

## Deteksi SARS-COV-2 dengan metode *colorimetric saliva-based RT-LAMP* menggunakan miniPCR

Tegar Bagus Prasetyo\*, Arif Bimantara, Sharfina Mutia Syarifah

Prodi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta  
\*Email: bagustegar123p@gmail.com

### Abstrak

*Coronavirus disease 2019* (COVID-19) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) yang pertama kali terjadi di China dan dikonfirmasi menjadi pandemi global oleh *World Health Organization* (WHO). Transmisi virus COVID-19 menyebar sangat cepat, untuk mengatasi hal tersebut diperlukan peningkatan dan perkembangan metode deteksi yang lebih efektif. *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) merupakan *gold standard* yang masih digunakan untuk metode deteksi virus COVID-19. Kelemahan dalam metode ini yaitu peralatan yang mahal dan waktu pengerjaan yang lama. Selain itu pengambilan sampel swab mengakibatkan ketidaknyamanan bagi pasien. Terdapat metode alternatif deteksi virus SARS-CoV-2 yaitu *saliva based RT-LAMP*. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan metode *colorimetric saliva based RT-LAMP* untuk deteksi virus SARS-CoV-2 yang menyebar di Indonesia. Pada penelitian ini digunakan 5 sampel *saliva* pasien positif COVID-19 yang berasal dari RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Setelah sampel terkumpul, virus diinaktivasi menggunakan *heating block* pada suhu 95°C selama 5 menit dan ditambahkan larutan PBS sebanyak 400µl. Kemudian hasil ekstraksi diampifikasi menggunakan miniPCR pada suhu 65°C selama 30 menit. Visualisasi hasil reaksi tersebut dideteksi secara *colorimetric* menggunakan *phenol red* dan dikonfirmasi menggunakan elektroforesis. Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan metode alternatif secara molekuler dalam deteksi SARS-CoV-2 berbasis *saliva* di Indonesia dan memberikan keuntungan kepada pasien karena metode *colorimetric saliva based RT-LAMP* dapat mengurangi ketidaknyamanan saat pengambilan sampel, membutuhkan waktu yang cepat dan biaya yang lebih murah. Pengujian metode *saliva based RT-LAMP* dengan visualisasi *phenol red* belum mampu untuk mendeteksi virus SARS-CoV-2 secara efektif dan efisien karena *phenol red* yang kurang kompatibel sebagai pewarna atau sudah rusak akibat penyimpanan yang terlalu lama. Namun berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis metode *saliva based RT-LAMP* efektif mendeteksi virus SARS-CoV-2 menggunakan *thermal cycler* yaitu pada suhu 65°C dengan waktu 30 menit.

**Kata kunci:** COVID-19; *colorimetric*; mini PCR; RT-LAMP; *saliva*

## Detection of SARS-CoV-2 using a *colorimetric saliva-based RT-LAMP* method with miniPCR

### Abstract

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) is caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), first identified in China and later declared a global pandemic by the World Health Organization (WHO). The rapid transmission of the COVID-19 virus necessitates the development of more effective detection methods. Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) remains the gold standard for COVID-19 detection. However, this method has drawbacks, including the high cost of equipment and lengthy processing time. In addition, the use of swab samples can cause discomfort for patients. An alternative detection method for SARS-CoV-2 is *saliva-based RT-LAMP*. This research aims to evaluate the effectiveness of the *colorimetric saliva-based RT-LAMP* method in detecting SARS-CoV-2 in Indonesia. Five *saliva* samples from COVID-19-positive patients were collected from PKU Muhammadiyah Hospital, Yogyakarta. Once collected, the virus was inactivated using a heating block at 95°C for 5 minutes, followed by the addition of 400 µL of PBS (Phosphate-Buffered Saline) solution. The extracted samples were then amplified using a miniPCR device at 65°C for 30 minutes. The reaction results were visualized colorimetrically using *phenol red* and confirmed through electrophoresis. This research offers a molecular alternative for detecting SARS-CoV-2 using *saliva* samples in Indonesia. It also benefits patients, as the *colorimetric saliva-based RT-LAMP* method reduces discomfort during sample collection, provides faster results, and is more cost-effective. However, the use of *phenol red* as a visual indicator in the *saliva-based RT-LAMP* method was found to be less effective and efficient for detecting SARS-CoV-2. This inefficacy may be due to the incompatibility of *phenol*

red as a dye or its degradation due to prolonged storage. Nevertheless, electrophoresis visualization confirmed that the saliva-based RT-LAMP method effectively detected SARS-CoV-2 using a thermal cycler at 65°C for 30 minutes.

**Keywords:** colorimetric; COVID-19; miniPCR; RT-LAMP; saliva

## 1. Pendahuluan

*Coronavirus disease 2019* (COVID-19) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) yang sebelumnya disebut 2019-nCoV, dan dinyatakan sebagai pandemi pada tanggal 12 Maret 2020 (Susilo *et al.*, 2020). Penyakit ini pertama kali terjadi di China dan dikonfirmasi menjadi pandemi global oleh *World Health Organization* (WHO) tanggal 22 Desember 2020 (WHO, 2020). Hingga 24 November 2021, total kasus konfirmasi COVID-19 di dunia adalah 258.164.425 kasus dengan 5.166.192 kematian (CFR 2,0%) di 204 Negara Terjangkit dan 151 Negara Transmisi Komunitas, sedangkan di Indonesia, Pemerintah Republik Indonesia telah melaporkan sebanyak 4.254.443 orang terkonfirmasi positif COVID-19 dan ada 143.766 kematian (CFR: 3,4%) terkait COVID-19 yang dilaporkan dan 4.102.700 pasien telah sembuh dari penyakit tersebut (Kemenkes, 2021).

