

**PENGEMBANGAN METODE DIAGNOSTIK *REVERSE*
TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL
AMPLIFICATION (RT-LAMP) DENGAN METODE PEMBACAAN
KUANTITATIF TERBARU BERUPA BIOSENSOR PH UNTUK
MENDETEKSI SARS-COV-2**

*Development of A Reverse Transcription Loop-Mediated
Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay with Novel
Quantitative pH Biosensor Readout Method for SARS-CoV-2
Detection*

DIAN EKAYANTI ASTARI

P062192011



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**PENGEMBANGAN METODE DIAGNOSTIK *REVERSE*
TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL
AMPLIFICATION (RT-LAMP) DENGAN METODE PEMBACAAN
KUANTITATIF TERBARU BERUPA BIOSENSOR PH UNTUK
MENDETEKSI SARS-COV-2**

Tesis

diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

DIAN EKAYANTI ASTARI

P062192011

Kepada

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

TESIS

**PENGEMBANGAN METODE DIAGNOSTIK *REVERSE TRANSCRIPTION
LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP)* DENGAN
METODE PEMBACAAN KUANTITATIF TERBARU BERUPA BIOSENSOR PH
UNTUK MENDETEKSI SARS-COV-2**

Yang disusun dan diajukan oleh:

Dian Ekayanti Astari

P062192011

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Tesis yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 27 Desember 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

Menyetujui,

Pembimbing Utama

dr. Gita Vita Soraya, Ph.D
NIP. 198906092014042001

Pembimbing Pendamping

dr. Marhaen Hardio, M.Biomed, Ph.D
NIP. 196712121999031002

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik

Prof. dr. Rahmawati M., Ph.D, Sp.PD, K-HOM
NIP. 196802181999032002

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin



Ir. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.MedEd
NIP. 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Dian Ekayanti Astari
NIM : P062192011
Program Studi : Ilmu Biomedik
Konsentrasi : Biokimia dan Biologi Molekuler

Dengan ini menyatakan bahwa, tesis saya berjudul "**Pengembangan Metode Diagnostik *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification* (RT-LAMP) dengan Metode Pembacaan Kuantitatif Terbaru Berupa Biosensor pH untuk Mendeteksi SARS-CoV-2**" adalah benar merupakan karya saya. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 27 Desember 2023

Yang menyatakan,



Dian Ekayanti Astari
NIM P062192011

PRAKATA

Alhamdulillah rabbil 'alamin, tiada kata yang pantas terucap selain rasa syukur ke hadirat Allah subhanahu wa ta'ala sebab hanya atas berkah, rahmat, dan izin-Nya, penulis mampu menyelesaikan penelitian, tesis, serta pendidikan Magister (S2) Ilmu Biomedik ini. Bak kerikil di tepi sungai, ada banyak sekali hambatan dan rintangan yang ditemui penulis selama proses pendidikan dan penyelesaian tesis ini, dan alhamdulillah atas izin Allah dapat terselesaikan pada titik ini. Pencapaian ini pun tidak lepas dari arahan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak yang kepadanya penulis menuturkan terima kasih yang sebesar-besarnya:

1. Kepada dr. Gita Vita Soraya, Ph.D selaku pembimbing utama yang telah banyak membimbing dan memberikan bantuan kepada penulis baik dalam penelitian, penulisan jurnal, maupun pengajaran. Dari beliau penulis belajar bagaimana menjadi seorang peneliti, penulis, dan dosen yang baik. Gagasan pada penelitian ini tidak lepas dari ide cemerlang beliau, pun dana penelitian ini merupakan pendanaan yang beliau dapatkan dari Konsorsium Riset dan Inovasi untuk Percepatan Penanganan COVID-19 dengan nomor 61/FI/PKS-KCOVID-19.C/VI/2020 oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) – RISPRO dan Kementerian Riset dan Teknologi – Badan Riset dan Inovasi Nasional (KEMENRISTEK-BRIN).
2. Kepada dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D selaku pembimbing pendamping serta Kepala Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, yang telah banyak memberikan bantuan dan bimbingan serta dukungan kepada penulis, baik selama penelitian dan proses pendidikan yang dijalani penulis, maupun selama penulis menjadi asisten dosen hingga dosen muda pada departemen ini.
3. Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok; Prof. dr. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK, dan Dr. dr. Rina Masadah, M.Phil, Sp.PA selaku penilai pada ujian tesis penulis serta banyak membantu selama proses penelitian ini dalam hal izin penelitian dan penggunaan alat, penyediaan sampel, serta memberikan masukan dan saran selama proses penelitian.
4. Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta jajaran dosen terutama Dr. dr. Syahrijuita Kadir, M.Kes,

Sp.THT(K) dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc., yang telah banyak mengajarkan dan membimbing penulis selama menjalani proses pendidikan Magister ini, serta jajaran dosen dan staf lainnya yang belum bisa penulis sebutkan satu per satu yang juga telah memberikan dukungan kepada penulis selama ini.

5. *Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC)* sebagai lokasi penelitian beserta staf terutama Ibu Handayani Halik, S.Si, M.Kes yang telah banyak sekali membantu penulis selama proses penelitian.

Selain pihak di atas, tak lupa pula penulis mendoakan dan mengutarakan terima kasih yang tulus dari dalam lubuk hati kepada orangtua yang sangat penulis sayangi, Bapak Sumariyono, S.T. dan Ibu Siti Arfah Pelu, atas doa, bantuan, dan ridhonya sejak awal penulis melangkahkan kaki di Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin, pun gelar yang penulis dapatkan ini adalah persembahan terutama untuk mereka berdua. Juga teristimewa untuk suami penulis tercinta, Bapak Tri Arfandy B. S., ST., yang telah mendampingi dan menjadi sandaran bagi penulis, terima kasih untuk setiap doa, motivasi, dan ridhonya pada setiap langkah penulis dalam proses penyelesaian studi ini. Serta untuk adik-adik penulis, Muh. S. Ghulam R., S.T., M.T. (*candidate*); Nur Afifah Zhafirah, S.Si, M.Si (*candidate*), dan Abdullah Abu Tholhah yang sangat banyak memberikan bantuan moril dan tenaga hingga penulis menamatkan studi ini. Penghargaan yang besar juga penulis sampaikan pada mertua penulis, Bapak Ir. Baharuddin Santiago, M.P., dan Ibu Rahmiati A., beserta keluarga besar yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan yang sangat besar pada penulis. Terakhir, untuk anak-anak sholeh-sholehah penulis yang tersayang, Khalid Abdurrahman dan calon adiknya yang in syaa Allah sebentar lagi akan hadir di tengah kami, *ups and downs through this long journey mean nothing because, with it, we have you here right now*. Semoga perjuangan ini menumbuhkan bibit kecerdasan dan kelak menjadikan kalian tumbuh menjadi anak-anak yang mencintai ilmu yang bermanfaat.

Makassar, 27 Desember 2023

Dian Ekayanti Astari

ABSTRAK

DIAN EKAYANTI ASTARI. ***Pengembangan Metode Diagnostik Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) dengan Metode Pembacaan Kuantitatif Terbaru Berupa Biosensor pH untuk Mendeteksi SARS-CoV-2*** (dibimbing oleh Gita Vita Soraya dan Marhaen Hardjo).

Reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) adalah salah satu alternatif pemeriksaan molekuler yang lebih cepat dan sederhana daripada *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang merupakan *gold standard* untuk mendeteksi SARS-CoV-2. Metode paling sederhana dari beberapa metode pembacaan hasil amplifikasi RT-LAMP adalah metode kolorimetrik. Namun, metode ini bersifat subjektif sehingga memiliki risiko bias yang tinggi. Untuk mengatasi subjektivitas tersebut, pada penelitian ini kami mengembangkan uji molekuler RT-LAMP menggunakan gen N SARS-CoV-2 sebagai target, yang dikombinasikan dengan metode pembacaan kuantitatif terbaru berupa biosensor pH portabel serta dibandingkan dengan pemeriksaan kualitatif berupa kolorimetrik dan gel elektroforesis. Uji molekuler ini kemudian divalidasi menggunakan 57 sampel yang telah dikonfirmasi menggunakan pemeriksaan RT-PCR. LoD pemeriksaan ini adalah 10^3 salinan/ μ l. Terdapat perubahan warna yang tidak jelas menjadi jingga pada beberapa sampel dengan nilai Ct yang hampir rendah (>28). Dari ketiga metode pembacaan yang diuji, sensitivitas tertinggi terdapat pada kolorimetrik dan gel elektroforesis (93,75%), sedangkan spesifisitas dan *likelihood ratio* tertinggi terdapat pada sensor pH (84% dan 5,47). Pada pengukuran sensor pH, terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,0001$) antara pH rata-rata sampel RT-PCR (+) ($6,15 \pm 0,27$) dengan pH rata-rata sampel RT-PCR (-) COVID-19 ($6,72 \pm 0,22$). Analisis korelasi menunjukkan terdapat korelasi yang kuat ($r = 0,78$, $p < 0,0001$) antara nilai Ct yang diperoleh dari RT-PCR dengan sensor pH. Dengan performa yang cukup baik ini, RT-LAMP dengan metode pembacaan sensor pH kuantitatif dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai pemeriksaan molekuler untuk deteksi SARS-CoV-2 yang cepat dan sederhana.

