sedangkan sensitivitas berdasarkan konsentrasi primer. PCR Konvensional dapat dinyatakan valid jika tidak terdapat pita DNA amplifikasi pada kontrol negatif dan memiliki pita DNA sesuai dengan ukuran (pasang basa) target DNA pada kontrol positif. DNA Ladder atau marker merupakan DNA yang telah diketahui ukuran panjang basa dan digunakan sebagai penanda. Hasil dinyatakan positif jika ukuran pita DNA sampel memiliki panjang basa yang sama dengan kontrol positif. Hasil dinyatakan negatif jika tidak terdapat pita DNA (Agustiningih *et al.*, 2020).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

## 1.1. Optimasi Kondisi PCR

Penelitian dilakukan dengan mengoptimasi kondisi PCR dan menguji sensitivitas primernya. Deteksi sampel penelitian menggunakan PCR sebaiknya dilakukan optimasi dan uji sensitivitas terlebih dahulu. Optimasi harus dilakukan sebelum deteksi sampel penelitian menggunakan PCR, sehingga didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai. Hal ini bertujuan untuk mencapai hasil PCR yang optimal (Nidom et al., 2021). Berdasarkan penelitian Park et al., (2020) pada tahun 2020, menunjukkan bahwa set primer optimal untuk deteksi SARS-Cov-2 berbasis PCR seperti RdRp, N, S. Primer ini menghasilkan pita gelap dengan ukuran yang tepat dan tidak ada primer dimer.

Optimasi suhu annealing didapatkan berdasarkan rekomendasi dari kit PCR untuk optimasi primer baru. Optimasi dilakukan dengan menggunakan suhu annealing dengan suhu terendah 5°C dibawah melting temperature ( $T_m$ ) yang direkomendasikan oleh produsen primer yang tertera pada tabung primer. Kemudian, pada mesin PCR variasi suhu annealing ini dilakukan dengan memasukkan program gradient. Suhu  $T_m$  dari primer INARdRp\_F adalah 56,6°C dan primer INARdRp\_R adalah 56,2°C. Oleh karena itu, pada penelitian ini menggunakan suhu annealing diantara 52°C dan 57°C yaitu 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, dan 57°C.

*Annealing* merupakan tahap terjadinya penempelan DNA template dengan primer. Pemilihan suhu yang terlalu tinggi dapat menghambat terbentuknya primer primer dan DNA template, sedangkan suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan primer yang tidak spesifik. Suhu annealing yang digunakan sebaiknya disesuaikan dengan melting temperature ( $T_m$ ) atau suhu leleh dari primer dan panjang primer. Berikut hasil elektroforesis yang disajikan pada Gambar 1.



**Keterangan : Optimasi Primer RdRp 232 bp**

M = Marker (100 bp)

1 = 52°C

2 = 53°C

3 = 54°C

4 = 55°C

5 = 56°C

6 = 57°C

7 = Non Template Control (NTC)

8 = Nuclease Free Water (NFW)

Gambar 1. Elektroforesis Optimasi Primer

Elektroforesis merupakan suatu metode untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan berat molekulnya. Elektroforesis bertujuan untuk melihat hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR. Hasil elektroforesis ini dianalisis secara visual dengan cara membandingkan ketebalan pita DNA. Pita DNA yang optimal adalah yang memiliki ukuran sesuai target dan tebal. Suhu annealing dan konsentrasi primer yang optimal kemudian digunakan untuk deteksi PCR pada sampel yang diteliti.

Berdasarkan hasil elektroforesis agarose menunjukkan bahwa 6 sampel dengan optimasi suhu annealing 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, dan 57°C teramplifikasi gen RdRp dengan ukuran amplicon 232 bp. Keberhasilan amplifikasi gen RdRp dapat terjadi karena suhu annealing yang optimum. Pada suhu annealing 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C band terlihat tebal, jelas, dan juga sesuai target. Ladder juga terpisah dengan baik. Hasil PCR yang menggunakan suhu annealing 54°C menghasilkan band yang paling tebal, lebih terang, jelas dibandingkan suhu yang lain.