Transmisi virus COVID-19 menyebar sangat cepat untuk mengatasi hal tersebut diperlukan adanya metode deteksi yang lebih efektif. Metode deteksi dengan *rapid test* dengan menggunakan antibodi untuk mendeteksi adanya virus COVID-19 namun, juga memiliki kelemahan yaitu hanya dapat mendeteksi antibodi dimana antibodi yang muncul terlambat sementara virusnya sudah masuk terlebih dahulu (Cevik *et al.*, 2020). Selain *rapid test* terdapat metode lain yaitu *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) merupakan *gold standard* yang ditetapkan WHO untuk deteksi virus SARS-CoV-2 (Corman *et al.*, 2020). Menurut Lamb *et al.* (2020), terdapat kelemahan dalam metode qRT-PCR yaitu peralatan yang mahal dan waktu pengerjaan yang lama. Menurut Jamal *et al.* (2021), terdapat kendala dalam menggunakan metode RT-PCR yaitu hasil deteksi yang membutuhkan waktu lama (2 hingga 4 jam) dan pengambilan sampel dengan cara swab nasofaring yang menimbulkan ketidaknyamanan. Penggunaan sampel swab nasofaring lebih berpotensi membuat petugas kesehatan terpapar droplet infeksius serta dapat menimbulkan infeksi silang dan mengganggu kenyamanan pasien saat pengambilan sampel. Menurut Xu *et al.* (2020), pencegahan terjadinya infeksi silang pada deteksi SARS-CoV-2 dapat dilakukan dengan menggunakan sampel *saliva*. Kelebihan dalam menggunakan sampel *saliva* yaitu dapat mencegah infeksi silang pada tenaga medis, penurunan kebutuhan tenaga medis, pengurangan biaya APD, dan dapat mengurangi ketidaknyamanan oleh pasien saat pengambilan sampel (To *et al.*, 2020). PCR mempunyai keunggulan dalam mendiagnosis penyakit, namun juga memiliki beberapa kekurangan seperti waktu pengerjaan yang rumit dan lebih lama. Oleh karena itu, beberapa peneliti mengeksplorasi lebih lanjut mengenai teknik amplifikasi DNA, sehingga ditemukan metode amplifikasi yang disebut *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) (Wang *et al.*, 2020).

LAMP merupakan metode amplifikasi asam nukleat berdasarkan pada prinsip aktivitas pemindahan untai asam nukleat yang mengamplifikasi beberapa salinan DNA target dengan spesifisitas, efisiensi, dan kecepatan tinggi dalam kondisi isothermal. Reaksi dari metode ini terdiri dari *reverse transcriptase*, enam primer yang mengikat wilayah DNA target, DNA polimerase di suhu yang konstan yaitu 65°C. Menurut Mukama *et al.* (2020), metode LAMP tergolong efektif dan cepat karena dapat mendeteksi DNA dengan konsentrasi yang sedikit dengan waktu sekitar 20-30 menit. LAMP memiliki metode khusus dalam menganalisis RNA yaitu *Reverse Transcriptase Loop-mediated Isothermal Amplification* (RT-LAMP) (Lamb *et al.*, 2020). Deteksi molekuler dengan menggunakan RT-LAMP berpotensi menjadi metode deteksi COVID-19 yang efektif karena cepat, mudah dilakukan, sensitif, spesifik dan akurat (Yu *et al.*, 2020). Hasil pengujian RT-LAMP dapat divisualisasikan dengan visualisasi kolometri atau fluorescence di bawah sinar ultra-violet (Aoki *et al.*, (2021).

Deteksi molekuler membutuhkan alat seperti *thermocycler* dalam penggunaannya, pada penelitian ini digunakan miniPCR sebagai alat deteksi. Alat ini memiliki bentuk yang kecil dan *portable* serta memiliki fungsi yang hampir sama dengan alat amplifikasi DNA pada umumnya. miniPCR memiliki

keunggulan dari segi ukurannya yang kecil memudahkan untuk dibawa dan dipindahkan, pengoperasian yang lebih mudah serta harga yang relatif terjangkau (Gonza'lez *et al.*, 2019). Metode RT-LAMP dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk mendeteksi SARS-CoV-2 karena proses yang cepat, sensitif, akurat, spesifik dan sangat berguna untuk daerah yang tidak memiliki fasilitas pemeriksaan laboratorium yang memadai (Lu *et al.*, 2020 ; Yu *et al.*, 2020). Untuk mempercepat interpretasi data hasil amplifikasi dapat digunakan metode koloimetri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan metode *colorimetric saliva based RT-LAMP* menggunakan MiniPCR untuk deteksi virus SARS-CoV-2 di Indonesia.

