

“Pengaruh Penyimpanan Sampel Terhadap Kemampuan Deteksi Virus Dengue Menggunakan Metode RT-PCR dan RT-LAMP”

Imelda Aprilia Anugrah Larasati / 221335300028

Dosen Pembimbing : Dr. Miftahul Mushlih, S.Si., M.Sc

Dosen Penguji : Chylen Setiyo Rini, S.Si., M.Si

Andika Aliviameita, S.ST., M.Si

D-IV Teknologi Laboratorium Medis

Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas Muhammadiyah Sidoarjo

2026



Pendahuluan

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus dengue dari genus Flavivirus dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*. WHO melaporkan kasus dengue meningkat dari 505.430 kasus pada tahun 2000 menjadi sekitar 14,6 juta kasus pada tahun 2024; Januari–Juli 2025 tercatat lebih dari 4 juta kasus dan >3.000 kematian.

Gejala awal dengue dapat berupa demam tinggi, nyeri otot dan sendi, sakit kepala, ruam kulit, serta perdarahan ringan. Gejala tersebut sering menyerupai penyakit infeksi lain, sehingga diagnosis klinis perlu didukung pemeriksaan laboratorium.

Pemeriksaan molekuler mendeteksi materi genetik virus secara langsung pada fase viremia. Namun, kualitas RNA sangat dipengaruhi oleh lama dan suhu penyimpanan sampel. Penurunan integritas RNA dapat menghambat reverse transcription dan amplifikasi pada RT-PCR.

Penelitian ini membandingkan kemampuan RT-PCR konvensional dan RT-LAMP dalam mendeteksi virus dengue pada sampel yang disimpan lebih dari 72 jam.

Metode Penelitian

Uji Etik

Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga Surabaya
No. 0609/HRECC.FODM/VI/2026

Tempat dan Waktu

RS Bhayangkara Pusdik
Sabhara Porong; pemeriksaan di
Lab Biologi Molekuler UMSIDA

Desain Penelitian

Komparatif laboratorik
terhadap sampel pasien
terduga dengue

Populasi dan Sampel

30 sampel whole blood
pasien terduga DBD
yang memenuhi kriteria

Teknik Sampling

Purposive sampling
berdasarkan kriteria klinis
dan kualitas spesimen

Metode Penelitian

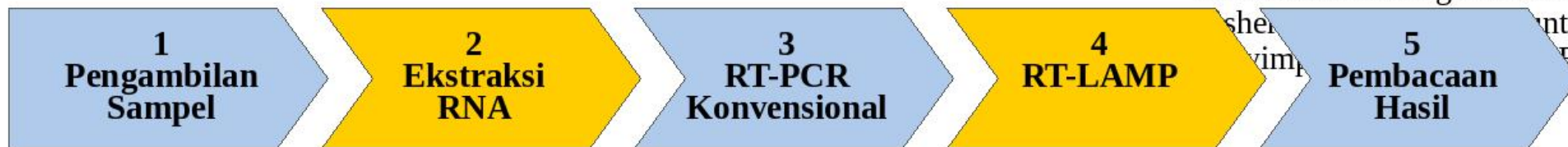
Alat dan Bahan

Alat : mikropipet, vortex, sentrifus, inkubator/waterbath, thermocycler Bio-Rad T100, elektroforesis set, UV transilluminator.

Bahan : sampel darah, kit ekstraksi RNA TIANGEN, primer RT-PCR dan RT-LAMP, PCR mix, enzim reverse transcriptase, Gel Red, TBE buffer, agarosa.

Tahap Penelitian

Analisis Data



Frekuensi dan persentase; uji McNemar exact untuk membandingkan RT-LAMP dan RT-PCR; uji t-test untuk lama RT-LAMP.

