

The Effect of RNA Storage on Dengue Virus Detection Capability Using Reverse Transcription PCR and Reverse Transcription LAMP Methods [Pengaruh Penyimpanan RNA Terhadap Kemampuan Deteksi Virus Dengue Menggunakan Metode *Reverse Transcription* PCR dan *Reverse Transcription LAMP*]

Imelda Aprilia Anugrah Larasati ¹⁾, Miftahul Mushlih ^{*,1)}

¹⁾ Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

* Email Penulis Korespondensi: mif.mushlih@umsida.ac.id

Abstract. *Dengue Hemorrhagic Fever remains a significant public health concern, with East Java Province recording an incidence rate of 78.83 per 100,000 population in 2024. Molecular detection of dengue virus is strongly influenced by RNA quality in clinical specimens, particularly when sample examination is delayed prior to laboratory analysis. This study aimed to analyze the ability to detect dengue virus in samples stored for ≥ 72 hours using conventional RT-PCR and RT-LAMP, and to compare the performance of both methods. A comparative laboratory design was applied to 30 whole blood samples from patients with suspected dengue, selected through purposive sampling and stored at 0–4°C across six storage durations (72, 96, 120, 144, 168, and 192 hours). RNA was extracted using the spin-column method, then examined using conventional RT-PCR targeting the C-prM gene (511 bp) and RT-LAMP with six primers, read through colorimetric change. The relationship between storage duration and RT-LAMP results was analyzed using the Fisher–Freeman–Halton test, while differences between RT-PCR and RT-LAMP results were analyzed using the McNemar test. RT-LAMP yielded positive results in 26 samples (86.7%), whereas conventional RT-PCR detected only 1 sample (3.3%). The Fisher–Freeman–Halton test showed no significant association between storage duration and RT-LAMP results ($p=0.660$), while the McNemar test showed a significant difference between RT-PCR and RT-LAMP outcomes ($p<0.001$). These findings indicate that RT-LAMP remains capable of detecting dengue virus in most long-stored samples, suggesting its potential as an alternative method when RNA quality has declined due to delayed sample handling.*

Keywords - *Dengue virus, conventional RT-PCR, RT-LAMP, sample storage duration, RNA degradation*

Abstrak. *Dengue masih menjadi masalah kesehatan yang signifikan, dengan Provinsi Jawa Timur mencatat incidence rate 78,83 per 100.000 penduduk pada tahun 2024. Diagnosis dengue berbasis molekuler dengue sangat dipengaruhi oleh kualitas RNA pada spesimen klinis, terutama jika sampel mengalami penundaan pemeriksaan sebelum dianalisis di laboratorium. Penelitian ini bertujuan menganalisis kemampuan deteksi virus dengue pada sampel yang disimpan ≥ 72 jam menggunakan RT-PCR konvensional dan RT-LAMP, serta membandingkan performa kedua metode tersebut. Desain penelitian berupa komparatif laboratorik terhadap 30 sampel whole blood pasien terduga DBD yang dipilih secara purposive sampling, disimpan pada suhu 0–4°C dengan enam variasi lama simpan (72, 96, 120, 144, 168, dan 192 jam). RNA diekstraksi menggunakan metode spin column, kemudian diperiksa menggunakan RT-PCR konvensional yang menargetkan gen C-prM (target 511 bp) dan RT-LAMP dengan enam primer yang dibaca berdasarkan perubahan warna. Hubungan lama penyimpanan dengan hasil RT-LAMP dianalisis menggunakan uji Fisher–Freeman–Halton, sedangkan perbedaan hasil RT-PCR dan RT-LAMP dianalisis menggunakan uji McNemar. Hasil penelitian menunjukkan RT-LAMP positif pada 26 sampel (86,7%), sementara RT-PCR konvensional hanya positif pada 1 sampel (3,3%). Uji Fisher–Freeman–Halton menunjukkan tidak terdapat hubungan signifikan antara lama penyimpanan dan hasil RT-LAMP ($p=0,660$), sedangkan uji McNemar menunjukkan perbedaan signifikan antara hasil RT-PCR dan RT-LAMP ($p<0,001$). RT-LAMP tetap mampu mendeteksi virus dengue pada sebagian besar sampel yang telah disimpan lama, sehingga berpotensi menjadi metode alternatif ketika kualitas RNA sudah menurun akibat keterlambatan penanganan sampel.*

Kata Kunci - *Virus dengue, RT-PCR konvensional, RT-LAMP, lama penyimpanan sampel, degradasi RNA*

I. PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus dengue dari genus *Flavivirus* dan ditularkan terutama melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* [1]. Data WHO mencatat peningkatan jumlah kasus dengue dari 505.430 kasus pada tahun 2000 menjadi sekitar 14,6 juta kasus pada tahun 2024. Bahkan pada periode Januari – Juli 2025 saja, tercatat lebih dari 4 juta kasus dengue dan lebih dari 3.000 kematian dari 97 negara [1]. Di Indonesia sendiri, Provinsi Jawa Timur tercatat memiliki *incidence rate* DBD sebesar 78,83 per 100.000 penduduk pada tahun 2024, angka ini menjadi salah satu yang tertinggi secara nasional [19], sehingga upaya diagnosis dini di daerah ini tetap penting untuk terus ditingkatkan. Gejala awal dengue umumnya berupa demam tinggi, nyeri otot dan sendi, sakit kepala, ruam kulit, hingga perdarahan ringan, yang seringkali mirip dengan gejala penyakit infeksi lain [3].