## 2. Metode

### 2.1. Alat dan Bahan

Untuk Pengabdian kepada Masyarakat, metodologi dijelaskan mulai dari tahap persiapan, pelaksanaan, penyusunan laporan dan publikasi. Selain itu, proses kerjasama dengan mitra juga dijelaskan secara sistematis. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu MiniPCR, mikropipet, mikrotip, mikrotube, *tube PCR*, *collection tube*, *marker pen*, *deep freezer*, *ice box*, *hot stirrer*, *aluminium foil*, mini spindown, *centrifuse*, erlenmeyer, *scapel*, timbangan analitik, tabung ukur, masker, gloves, *sput*, *heating block* dan kamera. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, alkohol, aquades, agarose, kit reagen RT-LAMP Optigen ISO-DR004-RT300 Ltd, sampel *saliva* positif COVID-19, kontrol positif (plasmid gen ORF1ab/RdRp SARS CoV-2), TE buffer, *Phosphate buffered saline*, *loading dye*, *nuclease free water*, Phenol red, Primer LAMP gen ORF1ab SARS CoV-2 yang dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Primer LAMP

Primer	Sekuens
F3	ACAAAGCCTTACATTAAGTGG
B3	CACCATCAACAAATATTTTCTCAC
FIP	TGGGTGGTATGTCTGATCCCAATATTGTTAAATATGACTTCACGG
BIP	TGTGTTAACTGTTTGGATGACAGATGTAGGTGG GAACACTGT
LF	CGGTCAAAGAGTTTTAACCTCTCTT
LB	TGCATTCTGCATTGTGCAAAC

### 2.2. Optimasi Waktu RT-LAMP

Untuk optimasi RT-LAMP mengikuti protokol Optigen ISO-DR004-RT300 Ltd dilakukan menggunakan kontrol positif konsentrasi 0.1 ng gen RdRp sintesis dengan kisaran waktu yaitu; 10, 20, 30, 45 dan 60 menit dengan suhu 65oC (OptiGen, 2020). Optimasi dilakukan untuk hasil kondisi RT-LAMP terbaik yang akan digunakan pada penelitian ini. Disiapkan mikrotube yang sudah dilabeli dengan marker pen yaitu 10, 20, 30, 45, dan 60 menit, Non Template Control (NTC) dan Nuclease Free Water (NFW). Untuk pembuatan larutan dilakukan di Laminar Air Flow (LAF) untuk menjaga kesterilan alat dan media serta meminimalisir adanya kontaminasi.

Reagen mix dibuat dengan komposisi antara lain Master Mix 12,5 µl, primer mix 2,5 µl, NFW 2,5 µl dan template yang berisi kontrol positif konsentrasi 0.1 ng sebanyak 5 µl. Total volume dalam tube PCR adalah 25 µl. Setelah itu, disiapkan kontrol negatif dengan menambahkan NFW sebagai template NTC dan NFW tanpa adanya campuran reagen mix. Kontrol negatif berfungsi untuk memastikan tidak adanya kontaminasi pada reagen. Selanjutnya, reagen di sentrifuge pada suhu 20oC dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Setelah itu, reagen dimasukkan ke dalam miniPCR secara bergantian berdasarkan waktu yang telah ditetapkan (10, 20, 30, 45 dan 60 menit). Kemudian dilakukan elektroforesis untuk visualisasi hasil setelah running miniPCR.

### 2.3. Uji RT Lamp Sampel RNA

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *saliva* pasien COVID-19 sebanyak 5 sampel. Sampel tersebut berasal dari RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Sampel yang digunakan adalah pasien yang telah mendapat hasil deteksi COVID-19 berdasarkan tes RT-qPCR. Jumlah sampel air liur yang didapat sebanyak tiga contoh positif dan dua contoh negatif COVID-19. Sebelum

pengambilan sampel, pasien mengisi *informed consent* yang telah disiapkan. Seleksi dilakukan dengan pasien diminta untuk tidak makan atau minum selama 30 menit kemudian pasien meludahkan *saliva* ke dalam *saliva collection* yang sudah steril (Yamazaki *et al.*, 2021). Setelah itu, sampel air liur disimpan dalam lemari es bersuhu 4°C sambil dipersiapkan untuk tahap inaktivasi panas.

Sampel *saliva* yang akan di inaktivasi, berasal dari *saliva* pasien yang telah terkonfirmasi positif covid-19 melalui tes swab PCR. Setelah didapatkan sampel *saliva* dari pasien positif covid-19, selanjutnya dilakukan inaktivasi. Inaktivasi panas sampel air liur dilakukan langsung pada hari yang sama setelah pengambilan sampel. Sampel air liur diambil dari lemari es dan diencerkan menggunakan larutan *Phosphate buffered saline* (PBS) steril dengan konsentrasi 1:2 (Matic *et al.*, 2021). Sampel air liur diambil sebanyak 0,2 mL menggunakan jarum suntik steril. Kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube yang berisi larutan PBS 0,4mL. Kemudian dilakukan inaktivasi panas menggunakan blok pemanas pada suhu 95°C selama 10 menit (Li *et al.*, 2021). Selanjutnya sampel air liur disimpan pada suhu -80°C di dalam freezer.

Total reaksi yang digunakan yaitu 25µl dengan komposisi yaitu *Master Mix*, sampel *saliva*, *primer mix* dan NFW. Komposisi reagen dapat dilihat pada tabel 3. Selanjutnya *tube* PCR dimasukkan ke dalam miniPCR *thermal cycler* pada suhu 65°C selama 30 menit (OptiGen, 2020).

