

miniPCR FLUORESCENCE – SALIVA BASED RT-LAMP (FOR SABALA) SEBAGAI METODE DETEKSI SARS-CoV-2 ASAL INDONESIA

miniPCR Fluorescence – Saliva Based RT-LAMP (FOR SABALA) for SARS-CoV-2 Detection from Indonesia

Salwa Salsabila^{1*}, Arif Bimantara¹ dan Nosa Septiana Anindita¹

¹Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas ‘Aisyiyah Yogyakarta

*Email: Salsabilasalwa159@gmail.com

ABSTRAK

Pandemi COVID-19 yang disebabkan oleh SARS CoV-2 telah menginfeksi jutaan orang di seluruh dunia. Penularan virus ini sangat cepat, melalui droplet atau kontak langsung. Oleh karena itu, diperlukan metode deteksi yang cepat dan akurat untuk mendukung upaya pencegahan penyebaran virus agar tidak semakin meluas. Metode *Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification* (RT-LAMP) merupakan metode deteksi molekuler yang mudah, murah dan cepat untuk mendeteksi materi genetik SARS CoV-2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimal RT-LAMP dan pengujian metode RT-LAMP pada sampel saliva menggunakan miniPCR untuk mendeteksi virus SARS CoV-2 asal Indonesia. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah optimasi kondisi RT-LAMP dengan variasi waktu reaksi dan pengujian RT-LAMP pada sampel saliva pasien COVID-19. Pengamatan hasil RT-LAMP pada tabung PCR divisualisasikan secara fluoresensi dengan penyinaran sinar UV menggunakan *UV transilluminator*. Untuk mengkonfirmasi hasil pendaran fluoresensi, produk RT-LAMP ini dilakukan elektroforesis. Hasil optimasi menunjukkan, metode RT-LAMP mampu secara optimal mendeteksi SARS CoV-2 pada suhu 65°C dalam waktu 30 menit. Berdasarkan hasil pengujian pada sampel saliva, metode RT-LAMP pada penelitian ini mampu mendeteksi SARS COV-2. Primer RT-LAMP yang didesain dalam penelitian ini dan penggunaan miniPCR sebagai *portable thermalcycler* juga mampu mendeteksi SARS COV-2. Pemeriksaan menggunakan metode *fluorescence – Saliva based RT-LAMP* ini dapat dijadikan sebagai alternatif untuk mendeteksi dalam diagnosis terkonfirmasi pasien positif COVID-19 di Indonesia.

Kata Kunci : SARS COV-2, RT-LAMP, miniPCR , *Saliva*

ABSTRACT

COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 has infected millions of people around the world. The quick transmission occurs through droplets or direct contact. Therefore, a fast and accurate detection method is essential to prevent the spread of the virus. Specifically, Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) is an easy, cheap, and quick method to detect SARS-CoV-2 genetics. This research aimed to investigate the optimal condition of RT-LAMP and the RT-LAMP testing method on saliva sample using miniPCR for SARS-CoV-2 detection obtained from Indonesia. The implemented method was optimization of RT-LAMP conditions with variations in the reaction time and the RT-LAMP testing on COVID-19 patients' saliva samples. The observation results of RT-LAMP on PCR tubes were visualized using fluorescence through UV irradiation on UV transilluminator. To verify the results of fluorescence luminescence, the RT-LAMP was electrophoresed. The optimization results reveal that RT-LAMP method optimally detects SARS-CoV-2 in the temperature of 65°C in 30 minutes. Further, the results of saliva sample test also show that RT-LAMP method detects SARS-CoV-2. Moreover, the primary RT-LAMP used in this research and the use of miniPCR as portable thermal cycler also help detect SARS-CoV-2. In

short, saliva-based fluorescence test method using RT-LAMP is suggested as an alternative to confirm the diagnosis of COVID-19 in patients in Indonesia.

Keywords : SARS-CoV-2, RT-LAMP, miniPCR , Saliva

1. Pendahuluan

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) yang disebabkan oleh SARS CoV-2 telah menyebar cepat dan menyebabkan lebih dari 621.797.000 kasus infeksi dan menyebabkan hingga 6.545.560 kematian di seluruh dunia hingga pertengahan oktober 2022 [1]. SARS CoV-2 ditularkan melalui droplet pernapasan secara langsung maupun tidak langsung melalui kontak dengan benda yang terkena droplet [3]. COVID-19 ditandai dengan adanya demam, batuk kering, kelelahan, nyeri otot, mual dan sesak napas [4]. Sebagai upaya pencegahan, penularan dan penyebaran SARS COV-2 terdapat beberapa langkah yang dapat dilakukan seperti menjaga jarak, menggunakan masker dan menerapkan protokol kesehatan [2]. Penyakit ini dilaporkan pertama kali terjadi di Wuhan pada akhir 2019, sebagian besar kasus pasien secara epidemiologis berasal dari Pasar Grosir Makanan Laut di pusat kota Wuhan [5]. Di Indonesia sendiri kasus pertama infeksi SARS CoV-2 dilaporkan pada 2 Maret 2020, selanjutnya COVID-19 ini mulai muncul dan teridentifikasi di berbagai provinsi di wilayah Indonesia [6]. Provinsi yang paling banyak melaporkan kasus konfirmasi adalah Jawa Timur, DKI Jakarta, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah dan Jawa Barat [7].

Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk deteksi COVID-19, salah satunya adalah *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) yang menjadi metode standar dan paling banyak digunakan untuk deteksi SARS CoV-2. Namun, metode ini masih mengalami banyak keterbatasan, seperti waktu penyelesaian yang lama dan alat deteksi yang mahal [8]. Untuk meningkatkan pengujian dan mengatasi penyebaran virus diperlukan metode yang cepat dan murah, teknik amplifikasi isothermal seperti *Reverse Transcription Loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP) telah banyak dipelajari dan digunakan sebagai alternatif untuk pengujian COVID-19 [9][10]. Metode ini dikembangkan pada tahun 2000 oleh Notomi *et al.*, (2000) untuk amplifikasi asam nukleat yang dilakukan oleh DNA polimerase dari *Bacillus stearothermophilus* (Bst), suatu enzim yang memiliki aktivitas *reverse transcriptase* dan aktivitas *strand displacement* dengan menggunakan 4 hingga 6 primer. Metode ini lebih efektif dan cepat karena dapat mendeteksi materi genetik dengan waktu ± 30 menit [12][13]. Hasil pengujian RT-LAMP ini dapat divisualisasikan berdasarkan turbiditas, kolorimetri atau *fluorescence* di bawah sinar ultraviolet [14]. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dao Thi *et al.*, (2020) terkait pengembangan uji RT-LAMP untuk mendeteksi SARS CoV-2. Uji RT-LAMP yang telah dilakukan pada beberapa ratus isolasi sampel RNA dari swab nasofaring dari pasien COVID-19 menunjukkan hasil pengujian dengan metode RT-LAMP dapat mendeteksi RNA SARS CoV-2 dengan sensitivitas 97,5% dan spesifisitas 99,7%. Pengujian ini dapat menjadi deteksi alternatif yang lebih cepat dibandingkan dengan pengujian menggunakan RT-qPCR.

Penggunaan sampel swab nasofaring juga berpotensi membuat petugas kesehatan terpapar droplet infeksius dan menimbulkan ketidaknyamanan pada pasien. Metode ini membutuhkan peralatan dan biaya pemeriksaan yang mahal, tenaga medis dengan keahlian khusus, resiko paparan yang tinggi dan memerlukan alat pelindung diri yang lengkap [14]. Saliva merupakan cairan mulut pada rongga mulut yang terdapat penanda biologis seperti DNA, RNA, protein, dengan tingkat mikroorganisme, sehingga memungkinkan adanya antibodi dan virus dari tubuh manusia [15]. Analisis saliva juga telah dikembangkan menjadi sumber untuk mengevaluasi keadaan fisiologis dan patologis sebagai metode yang digunakan untuk mendiagnosis penyakit [16]. Spesimen saliva dapat digunakan untuk diagnosis COVID-19 dikarenakan dapat dengan mudah disediakan langsung oleh pasien, dapat menghilangkan

waktu tunggu pada pengambilan spesimen, sampel saliva lebih aman ditangani, mudah dikirim dan disimpan. Oleh karena itu, penggunaan sampel saliva ini dapat digunakan sebagai alternatif sampel swab nasofaring dan orofaringeal, sehingga diharapkan dapat mengurangi risiko paparan droplet bagi petugas medis dan mempercepat proses deteksi dan biaya prosedur pengujian [17].

Penggunaan miniPCR merupakan alat *portable thermocycler* ukurannya kecil, miniPCR memungkinkan hasil amplifikasi dalam waktu yang sama sesuai dengan PCR konvensional [18]. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui kondisi optimal RT-LAMP dalam deteksi SARS CoV-2 menggunakan miniPCR dengan sampel saliva dan untuk mengetahui keefektifan metode *Fluorescence Saliva Based RT-LAMP* dalam deteksi SARS CoV-2 menggunakan miniPCR. Diharapkan metode FOR SABALA ini dapat menjadi metode alternatif dalam pengambilan sampel dan proses deteksi cepat pada virus ini khususnya diberbagai daerah di Indonesia yang memiliki keterbatasan alat *Thermocycler*.

2. Metodologi

2.1. Alat dan Bahan

Alat utama yang dibutuhkan dalam penelitian ini mesin untuk reaksi RT-LAMP yaitu miniPCR. Mikropipet, mikrotip, mikrotube, *freezer*, tabung PCR, *ice pack*, *spin down*, *vortex* dan *UV transluminator*, *centrifuge*, elektroforesis, erlenmeyer, scapel, timbangan analitik, tabung ukur, *aluminium foil*, *hotplate & magnetic stirrer*.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain masker, gloves, alcohol, agarose, *master mix*, sampel saliva positif COVID-19, kontrol positif berupa plasmid yang telah terinsersi gen SARS CoV-2, Primer RT-LAMP, DNA ladder 100bp, *fluorovue*, agarose, TAE buffer, *parafilm*, alcohol, masker, gloves, TE buffer, *nuclease free water*, *loading dye*, *marker*. Adapun komposisi primer mix yang digunakan yaitu 50 reaksi/penggunaan, terdapat pada tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi Primer Mix.