Kata kunci: RT-LAMP, COVID-19, SARS-CoV-2, sensor pH, diagnostik molekuler

ABSTRACT

DIAN EKAYANTI ASTARI. ***Development of A Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay with Novel Quantitative pH Biosensor Readout Method for SARS-CoV-2 Detection*** (supervised by Gita Vita Soraya and Marhaen Hardjo).

Reverse-transcription-loop-mediated-isothermal-amplification (RT-LAMP) is a molecular amplification method that can potentially detect SARS-CoV-2 as a COVID-19 causative agent in a shorter time than the current gold-standard reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) diagnostic tool. However, previously developed RT-LAMP assays have mostly relied on highly subjective visual colorimetric interpretation. In this study, an RT-LAMP assay was developed with a novel quantitative pH biosensor readout method. In this study, an RT-LAMP assay targeting the N-gene of SARS-CoV-2 was developed, with quantitative measurement of reaction pH using a portable pH sensor compared to qualitative colorimetric and gel electrophoresis readout methods. RT-PCR was used as the gold standard, with 57 clinical COVID-19 samples used for validation of the test. The LoD of the assay is 10^3 copies/ μ l. Indistinct color changes to orange were observed in some samples with almost low Ct values (>28). Of the three readout methods tested, the highest sensitivity was found in both colorimetric and gel electrophoresis (93.75%), while the highest specificity and likelihood ratio was found in the pH sensor (84% and 5.47). On the sensor measurement, a significant difference ($p < 0.0001$) was observed between the average pH of the RT-PCR (+) COVID-19 (6.15 ± 0.27) and the average pH of the RT-PCR (-) samples (6.72 ± 0.22). Correlation analysis revealed a strong correlation ($r = 0.78$, $p < 0.0001$) between the Ct-values obtained from RT-PCR with the biosensor pH readout. With this performance, RT-LAMP with the quantitative pH sensor readout method can be further developed as a molecular assay for the rapid and simple detection of SARS-CoV-2.

Keywords: RT-LAMP, COVID-19, SARS-CoV-2, pH sensor, molecular diagnostic

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 COVID-19.....	7
2.2 SARS-CoV-2	10
2.3 RT-PCR.....	11
2.4 RT-LAMP sebagai Alternatif RT-PCR	14
2.5 Kerangka Teori	19
2.6 Kerangka Konsep	19
2.7 Hipotesis Penelitian	19
2.8 Definisi Operasional.....	20
BAB III METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	21
3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
3.3 Populasi, Subjek, dan Sampel Penelitian.....	22
3.3.1 Populasi	22

3.3.2 Subjek penelitian	22
3.3.3 Sampel penelitian	22
3.3.4 Perkiraan besar sampel penelitian	23
3.4 Alur Penelitian	24
3.5 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik	24
3.6 Alat dan Bahan	25
3.7 Prosedur Kerja.....	25
3.7.1 Desain primer	25
3.7.2 Perhitungan konsentrasi sampel	26
3.7.3 Preparasi primer	26
3.7.4 Studi preliminier dan optimasi reaksi	27
3.7.5 Validasi dan pengujian sampel	27
3.7.6 Pembacaan hasil reaksi	28
3.7.7 Pengolahan dan analisis data.....	30
BAB IV HASIL PENELITIAN	34
4.1 Sensitivitas dan Spesifisitas Analitik	34
4.1.1 Sensitifitas analitik (<i>limit of detection</i> , LoD).....	34
4.1.2 Spesifisitas analitik	36
4.2 Hasil Validasi	37
4.2.1 Interpretasi kualitatif kolorimetrik	38
4.2.2 Interpretasi kualitatif gel elektroforesis.....	39
4.2.3 Interpretasi kuantitatif biosensor pH	39
4.3 Performa/Validitas Diagnostik.....	40
4.4 Pengujian RT-LAMP menggunakan <i>crude samples</i>	41
BAB V PEMBAHASAN	43
BAB VI PENUTUP	47
6.1 Kesimpulan.....	47
6.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Contoh primer RT-PCR SARS-CoV-2	13
Tabel 2. Definisi operasional.....	20
Tabel 3. Alat dan bahan yang dibutuhkan	25
Tabel 4. Set primer RT-LAMP untuk SARS-CoV-2	26
Tabel 5. Komposisi reaksi RT-LAMP	27
Tabel 6. Hasil validasi RT-LAMP.....	37
Tabel 7. Analisis deskriptif statistik pH hasil reaksi RT-LAMP	39
Tabel 8. Perbandingan hasil reaksi RT-LAMP dengan RT-PCR	41
Tabel 9. Performa diagnostik RT-LAMP	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Alur penanganan pasien COVID-19.....	8
Gambar 2. Beberapa uji laboratorium SARS-CoV-2	9
Gambar 3. Struktur SARS-CoV-2	10
Gambar 4. Struktur genom lengkap SARS-CoV-2	11
Gambar 5. Representasi prinsip real-time RT-PCR	12
Gambar 6. Prinsip metode LAMP	15
Gambar 7. Ilustrasi interpretasi uji diagnostik RT-LAMP SARS-CoV-2	18
Gambar 8. Kerangka teori.....	19
Gambar 9. Kerangka konsep	19
Gambar 10. Alur penelitian	24
Gambar 11. Proses amplifikasi metode RT-LAMP	28
Gambar 12. Pengukuran pH dengan MX3 Lab dan strip sensor pH MX3 29	
Gambar 13. Uji sensitifitas analitik reaksi RT-LAMP menggunakan kontrol positif standar gen N SARS-CoV-2.	34
Gambar 14. Uji sensitifitas analitik reaksi RT-LAMP menggunakan sampel RNA terekstraksi.....	35
Gambar 15. Uji spesivitas analitik RT-LAMP	36
Gambar 16. Contoh hasil interpretasi kolorimetrik RT-LAMP	38
Gambar 17. Hasil pengukuran pH sampel positif dan negatif serta analisa ROC RT-LAMP	40
Gambar 18. Hasil pengujian RT-LAMP menggunakan sampel crude	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Daftar Riwayat Hidup Penulis.....	53
----------------------------------------------	----

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti/Penjelasan
μL	mikroliter
AUC	Area under the curve
CI	Confidence interval
COVID-19	Coronavirus disease
Ct value	Cycle threshold
J	Index Youden
LoD	Limit of detection
LR	Likelihood ratio
RT-LAMP	Reverse transcription loop mediated isothermal amplification
NAAT	Nucleic acid amplification test
ng	nanogram
NPV	Negative predictive value
pH	Potential hydrogen, derajat keasaman
POC	Point-of-care
PPV	Positive predictive value
qRT-PCR	Quantitative real-time-polymerase chain reaction
r	Koefisien korelasi
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver operating characteristic
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
UV	Ultraviolet

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pandemi *coronavirus disease* (COVID-19) yang berlangsung pada tahun 2020 hingga 2023 memberi dampak yang sangat signifikan terhadap kehidupan global. Krisis kesehatan masyarakat yang timbul akibat pandemi membuktikan bahwa penyempurnaan modalitas pemeriksaan harus terus dilakukan dalam upaya penanganan dan pencegahan penyakit. Uji diagnostik yang terjangkau, cepat, dan sederhana sangat dibutuhkan pada pengendalian penyakit terutama ketika terjadi pandemi. Untuk diagnosis COVID-19, uji amplifikasi asam nukleat (*nucleic acid amplification test*, NAAT) memiliki sensitivitas terbaik dalam mendeteksi RNA SARS-CoV-2, dengan pemeriksaan *quantitative real-time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yang menjadi standar baku emas saat ini. (Vandenberg *et al.*, 2020; Mizoguchi *et al.*, 2021)

Di samping performanya yang unggul, RT-PCR memiliki beberapa kelemahan seperti lamanya waktu pemeriksaan, kebutuhan alat *thermocycler* yang mahal, reagen kit PCR yang terbatas di daerah perifer, serta kebutuhan akan fasilitas laboratorium yang terstandarisasi dan petugas yang terlatih. (Hadaya, Schumm and Livingston, 2020; Soraya and Ulhaq, 2020) Beberapa uji molekuler lain yang telah dikembangkan dapat digunakan sebagai alternatif lain, seperti *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) atau uji molekuler lainnya seperti *ID Now* atau *Cue's COVID- 19 Diagnostic Test*. Namun metode ini juga masih belum sesuai untuk daerah dengan keterbatasan sumber daya dan fasilitas, sebab sebagian metode tersebut masih dalam tahap evaluasi klinis dan menunggu persetujuan dari otoritas kesehatan. (Afzal, 2020; Ganguli *et al.*, 2020)