**Tabel 3.** Konsentrasi Reagen

No	Reagen	Volume (µl)
1	RT-LAMP Master Mix	15
2	Primer Mix	2,5
3	Nuclease Free Water	2,5
4	RNA template	5
	Total	25

## 2.4. Visualisasi Hasil

Penelitian ini menggunakan metode visualisasi kolorimetri dan elektroforesis. Visualisasi hasil secara kolorimetri dilakukan dengan menggunakan indikator pH yaitu phenol red. Tabung PCR yang di amplifikasi menambahkan phenol red sebanyak 1µl (Wu *et al.*, 2021). Kemudian diamati perubahan warna pada tabung berisi sampel air liur, perubahan warna merah jambu menunjukkan hasil positif menjadi kuning (Huang *et al.*, 2020). Kemudian dilanjutkan dengan elektroforesis. Pada elektroforesis, diawali dengan membuat gel agarose. Disiapkan agarose dengan konsentrasi 2% sebanyak 0,5 gram dan larutan TE buffer 25 ml. Agarose dan larutan TE buffer dilarutkan dengan magnetic stirrer hingga larutan agarose bening. Kemudian ditambahkan pewarna menggunakan fluorovue sebanyak 2 µl.

Gel agarose dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis dan berikan sisiran di atas cetakan untuk membentuk sumuran. Lalu ditunggu hingga gel agarose mengeras. Setelah gel agarose mengeras, lepaskan sisiran dan TE Buffer dimasukkan ke dalam cetakan elektroforesis hingga gel agarose terendam. Kemudian gel agarose siap digunakan untuk elektroforesis. Setelah itu, siapkan DNA ladder 100bp, kontrol positif, kontrol negatif, dan sampel sebanyak 5µl dan ditambahkan 1µl loading dye. Reagen dicampurkan dengan menggunakan mikropipet (Dragon Lab 0,5-10 µl) dan dihomogenkan. Setelah homogen, reagen dimasukkan ke dalam sumuran. Setelah itu, dilakukan elektroforesis selama 30 menit dan gel agarose diamati dengan sinar blue light transiluminator untuk melihat hasil visualisasi pita DNA.

## 2.5. Analisis Data

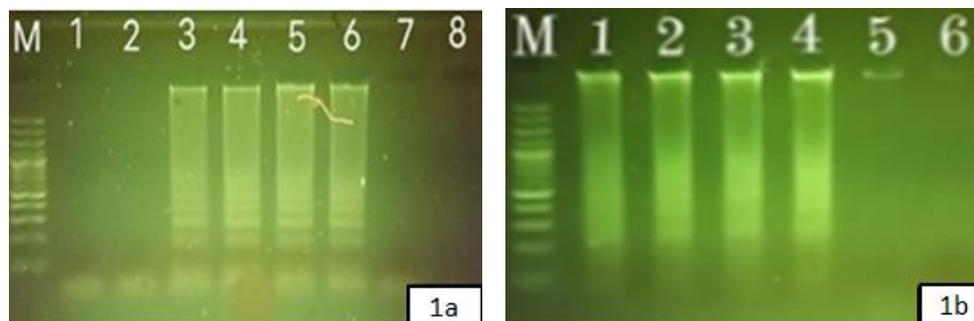
Analisis data dilakukan secara analisis deskriptif meliputi data hasil RT-LAMP dari perubahan warna setelah diberikan phenol red.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Optimasi RT-LAMP

Penelitian dilakukan dengan mengoptimasi waktu pada metode RT-LAMP. Deteksi sampel penelitian menggunakan RT-LAMP sebaiknya dilakukan optimasi terlebih dahulu. Optimasi harus

dilakukan sebelum deteksi sampel penelitian menggunakan miniPCR, sehingga didapatkan kondisi waktu yang sesuai. Hal ini bertujuan untuk mencapai hasil yang optimal (Nidom et al., 2021). Waktu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 10, 20, 30, 45 dan 60 menit. Sedangkan suhu yang digunakan yaitu 65°C sesuai dengan panduan kit yang digunakan. Berdasarkan hasil kondisi optimasi kontrol positif menggunakan miniPCR dengan metode RT-LAMP, hasil amplifikasi kontrol positif pada berbagai waktu yang disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil Elektroforesis Optimasi Waktu RT-LAMP. (1a) = Hasil Elektroforesis Optimasi Waktu RT-LAMP. M (Marker), 1-2 (Kontrol positif 10 Menit), 3-4 (Kontrol positif 20 menit), 5-6 (Kontrol positif 30 menit), 7 (NTC), 8 (NFW). (1b) = M (Marker), 1-2 (Kontrol positif 45 Menit), 3-4 (Kontrol positif 60 menit), 5 (NTC), 6 (NFW)

Waktu 10 menit tidak menunjukkan adanya band/pita DNA, hal ini menandakan bahwa waktu mempengaruhi amplicon yang terbentuk. Waktu 20 menit menunjukkan adanya pita DNA, hal ini menandakan bahwa amplifikasi visual dari RT-LAMP terjadi paling cepat namun tidak digunakan sebagai waktu uji RT-LAMP. Hal ini dikarenakan waktu yang terlalu cepat dapat menyebabkan primer menempel pada sisi genom lain sehingga mengakibatkan spesifitas yang rendah pada hasil amplifikasi. Waktu 45 dan 60 menit menunjukkan adanya pita DNA. Akan tetapi pada optimasi waktu 45 dan 60 menit tidak akan digunakan untuk uji RT-LAMP karena waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan kegagalan amplifikasi, hal ini dikarenakan tidak menempelnya primer pada gen target. Suhu yang digunakan adalah 65°C yang telah disesuaikan dengan panduan protokol kit yang digunakan.

