

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur selalu terpanjatkan kepada Allah SWT, karena atas segala pertolongan, rahmat dan kasih sayang-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Pengembangan Awal Alat Uji Cepat COVID-19 Berbasis Deteksi Nukleokapsid Pada Sampel Saliva Untuk Pengujian Mandiri”**. Shalawat dan salam semoga selalu tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang senantiasa menjadi sumber inspirasi dan teladan terbaik bagi umat manusia.

Dalam penyusunan tesis ini tentunya penulis tidak lepas dari bimbingan, masukan, pengetahuan, dan arahan dari berbagai pihak, terutama dosen pembimbing kami, yang terhormat

Muhammad Yusuf, Ph.D

dan

Prof. Toto Subroto, MS.

Selain itu, penulis juga ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. med. Setiawan, dr. sebagai Dekan Sekolah Pascasarjana.
2. Dr. Shabarni Gaffar sebagai Ketua Program Studi Bioteknologi.
3. Prof. Toto Subroto, MS. sebagai Kepala Pusat Riset Bioteknologi dan Bioinformatika yang telah memberikan pengetahuan, bimbingan, serta semangat yang bermanfaat bagi penyusun.

4. Bacht Alisjahbana, dr., Sp.PD-KPTI, Ph.D., dr. Leonardus Widyatmoko, Sp.MK., dr. Mas Rizky Anggun Adipurna Syamsunarno, M.Kes., Ph.D sebagai tim pembahas/penelaah tesis ini.
5. Sari Syahrani S.Si., M.Biotek., Fauzian Giansyah Rohmatulloh, S.Si., Henry Chandra, M.Si., dan Dhiya Salsabila sebagai rekan tim penelitian dari Pusat Riset Bioteknologi dan Bioinformatika yang telah membantu memberikan masukan, pengetahuan, dan bantuan tenaga dan pikiran dalam penyusunan tesis ini.
6. Staff dan rekan-rekan peneliti di Pusat Riset Bioteknologi dan Bioinformatika.
7. dr.Nisa Fauziah, Dr. Hesti Lina Wiraswati dan Neng Rita, M.Biotek dari Departemen Ilmu Biomedik, Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, yang telah membantu dalam pengujian sampel PCR.
8. Anita Yuwita, M.Si dan Teh Ana dari PT. Pakar Biomedika yang telah membantu dalam perakitan alat uji cepat yang dibutuhkan dalam penelitian.
9. Suami, apt. Eko Widhi Nur Cahyono, S.Farm, dan anak-anak, Faiza Akmalunnisa, dan Muhammad Fadhlán Kamil yang selalu memberikan dukungan dan do'a.
10. Mamah dan keluarga besar R.H.A Muhyidin (Alm) yang selalu mendo'akan, memberikan dukungan dan motivasi.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan segala bentuk kritik dan saran yang membangun untuk

memperbaiki kekurangan dalam tesis ini. Penulis berharap bisa belajar lebih banyak lagi dalam mengimplementasikan ilmu yang didapatkan. Semoga tesis ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan kontribusi dalam perkembangan alat diagnostik COVID-19.

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	10
1.3 Tujuan Penelitian.....	10
1.4 Manfaat Penelitian.....	11
BAB II.....	12
KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN DAN HIPOTESIS	12
2.1 Kajian Pustaka.....	12
2.1.1 <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)</i> ... 12	
2.1.2 Saliva	14
2.1.3 Musin	20
2.1.4 Uji Aliran Lateral (<i>Lateral Flow Immunoassay</i> atau LFIA).....	21
2.1.5 Tipe Uji Aliran Lateral	22
2.1.6 Komponen Uji Aliran Lateral	24
2.1.7 <i>Surface Plasmon Resonance (SPR)</i>	39
2.2 Kerangka Pemikiran	42
2.3 Hipotesis	43
BAB III	45
BAHAN/OBJEK DAN METODE PENELITIAN	45
3.1 Bahan dan Alat Penelitian	45
3.1.1 Bahan	45
3.1.2 Alat.....	46
3.1.3 Pengumpulan Sampel Saliva	46