Berdasarkan hal tersebut, dapat dikatakan bahwa suhu 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C masih dapat digunakan untuk deteksi SARS-CoV-2 disamping menggunakan suhu 54°C. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan uji in silico suhu annealing primer optimal pada suhu 54°C (Nabila et al.,

2022). Selain itu, pada penelitian (Li et al., 2020) menyebutkan bahwa suhu annealing yang baik adalah sekitar 50°C-55°C. Suhu yang lain tetap dapat digunakan untuk PCR namun tidak optimal. Penentuan kondisi optimal dari suhu annealing sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR.

Menurut penelitian Park et al., (2020) menyebutkan bahwa pentingnya proses validasi dan optimalisasi set primer yang digunakan untuk pengujian virus. Optimasi memiliki peranan penting untuk primer baru. Pentingnya mengoptimasi primer adalah untuk mengetahui kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal (Chan et al., 2020). Optimasi selalu dilakukan untuk setiap gen yang akan dideteksi dengan PCR. Hal ini dikarenakan kondisi sampel, reagen, dan alat-alat yang ada pada setiap laboratorium berbeda-beda. Park et al., (2020) melakukan optimasi set primer untuk deteksi SARS-CoV-2. Hasil menunjukkan set primer terbaik untuk protokol deteksi SARS-CoV-2 antara lain RdRp, N, dan S.

Pada penelitian Tombuloglu et al., (2021) melaporkan bahwa telah ditemukan set primer PCR yang tidak dioptimalkan sehingga menghasilkan positif palsu. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi kondisi PCR agar mendapatkan hasil yang optimal. Keberhasilan ini dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah panjang primer berkisar 16-25 nukleotida, primer harus memiliki GC content antara 40%-60%, dan hindari daerah struktur sekunder (Nabila et al., 2022). Hal ini, primer gen RdRp tersebut dapat dijadikan kandidat untuk deteksi molekuler karena telah memenuhi syarat sebagai primer yang baik (Nabila et al., 2022). Namun, perlu ditekankan kembali bahwasanya penetapan suhu annealing yang tepat sangat mempengaruhi hasil PCR. Suhu annealing yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak berhasil. Suhu annealing yang terlalu rendah juga akan menghasilkan produk dari amplifikasi yang tidak spesifik dikarenakan primer menempel pada sisi lain genom sehingga produk yang dihasilkan memiliki spesifitas yang rendah (Siswanto et al., 2019). Keadaan ini didukung dengan hasil amplifikasi yang menunjukkan suhu annealing yang paling rendah dan tinggi menunjukkan pita DNA yang lebih tipis, ketebalannya yang kurang dan sedikit samar.

## 1.2. Uji Sensitivitas Primer

Pada uji sensitivitas primer digunakan suhu dari optimasi sebelumnya yaitu 54°C

menguji sensitivitas primer terhadap DNA gen target RdRp SARS-2. Konsentrasi DNA Plasmid SARS-CoV-2 yang digunakan adalah 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng. Berdasarkan hasil amplifikasi menggunakan PCR Konvensional muncul pita DNA pada konsentrasi 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng. Pita DNA yang paling tebal adalah konsentrasi 1 ng, sedangkan untuk NTC (1) dan NFW (2) tidak memunculkan pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa primer 1  $\mu$ l sensitif dapat mengamplifikasi DNA dari konsentrasi 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa setiap konsentrasi primer yang diuji pada konsentrasi DNA 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, dan 0,001 ng merupakan konsentrasi yang masih baik untuk deteksi SARS-CoV-2. Berikut hasil elektroforesis yang disajikan pada Gambar 2.