Berdasarkan hasil pengujian bahwa untuk lama durasi proses reaksi ditentukan pada suhu 65°C selama 30 menit dalam metode RT-LAMP. Metode akan sensitif dan spesifik untuk mendeteksi SARS-CoV-2 apabila bereaksi pada suhu 65°C selama 30 menit. Penelitian Kobayashi *et al.* (2021), melakukan penelitian dengan menggunakan waktu 30 menit pada deteksi SARS-COV-2 dengan metode RT-LAMP dengan menghasilkan waktu yang optimal untuk deteksi yaitu pada kurun waktu 30 menit. Huang *et al.* (2020), juga melakukan penelitian dengan deteksi SARS-COV-2 menggunakan metode RT-LAMP dalam kurun waktu 30 menit pada suhu 65°C. Penelitian Mautner *et al.* (2020), menyatakan bahwa dibutuhkan suhu dan waktu yang sesuai untuk mendapatkan efektivitas yang tepat dari metode RT-LAMP. Suhu dan waktu yang tidak sesuai dapat mempengaruhi efektivitas dari metode RT-LAMP. Selanjutnya akan dilakukan pengambilan sampel dan dilanjutkan uji RT-LAMP.

### 3.2. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil sampel saliva dari pasien positif COVID-19. Sampel tersebut berasal dari RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Pengambilan sampel dilakukan oleh pihak laboratorium RS PKU Muhammadiyah Kota Yogyakarta. Pasien diminta untuk tidak makan atau minum selama 30 menit kemudian pasien meludahkan ke dalam wadah yang telah disediakan sehingga mempermudah dan tidak menimbulkan rasa sakit pada pasien (Gambar 2).



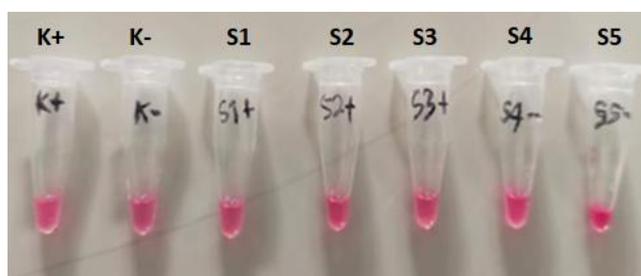
**Gambar 2.** Sampel Saliva dari Pasien Positif COVID-19

Hal ini sesuai dengan Jamal *et al.* (2021), yang menyatakan bahwa penggunaan *saliva* dapat menghindari risiko paparan terhadap petugas kesehatan dan tidak menimbulkan rasa sakit pada pasien. Inaktivasi sampel air liur dari pasien dilakukan selama 10 menit dengan panas pada suhu 95°C. Inaktivasi panas pada sampel air liur bertujuan untuk mencegah virus SARS-CoV-2 menular kepada petugas kesehatan. Sampel air liur disimpan pada suhu -80°C untuk menghindari panas dan tidak rusak.

Uji RT-LAMP dapat dilakukan dengan mudah setelah memanaskan sampel liur pada suhu 95°C saat inaktivasi panas dan juga dapat menghilangkan suatu inhibitor yang dapat mengganggu hasil uji RT-LAMP. Menurut Griesemer *et al.* (2021), antibodi dan enzim yang dikenal sebagai inhibitor pada sampel air liur memiliki kemampuan untuk mempengaruhi ketidakstabilan RNA virus dan menghambat proses deteksi. Sesuai dengan Priatni *et al.* (2007), menyatakan bahwa semakin tinggi suhu pemanasan, maka semakin besar untuk rusaknya virus yang disebabkan oleh denaturasi protein yang dapat menghilangkan efektivitas virus atau menyebabkan virus inaktif.

### 3.3. Uji RT LAMP

Uji RT-LAMP dilakukan dengan pengamatan perubahan warna pada tabung berisi sampel setelah diberikan phenol red. Perubahan warna dapat dilihat oleh mata telanjang setelah memasukan phenol red sebagai indikator perubahan warna. Warna merah jambu berubah menjadi kuning menunjukkan hasil positif, sedangkan tidak terjadi perubahan warna menunjukkan hasil yang negatif. Hasil Uji RT-LAMP menggunakan MiniPCR pada Gambar 3 menunjukkan, pada sampel saliva terlihat bahwa tidak ada perubahan warna yang terjadi pada kontrol positif dan seluruh sampel setelah diberikan phenol red. Hasil yang seharusnya didapatkan adalah terjadinya perubahan warna dari merah menjadi kuning setelah diberikan phenol red.



**Gambar 3.** Hasil uji kolorimetri berbasis air liur RT-LAMP. K+ (Kontrol positif), K-(NTC), S1-S3 (sampel air liur positif), S4-S5 (sampel air liur negatif).

Hasil uji RT-LAMP berbasis air liur pada Gambar 3 menunjukkan tidak terjadi perubahan warna pada seluruh tabung. Warna merah jambu menunjukkan tidak terdapat virus SARS-CoV-2 pada sampel, sedangkan pada saat dilakukan uji RT-LAMP, tabung S1,S2 dan S3 berisi air liur positif mengandung virus SARS-CoV-2, dan seharusnya terjadi perubahan warna merah jambu menjadi kuning. Perubahan warna merah menjadi kuning akan terjadi karena setiap terjadi polimerisasi dalam penambahan basa nitrogen, untuk membuat rantai nukleotida akan disertai pelepasan ion hidrogen