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	46
3.3 Metode Penelitian	47
3.3.1 Pengukuran Kinetika Pengikatan Antibodi.....	47
3.3.2 Sintesis AuNP	48
3.3.3 Optimasi pH untuk Konjugasi	49
3.3.4 Optimasi Konsentrasi Minimal Antibodi (IgG) untuk Konjugasi	49
3.3.5 Konjugasi AuNP dengan Antibodi (IgG)	50
3.3.6 Uji Setengah Strip.....	51
3.3.7 Pengujian Menggunakan $\frac{3}{4}$ Strip.....	52
3.3.8 Pengujian Menggunakan Strip Penuh.....	54
3.3.9 Pengujian Terhadap Variasi Konsentrasi Protein N SARS-CoV-2.....	56
3.3.10 Pengujian Terhadap Saliva yang Terkonfirmasi Negatif COVID-19.	56
3.3.11 Pengujian Terhadap Protein Rekombinan HA Virus Flu Burung	56
3.4 Diagram Alir Penelitian.....	57
BAB IV	58
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	58
4.1 Pengukuran Kinetika Pengikatan Antibodi	59
4.2 Sintesis AuNP.....	61
4.3 Optimasi pH untuk Konjugasi	63
4.4 Optimasi Konsentrasi Minimal Antibodi (IgG) untuk Konjugasi.....	66
4.5 Konjugasi AuNP dengan Antibodi (IgG).....	70
4.6 Uji Setengah Strip	73
4.7 Uji $\frac{3}{4}$ Strip	76
4.7.1 Optimasi Bantalan Konjugat.....	77
4.7.2 Optimasi <i>Running Buffer</i>	79
4.8 Pengujian Menggunakan Strip Penuh	84
4.8.1 Optimasi Bantalan Sampel.....	84
4.9 Pengujian Terhadap Variasi Konsentrasi Protein N SARS-CoV-2.....	88
4.10 Pengujian Terhadap Saliva yang Terkonfirmasi Negatif SARS-CoV-2	89
4.11 Pengujian Terhadap Protein Rekombinan HA Virus Flu Burung	90
BAB V.....	91
KESIMPULAN DAN SARAN.....	91

5.1	Kesimpulan.....	91
5.2	Saran.....	92
DAFTAR PUSTAKA		93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. 1 Jendela deteksi alat uji cepat antigen dengan PCR (Crozier et al., 2021)	4
Gambar 1. 2 Kriteria Penggunaan RDT-Ag Kriteria yang diatur oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2021)	5
Gambar 1. 3 Penggunaan RDT-Ag sebagai alat self-testing COVID-19.....	9
Gambar 2. 1 Struktur SARS-CoV-2 (Shereen et al., 2020).....	12
Gambar 2. 2 Potensi saliva sebagai spesimen diagnostik dan transmisi virus SARS-CoV dari manusia ke manusia melalui droplet saliva (Ruoshi Xu et al., 2020)	15
Gambar 2. 3 Berbagai jenis saliva (Azzi et al., 2021).....	15
Gambar 2. 4 Sifat, kandungan dan fungsi dari saliva (Khurshid et al., 2016)	16
Gambar 2. 5 Daftar protein utama yang ditemukan dalam saliva manusia (Pfaffe et al., 2011).....	17
Gambar 2. 6 Dugaan mekanisme SARS-CoV-2 masuk ke dalam sel kelenjar saliva (Sapkota et al., 2020)	18
Gambar 2. 7 Komponen struktural musin (Carlson et al., 2018)	20
Gambar 2. 8 Beberapa cara untuk memecah struktur musin (Carlson et al., 2018)	21
Gambar 2. 9 Perbedaan uji kompetitif dan uji sandwich (Farrell, 2009).....	24
Gambar 2. 10 Komponen-komponen uji aliran lateral (Parolo et al., 2020).....	25
Gambar 2. 11 Pengoperasian LFIA (Parolo et al., 2020).....	26
Gambar 2. 12 Gambar bantalan sampel pada alat uji cepat (Merck, 2021)	27
Gambar 2. 13 Perbandingan antara imobilisasi antibodi yang ideal dengan realistik (de Puig et al., 2017)	30
Gambar 2. 14 Langkah-langkah pembentukkan nanopartikel emas (Daruich De Souza et al., 2019).....	32
Gambar 2. 15 Interaksi hidrofobik dan ionik antara antibodi dan permukaan AuNP A) interaksi hidrofobik B) interaksi ionik C) terbentuk ikatan kovalen karena pengikatan datif (Jazayeri et al., 2016).....	33
Gambar 2. 16 Ilustrasi diameter hidrodinamik teoritis AuNP jenuh dengan monolayer mAb teradsorpsi dengan orientasi yang berbeda (Ruiz et al., 2019) ..	35
Gambar 2. 17 Gambar bantalan konjugat pada alat uji cepat (Millipore, 2013)...	36
Gambar 2. 18 Gambar bantalan penyerap pada alat uji cepat (Millipore, 2013)..	38
Gambar 2. 19 Diagram skema pengaturan SPR (Tang et al., 2010)	39
Gambar 2. 20 Sistem deteksi SPR untuk mendeteksi interaksi antibodi yang diamobilisasi pada permukaan emas dengan antigen (Hearty et al., 2018)	40