Primer	Sequence	Vol. of primer
F3	ACA AAG CCT TAC ATT AAG TGG	2,5 µl
B3	CAC CAT CAA CAA ATA TTT TTC TCA C	2,5 µl
FIP	TGG GTG GTA TGT CTG ATC CCA ATA TTG TTA AAA TAT GAC TTC ACG G	10,0 µl
BIP	TGT GTT AAC TGT TTG GAT GAC AGA TGT AGG TGG GAA CAC TGT	10,0 µl
LoopF	CGG TCA AAG AGT TTT AAC CTC TCT T	5,0 µl
LoopB	TGC ATT CTG CAT TGT GCA AAC T	5,0 µl
	10mM Tris	90µl
	Final volume	125µl

2.2. Pengambilan dan Inaktivasi Sampel

Pasien yang memiliki gejala dan diduga COVID-19 yang melakukan pemeriksaan di RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta diminta untuk meludah pada cup selanjutnya sampel saliva disimpan di dalam *freezer* pada suhu 80°C [19]. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah saliva pasien COVID-19 sebanyak 5 sampel. Sampel ini berasal dari saliva pasien yang telah terkonfirmasi positif berdasarkan pemeriksaan RT-PCR. Inaktivasi virus pada sampel saliva ini dilakukan dengan pengenceran dengan

perbandingan 1:2 dengan *phosphate-buffered saline* (PBS) [20]. Masing masing sampel saliva yang telah dikumpulkan diambil 200µl kemudian dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan 400µl PBS kemudian divortex dan dipanaskan pada suhu 95°C menggunakan *heating block* selama 10 menit [21].

2.3. Optimasi Kondisi RT-LAMP

Pengujian kondisi optimum metode RT-LAMP untuk mendeteksi SARS CoV-2 menggunakan miniPCR ini didapatkan berdasarkan berbagai komponen seperti suhu dan beberapa waktu amplifikasi yang digunakan. Reaksi RT-LAMP ini dilakukan menggunakan kit dari Optigen ISO-DR004-RT300. Setiap set primer terdiri dari F3 (*forward outer primer*), B3 (*backward outer primer*), FIP (*forward inner primer*), BIP (*backward inner primer*), LF (*loop forward primer*) dan LB (*loop backward primer*) yang didesain berdasarkan pada genom SARS CoV-2 di Indonesia.

Berdasarkan kit yang digunakan kondisi suhu yang sesuai untuk optimasi yaitu 65°C, sedangkan waktu yang digunakan untuk dilakukannya optimasi yaitu 10, 20, 30, 45 dan 60 menit [22]. Hasil RT-LAMP terbaik akan digunakan untuk melakukan uji *fluorescence* RT-LAMP menggunakan sampel saliva.

Tabel 2. Komposisi Reagen Mix

No	Reagen		Volume
1	LAMP Master Mix		15 µl
2	Primer Mix		2,5 µl
3	Nuclease Free Water		2,5µl
4	Template	Kontrol Positif	5 µl
		Kontrol Negatif (Non Template Control)	
		Sampel RNA	
Total			25µl

Selanjutnya siapkan reagen yang akan digunakan seperti *Mastermix*, *Primer Mix*, *Nuclease Free Water* (NFW). Berikan tanda atau kode menggunakan spidol marker pada masing masing tabung PCR. Kemudian, masukkan masing masing komposisi reagen (tabel 3) ke dalam microtube. Tambahkan masing masing template pada tabung yang sudah berisikan *reagen mix*.

Pada template kontrol negatif, digunakan juga 25 µl *nuclease free water* (NFW) tanpa penambahan *reagen mix*. Penggunaan kontrol negatif ini dilakukan untuk memastikan ada atau tidaknya kontaminan pada reagen atau bahan yang digunakan. Selanjutnya *spindown* selama 30 detik, kemudian masukan dan *running* masing masing tabung PCR ke dalam mesin miniPCR secara bergantian sesuai dengan kondisi yang sudah di *setting* dengan suhu 65°C dan pada masing masing waktu yang digunakan, yaitu; 10 menit, 20 menit, 30 menit, 45 menit dan 60 menit. Pada aplikasi yang telah terinstal pada laptop.

Setelah didapatkan waktu dari hasil optimasi menggunakan kontrol positif dan negatif, dilakukan juga optimasi dengan sampel RNA positif. Sampel RNA yang digunakan ini sudah diekstraksi sehingga RNA yang digunakan RNA yang lebih murni. Selanjutnya optimasi RT-LAMP dengan sampel RNA dilakukan pada suhu 65°C dengan waktu *running* yang digunakan yaitu 20 dan 30 menit.

2.4. Uji RT-LAMP

Pengujian RT-LAMP dilakukan dengan sampel saliva yang telah didapatkan dari proses ekstraksi menggunakan kit dari Optigen ISO-DR004-RT300 Ltd. Komposisi reagen

terdapat pada tabel 4. Uji RT-LAMP menggunakan miniPCR pada sampel saliva menggunakan satu suhu pada 65°C yang dilakukan selama 30 menit sesuai dengan kit yang digunakan [22].

Tabel 3. Komposisi Reagen Mix

No	Reagen		Volume
1	LAMP Master Mix		15 µl
2	Primer Mix		2,5 µl
3	Nuclease Free Water		2,5µl
4	Template	Kontrol Positif	5 µl
		Kontrol Negatif (Non Template Control)	
		Sampel Saliva Positif/Negatif	
Total			25µl

Siapkan reagen yang akan digunakan seperti *Mastermix*, *Primer Mix*, *Nuclease Free Water* (NFW) pada tabel 4. Berikan tanda atau kode menggunakan spidol marker, kemudian masukkan masing masing reagen mix pada masing masing *microtube*. Tambahkan masing masing template pada tabung yang sudah berisikan *reagen mix*. Selanjutnya *spindown* selama 30 detik, *running* masing masing tabung ke dalam mesin miniPCR yang sudah di *setting* dengan suhu 65°C pada suhu 30 menit pada aplikasi yang telah terinstal pada laptop.