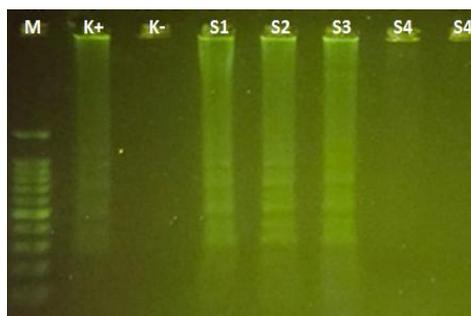
sehingga menjadi bersifat asam. Pemberian phenol red yang bersifat basa akan merubah warna tersebut menjadi kuning. Sejalan dengan Huang *et al.* (2020), menyatakan bahwa phenol red adalah salah satu indikator pH yang dapat digunakan, dengan menunjukkan warna merah muda pH 8,2-8,6 dan akan berubah warna menjadi kuning ketika pH menurun. Tanner *et al.* (2015), menyatakan bahwa pada perubahan warna hasil amplifikasi RT-LAMP dapat divisualisasikan dengan indikator pH karena amplifikasi asam nukleat melepaskan pirofosfat dan ion hidrogen yang dapat menurunkan pH larutan reaksi sehingga indikator pH yang sensitif dapat digunakan untuk menunjukkan hasil positif atau negatif dari RT-LAMP. Tidak terjadi perubahan warna pada hasil amplifikasi RT-LAMP dapat disebabkan karena ada kontaminasi pada phenol red. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan pada phenol red dan merubah pH yang semula basa menjadi asam. Sehingga ketika phenol red diberikan pada sampel yang bersifat asam, tidak terjadi perubahan pH yang merubah warnanya dari merah menjadi kuning. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dinyatakan terjadi negatif palsu. Faktor penyebab terjadinya negatif palsu pada penelitian ini adalah jumlah amplikon yang mungkin lebih sedikit dan nilai CT (*cycle threshold*) lebih dari 30. Menurut Aoki *et al.* (2021), uji kolorimetri RT-LAMP berkorelasi dengan nilai Ct pasien. Hasil uji kolorimetri RT-LAMP pada pasien jika diamati langsung dengan mata telanjang, menunjukkan hasil negatif palsu dan tidak dapat ditentukan.

Sampel air liur yang diperoleh dari pasien diencerkan dengan PBS kemudian diinaktivasi menggunakan panas pada suhu 95°C selama 10 menit. Perlakuan inaktivasi panas sampel air liur ini bertujuan untuk menonaktifkan virus SARS-CoV-2 agar tidak menular kepada peneliti atau petugas kesehatan saat proses pengujian. Setelah inaktivasi panas, sampel air liur disimpan pada suhu -80°C untuk menjaga kualitas sampel agar tidak rusak. Morais *et al.* (2022), menyatakan bahwa pemanasan pada suhu 95°C saat inaktivasi panas dapat menurunkan daya inhibitor yang ditimbulkan oleh inhibitor pada sampel liur sehingga memudahkan proses uji RT-LAMP. Sejalan dengan penelitian Griesemer *et al.* (2021), inhibitor pada sampel air liur merupakan antibodi dan enzim yang dapat mempengaruhi ketidakstabilan RNA virus dan menghambat proses deteksi.

Reagen RT-LAMP yang berbeda seperti Master Mix juga dapat menimbulkan hasil yang berbeda pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya. Penelitian ini menggunakan produk RT Isothermal Master Mix ISO-DR004-RT100 dari OptiGene. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yu *et al.* (2020), Janíková *et al.* (2021), dan Dos Santos *et al.* (2021) menggunakan *WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs)*, sedangkan Huang *et al.* (2020) menggunakan *WarmStart Colorimetric LAMP 29 (New England Biolabs)*. Phenol red yang digunakan dalam penelitian ini telah disimpan dalam waktu yang lama, sehingga ada kemungkinan terjadi kerusakan yang menyebabkan tidak adanya perubahan warna pada sampel yang diuji. Menurut Jaroenram *et al.* (2022), jenis indikator pH yang dapat digunakan selain phenol red adalah *xlenol orange (XO)*, *lavender green (LG)* dan *hydroxy naphthol blue (HNB)*. Berdasarkan hasil uji kolorimetri pada penelitian ini yang menunjukkan negatif palsu, maka perlu dipastikan dengan visualisasi menggunakan elektroforesis.

### 3.4. Visualisasi Hasil dengan Elektroforesis

Visualisasi hasil dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil dari perubahan warna menggunakan phenol red, dari hasil pengujian RT-LAMP dengan menggunakan elektroforesis (Gambar 4).



**Gambar 4.** Visualisasi hasil Elektroforesis dengan Uji RT-LAMP. M (Marker), K+ (Kontrol positif), K- (Kontrol negatif), S1-S3 (Sampel positif), S4-S5 (Sampel negatif).

Elektroforesis merupakan suatu metode untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan berat molekulnya. Elektroforesis bertujuan untuk melihat hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan miniPCR (Priatni *et al.*, 2007). Produk amplifikasi menunjukkan munculnya hasil pita DNA untuk spesimen kontrol positif dan sampel positif SARS-CoV-2. Tidak terdapat pita DNA yang terlihat dalam sampel negatif dan *Non Template Control* atau kontrol negatif. Hal ini berkorelasi pada hasil pengujian RT-LAMP yang dimana sampel yang positif berada pada kontrol positif, sampel S1, S2 dan S3 sedangkan sampel negatif berada pada kontrol negatif, sampel S4 dan S5 (gambar 3).