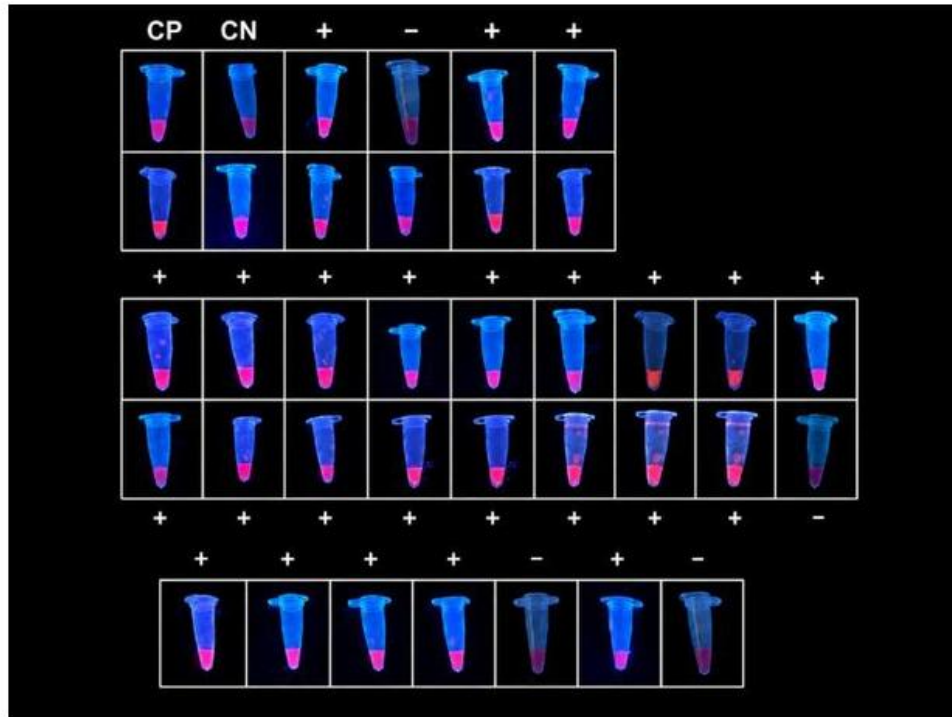
Hasil Penelitian dan Pembahasan

Gambaran Data Penelitian

Lama Simpan	Nomor Sampel	RT-LAMP (+)	RT-LAMP (-)	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	Total
72 jam	S26–S30	3 (60%)	2 (40%)	1 (20%)	4 (80%)	5
96 jam	S21–S25	4 (80%)	1 (20%)	0	5 (100%)	5
120 jam	S16–S20	5 (100%)	0	0	5 (100%)	5
144 jam	S11–S15	5 (100%)	0	0	5 (100%)	5
168 jam	S06–S10	5 (100%)	0	0	5 (100%)	5
192 jam	S01–S05	4 (80%)	1 (20%)	0	5 (100%)	5
Total	S01–S30	26 (86,7%)	4 (13,3%)	1 (3,3%)	29 (96,7%)	30

Inti data: seluruh kelompok lama simpan berisi 5 sampel. RT-LAMP masih mendeteksi virus dengue pada semua kelompok waktu 72–192 jam, sedangkan RT-PCR konvensional hampir seluruhnya tidak menunjukkan pita target.

Hasil RT-LAMP



Gambar. Hasil RT-LAMP berdasarkan perubahan warna

Data RT-LAMP

- Positif pada 26 dari 30 sampel (86,7%).
- Negatif pada 4 dari 30 sampel (13,3%).
- Hasil positif masih ditemukan pada semua kelompok lama penyimpanan 72, 96, 120, 144, 168, dan 192 jam.
- Pembacaan hasil dilakukan melalui perubahan warna setelah reaksi amplifikasi isothermal.

Makna: RT-LAMP tetap mampu mendeteksi sebagian besar sampel meskipun sampel telah disimpan >72 jam.