Karena gambaran klinis dengue mudah tertukar dengan penyakit infeksi lain, pemeriksaan laboratorium menjadi bagian penting untuk memastikan diagnosis. Pemeriksaan yang biasa digunakan antara lain pemeriksaan hematologi, deteksi antigen NS1, pemeriksaan antibodi IgM dan IgG, serta pemeriksaan molekuler [2][3]. Pemeriksaan hematologi seperti jumlah trombosit dan kadar hematokrit sebenarnya kurang spesifik untuk dengue, sehingga posisinya lebih sebagai pemeriksaan penunjang saja [3]. Antigen NS1 baru bisa diandalkan pada fase awal infeksi, sementara IgM dan IgG baru terbentuk beberapa hari setelah infeksi berlangsung, sehingga tidak bisa dipakai untuk deteksi dini [3]. Masing – masing metode ini, baik ELISA, NS1, maupun PCR, memiliki kelebihan dan keterbatasannya sendiri, sehingga pemilihan metode perlu disesuaikan dengan fase infeksi pasien [2].

Di antara metode – metode tersebut, pemeriksaan molekuler dianggap paling unggul karena dapat mendeteksi materi genetik virus secara langsung selama fase viremia, biasanya menggunakan sampel *whole blood* karena virus dengue banyak beredar di sirkulasi darah pada fase ini [4][12]. Karena genom virus dengue berupa RNA, pemeriksaan RT-PCR memerlukan tahap *reverse transcription* untuk mengubah RNA menjadi *complementary DNA* (cDNA) sebelum bisa diamplifikasi [5][6]. Selain mendeteksi keberadaan virus, RT-PCR konvensional juga bisa digunakan untuk menentukan serotipe dengue yang menginfeksi pasien [5]. Namun keberhasilan pemeriksaan ini sangat bergantung pada kecocokan primer dengan gen target serta kondisi amplifikasi yang dipakai [7].

Kemampuan RT-PCR konvensional dalam mendeteksi virus dengue turut dipengaruhi oleh pemilihan wilayah target amplifikasi, sebagaimana ditunjukkan pada penelitian yang membandingkan tiga primer berbeda untuk deteksi dan serotyping virus dengue pada 171 anak dengan kecurigaan klinis dengue di India [23]. Primer yang menargetkan gen C–prM berukuran 511 bp berhasil mendeteksi 59,5% dari sampel yang telah dikonfirmasi positif secara serologis. Ukuran primer ini sama dengan yang dipakai pada penelitian ini, sementara primer C–prM berukuran 654 bp pada penelitian tersebut justru menunjukkan kemampuan deteksi yang lebih tinggi, yaitu 75,2% [23]. Temuan tersebut menunjukkan bahwa kemampuan RT-PCR konvensional dalam mendeteksi dengue tidak semata-mata ditentukan oleh keberadaan target gen, tetapi juga oleh pemilihan wilayah target serta ukuran produk amplifikasi yang digunakan.

Selain RT-PCR, metode molekuler lain yang belakangan mulai banyak digunakan untuk deteksi dengue adalah RT-LAMP (*reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*). Berbeda dengan RT-PCR yang memerlukan mesin *thermal cycler* untuk mengatur perubahan suhu berulang, RT-LAMP bekerja pada suhu konstan dan menggunakan beberapa pasang primer yang menempel pada beberapa titik di sepanjang gen target, sehingga reaksinya berlangsung lebih cepat dan hasilnya bisa langsung diamati lewat perubahan warna tanpa perlu elektroforesis [8][10]. Hal ini didasarkan pada penelitian yang pertama kali mengembangkan metode LAMP, yang menunjukkan bahwa penggunaan serangkaian primer khusus yang mengenali beberapa wilayah berbeda pada DNA target memungkinkan amplifikasi berlangsung secara spesifik, efisien, dan cepat pada kondisi suhu tetap, tanpa memerlukan tahap denaturasi panas seperti pada PCR konvensional [24]. Karena tidak bergantung pada peralatan yang rumit, RT-LAMP dinilai lebih praktis digunakan di fasilitas kesehatan dengan sumber daya terbatas, dan penelitian melaporkan sensitivitas RT-LAMP yang sebanding atau bahkan lebih baik dibandingkan RT-PCR pada sampel dengue [9][16].

Selain metode yang digunakan, kondisi penyimpanan sampel juga menjadi faktor yang tidak kalah penting untuk diperhatikan, karena berkaitan langsung dengan kualitas RNA yang akan diperiksa [13][14]. RNA yang mengalami penurunan kualitas dapat menghambat proses *reverse transcription*, sehingga jumlah target yang berhasil diamplifikasi pada RT-PCR ikut berkurang [13]. Selain itu, media transportasi, suhu, dan lama penanganan sampel sebelum diperiksa juga ikut memengaruhi kestabilan materi genetik virus [14], ditambah lagi proses beku-cair (*freeze-thaw*) yang berulang justru mempercepat kerusakan RNA [15]. Beberapa penelitian sebelumnya membuktikan keterkaitan antara lama penyimpanan dan penurunan kualitas RNA ini. Kualitas RNA sampel darah dilaporkan mulai menurun setelah disimpan lebih dari 24 jam, dan penyimpanan pada suhu rendah tidak sepenuhnya mampu mencegah degradasi tersebut [17]. Hasil penelitian lain menunjukkan kestabilan RNA virus pada sampel darah juga berkurang seiring waktu, meski RNA masih relatif stabil sampai sekitar 72 jam penyimpanan pada suhu 0–4°C [18]. Penelitian yang secara khusus meneliti virus dengue melaporkan hasil yang sedikit berbeda, yaitu RNA dengue pada sampel