2.5. Visualisasi Hasil

Semua produk hasil amplifikasi RT-LAMP selanjutnya dilakukan pengamatan visualisasi *fluorescence* dibawah penyinaran sinar UV menggunakan *UV Transilluminator*. Hasil positif dapat divisualisasikan langsung dari tabung PCR di bawah paparan sinar UV menggunakan *UV Transilluminator*. Pada hasil amplifikasi dengan visualisasi *fluorescence* dalam tabung PCR positif hasil pendaran akan lebih terang dibandingkan dengan hasil pada tabung PCR dengan hasil negatif. Jika pada masing masing sampel terdapat pendaran, selanjutnya akan dilakukan elektroforesis sebagai validasi hasil akhir amplifikasi [23].

Konsentrasi gel agarose yang digunakan yaitu 2%. Proses pembuatan gel agarose dilakukan dengan menimbang 0,5gr agarose, kemudian dilarutkan dalam larutan 25 ml TAE dengan menggunakan pemanas (*hotplate* dan *magnetic stirrer*), agarose dilarutkan hingga mendidih dan berwarna bening. Kemudian tambahkan 2µl *fluorovue*, gojok hingga merata, kemudian tuang ke dalam tray/cetakan agarose yang telah diletakan sisiran untuk membentuk sumuran gel. Tunggu agarose hingga mengeras, angkat sisiran kemudian gel dimasukkan ke dalam elektroforesis yang telah diisi dengan TAE sebagai buffer elektroforesis.

Selanjutnya untuk *running elektroforesis*, masukan 5 µl marker/DNA Ladder ke dalam sumuran pertama, kemudian ambil loading dye sebanyak 1 µl, lalu letakkan pada kertas *parafilm* sebanyak sampel. Tambahkan masing masing 5 µl kontrol positif, kontrol negatif dan hasil sampel yang telah di *running* menggunakan miniPCR pada loading dye pada *parafilm*, campurkan dan suspensikan masing masing reagen, setelah tercampur masukan masing masing reagen ke dalam sumuran gel elektroforesis. Selanjutnya *running* elektroforesis selama 30–35 menit.

2.6. Analisis Data

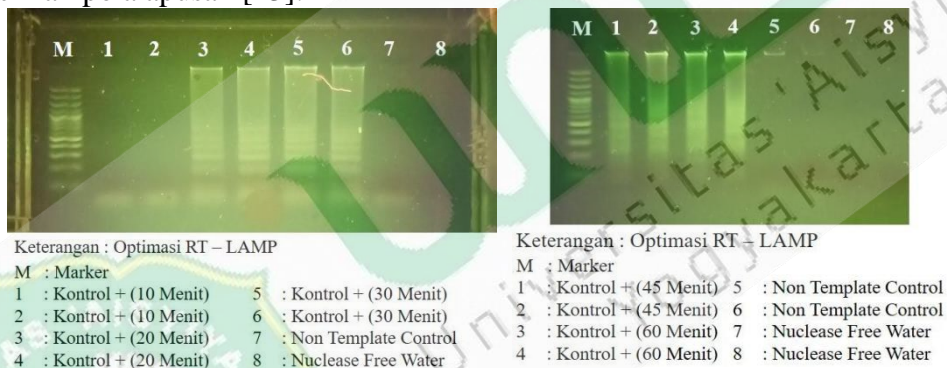
Hasil pengamatan data dianalisis didasarkan pada pembacaan hasil visualisasi pendaran pada tabung PCR atau munculnya warna *fluorescence* pada tabung PCR yang dilakukan

dengan penyinaran dibawah sinar *UV Transilluminator*. Hasil yang didapatkan pada hasil visualisasi *fluorescence* pada tabung PCR kemudian dikonfirmasi menggunakan elektroforesis. Elektroforesis hasil pengamatan didasarkan pada pembacaan pada munculnya pendaran pita DNA. Hasil optimasi dan uji efektifitas dinyatakan positif apabila terdapat pita DNA yang sama dengan kontrol positif, sedangkan hasil akan dinyatakan negatif jika tidak terdapat pita DNA seperti pada kontrol positif atau hasil sama dengan kontrol negatif.