Modalitas lain yang berpotensi untuk digunakan di daerah terbatas adalah metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Metode ini

menggunakan 4-6 primer spesifik serta enzim *Bst polymerase* untuk mengamplifikasi DNA (atau RNA jika dikombinasikan dengan *reverse transcriptase*) secara *isothermal* (pada suatu suhu yang sama) menjadi amplicon dalam jumlah besar. Oleh sebab itu, metode LAMP dapat dilakukan menggunakan *waterbath* atau *heat block* dan dapat memberikan hasil yang cepat. (Notomi *et al.*, 2000)

Hasil amplifikasi metode LAMP dapat dideteksi dengan beberapa metode seperti turbidimetri, visualisasi kolorimetrik, gel elektroforesis, dan fluoresens *real-time*. Metode yang paling umum adalah interpretasi kolorimetrik dengan penambahan indikator pH seperti *phenol red* ke dalam campuran reaksi. Dengan adanya sekuens target asam nukleat pada sampel, reaksi LAMP berlangsung dengan cepat dan menghasilkan hasil amplifikasi berupa amplicon serta produk sampingan seperti ion hidrogen. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan pH pada campuran reaksi, menghasilkan perubahan warna dari merah muda (pH 8) menjadi kuning (pH 6) yang dapat diinterpretasikan secara visual bahwa target DNA atau RNA positif terdapat dalam sampel yang sedang dianalisis. (Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020; Subsoontorn, Lohitnavy and Kongkaew, 2020)

Sejauh ini, metode LAMP telah digunakan pada banyak studi untuk mendeteksi berbagai organisme dalam berbagai bidang, seperti pertanian, kedokteran hewan, keamanan pangan, bioterorisme, pemantauan lingkungan, dan diagnostik klinis. (Moehling *et al.*, 2021) Dalam bidang kedokteran, metode ini telah dikembangkan untuk diagnostik klinis deteksi gen tertentu (misalnya hBRCA1, BRAF, HLA-B), atau patogen seperti virus (misalnya dengue, influenza, HSV, hepatitis), bakteri (misalnya *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholera*), parasit (misalnya *Plasmodium*), dan lainnya. (Becherer *et al.*, 2020)

Pada pandemi COVID-19, beberapa studi juga telah mengembangkan metode LAMP untuk mendeteksi SARS-CoV-2 dengan penggunaan enzim *reverse transcriptase* (dalam bentuk *reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*, RT-LAMP) dalam

waktu kurang dari 60 menit. Penelitian-penelitian ini menggunakan target gen yang berbeda, seperti ORF1ab (Lamb *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020), gen S (G.-S. Park *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020), gen N (W. E. Huang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), atau gen E (Lee *et al.*, 2020). Di antara penelitian tersebut, Park *et al.*, Huang *et al.*, dan Baek *et al.* menggunakan interpretasi kolorimetrik dengan *phenol red* sebagai indikator pH. Meskipun metode kolorimetrik ini sangat sederhana, metode ini memiliki keterbatasan berupa subjektivitas penentuan warna secara visual. (de Oliveira Coelho *et al.*, 2021)

Metode pembacaan lain yang lebih objektif misalnya dengan pengukuran pH kuantitatif, yaitu dengan pengukuran pH campuran reaksi secara langsung dan bukan disimpulkan dari perubahan kolorimetrik. Namun, analisis pH reaksi LAMP menggunakan pH meter konvensional masih sulit dilakukan karena beberapa faktor. Pertama, volume cairan yang diperlukan untuk pengujian pH adalah sekitar 5 ml pada pH meter konvensional atau 100 μ l pada pH meter bervolume mikro, sedangkan volume total untuk reaksi RT-LAMP biasanya hanya 25 μ l. Kedua, alat ukur pH konvensional memerlukan kalibrasi dan pemeliharaan secara berkala sehingga penggunaannya tidak praktis. Ketiga, alat ukur pH konvensional perlu dibersihkan setiap kali telah digunakan untuk mengurangi kontaminasi silang yang dapat mengacaukan hasil pengukuran. (Mcglynn, 2003; Kwong *et al.*, 2013; Afsahi, Ahmadi-hamedani and Khodadi, 2020)

Keterbatasan ini dapat diatasi dengan penggunaan biosensor pH sekali pakai bervolume mikro yang telah terkalibrasi. Dalam studi ini, kami mengeksplorasi penggunaan biosensor seperti itu untuk pengukuran pH kuantitatif dalam uji molekuler berbasis RT-LAMP untuk mendeteksi RNA SARS-CoV-2. Jika berhasil, teknologi ini dapat dikembangkan menjadi suatu platform pengukuran utuh yang memanfaatkan pengukuran pH kuantitatif untuk penilaian hasil reaksi RT-LAMP yang cepat untuk deteksi SARS-CoV-2 atau patogen lainnya. Untuk mengamati performa metode RT-LAMP-COVID-19 ini, penelitian ini membandingkan pengukuran pH

kuantitatif dengan kolorimetrik dan gel elektroforesis konvensional, dengan menjadikan pemeriksaan RT-PCR sebagai rujukan.

1.2 Rumusan Masalah

Keterbatasan yang terdapat pada metode diagnostik standar baku emas untuk deteksi SARS-CoV-2 saat ini mendorong peneliti untuk mengembangkan metode RT-LAMP yang dikombinasikan dengan metode pembacaan kuantitatif berupa sensor pH. Dalam penelitian ini, peneliti juga membandingkan performa metode tersebut dengan metode pembacaan kualitatif yaitu kolorimetrik dan gel elektroforesis. Selain itu, metode pemeriksaan ini juga akan dicobakan menggunakan sampel apusan nasofaring yang tidak melalui proses ekstraksi. Rumusan masalah dalam penelitian ini dapat diuraikan dalam beberapa pertanyaan penelitian sebagai berikut.

1. Bagaimanakah sensitivitas analitik (*limit of detection*, LoD) dan spesifisitas analitik RT-LAMP-COVID-19 dengan metode pembacaan kolorimetrik dan gel elektroforesis jika dibandingkan dengan standar emas RT-PCR?
2. Bagaimanakah perbedaan rerata pH hasil positif dan negatif RT-LAMP, korelasi antara pH RT-LAMP dan nilai Ct RT-PCR, serta *cut-off point* dan *area under the curve* (AUC) RT-LAMP-COVID-19 dengan metode pembacaan sensor pH?
3. Bagaimanakah performa diagnostik (sensitivitas dan spesifisitas klinis, akurasi, nilai duga positif, nilai duga negatif, rasio kemungkinan positif, dan rasio kemungkinan negatif) RT-LAMP-COVID-19 dengan metode pembacaan kolorimetrik, gel elektroforesis, serta biosensor pH jika dibandingkan dengan standar emas RT-PCR?
4. Bagaimanakah hasil pemeriksaan RT-LAMP-COVID-19 jika menggunakan sampel RNA yang tidak diekstraksi (*crude sample*) dibandingkan dengan standar emas RT-PCR?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan suatu pemeriksaan molekuler berbasis RT-LAMP untuk mendeteksi SARS-CoV-2 dalam waktu singkat serta menggunakan peralatan laboratorium sederhana sehingga dapat digunakan di daerah perifer. Secara khusus, tujuan dari penelitian ini dapat diuraikan sebagai berikut.

1. Menilai sensitivitas analitik (*limit of detection*, LoD) dan spesifisitas analitik RT-LAMP-COVID-19 dengan metode pembacaan kolorimetrik dan gel elektroforesis jika dibandingkan dengan standar emas RT-PCR.
2. Menilai perbedaan rerata pH hasil positif dan negatif RT-LAMP, korelasi antara pH RT-LAMP dan nilai Ct RT-PCR, serta *cut-off point* dan *area under the curve* (AUC) RT-LAMP-COVID-19 dengan metode pembacaan sensor pH.
3. Menilai performa diagnostik (sensitivitas dan spesifisitas klinis, akurasi, nilai duga positif, nilai duga negatif, rasio kemungkinan positif, dan rasio kemungkinan negatif) RT-LAMP-COVID-19 dengan metode pembacaan kolorimetrik, gel elektroforesis, serta biosensor pH jika dibandingkan dengan standar emas RT-PCR.
4. Menilai hasil pemeriksaan RT-LAMP-COVID-19 jika menggunakan sampel RNA yang tidak diekstraksi (*crude sample*) dibandingkan dengan standar emas RT-PCR.