darah yang disimpan dalam bentuk kering di atas kertas saring tetap stabil dan masih dapat dideteksi melalui RT-PCR hingga 9 minggu penyimpanan, baik pada suhu ruang, 4°C, maupun -70°C [27]. Meskipun demikian, penelitian tersebut menggunakan metode penyimpanan berbeda (darah kering pada kertas saring, bukan sampel cair langsung) dari yang digunakan pada penelitian ini, sehingga belum banyak penelitian yang secara langsung membandingkan kemampuan deteksi RT-PCR konvensional dengan RT-LAMP pada sampel dengue klinis cair dengan variasi waktu penyimpanan yang jelas.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan deteksi virus dengue pada sampel yang disimpan selama ≥ 72 jam serta membandingkan kinerja metode RT-PCR konvensional dan RT-LAMP dalam mendeteksi virus tersebut. Selain itu, penelitian ini menganalisis kemungkinan pengaruh degradasi RNA dan karakteristik daerah target amplifikasi terhadap perbedaan hasil deteksi yang diperoleh dari kedua metode.

II. METODE

Penelitian ini menggunakan desain kualitatif komparatif laboratorik. Penelitian ini telah melalui uji ke-laiikan etik (ethical clearance) yang diterbitkan oleh Komisi Kelaikan Etik Penelitian dan Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya dengan nomor 0609/HRECC.FODM/VI/2026. Pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2026, sedangkan analisis laboratorium yang meliputi ekstraksi RNA, pemeriksaan RT-PCR, dan RT-LAMP dilaksanakan pada bulan Juni – Juli 2026. Sampel penelitian merupakan pasien terduga DBD yang diperoleh dari Rumah Sakit Bhayangkara Pusdik Sabhara Porong, kemudian diperiksa di Laboratorium Biologi Molekuler Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode purposive sampling berdasarkan kriteria klinis dan kualitas spesimen, dengan jumlah sampel yang digunakan sebanyak 30 sampel pasien terduga DBD.

Kriteria inklusi dalam penelitian ini meliputi pasien berusia ≥ 1 tahun dengan diagnosis klinis terduga DBD, mengalami demam akut selama 2–7 hari disertai minimal dua gejala klinis dengue, serta berada pada fase febril, yaitu fase demam akut yang berlangsung selama 2–7 hari sejak onset demam. Selain itu, pasien juga harus memiliki hasil pemeriksaan hematologi yang menunjukkan adanya trombositopenia, yaitu jumlah trombosit kurang dari 150.000/ μ L. Kriteria eksklusi dalam penelitian ini meliputi sampel dengan hemolisis berat, volume yang tidak mencukupi untuk ekstraksi RNA, mengalami kontaminasi, atau kondisi lain yang dapat menurunkan mutu hasil ekstraksi RNA.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung vacutainer EDTA untuk pengambilan sampel darah, cooler box dan ice pack untuk transportasi sampel dari rumah sakit ke laboratorium, lemari pendingin (refrigerator) untuk menyimpan sampel pada suhu 0–4°C, mikropipet dan tip berbagai ukuran, tabung mikrosentrifus (microtube), vortex mixer, sentrifuge, mesin PCR Bio-Rad T100 untuk proses reverse transcription dan amplifikasi, perangkat elektroforesis gel agarosa, serta UV transilluminator untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi RT-PCR. Bahan yang digunakan meliputi kit ekstraksi RNA merek TIANGEN yang terdiri atas buffer R2, kloroform, etanol, spin column, buffer pencuci RD, RW1, dan RW2, serta RNase-free ddH₂O. Pada pemeriksaan RT-PCR konvensional, bahan yang digunakan meliputi PCR-mix, enzim reverse transcriptase, sepasang primer spesifik virus dengue (forward dan reverse), nuclease-free water, agarosa 1%, buffer TBE, gel red sebagai pewarna DNA, serta DNA ladder 100 bp sebagai penanda ukuran. Pada pemeriksaan RT-LAMP, bahan yang digunakan meliputi buffer reaksi, enzim dengan aktivitas strand displacement dan reverse transcription, nuclease-free water, serta enam primer spesifik virus dengue yang terdiri atas F3, B3, FIP, BIP, LoopF, dan LoopB.

Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan kit ekstraksi RNA (TIANGEN, China). Sebanyak 250 μ L sampel (serum atau darah utuh) dicampurkan dengan 750 μ L buffer R2, kemudian divortex dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 200 μ L kloroform, divortex kembali, diinkubasi selama 3 menit, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian ditambahkan etanol sebanyak 0,5 kali volumenya, lalu dimasukkan ke dalam spin column. Kolom dicuci secara berturut – turut menggunakan buffer RD, RW1, dan RW2, kemudian disentrifugasi kembali untuk menghilangkan sisa larutan pencuci. Tahap akhir dilakukan dengan mengelusi RNA menggunakan 30–100 μ L RNase-free ddH₂O.