3. Hasil dan Pembahasan

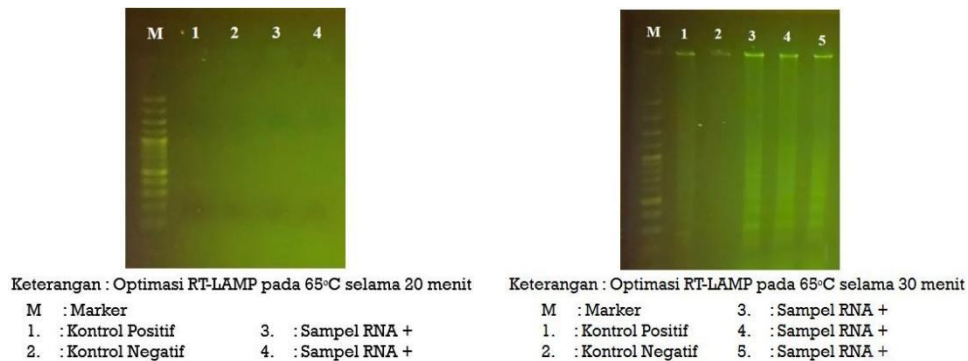
A. Optimasi RT-LAMP

Optimasi RT-LAMP dilakukan menggunakan miniPCR untuk memperoleh kondisi atau waktu yang sesuai untuk mendapatkan hasil yang optimal. Oleh karena itu, diperlukan optimasi terlebih dahulu untuk mendapatkan kondisi RT-LAMP yang tepat sehingga mendapatkan hasil pemeriksaan yang akurat. Optimasi yang dilakukan berdasarkan waktu amplifikasi, waktu yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10, 20, 30, 45 dan 60 menit. Sedangkan suhu yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh berdasarkan sesuai yang telah direkomendasikan oleh panduan kit yang digunakan, suhu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 65°C. Hasil pengujian dengan menggunakan metode RT-LAMP positif menunjukkan pola pita atau tangga yang sama, sedangkan sampel RT-LAMP negatif menghasilkan pola apusan [13].



Gambar 1. Hasil Optimasi Kondisi RT-LAMP

Berdasarkan hasil amplifikasi menggunakan miniPCR, optimasi kondisi RT-LAMP disajikan pada gambar 9. Hasil elektroforesis menunjukkan munculnya pita DNA pada waktu 20, 30, 45 dan 60 menit. Pada waktu 10 menit menunjukkan hasil negatif, tidak terdapat pita DNA pada waktu 10 menit. Hal ini memungkinkan dikarenakan waktu yang juga dapat mempengaruhi jumlah amplikon yang terbentuk, sehingga dapat menyebabkan elektroforesis yang menunjukkan hasil negatif. Tidak terdapat pita DNA pada kontrol negatif, baik *Non Template Control* (NTC) ataupun *Nuclease free water* (NFW). Keempat variasi waktu optimasi pada plasmid kontrol positif menunjukkan pita band DNA yang sama. Hasil negatif ditunjukkan pada waktu 10 menit dan kontrol negatif.



Gambar 2. Hasil Optimasi RT-LAMP

Kemudian hasil optimasi dilanjutkan dengan menguji sampel klinis RNA menggunakan waktu 20 menit. Hasil elektroforesis pada gambar 10 menunjukkan tidak adanya pita DNA pada kontrol positif, sampel RNA positif dan juga kontrol positif. Karena tidak terdapat sampel yang teramplifikasi, selanjutnya dilakukan kembali uji RT-LAMP dengan waktu 30 menit. Hasil elektroforesis yang disajikan pada gambar 10 menunjukkan terdapat pita DNA pada kontrol positif dan seluruh sampel RNA positif. Tidak terdapat pita DNA pada hasil kontrol negatif *non template control*, sehingga dari beberapa waktu yang telah dilakukan pengujian, waktu 30 menit ditentukan sebagai waktu optimal untuk pengujian metode RT – LAMP dalam pemeriksaan SARS COV–2.

Berdasarkan penelitian Cabrera *et al.*, (2021) Secara umum, melaporkan tingkat positif palsu pada ketiga set primer dalam reaksi RT-LAMP menunjukkan tingkat positif palsu yang lebih rendah didapatkan dalam waktu reaksi yang lebih singkat (± 15 menit) dan tingkat positif palsu yang lebih tinggi dengan waktu reaksi yang lebih lama (45 menit). Oleh karena itu, penggunaan waktu reaksi RT-LAMP disarankan menggunakan waktu reaksi 30 menit.

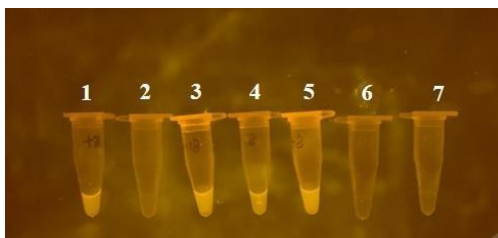
Waktu optimasi ini juga didapatkan sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jones *et al.*, (2021). RT – LAMP memiliki hasil yang sama dengan RT – qPCR dalam mendeteksi SARS CoV–2 pada gen RdRp yang digunakan sebagai konfirmasi keberadaan RNA SARS CoV–2. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh W. E. Huang *et al.*, (2020), pengujian yang dilakukan menggunakan metode RT – LAMP hasil yang didapatkan menunjukkan cukup sensitif untuk mendeteksi RNA virus dalam waktu reaksi 30 menit. Semakin tinggi salinan RNA, semakin singkat waktu yang dibutuhkan produk hasil amplifikasi.

B. Uji Metode RT-LAMP dengan miniPCR

Dari hasil optimasi plasmid kontrol positif menggunakan miniPCR yang telah dilakukan pada suhu 65°C dengan waktu 30 menit. Uji metode *fluorescence* ini kemudian dilakukan dengan menggunakan suhu 30 menit, waktu 30 menit ini ditentukan sebagai waktu optimal untuk pengujian RT-LAMP. Suhu dan waktu yang tidak sesuai dapat mempengaruhi efektivitas dari metode RT-LAMP. Suhu yang terlalu tinggi dan waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan kegagalan amplifikasi, hal ini mungkin dikarenakan tidak menempelnya primer pada gen target. Kemudian suhu yang terlalu rendah dan waktu yang terlalu cepat juga dapat menyebabkan primer menempel pada sisi genom lain sehingga mengakibatkan spesifitas yang rendah pada hasil amplifikasi [29].