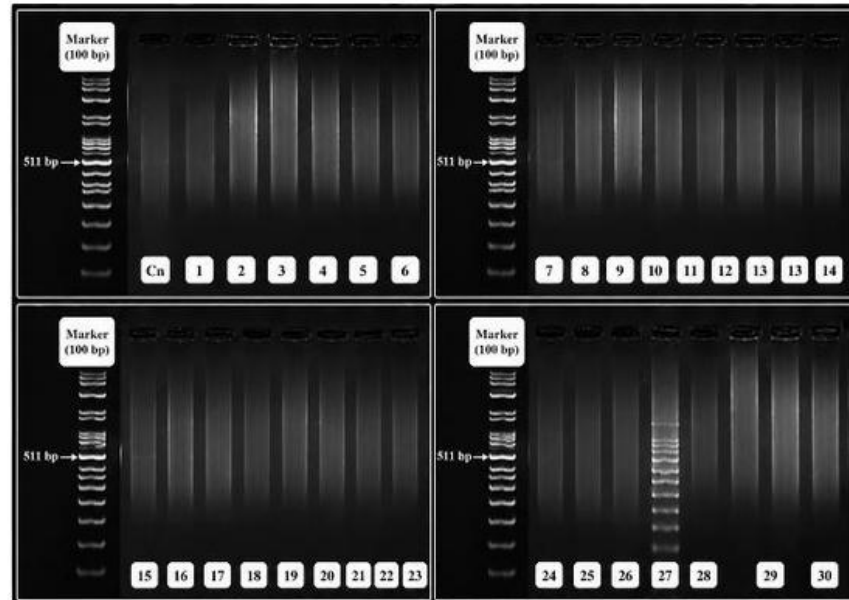
Pembahasan RT-LAMP

Penjelasan data RT-LAMP satu per satu

Lama simpan	Hasil RT-LAMP	Interpretasi
72 jam	3 positif; 2 negatif	Masih terdeteksi pada 60% sampel, tetapi ada 2 sampel negatif.
96 jam	4 positif; 1 negatif	Kemampuan deteksi meningkat menjadi 80%.
120 jam	5 positif; 0 negatif	Seluruh sampel terdeteksi.
144 jam	5 positif; 0 negatif	Seluruh sampel terdeteksi.
168 jam	5 positif; 0 negatif	Seluruh sampel terdeteksi.
192 jam	4 positif; 1 negatif	Masih terdeteksi 80%, tidak tampak penurunan linear.

Secara statistik, hubungan lama penyimpanan dengan hasil RT-LAMP tidak signifikan ($p > 0,05$). Artinya, pada data penelitian ini, lama simpan 72–192 jam tidak terbukti berhubungan langsung dengan positif/negatif RT-LAMP.

Hasil RT-PCR Konvensional



Keterangan:
Marker (100 bp) = DNA Ladder 100 bp. Panah menunjukkan posisi pita DNA 511 bp (target gen *C-prM*).
Cn = kontrol negatif (air bebas nuklease); 1–30 = sampel S01–S30.
Kontrol positif (CP) menggunakan RNA virus dengue (target gen NS1) yang diketahui positif.

Gambar. Visualisasi produk amplifikasi RT-PCR pada gel agarosa

Data RT-PCR

- Positif hanya pada 1 dari 30 sampel (3,3%), yaitu sampel nomor 27.
- Sebanyak 29 sampel (96,7%) tidak terdeteksi atau diduga mengalami degradasi.
- Pita DNA target tampak sekitar 511 bp pada sampel yang berhasil teramplifikasi.
- Sampel lain tidak memperlihatkan pita target yang jelas pada elektroforesis.

Makna: hasil RT-PCR yang rendah lebih menunjukkan penurunan kualitas RNA sampel, bukan berarti metode RT-PCR secara umum tidak baik.

Pembahasan RT-PCR

Mengapa RT-PCR banyak tidak terdeteksi?

1. Sampel disimpan >72 jam

RNA virus dengue berisiko mengalami degradasi atau fragmentasi selama penyimpanan dan penanganan sampel.