Setelah dilakukan ekstraksi RNA, sampel disimpan pada suhu 0–4°C dengan enam variasi lama penyimpanan, yaitu 72 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam, 168 jam, dan 192 jam, sebelum digunakan pada pemeriksaan RT-PCR dan RT-LAMP. Lama penyimpanan tiap sampel dicatat dalam satuan jam untuk memungkinkan analisis berdasarkan durasi aktual. Pemeriksaan RT-LAMP dilakukan dalam volume reaksi total 25 μ L, dengan komposisi 2 $\times$ PCR-mix sebanyak 12,5 μ L, RNA hasil ekstraksi sebagai template sebanyak 3,0 μ L, enzim M-MuLV RT sebanyak 1,0 μ L, enzim Bst 2.0 sebanyak 1,0 μ L, primer FIP sebanyak 2,0 μ L, primer BIP sebanyak 2,0 μ L, LoopF sebanyak 1,0 μ L, LoopB sebanyak 1,0 μ L, F3 sebanyak 0,5 μ L, B3 sebanyak 0,5 μ L, dan sisanya nuclease-free water hingga mencapai volume akhir 25 μ L. Keenam primer tersebut terdiri atas dua primer luar (outer primer), yaitu F3 (5'-AGTTTTTGTGAGGGTGGTG-3') dan B3 (5'-CCGACCTCCTTCTCCTTG-3'), lalu dua primer dalam (inner primer), yaitu FIP (5'-TCTAAGCTTCGAGTGAGGAGCTTAAGATGGTTTCAACGAT-3') dan BIP (5'-GGTTTGGTTTGGTTTGGTTTGGTTTCTAGTTGGTCTCA-3'); serta dua loop primer, yaitu LoopF (5'-

TGGTTCTGGTGGTGAATC-3') dan LoopB (5'-CCTCTTTCTTTGAGCTCT-3'). Seluruh komponen reaksi dicampurkan dalam satu tabung, kemudian dipanaskan menggunakan waterbath pada suhu 60°C selama 60 menit, dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 80°C selama 2 menit. Setelah proses inkubasi selesai, ke dalam campuran reaksi ditambahkan gel red dengan pengenceran 100 kali sebanyak 0,5 µL sebagai indikator visualisasi warna. Selama proses inkubasi berlangsung, terjadi reaksi reverse transcription dan amplifikasi secara bersamaan, sehingga RNA target langsung diperbanyak tanpa memerlukan tahap pembentukan cDNA secara terpisah. Hasil amplifikasi diamati secara visual berdasarkan perubahan warna larutan, dengan perubahan warna menjadi merah muda (pink) menunjukkan hasil positif, sedangkan warna yang tetap ungu menunjukkan hasil negatif.

Pemeriksaan RT-PCR konvensional diawali dengan tahap reverse transcription, yaitu proses mengubah RNA hasil ekstraksi menjadi complementary DNA (cDNA), dengan volume reaksi total 25 µL yang terdiri atas 2× PCR-mix sebanyak 12,5 µL, RNA hasil ekstraksi sebanyak 5 µL, forward primer sebanyak 1 µL, reverse primer sebanyak 1 µL, enzim reverse transcriptase sebanyak 0,5 µL, dan nuclease-free water sebanyak 5 µL. Reaksi reverse transcription dilakukan pada suhu 55°C selama 60 menit, dilanjutkan dengan inaktivasi enzim pada suhu 70°C selama 5 menit. Selanjutnya, cDNA yang terbentuk diamplifikasi menggunakan mesin PCR Bio-Rad T100 dengan sepasang primer spesifik virus dengue yang menargetkan gen C-prM (capsid-premembrane), dimana terdiri dari forward primer 5'-TCAATATTGCTGAAACGCGAGAGAAACCCG-3' dan juga reverse primer 5'TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3', dengan produk amplifikasi yang diharapkan berukuran 511 bp. Program amplifikasi PCR terdiri atas denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus yang masing-masing terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, annealing pada suhu 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Produk amplifikasi selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dalam buffer TBE pada tegangan 100 volt selama 30 menit, kemudian divisualisasikan menggunakan UV transilluminator. Sampel dinyatakan terdeteksi positif apabila terbentuk pita DNA pada ukuran 511 bp yang sejajar dengan marker 100 bp, sedangkan sampel dinyatakan tidak terdeteksi apabila pita DNA pada ukuran tersebut tidak muncul.

Data disajikan dalam bentuk frekuensi dan persentase untuk hasil terdeteksi, tidak terdeteksi, dan tidak valid. Perbedaan hasil berpasangan antara RT-PCR konvensional dan RT-LAMP dianalisis menggunakan uji McNemar (exact), karena kedua pemeriksaan dilakukan pada sampel yang sama dan menghasilkan data kat-egori berpasangan. Hubungan antara lama penyimpanan sampel dengan hasil pemeriksaan RT-LAMP dianalisis menggunakan uji Fisher-Freeman-Halton (exact) dengan pendekatan Monte Carlo, mengingat jumlah sel dengan frekuensi harapan kurang dari 5 cukup banyak pada tabulasi silang. Nilai $p < 0,05$ digunakan sebagai batas kemaknaan statistik pada seluruh pengujian.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 30 sampel diperiksa menggunakan RT-PCR konvensional dan RT-LAMP. Hasil menunjukkan bahwa hampir seluruh sampel pada RT-PCR konvensional tidak memperlihatkan pita DNA target pada elektroforesis gel agarosa, kecuali satu sampel (sampel nomor 27) yang menunjukkan pita DNA jelas pada ukuran 511 bp. Dari 30 sampel yang diperiksa, hanya 1 sampel (3,3%) yang terdeteksi positif melalui RT-PCR konvensional, sedangkan 29 sampel lainnya (96,7%) tidak menunjukkan hasil amplifikasi. Sementara itu, pemeriksaan RT-LAMP menunjukkan hasil positif pada 26 sampel (86,7%) dan negatif pada 4 sampel (13,3%). Rincian distribusi kedua hasil pemeriksaan berdasarkan lama penyimpanan sampel disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi Hasil RT-LAMP dan RT-PCR Berdasarkan Lama Penyimpanan Sampel, serta Hasil Uji Fisher–Freeman–Halton terhadap Hubungan Lama Penyimpanan dengan Hasil RT-LAMP