**Keterangan : Sensitivitas Primer RdRP 232 bp**

M = Marker 100 bp

1 = Non Template Control (NTC)

2 = Nuclease Free Water (NFW)

3 = 1 ng

4 = 0,1 ng

5 = 0,01 ng

6 = 0,001 ng

Gambar 2. Uji Sensitivitas Primer

### 3.3 Hasil Kombinasi Optimasi dan Sensitivitas Primer

Penelitian ini melakukan optimasi suhu *annealing* dan uji sensitivitas primer untuk mendapatkan hasil yang optimal dalam penggunaan PCR. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimal untuk deteksi SARS-CoV-2 adalah 54°C dan konsentrasi DNA 1 ng hingga 0,001 ng dengan konsentrasi primer 10 $\mu$ M. Menurut

penelitian Tombuloglu *et al.*, (2021), menyebutkan bahwa primer gen RdRp ditemukan lebih sensitif daripada primer gen E. Konsentrasi yang digunakan primer RdRp adalah 10  $\mu$ M dan primer E menggunakan konsentrasi 4  $\mu$ M. Selain itu, pada penelitian Setyawati & Zubaidah (2021) menyebutkan bahwa konsentrasi primer 10  $\mu$ M didapatkan hasil pita DNA yang jelas dibandingkan dengan konsentrasi primer 5  $\mu$ M. Pada penelitian ini setuju dengan penelitian yang diterbitkan oleh Park *et al.*, (2020) bahwasanya set primer gen RdRp dapat digunakan untuk deteksi molekuler. Mereka melaporkan pedoman tiga Langkah untuk merancang dan mengoptimalkan set primer spesifik: 1) pemilihan set primer gen target RdRp dalam genom SARS-CoV-2, 2) efektivitas *in-silico* dari primer dan sekuens ampikon, dan 2) optimalisasi kondisi PCR.

Diantara semua set primer yang diteliti, gen target RdRp adalah yang paling tidak direkomendasikan karena sensitivitasnya rendah (Tao *et al.*, 2022) Namun, pada penelitian ini primer INARdRp didapatkan hasil yang sensitif dari konsentrasi DNA 1 ng hingga 0,001 ng. Konsentrasi DNA sebesar 0,01-0,1 ng setiap 1  $\mu$ l larutan *template*, sudah baik untuk deteksi PCR (Setyawati & Zubaidah, 2021). Hal ini didukung dengan penelitian Nguyen, 2020 melaporkan bahwa set primer ORF1ab (RdRp) dan N lebih baik daripada gen target E dan S. Gen ORF1 termasuk daerah gen RdRp direkomendasikan sebagai salah satu daerah terbaik untuk identifikasi SARS-CoV-2 (Tao *et al.*, 2020).

Berdasarkan penelitian Corman *et al.*, (2020) menyebutkan bahwa gen RdRp dan E lebih sensitif daripada gen N. Namun, pada penelitian Chu *et al.*, (2020) ditemukan uji gen N kira-kira 10 kali lebih sensitif daripada RdRp. Menurut penelitian Jung *et al.*, (2020) melaporkan bahwa daerah RdRp/ORF1, set ORF1ab (China) paling sensitif daripada set probe primer lainnya. Sedangkan untuk negara Amerika dan Jepang pengujian qRT-PCR yang paling sensitif adalah pada pengujian daerah gen target N. Hal ini menunjukkan hasil yang berbeda-beda disetiap negara. Oleh karena itu, sebaiknya pengujian deteksi molekuler disetiap negara menggunakan set probe primer yang spesifik.

Penelitian terkait optimasi dan sensitivitas primer ini memang masih sangat jarang dilakukan, terutama pada SARS-CoV-2. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk pengembangan protokol deteksi molekuler menggunakan primer yang spesifik sesuai dengan *clade* virus SARS-CoV-2 yang ada di Indonesia.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian terkait optimasi dan sensitivitas primer untuk deteksi molekuler SARS-CoV-2 Indonesia didapatkan kesimpulan bahwa :