2. Reverse transcription terganggu

RNA yang tidak utuh dapat menghambat pembentukan cDNA sebagai template PCR.

3. Primer perlu target utuh

RT-PCR konvensional menggunakan satu pasang primer pada target C-prM ± 511 bp. Jika area primer atau segmen di antaranya rusak, amplifikasi tidak optimal.

4. Pita DNA tidak muncul

Produk amplifikasi tidak terbentuk atau sangat rendah sehingga tidak tampak pada gel agarosa.

Kesimpulan pembahasan RT-PCR: metode ini sensitif, tetapi sangat bergantung pada kualitas RNA, kestabilan sampel, serta keberhasilan reverse transcription dan amplifikasi.

Perbandingan Data RT-LAMP dan RT-PCR

Tabulasi Silang Hasil Pemeriksaan

Penjelasan Data

Hasil RT-LAMP	RT-PCR tidak terdeteksi	RT-PCR positif	Total
Negatif	4	0	4
Positif	25	1	26
Total	29	1	30

- Empat sampel negatif pada RT-LAMP juga tidak terdeteksi pada RT-PCR.
- Dua puluh lima sampel positif RT-LAMP tidak terdeteksi pada RT-PCR.
- Hanya satu sampel yang positif pada kedua metode.
- Uji McNemar exact menunjukkan $p < 0,001$, sehingga terdapat perbedaan signifikan antara hasil RT-LAMP dan RT-PCR.

Makna statistik: RT-LAMP memberikan hasil positif jauh lebih banyak dibandingkan RT-PCR pada kondisi sampel yang telah disimpan lebih dari 72 jam.

Pembahasan Utama

Interpretasi Metode

- RT-LAMP menggunakan beberapa primer dan bekerja pada suhu konstan, sehingga pembacaan dapat dilakukan melalui perubahan warna tanpa elektroforesis.
- RT-PCR konvensional memerlukan RNA yang lebih utuh karena target amplifikasi C-prM sekitar 511 bp harus tetap lengkap agar pita DNA terbentuk.
- Perbedaan hasil kemungkinan dipengaruhi oleh kualitas RNA, lama penyimpanan, kondisi penanganan, dan karakteristik target amplifikasi masing-masing metode.