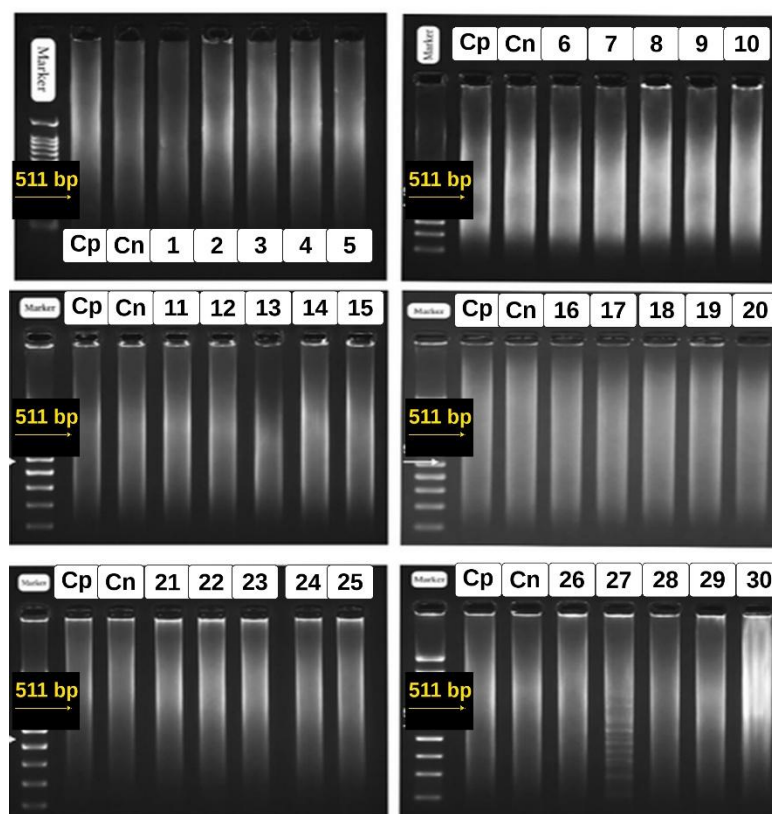
Lama Penyimpanan	Nomor Sampel	RT-LAMP Positif n (%)	RT-LAMP Negatif n (%)	RT-PCR Positif n (%)	RT-PCR Negatif n (%)	Total
72 jam	S26–S30	3 (60%)	2 (40%)	1 (20%)	4 (80%)	5
96 jam	S21–S25	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	5 (100%)	5
120 jam	S16–S20	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)	5
144 jam	S11–S15	5 (100%)	0 (0%)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

Uji Fisher–Freeman–Halton **p=0,660**

Persentase pada tiap baris kelompok waktu dihitung terhadap jumlah sampel dalam kelompok tersebut (n=5), sedangkan persentase pada baris Total dihitung terhadap keseluruhan sampel penelitian (n=30). RT-PCR dinyatakan negatif apabila tidak terbentuk pita DNA pada ukuran target 511 bp, termasuk kondisi yang menunjukkan pola smear akibat degradasi RNA. Uji Fisher–Freeman–Halton pada tabel 1 digunakan untuk menguji hubungan antara lama penyimpanan dengan hasil RT-LAMP, dan tidak diterapkan pada data RT-PCR karena hampir seluruh sampel menunjukkan hasil negatif sehingga variasi datanya tidak memadai untuk diuji secara statistik.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa RT-LAMP tetap mampu mendeteksi virus dengue pada seluruh kelompok waktu penyimpanan (72–192 jam), dengan proporsi hasil positif sebesar 60% pada kelompok 72 jam, meningkat menjadi 80% pada kelompok 96 jam dan 192 jam, serta mencapai 100% pada kelompok 120, 144, dan 168 jam. RT-PCR konvensional menunjukkan pola yang jauh berbeda: hanya satu sampel positif yang ditemukan, yaitu pada kelompok 72 jam, sementara seluruh kelompok waktu lainnya tidak menunjukkan hasil amplifikasi sama sekali. Penurunan kemampuan deteksi RT-PCR ini sudah terjadi sejak durasi penyimpanan paling pendek yang diuji, dan berlanjut konsisten hingga durasi terpanjang, kondisi ini dapat dijelaskan oleh sifat RNA virus yang memang rentan terdegradasi seiring bertambahnya waktu penyimpanan [13][14]. Elektroforesis RT-PCR pada penelitian ini dijalankan secara bertahap sesuai kelompok lama penyimpanan sampel, sehingga hasil visualisasi pada Gambar 1 mewakili kondisi amplifikasi masing-masing kelompok waktu secara representatif, bukan hasil dari satu kali proses running gabungan seluruh sampel.