1.4 Manfaat Penelitian

Bagi pengembangan ilmu, penelitian ini dapat memberikan pengetahuan yang lebih luas tentang metode pemeriksaan RT-LAMP khususnya untuk deteksi SARS-CoV-2, terutama bagi peneliti serta bagi pembaca. Apabila tes ini dapat dikembangkan dengan sensitivitas dan spesifisitas yang baik, maka diharapkan bahwa tes ini dapat digunakan secara luas sebagai alat diagnostik molekuler untuk deteksi SARS-CoV-2 atau dikembangkan lebih lanjut untuk modalitas diagnostik pemeriksaan

virus lainnya. Terlebih karena metode LAMP memiliki keunggulan dibandingkan metode PCR yaitu membutuhkan waktu yang lebih singkat serta menggunakan peralatan laboratorium sederhana, dengan metode pembacaan sensor pH yang modern dan *simple*, maka diharapkan alat ini dapat digunakan hingga pada fasilitas pelayanan kesehatan di perifer.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

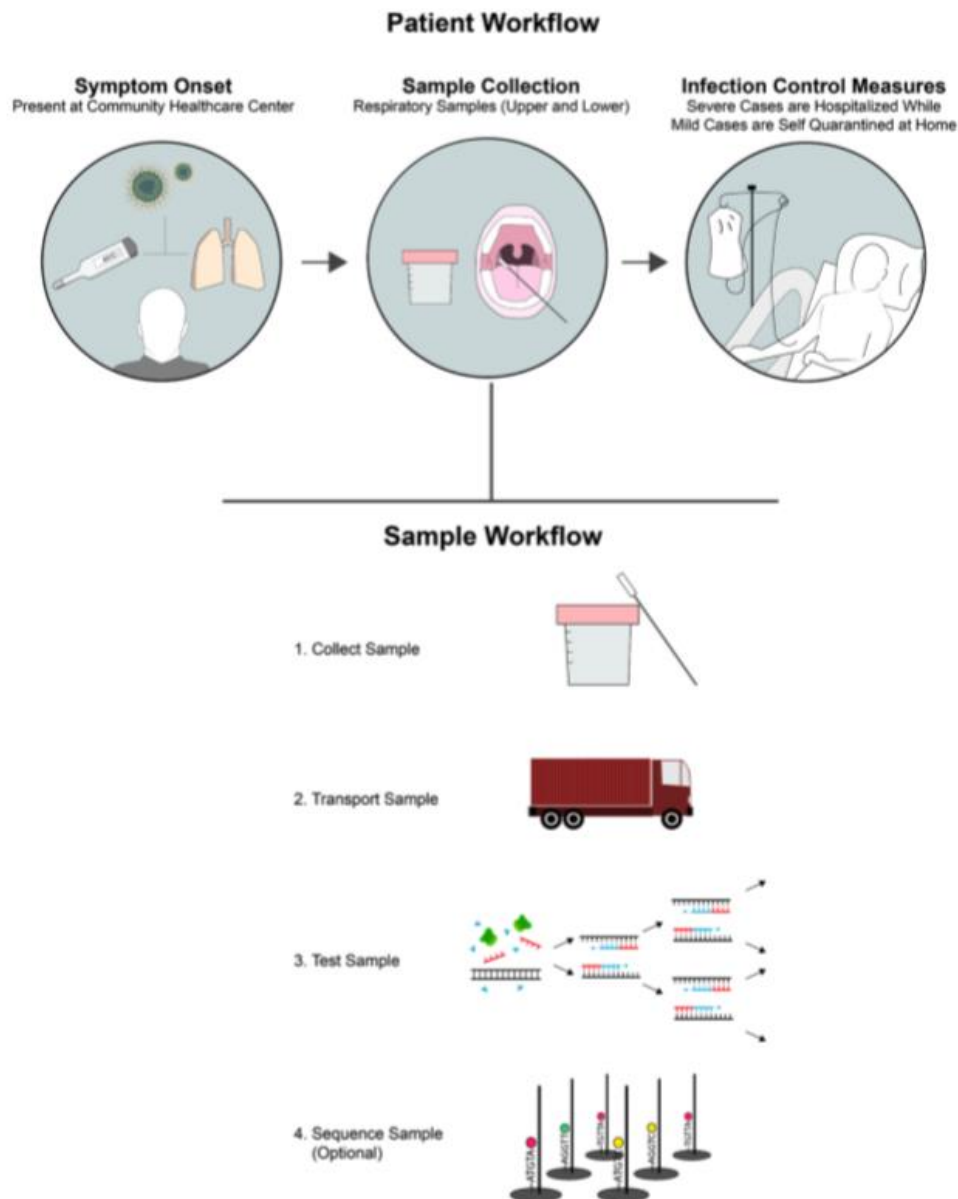
2.1 COVID-19

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) merupakan penyakit respiratorik kausa virus yang mulai muncul di akhir tahun 2019, disebabkan oleh virus baru dari kelompok *coronavirus*, yaitu *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2). Sebelumnya, virus lain dari kelompok *coronavirus* juga pernah merebak sebagai penyakit respiratorik berat, yaitu *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV) pada tahun 2002 dan *Middle East respiratory syndrome* (MERS-CoV) pada tahun 2012. (Hu *et al.*, 2020) Ketiga virus ini merupakan anggota yang paling berbahaya diantara tujuh jenis *coronavirus* yang telah ditemukan. (Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020) Namun, penularan SARS-CoV-2 telah melampaui SARS-CoV dan MERS-CoV, menyebabkan wabah ini menjadi fokus perhatian dunia kesehatan. (Hu *et al.*, 2020)

Semua kelompok usia memiliki risiko untuk terinfeksi SARS-CoV-2, namun usia yang lebih tua (>60 tahun) serta adanya komorbid akan menimbulkan manifestasi klinis yang lebih parah berupa penyakit respiratorik berat yang membutuhkan perawatan bahkan menyebabkan kematian. Umumnya gejala berupa demam, batuk kering, kelelahan, dan sesak pada kasus yang lebih berat. Infeksi pada anak-anak dan dewasa muda biasanya asimtomatis atau hanya berupa gejala ringan, sedangkan pada lansia berupa gejala berat hingga gagal pernapasan dan kematian. Kebanyakan pasien menunjukkan gejala klinis setelah waktu inkubasi 1-14 hari (rata-rata 5 hari) serta munculnya *dyspneu* dan pneumonia sekitar 8 hari sejak munculnya gejala penyakit ini disusul oleh fase kritis dan kematian sekitar 16 hari. (Hu *et al.*, 2020)

Diagnosis COVID-19 yang tepat berperan penting dalam manajemen penyakit ini, terutama dalam pengendalian dan pembatasan dengan cara identifikasi kasus, isolasi, dan pelacakan kontak (**Gambar 1**).

Gejala klinis yang bermanifestasi pada pasien COVID-19 umumnya tidak spesifik sehingga tidak dapat menjadi acuan untuk diagnosis yang akurat. Beberapa modalitas diagnostik yang umum digunakan saat ini adalah pemeriksaan *computer tomography scan* (CT-scan), pemeriksaan serologis, maupun deteksi molekular. (Udugama *et al.*, 2020)

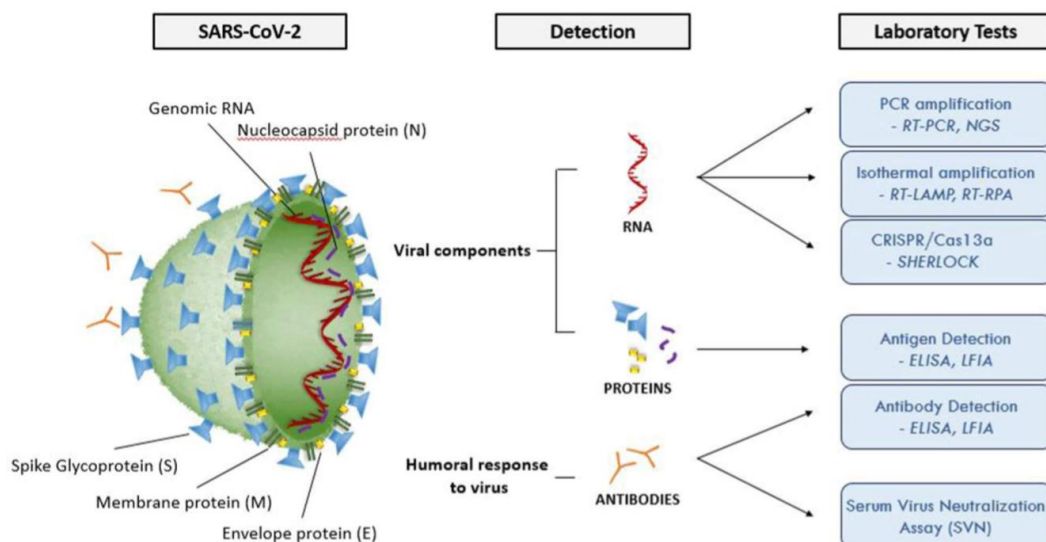


Gambar 1. Alur penanganan pasien COVID-19 saat ini (Udugama *et al.*, 2020)