Sampel RT-LAMP positif memiliki pola pita atau tangga yang sama dengan kontrol positif. Hal ini sesuai dengan hasil pengujian RT-LAMP bahwa adanya warna merah setelah proses reaksi menunjukkan adanya virus SARS-COV-2. Hal ini sesuai dengan hasil visualisasi melalui elektroforesis bahwa muncul band pada sampel pada sampel S1, S2 dan S3. Sedangkan pada sampel S4 dan S5 menunjukkan tidak adanya virus SARS-COV-2 ditandai dengan tidak munculnya pita band dari hasil elektroforesis. Dari hasil tersebut dapat memperkuat bahwa adanya negatif palsu pada hasil uji kolorimetri RT-LAMP dengan indikator phenol red.

Penelitian ini berhasil menunjukkan bahwa reaksi RT-LAMP mampu mengamplifikasi gen RdRp dari SARS COV-2 secara spesifik, efektif, dan efisien melalui visualisasi elektroforesis. Namun, metode saliva-based RT-LAMP dengan visualisasi phenol red belum mampu menunjukkan hasil yang sesuai dengan visualisasi elektroforesis. Visualisasi kolorimetri dengan phenol red tidak memberikan hasil yang signifikan karena kemungkinan kerusakan reagen karena penyimpanan dalam waktu yang lama atau faktor lain seperti amplikon yang rendah. Namun, hasil elektroforesis mendukung keberadaan SARS-CoV-2 dengan munculnya pita DNA pada sampel positif. Dengan demikian, metode ini dapat digunakan sebagai alternatif deteksi yang lebih nyaman, cepat, dan hemat biaya, meskipun perlu pengembangan lebih lanjut untuk meningkatkan akurasi dan sensitivitasnya.

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian metode *saliva based* RT-LAMP dengan visualisasi phenol red belum mampu untuk mendeteksi virus SARS-CoV-2 secara efektif dan efisien karena phenol red yang kurang kompatibel sebagai pewarna atau sudah rusak akibat penyimpanan yang terlalu lama. Namun berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis metode *saliva based* RT-LAMP efektif mendeteksi virus SARS-CoV-2 menggunakan *thermal cycler* yaitu pada suhu 65°C dengan waktu 30 menit.

#### Daftar Pustaka

- Aoki, M. N., de Oliveira Coelho, B., Góes, L. G. B., Minoprio, P., Durigon, E. L., Morello, L. G., Marchini, F. K., Riediger, I. N., do Carmo Debur, M., Nakaya, H. I., & Blanes, L. (2021). The diagnostic sensitivity of SARS-CoV-2 LAMP depends on color interpretation and viral load. *Scientific Report*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88506-y>
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). *Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2*. 2019, 1–6.
- Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. K., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M. L., Mulders D. G., Haagmans B. L., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., Goderski G., Romette J. L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans M. P., & Drosten C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan;25(3):2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- Dos Santos, C. A., de Oliveira, K. G., Mendes, G. M., Silva, L. C., de Souza, M. N., Estrela, P. F. N., Guimarães, R. A., Silveira-Lacerda, E. P., & Duarte, G. R. M (2021). Detection of SARS-CoV-2 in Saliva by RT-LAMP During Worker Screening in Brazil, Including Pre-Symptom Carriers. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32(11), 2071–2077. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210098>.
- González, Mendoza-Ramos J. L., Pedroza S. C., Cuellar-Monterrubio A. A., MárquezIpiña A. R., Lira-Serhan D. (2019). Validation of use of the miniPCR thermocycler for Ebola and Zika virus

- detection. Ansumana R, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2019; 14: e0215642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215642>. PMID: 31071117.
- Griesemer, S. B., Van Slyke, G., Ehrbar, D., Strle, K., Yildirim, T., Centurioni, D. A., Walsh, A. C., Chang, A. K., Waxman, M. J., & St. George, K. (2021). Evaluation of specimen types and saliva stabilization solutions for SARS-CoV-2 testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/JCM.01418-20>
- Huang, W. E., Lim, B., Hsu, C. C., Xiong, D., Wu, W., Yu, Y., Jia, H., Wang, Y., Zeng, Y., Ji, M., Chang, H., Zhang, X., Wang, H., & Cui, Z. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 950–961. doi: 10.1111/1751-7915.13586. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32333644/>.
- Jamal A. J., Mozafarihashjin M., Coomes E., Powis J., Li A. X., Paterson A., Anceva-Sami S., Barati S., Crowl G., Faheem A., Farooqi L., Khan S., Prost K., Poutanen S., Taylor M., Yip L., Zhong X. Z., McGeer A. J., & Mubareka S.; Toronto Invasive Bacterial Diseases Network COVID-19 Investigators. (2021). Sensitivity of Nasopharyngeal Swabs and Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Clin Infect Dis*. 2021 Mar 15;72(6):1064-1066. doi: 10.1093/cid/ciaa848. PMID: 32584972; PMCID: PMC7337630.
- Janíková, M., Hodosy, J., Boor, P., Klempa, B., & Celec, P. (2021). Loop-mediated isothermal amplification to detect SARS-CoV-2 in saliva. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 307–316. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13737>.
- Jaroenram W., Chatnuntawech I., Kampeera J., Pengpanich S., Leungwutiwong P., Tondee B., Sirithammajak S., Suvannakad R., Khumwan P., Dangtip S., Arunrut N., Bantuchai S., Nguitragool W., Wongwaroran S., Khanchaitit P., Sattabongkot J., Teerapittayanon S., & Kiatpathomchai W. (2022). One-step colorimetric isothermal detection of COVID-19 with AI-assisted automated result analysis: A platform model for future emerging point-of-care RNA/DNA disease diagnosis. *Talanta*. 2022 Nov 1;249:123375. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123375. Epub 2022 Mar 10. PMID: 35738204; PMCID: PMC9404558.
- Kemkes. 2021. Infeksi emerging : Situasi Terkini perkembangan covid 19. <https://infeksiemerging.kemkes.go.id/>. Diakses pada tanggal 29 November 2021.
- Kobayashi, G. S.; Brito, L. A.; Moreira, D.d. P.; Suzuki, A. M.; Hsia, G. S. P.; Pimentel, L. F.; de Paiva, A. P. B.; Dias, C. R.; Lourenço, N. C. V.; Oliveira, B.A.; et al. (2021). A Novel Saliva RT-LAMP Workflow for Rapid Identification of COVID-19 Cases and Restraining Viral Spread. *Diagnostics* 2021, 11, 1400. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081400>
- Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020 Jun 12;15(6):e0234682. doi: 10.1371/journal.pone.0234682. PMID: 32530929; PMCID: PMC7292379.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- Li J., Hu X., Wang X., Yang J., Zhang L., Deng Q., Zhang X., Wang Z., Hou T., & Li S. (2021). A novel One-pot rapid diagnostic technology for COVID-19. *Anal Chim Acta*. 2021 Apr 15;1154 : 338310. doi: 10.1016/j.aca.2021.338310. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33736798; PMCID: PMC7877206.
- Matic, N., Lawson, T., Ritchie, G., Stefanovic, A., Leung, V., Champagne, S., Romney, MG, & Lowe, C. F. (2021). Pengujian molekuler otomatis air liur untuk SARS-CoV-2 deteksi. *Mikrobiologi Diagnostik dan Penyakit Menular*, 100(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115324>
- Mautner L., Christin K, B., Heike M, H., Wolfram V., Patrick G., Ute E., Nikolaus A., Andreas S., Melanie P., Ottmar G., Ulrich B., Lars W., Ingrid H., & Armin B. (2020). Rapid Point of Care Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal

- Amplification (RT-LAMP). *Virology Journal*, 17:160. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01435-6>.
- Morais O. M., Azevedo Alves M. R., & Fernandes P. A. D. C. (2022). Impact of Thermal Pretreatment of Saliva on the RT-PCR Detection of SARS-CoV-2. *Adv Virol.* 2022 Jun 1;2022:7442907. doi: 10.1155/2022/7442907. PMID: 35693127; PMCID: PMC9177321.
- Mukama O., Nie C., Habimana J. D., Meng X., Ting Y., Songwe F., A. I. Farga A., Mugisha S., Rwibasira P., Zhang Y., & Zeng L. (2020). Synergetic performance of isothermal amplification techniques and lateral flow approach for nucleic acid diagnostics. *Anal Biochem.* 2020 Jul 1;600:113762. doi: 10.1016/j.ab.2020.113762. Epub 2020 May 5. PMID: 32387190.
- 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. doi: 10.1186/s42269-021-00657-0. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8606223/>.
- OptiGene. (2020). LAMP User Guide-Mastermixes & Assay Optimisation.
- Priatni, D., Alifuddin, M., & Djokosetiyanto, D. (2007). Effect of Heating at Various Temperatures for 30 Minutes on Pathogenicity of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabr.). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.19027/jai.5.5-12>.
- Susilo, A., Rumende, C. M., Pitoyo, C. W., Santoso, W. D., Yulianti, M., Sinto, R., Yuniastuti, E. (2020). Coronavirus Disease 2019 : Tinjauan Literatur Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*, 7(1), 45–67. doi: 10.7454/jpdi.v7i1.415. <https://scholarhub.ui.ac.id/jpdi/vol7/iss1/8/>.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>.
- To, K. K.-W., Tsang, O. T.-Y., Yip, C. C.-Y., Chan, K.-H., Wu, T.-C., Chan, J. M.-C., Leung, W.-S., Chik, T. S.-H., Choi, C. Y.-C., Kandamby, D. H., Lung, D. C., Tam, A. R., Poon, R. W.-S., Fung, A. Y.-F., Hung, I. F.-N., Cheng, V. C.-C., Chan, J. F.-W., & Yuen, K.-Y. (2020). Consistent Detection of 2019. Novel Coronavirus in Saliva. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 841–843 <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>
- World Health Organization. (2020). WHO Coronavirus disease 2019 (COVID-19) dashboard. <https://covid19.who.int/>. Diakses pada tanggal 29 November 2021.
- Wu S., Liu X., Ye S., Liu J., Zheng W., Dong X., & Yin X. (2021). Colorimetric isothermal nucleic acid detection of SARS-CoV-2 with dye combination. *Heliyon*. 2021 Apr;7(4):e06886. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06886. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33903853; PMCID: PMC8059943.
- Xu, J., Zhao, S., Teng, T., Abdalla, A. E., Zhu, W., Xie, L., Wang, Y., & Guo, X.(2020). Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*, 12(2), 244. <https://doi.org/10.3390/v12020244>.
- Yamazaki W, Matsumura Y, Thongchankaw-Seo U, Yamazaki Y, Nagao M. Development of a point-of-care test to detect SARS-CoV-2 from saliva which combines a simple RNA extraction method with colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection. *J Clin Virol.* 2021 Mar;136:104760. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104760. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33610926; PMCID: PMC7877809.
- Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, Chen WH, Yin X. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin Chem.* 2020 Jul 1;66(7):975-977. doi: 10.1093/clinchem/hvaa102. PMID: 32315390; PMCID: PMC7188121.