Secara keseluruhan, RT-LAMP mampu mendeteksi virus dengue pada 26 dari 30 sampel (86,7%), sedangkan RT-PCR konvensional hanya mendeteksi 1 dari 30 sampel (3,3%). Hasil RT-PCR yang sebagian besar tidak terdeteksi tidak menunjukkan bahwa metode tersebut kurang baik, melainkan menunjukkan bahwa keberhasilan RT-PCR sangat bergantung pada keutuhan RNA pada satu wilayah target, yang rentan terganggu oleh proses penyimpanan [13][14]. Pola ini sejalan dengan laporan penelitian dengue terdahulu, yang mendapati sensitivitas RT-LAMP setara atau bahkan melampaui RT-PCR pada sampel klinis, termasuk pada kondisi sampel dengan kualitas yang tidak lagi optimal [16][20]. Dengan demikian, RT-LAMP dapat dipertimbangkan sebagai metode alternatif yang lebih andal untuk deteksi virus dengue, khususnya pada kondisi sampel yang telah mengalami penundaan pemeriksaan atau penyimpanan dalam durasi cukup lama.



Gambar 1. Visualisasi produk amplifikasi RT-PCR konvensional pada gel agarosa.

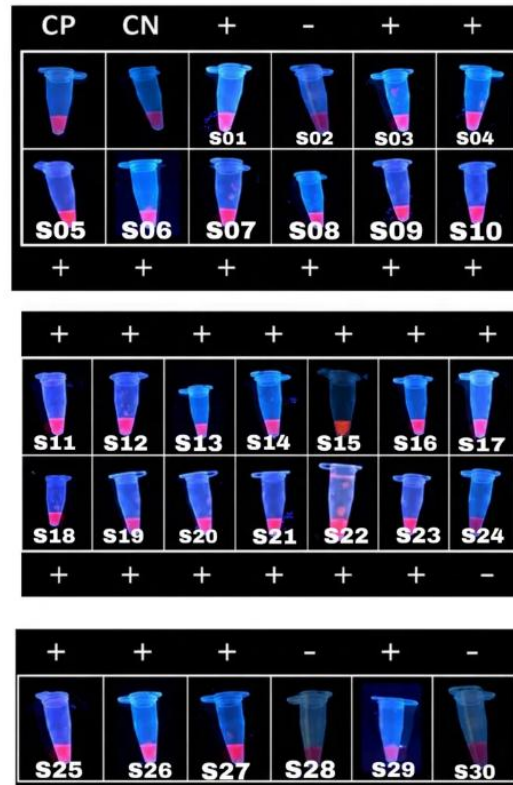
Produk amplifikasi target menunjukkan ukuran pita sebesar 511 bp berdasarkan penanda ukuran DNA (DNA ladder).

Kontrol positif (CP) pada penelitian ini menggunakan sampel pasien yang sebelumnya dinyatakan positif dengue, bukan reagen kontrol komersial yang sudah terstandarisasi. Penggunaan sampel klinis sebagai kontrol positif umum dilakukan ketika kontrol standar tidak tersedia. Namun, pendekatan ini memiliki keterbatasan karena stabilitas dan konsentrasi RNA target pada sampel klinis tidak selalu konsisten seperti pada kontrol sintesis atau komersial yang telah dikalibrasi [21]. Dengan demikian, status positif pada kontrol tersebut tidak dapat ditentukan secara spesifik berdasarkan jenis antibodi (IgG atau IgM) maupun keberadaan antigen NS1 karena tidak dilakukan pemeriksaan lanjutan untuk membedakan parameter tersebut. Terdapat kemungkinan bahwa sampel kontrol positif telah mengalami penurunan kualitas sebelum atau selama proses ekstraksi RNA, sehingga hasil amplifikasi menunjukkan pola smear pada elektroforesis, bukan pita tunggal yang spesifik [13][14]. Pola serupa juga dilaporkan pada penelitian yang mengulas pengaruh integritas RNA terhadap kinerja RT-PCR, yang menunjukkan bahwa RNA dengan tingkat degradasi tinggi cenderung menghasilkan pola pita yang bergeser ke arah fragmen berukuran lebih kecil dan tampak sebagai pita yang tidak jelas atau menyebar pada hasil elektroforesis, alih-alih pita tunggal yang tajam [25].

Berbeda dari sampel lain, sampel nomor 27 pada gambar elektroforesis menunjukkan pita DNA yang jelas pada posisi sekitar 511 bp, sejajar dengan marker 100 bp. Munculnya pita pada posisi tersebut berarti fragmen RNA pada sampel 27 masih cukup utuh untuk diamplifikasi secara spesifik pada wilayah target gen C-prM yang dirancang [5] [6]. Kemungkinan besar, hal ini terjadi dikarenakan sampel 27 memiliki titer atau jumlah salinan (copy number) RNA virus yang relatif lebih tinggi dibandingkan sampel lain sejak awal pengambilan, sehingga meskipun mengalami penyimpanan, jumlah RNA target yang tersisa masih berada di atas ambang deteksi RT-PCR. Penjelasan ini sejalan dengan temuan bahwa kegagalan deteksi pada metode molekuler dengue paling sering terjadi pada sampel dengan jumlah salinan virus yang rendah (<50 kopi), sementara sampel dengan titer virus lebih tinggi cenderung tetap terdeteksi meskipun kualitas RNA-nya sudah menurun [20].