Pemeriksaan CT-scan hanya dapat digunakan untuk diagnosis klinis, namun dapat memberikan gambaran normal pada fase awal perjalanan penyakit ini. (Udugama *et al.*, 2020) Pemeriksaan serologis

berupa deteksi antibodi terhadap SARS-CoV-2 hanya mendeteksi orang dengan respon imun humoral yang telah terbentuk terhadap virus ini, sehingga dapat melewati *carrier* virus yang belum memiliki imunitas aktif tersebut. (Afzal, 2020) Pemeriksaan antigen secara cepat juga sedang dikembangkan saat ini namun masih memiliki sensitivitas yang rendah dengan kemungkinan yang besar untuk memberikan hasil negatif palsu. (Vandenberg *et al.*, 2020)

Deteksi molekular adalah pilihan utama sebagai pemeriksaan standar baku emas terhadap COVID-19, karena dapat mengidentifikasi patogen kausatifnya secara langsung, yaitu SARS-CoV-2. (Afzal, 2020; Udogama *et al.*, 2020) Beberapa uji molekular yang ada saat ini menggunakan teknik amplifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) ataupun teknik *sequencing* (**Gambar 2**). (D'Cruz, Currier and Sampson, 2020) *Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR) menjadi pemeriksaan standar baku emas saat ini karena lebih efisien secara biaya serta memiliki performa yang cukup baik. (Afzal, 2020)



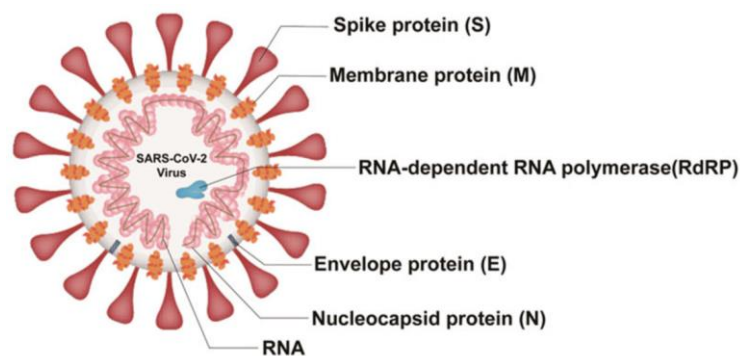
Gambar 2. Struktur SARS-CoV-2 dan beberapa uji laboratorium serta molekul targetnya (D'Cruz, Currier and Sampson, 2020)

Pemeriksaan RT-PCR dilakukan dalam bentuk DNA, sehingga RNA SARS-CoV-2 perlu ditranskripsikan dengan bantuan *reverse transcriptase* menjadi *complementary* DNA (cDNA). (Vandenberg *et al.*, 2020) Sampel yang digunakan pada pemeriksaan ini adalah apusan dari

saluran respiratorik atas (nasofaring dan/atau orofaring) maupun saluran respiratorik bagian bawah. (WHO, 2020) Karena pemeriksaan yang ada masih membutuhkan fasilitas laboratorium, sehingga alur pemeriksaan sampel masih harus melewati proses transport dari tempat pasien ke tempat pemeriksaan sebelum dilakukannya pemeriksaan tersebut. (Udugama *et al.*, 2020)

2.2 SARS-CoV-2

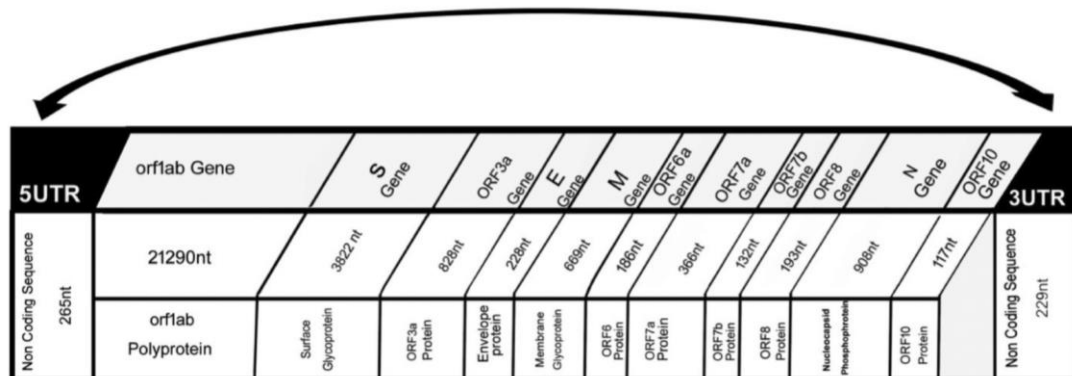
SARS-CoV-2 merupakan anggota keluarga *Coronaviridae* yang termasuk dalam ordo *Nidovirales* dan genus betacoronavirus (β -CoV). (Ramakrishna *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2020) Virus ini berbentuk sferis dengan diameter 80-160 nm, memiliki nukleokapsid yang membungkus untai RNA-nya, dan diselubungi oleh *envelop*, membran, serta protein spike pada permukaannya (**Gambar 3**). Baik secara struktural maupun sekuens genome yang dimilikinya, terdapat kemiripan antara SARS-CoV-2 dengan SARS-CoV (79%) dan MERS-CoV (50%). (Afzal, 2020; Hu *et al.*, 2020)



Gambar 3. Struktur SARS-CoV-2 (M. Park *et al.*, 2020)

SARS-CoV-2 memiliki *single-stranded RNA positive-sense* (+ssRNA) dengan genome sepanjang ~30.000 nukleotida (Afzal, 2020; Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020) yang mengkode sedikitnya 29 protein (Yao *et al.*, 2020) termasuk empat protein strukturalnya, yaitu protein *nucleocapsid* (N), *envelop* (E), *membrane* (M), dan *spike* (S), serta dua gen *open reading frame* (ORF1a dan ORF1b) yang mengkode protein nonstruktural, termasuk *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp)

(**Gambar 4**). (Soraya *et al.*, 2018; Afzal, 2020; Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020) Berdasarkan perbedaan sekuens pada urutan basa 28.144 pada genome RNA-nya, SARS-CoV-2 dibagi menjadi subtype L dan S, di mana subtype L memiliki mutasi yang lebih banyak dengan kemampuan penyebaran yang lebih tinggi. (Yang *et al.*, 2020)



Gambar 4. Struktur genom lengkap SARS-CoV-2 (29.903 nukleotida) (Khailany, Safdar and Ozaslan, 2020)

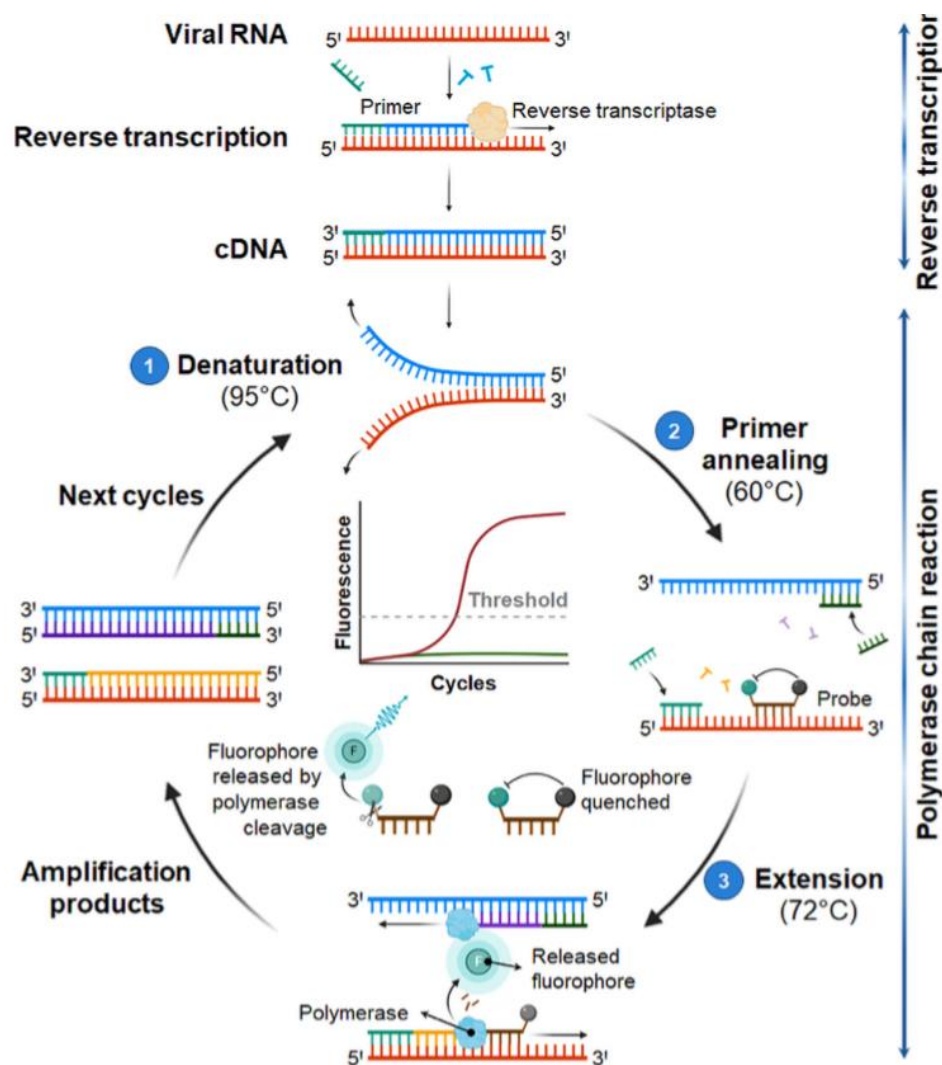
Ketika SARS-CoV-2 menginfeksi suatu sel, protein *spike* (S) akan berikatan dengan reseptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) pada permukaan sel inang melalui *receptor binding domain* (RBD) yang berada pada subunit S1 protein S tersebut. Subunit S1 akan mengalami perubahan bentuk kemudian dilepaskan, serta subunit S2 akan mengalami transisi menjadi bentuk pascafusi yang lebih stabil yang akan memediasi masuknya virus ke dalam sel inang. Setelah masuk ke dalam sel inang, virus akan berkembang biak dan melisis sel inang, menyebabkan kerusakan alveolar, serta *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) pada pasien yang terinfeksi. (Afzal, 2020; Y. Huang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2020)