Gambar 2. 21 Representasi diagram dari profil sensorgram SPR (Hearty et al., 2018)	41
Gambar 4. 1 Prosedur untuk mengoptimasi fabrikasi alat uji lateral yang ideal (Parolo et al., 2020).....	59
Gambar 4. 2 Sensorgram SPR kinetika pengikatan IgG anti-N SARS-CoV-2 klon 4H2 dan IgG anti-N SARS-CoV-2 klon 3H11 dengan protein N.....	61
Gambar 4. 3 Posisi antibodi deteksi dan antibodi penangkap.....	61
Gambar 4. 4 Spektrum serapan UV-Vis AuNP	62
Gambar 4. 5 Distribusi ukuran partikel AuNP.....	63
Gambar 4. 6 Perubahan warna larutan konjugat pada variasi pH setelah ditambahkan dengan NaCl 10%	64
Gambar 4. 7 Spektrum serapan UV-Vis AuNP-IgG pada variasi pH setelah ditambahkan dengan NaCl 10%	65
Gambar 4. 8 Perubahan warna larutan konjugat pada variasi konsentrasi antibodi 0 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, dan 100 µg/mL pada pH 8,0 setelah ditambahkan dengan NaCl 10%	67
Gambar 4. 9 Spektrum serapan UV-Vis AuNP-IgG pada variasi konsentrasi setelah ditambahkan dengan NaCl 10%	68
Gambar 4. 10 Kurva flokulasi dari antibodi dengan variasi konsentrasi yang dikonjugasikan dengan AuNP pada panjang gelombang 580 nm.....	69
Gambar 4. 11 Spektrum serapan UV-Vis bare AuNP dan AuNP-IgG	73
Gambar 4. 12 Diagram skema alat uji cepat deteksi antigen SARS-CoV-2.....	74
Gambar 4. 13 Uji setengah strip.....	74
Gambar 4. 14 Hasil pengujian setengah strip menggunakan konjugat AuNP-IgG (A) tanpa penambahan protein N dan (B) dengan penambahan protein N 20 ng/mL.	75
Gambar 4. 15 Uji ¾ strip.....	77
Gambar 4. 16 Perbandingan hasil antara bantalan konjugat (A) saliva tanpa dispiki dengan protein N dan (B) saliva yang dispiki dengan protein N	79
Gambar 4. 17 Pengujian ¾ strip dengan berbagai komposisi buffer	81
Gambar 4. 18 Gambar ImageJ dan histogram area pada garis uji berbagai komposisi buffer	82
Gambar 4. 19 Pengujian ¾ strip dengan variasi pH buffer.....	83
Gambar 4. 20 Gambar ImageJ dan histogram area pada garis uji variasi pH buffer	83
Gambar 4. 21 Uji strip penuh.....	84
Gambar 4. 22 Pengujian strip penuh dengan variasi bahan bantalan sampel	85
Gambar 4. 23 Hasil pengujian menggunakan bantalan sampel yang diberi perlakuan dan tanpa diberi perlakuan menggunakan saliva yang tidak dispiki dengan protein N	87