Ketidakhadiran pita DNA target pada 29 sampel lainnya kemungkinan besar berkaitan dengan penurunan kualitas RNA selama penyimpanan. RNA virus dengue yang mengalami fragmentasi dapat mengurangi keberhasilan proses reverse transcription dalam membentuk cDNA. Pada RT-PCR konvensional, primer forward dan reverse harus menempel pada daerah target yang masih utuh agar amplifikasi dapat berlangsung; apabila salah satu lokasi pengikatan primer atau bagian di antara kedua primer mengalami kerusakan, produk amplifikasi tidak terbentuk secara optimal [13][14]. RT-PCR konvensional pada deteksi virus dengue umumnya menggunakan sepasang pri-mer forward dan

reverse yang menargetkan wilayah genom C-prM (capsid-premembrane), menghasilkan produk amplifikasi sekitar 511 bp. Karena mekanisme amplifikasi RT-PCR hanya melibatkan satu pasang primer yang mengapit satu daerah target tertentu, keberhasilan deteksinya sangat bergantung pada keutuhan seluruh segmen RNA di antara kedua primer tersebut [5][6]. Pada penyimpanan suhu 0–4°C, RNA virus umumnya masih relatif stabil dalam rentang waktu sekitar 24–72 jam, setelah melewati waktu tersebut, risiko degradasi bertahap meningkat, tergantung pada kondisi penanganan sampel [13][14].



Gambar 2. Hasil Pemeriksaan RT-LAMP Berdasarkan Perubahan Warna

Hasil pemeriksaan RT-LAMP diamati berdasarkan perubahan warna dan intensitas pendar larutan reaksi setelah penambahan GelRed pasca-inkubasi, di mana perubahan warna menjadi merah muda disertai pendar yang lebih terang menandakan hasil positif, sedangkan warna yang tetap ungu dan tampak lebih redup menandakan hasil negatif. Perbedaan intensitas pendar ini berkaitan dengan prinsip kerja GelRed sebagai pewarna asam nukleat yang berpendar ketika berikatan dengan untai DNA hasil amplifikasi dan diamati di bawah sinar ultraviolet menggunakan UV transilluminator [26]. Semakin banyak produk amplifikasi yang terbentuk selama inkubasi pada sampel positif, semakin banyak pula molekul GelRed yang dapat berikatan dengan DNA tersebut setelah ditambahkan, sehingga pendar yang dihasilkan tampak lebih terang dibandingkan sampel negatif yang produk amplifikasinya sedikit atau tidak terbentuk sama sekali. Dari 30 sampel yang diperiksa, sebanyak 26 sampel (86,7%) menunjukkan hasil positif, sedangkan 4 sampel lainnya (13,3%), yaitu sampel S02, S24, S28, dan S30, tetap menunjukkan warna ungu dan dinyatakan negatif. Keempat sampel yang negatif tersebut tersebar pada kelompok waktu penyimpanan yang berbeda-beda (192 jam, 96 jam, dan 72 jam), sehingga tidak menunjukkan pola pengelompokan tertentu berdasarkan lama penyimpanan.

Hasil pada RT-LAMP berbeda dari RT-PCR. Metode ini tetap mampu mendeteksi virus dengue pada sebagian besar sampel, meskipun sampel-sampel tersebut telah disimpan ≥ 72 jam. Perbedaan ini berkaitan dengan karakteristik primer yang digunakan. RT-LAMP menempel pada enam titik berbeda di sepanjang wilayah genom target, lebih banyak dibandingkan RT-PCR konvensional yang hanya mengapit satu wilayah target tunggal (C-prM). Keberadaan beberapa titik penempelan pada RT-LAMP menyebabkan metode ini tidak sepenuhnya bergantung pada keutuhan segmen RNA panjang seperti yang diperlukan pada RT-PCR, sehingga peluang keberhasilan amplifikasinya tetap tinggi meskipun sebagian kecil fragmen RNA telah terdegradasi [8][10]. Hal ini menjadi salah satu alasan mengapa RT-LAMP pada berbagai penelitian dilaporkan memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan RT-PCR konvensional, baik pada sampel dengue dengan kondisi klinis yang beragam maupun pada sampel dengan viremia rendah atau RNA yang sudah mulai terdegradasi. [16][20].

Tabel 2. Hasil Uji McNemar terhadap Kesesuaian Deteksi antara RT-LAMP dan RT-PCR Konvensional

Kategori Hasil	Nomor Sampel	Jumlah Sampel	Persentase
RT-LAMP positif – RT-PCR positif	S27	1	3,30%
RT-LAMP positif – RT-PCR negatif	S01, S03–S23, S25, S26, S29	25	83,30%
RT-LAMP negatif – RT-PCR positif	–	0	0,00%
RT-LAMP negatif – RT-PCR negatif	S02, S24, S28, S30	4	13,30%
Total	S01–S30	30	100%
Uji McNemar (<i>exact</i>)			p<0,001

RT-PCR pada tabel 2 dikatakan negatif jika tidak muncul pita DNA berukuran 511 bp setelah proses elektroforesis, termasuk apabila hasilnya berupa pola smear (pita yang tidak jelas dan menyebar) akibat RNA yang sudah rusak atau terdegradasi. Dari 30 sampel yang diperiksa, hanya 1 sampel (S27, 3,3%) yang terdeteksi positif oleh kedua metode sekaligus, dan 4 sampel (S02, S24, S28, S30, 13,3%) negatif pada kedua metode; kedua kelompok ini tidak memengaruhi uji McNemar karena uji tersebut hanya menghitung sampel yang hasilnya berbeda antara dua metode. Sampel yang hasilnya berbeda berjumlah 25 (83,3%), dan seluruhnya mengarah ke satu arah yang sama, yaitu RT-LAMP positif sementara RT-PCR negatif, sedangkan arah sebaliknya (RT-PCR positif namun RT-LAMP negatif) tidak ditemukan sama sekali. Uji McNemar membandingkan kedua angka tersebut (25 berbanding 0) untuk menentukan apakah selisih sebesar itu terjadi karena kebetulan atau mencerminkan perbedaan kemampuan deteksi yang nyata, dan hasilnya menunjukkan nilai $p < 0,001$, yang berarti kemungkinan selisih ini terjadi karena kebetulan sangat kecil, yaitu kurang dari 1 berbanding 1.000.