2.3 RT-PCR

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) saat ini merupakan modalitas diagnostik standar baku emas (*gold standar*) dan telah digunakan secara luas untuk skrining maupun deteksi dini COVID-19. Pemeriksaan ini sangat sensitif karena mampu mendeteksi sekuens genomik spesifik. Lebih jauh lagi, terdapat pemeriksaan real time RT-PCR

(qRT-PCR) yang merupakan teknik kuantitatif dan mampu mendeteksi jumlah RNA yang teramplifikasi melalui PCR. (Afzal, 2020)

Untuk pemeriksaan RT-PCR, RNA virus diekstraksi dari spesimen apusan nasofaring atau orofaring dan akan dipurifikasi. RNA yang telah dipurifikasi ini akan dikonversi menjadi *complementary* DNA (cDNA) menggunakan *reverse transcriptase*, suatu enzim DNA polimerase yang *RNA-dependent*. Hasil cDNA inilah yang nantinya akan diamplifikasi menggunakan PCR. (Fraga, Meulia and Fenster, 2014; Afzal, 2020)



Gambar 5. Representasi prinsip *real-time* RT-PCR (Afzal, 2020)

Prinsip *real time* RT-PCR (**Gambar 5**) menggunakan primer sekuens spesifik yang berada di depan (*forward primer*) dan belakang (*reverse primer*) gen target, serta *probe* fluorogenik yang telah dilabel

dengan sebuah *fluorophore* (reporter *fluorescent*) pada 5' serta sebuah *quencher* pada 3'. *Probe* ini disebut juga sebagai Taq-Man *probes*. Ketika Taq-Man *probe* terhibridisasi ke sekuens target kemudian didegradasi oleh DNA polimerase selama PCR, *fluorophore* akan dilepaskan sebagai sinyal *fluorescence* dan akan terdeteksi secara *real-time* dan data tersebut akan diplot sesuai siklus replikasi. (Afzal, 2020) Beberapa contoh primer RT-PCR serta gen targetnya dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Contoh primer RT-PCR SARS-CoV-2 (Udugama *et al.*, 2020)

Institution	Gene target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Probe (5'-3')
U.S. CDC ¹⁶	N gene	N1: GACCCCAAAATCAGCGAAAT N2: TTACAAACATTGGCCGCAAA N3: GGGAGCCTTGAATACACAAAA RP-F RNase: AGATTTGGACCTGCGAGCG	N1: TCTGGTACTGCCAGITGAATCTG N2: GCGCGACATTCCGAAGAA N3: TGTAGCACGATTGCAGCATTG RP-RRNase: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	N1: FAM-ACCCCGCATTACGTTTG GTGGACC-BHQ1 N2 FAM-ACAATTTGCCCCAGC GCTTCAG-BHQ1 N3: FAM-AYCACATTGGCACCCGC AATCCTG-BHQ1 RP-P RNase: FAM-TTCTGACCTGAAGGCTC TGC GCG-BHQ-1
China CDC ¹⁶	ORF1ab and N gene	ORF1ab: CCCTGTGGGTTTTACTACTAA N: GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAT	ORF1ab: ACGATTGTGCATCAGCTGA N: CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG	ORF1ab: FAM- CCGCTGCGGTATGTGGAAG GTTATGG-BHQ1 N: FAM-TTGTGCTGCTTGA CAGATT-TAMRA
Charité, Germany ¹⁶	RdRp, E, N gene	RdRp: GTGARATGGTCATGTGTGGCGG E: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	RdRp: CARATGTTAAASACACTATTAGCATA E: ATATTGCAGCAGTACGCACACA	RdRp 1: FAM-CAGGTGGAACCTCATC AGGAGATGC-BBQ RdRp 2: FAM-CCAGGTGGWACRTCATC MGGTGATGC-BBQ E: FAM-ACACTAGCCATCCTTA CTGCGTTTCG-BBQ
Hong Kong University ¹⁶	ORF1b-nsp14, N gene	ORF1b-nsp14: TGGGGYTTTACRGGTAACCT N: TAATCAGACAAGGAAGTATTA	ORF1b-nsp14: AACRCGCTTAACAAAGCACTC N: CGAAGGTGTGACTTCCATG	ORF1b-nsp14: FAM-TAGTGTGATGCWATC ATGACTAG-TAMRA N: FAM-GCAAATTGTGCA ATTTGCGG-TAMRA
National Institute of Infectious Diseases, Japan ¹⁶	N gene	N: AAATTTGGGGACCAGGAAC	N: TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	N: FAM-ATGTCGCGCAT TGGCATGGA-BHQ
National Institute of Health, Thailand ¹⁶	N gene	N: CGTTTGGTGGACCCTCAGAT	N: CCCCACTGCGTCTCCATT	N: FAM- CAACTGGCAGTAACCBQHI

Hasil dari pemeriksaan RT-PCR ini adalah berupa nilai *cycle threshold* (Ct *value*), yang merupakan jumlah siklus PCR yang dibutuhkan untuk menghasilkan *fluorescence* yang dapat terdeteksi. Nilai Ct <37 menunjukkan infeksi COVID-19 yang positif secara klinis, nilai Ct >40 menunjukkan infeksi negatif, sedangkan nilai Ct 37-40 direkomendasikan

untuk menjalani pemeriksaan ulang. Nilai Ct yang semakin rendah menunjukkan *viral load* yang semakin tinggi. (Afzal, 2020; M. Park *et al.*, 2020) Saat ini, gen target yang sering digunakan dalam pemeriksaan RT-PCR adalah gen N, E, S, dan RdRp. (Ramakrishna *et al.*, 2020; WHO, 2020)