1. Kondisi suhu yang optimal primer INARdRp pada deteksi SARS-CoV-2 adalah 54°C.
2. Primer INARdRp memiliki sensitivitas primer yang baik yaitu mampu mendeteksi materi genetik virus SARS-CoV-2 hingga konsentrasi 0,001 ng, sehingga dapat dijadikan referensi primer untuk deteksi molekuler SARS-CoV-2 di Indonesia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Laboratorium Molekuler Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta yang telah mengizinkan untuk melakukan penelitian. Selain itu, diucapkan terimakasih kepada Bapak Arif Bimantara dan Ibu Nosa Septiana Anindita yang telah membantu dalam penyusunan artikel ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbasi, H., Tabaraei, A., Hosseini, S. M., Khosravi, A., & Nikoo, H. R. (2022). Real-time PCR Ct value in SARS-CoV-2 detection: RdRp or N gene? *Infection*, 50(2), 537–540. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01674-x>
- Agustina, A. S., & Fajrunnimah, R. (2020). Perbandingan Metode RT-PCR dan Tes Rapid Antibodi untuk Deteksi COVID-19. *Jurnal Kesehatan Manarang*, 6(Khusus), 47. <https://doi.org/10.33490/jkm.v6ikhusus.317>
- Agustiningsih, A., Nugraha, A. A., Daryanto, D., Pawestri, H. A., Ikawati, H. D., Harianja, H., Wibowo, H. A., Susanti, I., Indalao, I. L., & Sariadji, K. (2020). *Pedoman Pemeriksaan PCR Sars-Cov-2 Bagi Petugas Laboratorium*. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Arianto, D., & Sutrisno, A. (2021). Kajian Antisipasi Pelayanan Kapal dan Barang di Pelabuhan Pada Masa Pandemi Covid-19. *Jurnal Penelitian Transportasi Laut*, 22(2), 97–110. <https://doi.org/10.25104/transla.v22i2.1682>
- Ateng, M. A. (2020). *A peace process in a deadlock: Critical assessment of the peace processes of the Dagbon intra-chieftaincy conflict in the Northern Region of Ghana*.
- Budiarto, B. R. (2015). Polymerase Chain Reaction (PCR): Perkembangan Dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan. *BioTrends*, 6(2), 29–38.

- Carvalho, RF, Oliveira, MDS, Ribeiro, J., Dos Santos, IGC, Almeida, KDS, Conti, ACM, ... & Ribeiro Júnior, JC (2021). Validasi alternatif seperti PCR konvensional untuk deteksi SARS-CoV-2 dengan gen protein nukleokapsid target dalam sampel nasofaringeal. *Plos satu*, 16 (9), e0257350.
- Chan, J. F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K.-W., Yuan, S., & Yuen, K.-Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236.
- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, 66(4), 549–555. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., & Schmidt, M. L. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045.
- Damo, N. Y., Porotu'o, J. P., Rambert, G. I., & Rares, F. E. S. (2021). Diagnostik Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) dengan Pemeriksaan Laboratorium Mikrobiologi Klinik. *Jurnal E-Biomedik*, 9(1), 77–86. <https://doi.org/10.35790/ebm.v9i1.31899>
- Djalante, R., Lassa, J., Setiamarga, D., Sudjatma, A., Indrawan, M., Haryanto, B., Mahfud, C., Sinapoy, M. S., Djalante, S., Rafliana, I., Gunawan, L. A., Surtiari, G. A. K., & Warsilah, H. (2020). Review and analysis of current responses to COVID-19 in Indonesia: Period of January to March 2020. *Progress in Disaster Science*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.pdisas.2020.100091>
- Dey, P. (2018). Haematoxylin and eosin stain of the tissue section. In *Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology* (pp. 69–79). Springer.
- Emameh, R. Z., Nosrati, H., & Taheri, R. A. (2020). Combination of biodata mining and computational modelling in identification and characterization of ORF1ab polyprotein of SARS-CoV-2 isolated from Oronasopharynx of an Iranian patient. *Biological Procedures Online*, 22(1), 1–8.
- Graham, R. L., Sparks, J. S., Eckerle, L. D., Sims, A. C., & Denison, M. R. (2008). SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis. *Virus Research*, 133(1), 88–100.
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., & Hui, D. S. C. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708–1720.
- Jung, Y. J., Park, G.-S., Moon, J. H., Ku, K., Beak, S.-H., Kim, S., Park, E. C., Park, D., Lee, J.-H., Byeon, C. W., Lee, J. J., Maeng, J., Kim, S. J., Kim, S. II, Kim, B.-T., Lee, M. J., & Kim, H. G. (2020). Comparative analysis of primer-probe sets for the laboratory confirmation of SARS-CoV-2. *BioRxiv*, 2020.02.25.964775.
- Kubina, R., & Dziedzic, A. (2020). Molecular and serological tests for COVID-19. A comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics*, 10(6), 434.
- Li, D., Zhang, J., & Li, J. (2020). Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics*, 10(16), 7150–7162. <https://doi.org/10.7150/thno.47649>