Produk hasil amplifikasi RT-LAMP dalam tabung PCR kemudian divisualisasikan di bawah cahaya atau sinar UV menggunakan *UV Transilluminator*. Pewarna *fluorescence* ini menyisip di antara untaian DNA dan teramplifikasi, kemudian akan berpendar pada saat disinari di bawah panjang gelombang UV. Produk hasil RT-LAMP yang

menunjukkan pewarna *fluorescence* pada sampel positif dengan produk yang diamplifikasi akan berpendar dengan memiliki warna hijau kekuningan, sedangkan pada kontrol negatif berwarna bening dan tidak terdapat pendaran cahaya dibawah sinar UV menggunakan *UV Transilluminator*. Tabung positif juga terdapat pendaran cahaya neon terang, sedangkan pada sampel negatif terlihat redup atau tidak ada cahaya neon [23].

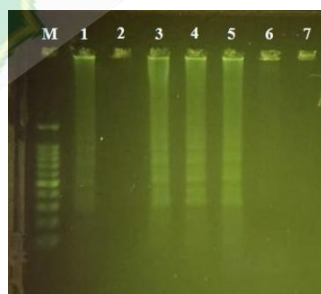


Keterangan : Visualisasi Fluorescence Uji RT – LAMP

- | | |
|---------------------|--------------------|
| 1 : Kontrol Positif | 5 : Sampel Positif |
| 2 : Kontrol Negatif | 6 : Sampel Negatif |
| 3 : Sampel Positif | 7 : Sampel Negatif |
| 4 : Sampel Positif | |

Gambar 3. Visualisasi Hasil Pengamatan Pendaran menggunakan *UV Transilluminator* pada Uji Efektivitas RT-LAMP

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, hasil Uji Efektivitas RT-LAMP menggunakan miniPCR pada Gambar 11 menunjukkan pada sampel saliva terdapat pendaran *fluorescence* pada kontrol positif dan ketiga sampel saliva positif pada tabung PCR yang telah disinari UV, tidak terdapat pendaran atau cahaya *fluorescence* pada kontrol negatif dan kedua sampel saliva negatif, sehingga memberikan hasil yang negatif. Berdasarkan penelitian Beissner *et al.*, (2019) Pengujian metode RT-LAMP yang telah dilakukan menunjukkan hasil sensitivitas dan spesifisitas yang sama dan dapat dikembangkan untuk penggunaan klinis dengan kecepatan, portabilitas, sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi. Pengukuran *fluorescence* ini juga memungkinkan untuk dilakukannya interpretasi visual dari hasil amplifikasi. Selain itu, metode ini juga dapat ditingkatkan dengan menggunakan fluorometer. RT-LAMP dapat mendeteksi SARS CoV-2 dengan kesesuaian hingga 100%. Pengujian metode RT-LAMP dengan menggunakan visualisasi *fluorescence*, dengan penyisipan pewarna *fluorescence* dalam untai DNA dapat dideteksi dengan menggunakan metode ini [31].



Keterangan : Uji RT – LAMP sampel Saliva

- | | |
|---------------------|--------------------|
| M : Marker | |
| 1 : Kontrol Positif | 4 : Sampel Positif |
| 2 : Kontrol Negatif | 5 : Sampel Negatif |
| 3 : Sampel Positif | 6 : Sampel Negatif |

Gambar 4. Visualisasi Hasil Elektroforesis Uji RT-LAMP

Untuk mengkonfirmasi hasil pendaran *fluorescence*, produk RT-LAMP ini kemudian dilakukan elektroforesis sampel dalam gel agarosa. Berdasarkan hasil elektroforesis yang

disajikan pada gambar 12. Produk hasil amplifikasi uji RT-LAMP pada sampel saliva menunjukkan munculnya pita DNA pada kontrol positif dan ketiga sampel saliva positif SARS CoV-2. Tidak terdapat pita DNA yang terlihat dalam sampel saliva negatif dan kontrol negatif *non template control*.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Poon *et al.*, (2021), Pengujian metode RT-LAMP untuk mendiagnosis SARS COV 2 menunjukkan hasil yang sesuai dan metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi virus SARS CoV-2. Wilayah ORF1ab dari SARS CoV yang dipilih sebagai gen target untuk mendiagnosis SARS CoV dan diamplifikasi dengan metode RT-LAMP menggunakan enam primer, produk yang diamplifikasi ini dianalisis menggunakan gel elektroforesis. Tingkat deteksi dan sensitivitas dari hasil amplifikasi SARS CoV dalam uji RT-LAMP ini serupa dengan metode PCR. Berdasarkan penelitian Pasomsub *et al.*, (2021) melaporkan uji efektivitas penggunaan saliva sebagai sampel noninvasif menunjukkan hasil sensitivitas diagnostik 84,3% dan spesifisitas 98,9%. Selain itu pada penelitian lain yang dilakukan oleh Tamminga *et al.*, (2022) hasil deteksi yang dilakukan pada sampel saliva juga menunjukkan sensitivitas 96,0% dan spesifisitas 98,5%, hasil ini sebanding dengan analisis RT-PCR pada swab nasofaring. Sedangkan pada penelitian Yokota *et al.*, (2021) hasil menunjukkan sensitivitas 92% dan spesifisitas 99,96% untuk sampel saliva dibandingkan swab nasofaring.