Implikasi Penelitian

- Pada penelitian ini, RT-LAMP tampak lebih mampu mendeteksi virus dengue pada sampel yang telah mengalami penyimpanan.
- Hasil RT-PCR yang sebagian besar negatif tidak boleh langsung diartikan sebagai ketiadaan virus, karena dapat berkaitan dengan degradasi RNA.
- RT-LAMP berpotensi menjadi metode alternatif pada kondisi sampel terbatas atau kualitas RNA menurun, tetapi validasi lebih lanjut tetap diperlukan.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, RT-LAMP menunjukkan kemampuan deteksi yang lebih baik dibandingkan RT-PCR konvensional pada sampel yang disimpan lebih dari 72 jam. RT-LAMP mampu mendeteksi 26 dari 30 sampel (86,7%), sedangkan RT-PCR konvensional hanya mendeteksi 1 sampel (3,3%) dan 29 sampel lainnya (96,7%) tidak terdeteksi atau mengalami degradasi. Hasil uji McNemar menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara hasil deteksi RT-LAMP dan RT-PCR konvensional. Dengan demikian, RT-LAMP dapat menjadi metode alternatif yang potensial untuk deteksi virus dengue pada kondisi sampel yang telah mengalami penyimpanan.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] WHO, "Dengue and severe dengue." Accessed: Jun. 30, 2026. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- [2] Z. Hussain, S. Batool, A. U. Khan, R. Shaheen, M. Asif, and A. Ghulam, "Comparative Evaluation of ELISA, PCR, and NS1 Antigen Detection for Dengue Virus Diagnosis," *Insights-Journal of Health and Rehabilitation*, vol. 3, no. 1, pp. 574–580, 2025, doi: 10.71000/r4b32w02.
- [3] D. Anggraini and M. Ariyanti, "Aspek Klinis dan Pemeriksaan Laboratorium untuk Diagnosis Demam Berdarah Dengue," *Scientific Journal*, vol. 1, no. 1, pp. 70–78, 2022, doi: 10.56260/sciena.v1i1.13.
- [4] G. Iqbal, H. Javed, F. A. Raza, U. F. Gohar, W. Fatima, and M. Khurshid, "Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Real-Time PCR," *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, vol. 2023, pp. 1–8, 2023, doi: 10.1155/2023/3995366.
- [5] A. R. Siregar, T. Wibawa, and N. Wijayanti, "Early Detection and Serotyping of Dengue Viruses by Using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 2 Primers," *Indonesian Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 2, pp. 71–75, 2011, doi: 10.22146/ijbiotech.7836.
- [6] G. A. Santiago et al., "Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 7, 2013, doi: 10.1371/journal.pntd.0002311.
- [7] S. Aziz, R. C. Sari, D. Priyanto, and T. Ramadhani, "Design and Evaluation of Degenerate Primers Targeting the NS3 Gene for Detection of Dengue Virus by RT-PCR," *Acta Biochimica Indonesiana*, vol. 8, no. 1, pp. 190–198, 2025, doi: 10.32889/actabioina.190.
- [8] S. Kumar, S. Sharma, N. Bhardwaj, V. Pande, D. Savargaonkar, and A. R. Anvikar, "Advanced Lyophilised Loop Mediated Isothermal Amplification (L-LAMP) Based Point of Care Technique for the Detection of Dengue Virus," *Journal of Virological Methods*, vol. 293, pp. 114168–114168, 2021, doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114168.
- [9] L. Hurtado-Gómez, M. A. Castro-Jiménez, J. D. Sepúlveda-Arias, J. A. Cardona-Ospina, and A. J. Rodríguez-Morales, "Development and Validation of a Combined RT-LAMP Assay for the Rapid and Sensitive Detection of Dengue Virus in Clinical Samples from Colombia," *Diagnostics*, vol. 15, no. 5, pp. 570–570, 2025, doi: 10.3390/diagnostics15050570.
- [10] J. G. Kim, S. Yun, Y. Kim, S. Lee, and H. Kim, "Rapid Discriminative Detection of Dengue Viruses via Loop-Mediated Isothermal Amplification," *Talanta*, vol. 190, pp. 391–396, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.08.019.
- [11] K. Rani, S. Sharma, A. Gupta, R. Verma, and P. Singh, "Dengue Virus: A Global Concern and Advances in Treatment Strategies," *Microbe*, vol. 9, pp. 100591–100591, 2025, doi: 10.1016/j.microb.2025.100591.
- [12] S. C. Kaushik, S. Singh, and P. Srivastava, "Detection of Dengue Virus in Human Blood Samples from Selected Localities of Delhi and NCR," *Journal of Communicable Diseases*, vol. 51, no. 3, pp. 10–14, 2019, doi: 10.24321/0019.5138.201920.
- [13] A. A. Rogers, R. E. Baumann, G. A. Borillo, R. M. Kagan, H. J. Batterman, M. M. Galdzicka, and E. M. Marlowe, "Evaluation of transport media and specimen transport conditions for the detection of SARS-CoV-2 by use of real-time reverse transcription-PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 58, no. 8, pp. e00708–20–e00708–20, 2020, doi: 10.1128/JCM.00708-20.
- [14] S. A. Bustin and T. Nolan, "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction," *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 15, no. 3, pp. 155–166, 2004.
- [15] B. La Scola and D. Raoult, "Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998)," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, no. 6, pp. 1899–1905, 1999, doi: 10.1128/JCM.37.6.1899-1905.1999.
- [16] M. Parida et al., "Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 2895–2903, 2005, doi: 10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005.