- Nalla, A. K., Casto, A. M., Huang, M.-L. W., Perchetti, G. A., Sampoleo, R., Shrestha, L., Wei, Y., Zhu, H., Jerome, K. R., & Greninger, A. L. (2020). Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer-probe sets and one assay kit. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(6), e00557-20.
- Nabila, T. T., Wasiati, A. R., Jati, A. P., & Khumaira, A. (2022). The design of Indonesian SARS-CoV-2 primers based on phylogenomic analysis of their clades. *Indonesian Journal of Biotechnology*, *27*(1), 19. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.66854>
- Nguyen, T., Duong Bang, D., & Wolff, A. (2020). 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): paving the road for rapid detection and point-of-care diagnostics. *Micromachines*, *11*(3), 306.
- Nidom, R. v, Indrasari, S., Normalina, I., Nidom, A. N., Afifah, B., Dewi, L., Putra, A. K., Ansori, A. N. M., Kusala, M. K. J., & Alamudi, M. Y. (2021). Phylogenetic and full-length genome mutation analysis of SARS-CoV-2 in Indonesia prior to COVID-19 vaccination program in 2021. *Bulletin of the National Research Centre*, *45*(1), 1–9.
- Oliveira, B. A., Oliveira, L. C. de, Sabino, E. C., & Okay, T. S. (2020). SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *62*.
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2003). The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, *14*(1), 33.
- Park, M., Won, J., Choi, B. Y., & Lee, C. J. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(6), 963–977.
- Pedersen, S. F., & Ho, Y.-C. (2020). SARS-CoV-2: a storm is raging. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2202–2205.
- Phan, T. (2020). Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infection, Genetics and Evolution*, *81*, 104260.
- Prastyowati, A. (2020). Mengenal Karakteristik Virus SARS-CoV-2 Penyebab Penyakit COVID-19 Sebagai Dasar Upaya Untuk Pengembangan Obat Antivirus Dan Vaksin. *BioTrends*, *11*(1), 1–10.
- Robert, K., & Arkadiusz, D. (2020). Molecular and Serological Tests for COVID-19 . A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics*, *10*(6).
- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, *24*, 91.
- Siswanto, Y. P., Merdekawati, F., Ernawati, E., Hardiana, A. T., & Kurniawan, E. (2019). OPTIMASI SUHU ANNEALING DAN KONSENTRASI PRIMER UNTUK DETEKSI *Brugia malayi* MENGGUNAKAN REAL-TIME PCR. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, *11*(1), 314–321. <https://juriskes.com/ojs/index.php/jrk/article/view/791>
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, *4*(1), 36. <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>
- Tao, Y., Yue, Y., Qiu, G., Ji, Z., Spillman, M., Gai, Z., ... & Wang, J. (2022). Comparison

- of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(5), 2207-2218.
- Tombuloglu, H., Sabit, H., Al-Suhaimi, E., al Jindan, R., & Alkharsah, K. R. (2021). Development of multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2. *Plos One*, 16(4), e0250942.
- Vogels, C. B. F., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Ott, I. M., Kalinich, C. C., Petrone, M. E., Casanovas-Massana, A., Catherine Muenker, M., Moore, A. J., Klein, J., Lu, P., Lu-Culligan, A., Jiang, X., Kim, D. J., Kudo, E., Mao, T., Moriyama, M., Oh, J. E., ... Grubaugh, N. D. (2020). Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature Microbiology*, 5(10), 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2(8), 1805–1820. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
- World Health Organization (WHO). 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19), Geneva: WHO; Situation report 40.
- Yuniarti, H., Cholis, B., Utami, I. W., & Putri, L. R. (2021). Prosedur awal deteksi segmen genomik virus sars-cov-2 melalui pengujian primer multipleks rt-pcr. *MAKALAH DOSEN-2021*.
- Zhou, Y., Zhang, L., Xie, Y.-H., & Wu, J. (2021). Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics. *Laboratory Investigation*, 1–10.



WUSA  
Universitas 'Aisyiyah  
Yogyakarta