Penggunaan sampel saliva ini juga perlu diperhatikan selama pengujian. Pada beberapa pasien yang sakit atau dehidrasi dapat menghasilkan sampel saliva yang kental. Sampel saliva mungkin akan sulit untuk dipipet, sedangkan pada pasien tanpa gejala, sensitivitas sampel saliva yang lebih rendah ini perlu dibandingkan dengan sampel nasofaring untuk mendeteksi RNA SARS COV-2 [35]. Varian genetik juga dapat menyebabkan pengujian SARS CoV-2 menyebabkan negatif palsu apabila terjadi mutasi di wilayah target primer atau probe dari tes diagnosis [38]. Selain itu juga, pada penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.*, (2020) melaporkan bahwa transmisi cepat dan infektivitas virus dapat berkorelasi dengan mutasi spesifik pada genom.

4. Penutup

4.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan adapun kesimpulan pada penelitian yang dilakukan ini yaitu Kondisi optimal metode RT-LAMP dalam deteksi SARS CoV-2 dengan sampel saliva menggunakan miniPCR yaitu pada suhu 65°C dengan waktu running selama 30 menit dan metode *Fluorescence Saliva Based RT-LAMP* menggunakan miniPCR sebagai mesin *portable thermocycler* mampu mendeteksi dan efektif dalam pemeriksaan diagnosis SARS CoV-2, sehingga dapat dijadikan sebagai alternatif pilihan dalam penggunaan diagnosis terkonfirmasi pasien positif COVID-19.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] G. G. Tamminga, G. J. Jansen, and M. Wiersma, "Evaluation of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method for detection of SARS-CoV-2 in saliva," *PLoS One*, vol. 17, no. 11, pp. 1–19, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0277367.
- [2] M. Cascella, M. Rajnik, A. Cuomo, S. C. Dulebohn, and R. Di Napoli, "Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)," *StatPearls*, no. 3, Oct. 2020, Accessed: Nov. 30, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
- [3] Y. Yang *et al.*, "SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research," *Virolog. J.*, vol. 117, no. 17, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1186/s12985-020-01369-z.
- [4] A. Sharma, S. Tiwari, M. K. Deb, and J. L. Marty, "Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 56, no. 6, pp. 1–14, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106054> 0924-8579/©.
- [5] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z. L. Shi, "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 141–154, 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.
- [6] D. D. R. Turista, A. Islamy, V. D. Kharisma, and A. N. M. Ansori, "Distribution of COVID-19 and phylogenetic tree construction of sars-CoV-2 in Indonesia," *J. Pure Appl. Microbiol.*, vol. 14, no. 5, pp. 1035–1042, 2020, doi: 10.22207/JPAM.14.SPL1.42.
- [7] Agustiniingsih *et al.*, "Pedoman Pemeriksaan PCR SARS-COV-2 Bagi Petugas Laboratorium," vol. 4, no. 1, 2020, pp. 1–251.
- [8] Xuejiao-hu *et al.*, "Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection," *Clin. Sci. Epidemiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 1–12, 2020, doi: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00808-20>.
- [9] D. Thompson and Y. Lei, "Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection," *Sensors and Actuators Reports*, vol. 2, no. 8, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1016/j.snr.2020.100017.
- [10] Lahude, L. R. (2021). Literature Review : Efektivitas Metode Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (Rt-Lamp) Sebagai Uji Alternatif Virus Sars-Cov-2. [http://digilib.unisayogya.ac.id/6068/1/NASKAH_PUBLIKASI_IKA_LAHUDE - Ika Lahude.pdf](http://digilib.unisayogya.ac.id/6068/1/NASKAH_PUBLIKASI_IKA_LAHUDE_-_Ika_Lahude.pdf).
- [11] T. Notomi *et al.*, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Oxford Univ. Press*, vol. 28, no. 12, 2000.
- [12] O. Mukama *et al.*, "Synergetic performance of isothermal amplification techniques and lateral flow approach for nucleic acid diagnostics," *Anal. Biochem.*, vol. 600, no. 4, p. 113762, 2020, doi: 10.1016/j.ab.2020.113762.
- [13] Rofita Wasiati, A., Bimantara, A., Septiana Anindita, N., & Yogyakarta, A. (2022). OPTIMASI DAN UJI SENSITIVITAS PRIMER POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) GEN RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDRP) SARS-COV-2 ASAL INDONESIA. [http://digilib.unisayogya.ac.id/6449/1/1811201012_Bioteknologi_Atta Rofita Wasiati - atta rofita.pdf%0A](http://digilib.unisayogya.ac.id/6449/1/1811201012_Bioteknologi_Atta_Rofita_Wasiati_-_atta_rofita.pdf%0A).
- [14] K. Shirato *et al.*, "Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)," *Virolog. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1186/1743-422X-11-139.
- [15] V. L. Dao Thi *et al.*, "A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples," *Sci. Transl. Med.*, vol. 12, no. 556, 2020, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.ABC7075.