Pola satu arah ini konsisten dengan karakteristik primer RT-LAMP yang menempel pada enam titik berbeda di sepanjang gen target, sehingga kemungkinan kegagalan amplifikasi akibat degradasi RNA jauh lebih kecil dibandingkan RT-PCR yang hanya bergantung pada satu pasang primer [8] [10]. Temuan ini sejalan dengan penelitian dengue sebelumnya yang melaporkan sensitivitas RT-LAMP setara atau lebih tinggi dibandingkan RT-PCR pada sampel klinis, termasuk pada kondisi sampel dengan viremia rendah atau kualitas RNA yang menurun [16] [20]. Dengan demikian, RT-LAMP dapat dipertimbangkan sebagai metode alternatif yang lebih andal untuk deteksi virus dengue pada kondisi sampel yang telah mengalami penundaan pemeriksaan atau penyimpanan dalam durasi cukup lama. Penelitian ini belum menyertakan kelompok sampel yang diperiksa segera setelah pengambilan (0 jam) dan menggunakan jumlah sampel yang relatif kecil pada tiap kelompok waktu penyimpanan, sehingga temuan ini masih perlu dikonfirmasi melalui penelitian dengan desain yang lebih luas.

IV. SIMPULAN

Virus dengue masih dapat dideteksi pada sebagian besar sampel yang disimpan selama ≥ 72 jam apabila menggunakan RT-LAMP, sementara kemampuan deteksi RT-PCR konvensional pada kondisi yang sama menurun tajam. RT-LAMP menunjukkan kemampuan deteksi yang lebih tinggi dibandingkan RT-PCR konvensional, sedangkan lama penyimpanan tidak berhubungan dengan hasil deteksi RT-LAMP.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, khususnya Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Rumah Sakit Bhayangkara Pusdik Sabhara Porong yang telah memberikan izin, fasilitas, dan bantuan selama pelaksanaan penelitian. Terima kasih pula disampaikan kepada seluruh responden, serta kepada semua pihak yang turut membantu hingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

REFERENSI

- [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, pp. e2311–e2311, 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 Me-diated 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. Rodriguez-Morales, "Development and Validation of a Combined RT-LAMP Assay for the Rapid and Sensitive Detection of Dengue Vi-rus 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 Lo-calities 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," *Jour-nal 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.
- [17] L.-H. Huang, P.-H. Lin, K.-W. Tsai, L.-J. Wang, Y.-H. Huang, H.-C. Kuo, and S.-C. Li, "The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 9, pp. e0184692–e0184692, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184692.
- [18] K. Bonner, R. A. Siemieniuk, A. Boozary, T. Roberts, E. Fajardo, and J. Cohn, "Expanding access to HIV viral load testing: A systematic review of RNA stability in EDTA tubes and PPT beyond current time and temperature thresholds," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 12, pp. e113813–e113813, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0113813.
- [19] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, *Profil Kesehatan Indonesia 2024*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI, 2025, hal. 205.
- [20] B.-T. Teoh, S.-S. Sam, K.-K. Tan, M. B. Danlami, M.-H. Shu, J. Johari, P.-S. Hooi, D. Brooks, O. Piepenburg, O. Nentwich, A. Wilder-Smith, L. Franco, A. Tenorio, and S. AbuBakar, "Early detection of dengue virus by use of re-verse transcription-recombinase polymerase amplification," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 53, no. 3, pp. 830–837, 2015, doi: 10.1128/JCM.02648-14.
- [21] H.-J. Burkhardt, "Standardization and quality control of PCR analyses," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 38, no. 2, pp. 87–91, 2000, doi: 10.1515/CCLM.2000.014.
- [22] C. J. Morgan, "Use of proper statistical techniques for research studies with small samples," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 313, no. 5, pp. L873– L877, 2017, doi: 10.1152/ajplung.00238.2017.
- [23] S. F. Ahamed, R. Vivek, S. Kotabagi, K. Nayak, A. Chandele, K. Murali-Krishna, and A. Shet, "Enhancing the sensitivity of Dengue virus serotype detection by RT-PCR among infected children in India," *Journal of Virological Methods*, vol. 244, pp. 46–54, 2017, doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.014.
- [24] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, "Loop- mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 12, p. e63, 2000, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [25] S. Fleige and M. W. Pfaffl, "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, no. 2–3, pp. 126–139, 2006, doi: 10.1016/j.mam.2005.12.003.
- [26] Q. Huang, L. Baum, and W.-L. Fu, "Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis," *Clinical Laboratory*, vol. 56, no. 3–4, pp. 149–152, 2010.
- [27] I. Prado, D. Rosario, L. Bernardo, M. Álvarez, R. Rodríguez, S. Vázquez, and M. G. Guzmán, "PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper," *Journal of Virological Methods*, vol. 125, no. 1, pp. 75–81, 2005, doi: 10.1016/j.jviromet.2005.01.001.

Conflict of Interest Statement:

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.