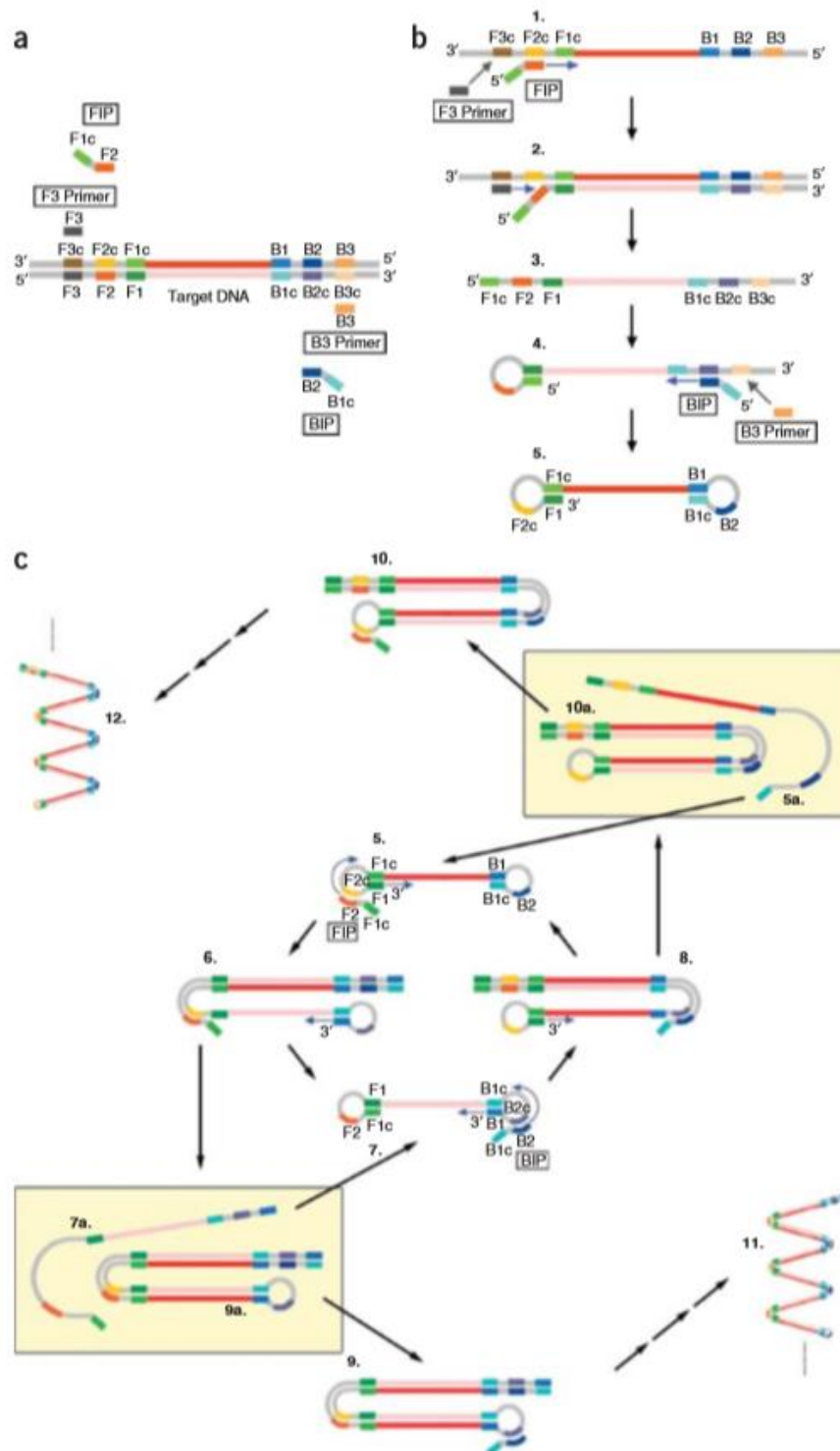
2.4 RT-LAMP sebagai Alternatif RT-PCR

Pemeriksaan RT-PCR yang digunakan sebagai standar baku emas saat ini memiliki beberapa kekurangan, seperti biaya yang besar dengan waktu analisis lebih lama, sekitar 4 sampai 6 jam, sehingga waktu *turn-around* dari sampel hingga hasil juga lebih lama. Selain itu, pemeriksaan ini membutuhkan laboratorium dengan fasilitas lengkap serta tenaga analis yang lebih terlatih yang mampu mengoperasikan alat-alat pemeriksaan tersebut. (Afzal, 2020)

Selain modalitas diagnostik seperti RT-PCR, para peneliti di dunia saat ini juga sedang mengembangkan beberapa metode lain untuk pemeriksaan SARS-CoV-2 seperti *reverse transcription loop mediated isothermal amplification* (RT-LAMP), *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), biosensor elektrokimia dan optic untuk deteksi RNA, serta metode deteksi virus maupun protein virus SARS-CoV-2. (Afzal, 2020; Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020)

Terdapat beberapa metode amplifikasi asam nukleat selain PCR, misalnya *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), *transcription-mediated amplification* (TMA), *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *isothermal multiple displacement amplification* (IMDA), *strand displacement amplification* (SDA), *signal-mediated amplification of RNA technology* (SMART), dan *helicase-dependent amplification* (HDA). Diantara beberapa metode ini, metode LAMP adalah metode yang paling sering digunakan setelah metode PCR. Selain lebih murah dan lebih cepat, metode ini hanya membutuhkan kondisi *isothermal* sehingga tidak bergantung pada ketersediaan *thermocycler*. (Parivallal and Vasanthakumar, 2020; Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020) Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa metode LAMP ini dapat

memberikan hasil dalam waktu yang singkat yaitu satu jam atau lebih cepat. (Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020) Metode LAMP juga bersifat *portable* sehingga dapat digunakan *on site*, serta tidak membutuhkan transpor sampel. (Cui *et al.*, 2020)



Gambar 6. Prinsip metode LAMP (Tomita *et al.*, 2008)

Prinsip metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) dijelaskan pada **Gambar 6**. **Gambar 6a** Menunjukkan tahap desain primer reaksi LAMP. Pada sekuens DNA target, ditentukan enam daerah berbeda yang diberi label F3, F2, F1, B1c, B2c, dan B3c dari ujung 5'. Jika c mewakili sekuens yang komplementer, maka sekuens F1c merupakan komplementer dari sekuens F1. Metode LAMP menggunakan dua *inner primer* (*forward*, FIP, dan *backward*, BIP) serta *outer primer* (F3 dan B3). FIP (BIP) adalah primer hybrid yang terdiri dari sekuens F1c (B1c) dan F2 (B2). (Tomita *et al.*, 2008)

Gambar 6b menunjukkan tahap pembentukan struktur baru dalam metode LAMP. Sintesis DNA dimulai dari menempelnya sekuens F2 dari FIP ke sekuens F2c pada DNA target yang akan memulai elongasi. Amplifikasi DNA pada BIP juga terjadi dengan cara yang sama. Primer F3 kemudian akan menempel pada sekuens F3c pada DNA target, dan terjadi sintesis DNA oleh *Bst* DNA polimerase yang menyebabkan pergeseran, di mana untai DNA yang memanjang dari FIP akan terlepas. Untai tunggal yang dilepaskan akan membentuk struktur *loop* pada ujung 5' (struktur 4). Sintesis DNA akan berlanjut dengan DNA untai tunggal sebagai cetakan, di mana primer BIP dan B3, akan menghasilkan struktur 5 dengan cara yang sama seperti yang dijelaskan sebelumnya. (Tomita *et al.*, 2008)

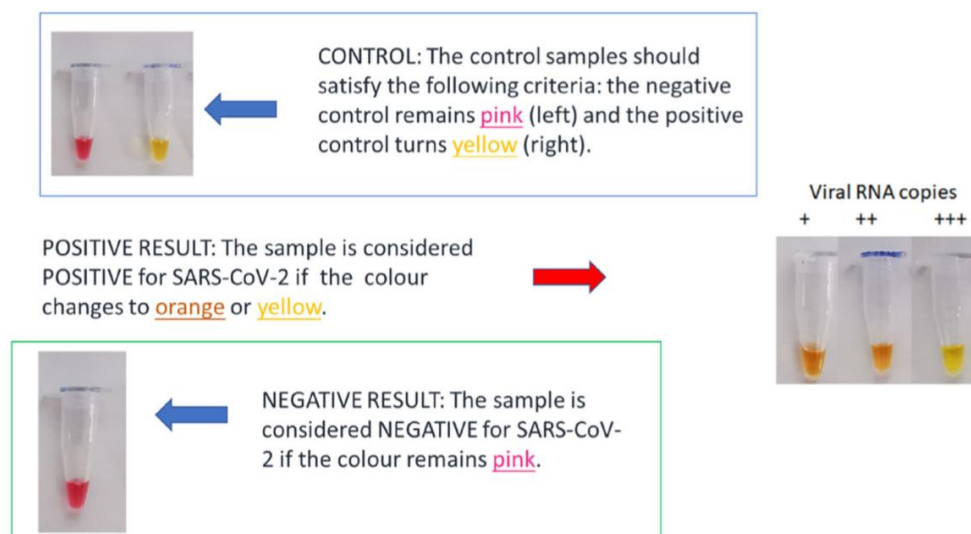
Gambar 6c menunjukkan langkah-langkah siklus amplifikasi. Dengan menggunakan struktur 5 sebagai cetakan, sintesis DNA dimulai dari sekuens F1 pada ujung 3', dan elongasi dimulai dari menempelnya FIP ke untai tunggal F2c dalam struktur *loop*. Langkah amplifikasi akan berlanjut hingga menghasilkan struktur 7 yang komplementer dengan struktur 5, serta struktur 8 juga akan menghasilkan struktur 5 dengan reaksi yang mirip. Secara khusus, struktur 7a dan 9a serta struktur 5a dan 10a (dalam kotak kuning) dihasilkan dari struktur 6 dan 8. Struktur 9a dan 10a kemudian masing-masing membentuk struktur 9 dan 10, sedangkan 7a dan 5a masing-masing membentuk struktur 7 dan 5. Pada proses ini, struktur yang lebih panjang (11, 12) juga diproduksi. (Tomita *et al.*, 2008)