- [16] L. M. Czumbel *et al.*, “Saliva as a candidate for COVID-19 diagnostic testing: A meta-analysis,” *Front. Med.*, vol. 7, pp. 1–36, 2020, doi: 10.3389/fmed.2020.00465.
- [17] L. Chen *et al.*, “Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients,” *Cell Prolif.*, vol. 53, no. 12, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1111/cpr.12923.
- [18] D. Sapkota *et al.*, “COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 74, no. 6, pp. 344–349, 2021, doi: 10.1136/jclinpath-2020-206834.
- [19] M. N. Ikeda, K. Imai, S. Tabata, K. Miyoshi, N. Murahara, and T. Mizuno, “Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 58, no. 9, pp. 1–9, 2020, doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.01438-20>.Editor.
- [20] E. González-González *et al.*, “Validation of use of the miniPCR thermocycler for Ebola and Zika virus detection,” *PLoS One*, vol. 14, no. 5, pp. 13–16, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0215642. A. L. Wyllie *et al.*, “Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs,” *medRxiv*, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1101/2020.04.16.20067835.
- [21] N. Matic *et al.*, “Automated molecular testing of saliva for SARS-CoV-2 detection,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 100, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115324.
- [22] D. M. Dudley *et al.*, “Optimizing direct RT-LAMP to detect transmissible SARS-CoV-2 from primary nasopharyngeal swab samples,” *PLoS One*, vol. 15, no. 12 December, pp. 1–15, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0244882.
- [23] OptiGene, “LAMP User Guide-Mastermixes & Assay Optimisation,” 2020.
- [24] N. Garg, U. Sahu, S. Kar, and F. J. Ahmad, “Development of a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for specific and early detection of *Mycobacterium leprae* in clinical samples,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-89304-2.
- [25] D. U. Cabrera *et al.*, “Comparative analysis of loop - mediated isothermal amplification (LAMP)-based assays for rapid detection of SARS - COV2 genes,” *Sci. Rep.*, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-01472-3.
- [26] L. Jones *et al.*, “Isothermal amplification and fluorescent detection of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant virus in nasopharyngeal swabs,” *RT-LAMP Fluoresc. Detect. SARS-CoV-2*, vol. 16, no. 9, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0257563.
- [27] W. E. Huang *et al.*, “RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 950–961, 2020, doi: doi:10.1111/1751-7915.13586.
- [28] F. Morecchiato *et al.*, “Evaluation of extraction-free RT-PCR methods for faster and cheaper detection of SARS-CoV-2 using two commercial systems,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 112, no. 9, pp. 264–268, 2021, doi: 10.1016/j.ijid.2021.09.046.
- [29] B. A. Rabe and C. Cepko, “SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 39, pp. 24450–24459, 2020, doi: 10.1073/pnas.2011221117.
- [30] A. Ludyasari, “Pengaruh Suhu Annealing Pada Program Pcr Terhadap Keberhasilan Amplifikasi Dna Udang Jari,” 2019.
- [31] M. Beissner *et al.*, “Development of a combined RLEP/16S rRNA (RT) qPCR assay for the detection of viable *M. leprae* from nasal swab samples,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1186/s12879-019-4349-9.
- [32] J. Y. H. Lee *et al.*, “Validation of a single-step, single-tube reverse transcription loop-

- mediated isothermal amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2 RNA,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 69, no. 9, pp. 1169–1178, 2020, doi: 10.1099/jmm.0.001238.
- [33] E. Pasomsub *et al.*, “Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 27, no. 2, pp. 1–4, 2020, doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.001.
- [34] I. Yokota *et al.*, “Mass Screening of Asymptomatic Persons for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Using Saliva,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 73, no. 8, pp. 559-E566, Aug. 2021, doi: 10.1093/CID/CIAA1388.
- [35] R. C. Bravo *et al.*, “Clinical Performance of Direct RT-PCR Testing of Raw Saliva for Detection of SARS-CoV-2 in Symptomatic and Asymptomatic Individuals,” *medRxiv*, pp. 1–9, 2022, [Online]. Available: <http://medrxiv.org/content/early/2022/05/16/2022.05.15.22275086.abstract>
- [36] O. B. Salu *et al.*, “Saliva sample for detection of SARS-CoV-2: A possible alternative for mass testing,” *PLoS One*, vol. 17, no. 9, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0275201.
- [37] G. Alhamid *et al.*, “Colorimetric and fluorometric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for diagnosis of SARS-CoV-2,” *Funct. Integr. Genomics*, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1007/s10142-022-00900-5.
- [38] A. A. Zasada *et al.*, “Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription Helicase Dependent Amplification and Reverse Transcription Loop-Mediated Amplification Combined with Lateral Flow Assay,” *Biomedicines*, vol. 10, no. 9, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3390/biomedicines10092329.
- [39] F. S. Schneider *et al.*, “Performances of rapid and connected salivary RT-LAMP diagnostic test for SARS-CoV-2 infection in ambulatory screening,” *Sci. Rep.*, vol. 2843, no. 12, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-04826-7.
- [40] J. S. Kim, J. H. Jang, J. M. Kim, Y. S. Chung, C. K. Yoo, and M. G. Han, “Genome-Wide Identification and Characterization of Point Mutations in the SARS-CoV-2 Genome,” *Osong Public Heal. Res. Perspect.*, vol. 11, no. 3, pp. 101–111, 2020, doi: 10.24171/j.phrp.2020.11.3.05.