Kunci utama dalam amplifikasi menggunakan metode LAMP sekaligus merupakan tahap pertama yang perlu diperhatikan adalah proses desain primer. (Tomita *et al.*, 2008) Proses desain ini dapat menggunakan *software* khusus untuk mendesain primer untuk metode LAMP, yaitu PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/>) dengan cara mengunggah sekuens gen target yang diinginkan. Sekuens genomik tersebut dapat diakses melalui *database* Genbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). (Mohon *et al.*, 2020) Beberapa syarat yang perlu diperhatikan untuk mendapatkan primer yang optimal yaitu:

- a. Kedua ujung *inner primer* tidak mengandung banyak AT.
- b. Nilai T_m untuk setiap domain harus berkisar antara ~ 55–65°C.
- c. 5' dari F2 hingga 5' dari F1 dan 5' dari B2 hingga 5' dari B1 harus sepanjang 40–60 bp.
- d. Panjang daerah DNA yang diamplifikasi (khususnya dari F2 hingga B2) tidak boleh lebih dari 4200 bp.
- e. Kemurnian primer sangat penting untuk kecepatan dan reproduktibilitas amplifikasi dan direkomendasikan menggunakan primer FIP dan BIP yang telah dimurnikan menggunakan HPLC. (Tomita *et al.*, 2008)

Untuk amplifikasi RNA, langkah *reverse transcriptase* perlu dilakukan sebelum proses LAMP, dan metode ini dikenal sebagai RT-LAMP. *Reverse transcriptase loop mediated isothermal amplification* (RT-LAMP) didefinisikan sebagai metode diagnostik molekular *isothermal* dengan cara mengamplifikasi DNA sampel dengan bantuan Bst DNA polimerase dan *reverse transcriptase*, seperti yang digunakan untuk mendeteksi RNA SARS-CoV-2. (Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020) Deteksi *amplicon* yang dihasilkan dapat dilakukan dengan mengidentifikasi produk sampingan berupa presipitat magnesium pirofosfat, pewarnaan *DNA-binding*, gel elektroforesis, maupun *real-time* fluoresens. (Shabani, Dowlatshahi and Abdekhodaie, 2020)

Beberapa pendekatan telah diketahui untuk mendeteksi produk RNA pada RT-LAMP, salah satunya adalah dengan menggunakan indikator pH seperti *phenol red* pada reaksi pada lingkungan buffer yang lemah. Seiring dengan berjalannya reaksi amplifikasi, terbentuk produk sampingan berupa proton yang akan menurunkan pH reaksi dan menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning sehingga dapat dinilai secara visual, baik menggunakan kamera telepon genggam sederhana, mesin fotokopi, *office scanner*, maupun *plate scanner* dengan kuantifikasi spektrofotometer. (Dao Thi *et al.*, 2020) Ilustrasi uji diagnostik molekular menggunakan RT-LAMP dengan interpretasi kolorimetrik dapat dilihat pada **Gambar 7**. (Cui *et al.*, 2020)

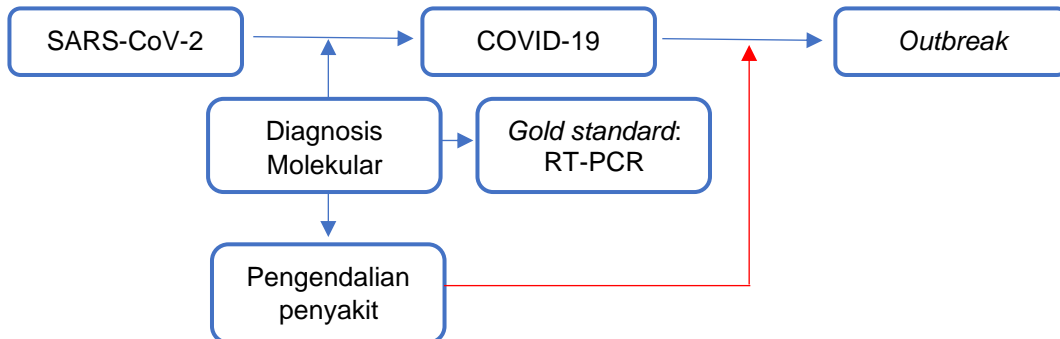


Gambar 7. Ilustrasi interpretasi uji diagnostik RT-LAMP SARS-CoV-2 (Cui *et al.*, 2020)

Sudah terdapat beberapa penelitian yang menggunakan metode RT-LAMP ini untuk mendeteksi SARS-CoV-2 dengan waktu yang dibutuhkan di bawah 60 menit. Beberapa dari penelitian tersebut menggunakan gen target yang berbeda, seperti ORF1ab (G.-S. Park *et al.*, 2020; Lamb *et al.*, 2020; W. E. Huang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), gen S (G.-S. Park *et al.*, 2020; W. E. Huang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020), gen N (Baek *et al.*, 2020; G.-S. Park *et al.*, 2020; Klein *et al.*, 2020; W. E. Huang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), maupun gen E (Lee *et al.*, 2020). Gen N yang mengkode protein

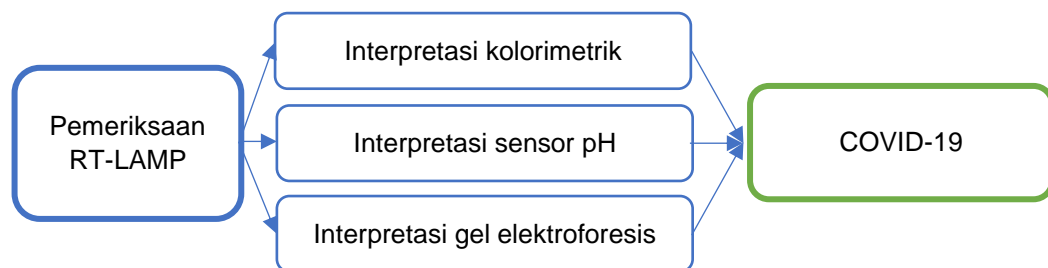
nukleokapsid sering digunakan sebagai target diagnosis molekular karena kandungan mRNA yang melimpah. (G.-S. Park *et al.*, 2020)

2.5 Kerangka Teori

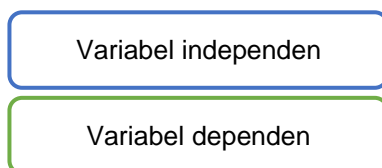


Gambar 8. Kerangka teori penelitian ini

2.6 Kerangka Konsep



Keterangan:



Gambar 9. Kerangka konsep penelitian ini

Variabel independen pada penelitian ini adalah pemeriksaan RT-LAMP dengan interpretasi kolorimetrik, gel elektroforesis, dan sensor pH. Sedangkan variabel dependen pada penelitian ini adalah kejadian COVID-19 yang dikonfirmasi melalui hasil pemeriksaan qRT-PCR.

2.7 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu:

Hipotesis nol (H_0): Tidak terdapat perbedaan performa diagnostik antara metode pembacaan kuantitatif sensor pH dan metode kualitatif pada pemeriksaan RT-LAMP untuk mendeteksi SARS-CoV-2 pada sampel berupa apusan nasofaring.

Hipotesis alternatif (H_1): Metode pembacaan kuantitatif sensor pH pada pemeriksaan RT-LAMP dapat memberikan performa diagnostik yang lebih baik daripada metode kualitatif untuk mendeteksi SARS-CoV-2 pada sampel berupa apusan nasofaring.

2.8 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Cara pengukuran	Skala
Variabel dependen			
Pemeriksaan RT-LAMP dengan metode interpretasi kolorimetrik	Pemeriksaan RT-LAMP dilakukan oleh peneliti sesuai metode penelitian. Interpretasi kolorimetrik dilakukan secara visual dengan mata telanjang peneliti.	Dilakukan secara visual menggunakan mata telanjang	Kategorik nominal dikotom: 1. Kuning dan orange: positif 2. Merah muda: negatif
Pemeriksaan RT-LAMP dengan metode pembacaan gel elektroforesis	Pemeriksaan gel elektroforesis dilakukan sesuai yang disebutkan pada metode penelitian	Interpretasi dilakukan di bawah sinar UV	Kategorik nominal dikotom 1. Positif 2. Negatif
Pemeriksaan RT-LAMP dengan metode pembacaan sensor pH	Pemeriksaan pH dengan sensor pH dilakukan sesuai yang disebutkan pada metode penelitian	Dilakukan dengan alat biosensor pH yang akan membaca pH larutan hasil reaksi secara otomatis	Numerik interval yang akan dikelompokkan menjadi kategorik nominal dikotom (positif/negatif) sesuai titik potong yang akan ditentukan
Variabel independen			
Kejadian COVID-19 yang dikonfirmasi dengan pemeriksaan qRT-PCR	Pemeriksaan qRT-PCR dilakukan oleh petugas laboratorium HUMRC dengan menggunakan sampel RNA yang telah diekstraksi	Data dari laboratorium HUMRC	Kategorik nominal dikotom (positif/negatif) sesuai hasil pemeriksaan berupa nilai Ct, nilai Ct <37 diinterpretasikan sebagai positif