Gambar 4. 24 Hasil pengujian menggunakan bantalan sampel yang diberi perlakuan dan tanpa diberi perlakuan menggunakan saliva yang dispike dengan protein N konsentrasi akhir 1 µg/mL	87
Gambar 4. 25 Struktur casein (National Center for Biotechnology Information, 2021) dan BSA (Majorek et al., 2012)	88
Gambar 4. 26 Hasil pengujian menggunakan saliva yang dispike dengan protein N SARS-CoV-2 berbagai konsentrasi.....	88
Gambar 4. 27 Gambar ImageJ dan grafik regresi linear konsentrasi akhir N yang dapat dideteksi oleh purwarupa alat uji cepat	89
Gambar 4. 28 Spesifisitas purwarupa alat uji cepat yang dikembangkan menggunakan saliva yang terkonfirmasi negatif SARS-CoV-2 dengan RT-PCR	90
Gambar 4. 29 Hasil pengujian terhadap protein rekombinan HA virus flu burung	90

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1 Penelitian yang menunjukkan terdeteksinya virus SARS-CoV-2 pada saliva pasien terkonfirmasi positif COVID-19 menggunakan RT-PCR.....	7
Tabel 3. 1 Variasi Konsentrasi IgG.....	50
Tabel 3. 2 Komposisi running buffer	53
Tabel 3. 3 Perlakuan Bantalan Sampel	55
Tabel 4. 1 Hasil pengukuran kinetika pengikatan IgG anti-N SARS-CoV-2 dengan protein nukleokapsid menggunakan Nano-SPR	61
Tabel 4. 2 Panjang gelombang dan absorbansi maksimum Bare AuNP dan AuNP-IgG pada variasi pH setelah ditambahkan dengan NaCl 10%	65
Tabel 4. 3 Panjang gelombang dan absorbansi maksimum Bare AuNP dan AuNP-IgG pada variasi konsentrasi setelah ditambahkan dengan NaCl 10%	67
Tabel 4. 4 Absorbansi Bare AuNP dan AuNP-IgG pada variasi konsentrasi setelah ditambahkan dengan NaCl 10% pada panjang gelombang 580 nm	69

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Daftar Singkatan

- ACE2 : *Angiotensin Converting Enzyme 2*, enzim yang menempel pada permukaan luar (membran) sel-sel di beberapa organ, seperti paru-paru, arteri, jantung, ginjal, dan usus. ACE2 bertindak sebagai reseptor untuk virus SARS-CoV-2 dan memungkinkannya menginfeksi sel.
- ARDS : *Acute Respiratory Distress Syndrome*, cedera paru-paru yang mengancam jiwa yang memungkinkan cairan bocor ke paru-paru, sehingga bernapas menjadi sulit dan oksigen tidak bisa masuk ke dalam tubuh.
- ASSURED : *Affordable, Sensitive, Specific, User Friendly, Rapid and Robust, Equipment free, Deliverable to end user*, kriteria yang harus dimiliki oleh suatu alat diagnostik *point of care* menurut WHO.
- AuNP : *Gold-NanoParticles*, partikel emas kecil dengan diameter 1 hingga 100 nm. AuNP telah digunakan sebagai label deteksi yang paling banyak digunakan di LFIA, hal ini karena SPR AuNP menghasilkan warna merah yang kuat untuk mendeteksi dengan mata telanjang.
- BSA : *Bovine Serum Albumin*, protein serum albumin yang berasal dari sapi, dan sering digunakan sebagai standar konsentrasi protein dalam eksperimen laboratorium.
- COVID-19 : *Coronavirus Disease 19*, penyakit akibat infeksi virus *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, yaitu penyakit pernapasan yang menyebabkan pandemic pada awal tahun 2020 sampai sekarang.
- DNA : *Deoxyribonucleic acid*, molekul yang terdiri dari dua rantai polinukleotida yang melingkari satu sama lain untuk membentuk heliks ganda yang membawa instruksi genetik untuk pengembangan, fungsi, pertumbuhan dan reproduksi suatu organisme.
- E : *Envelope*, protein struktural virus SARS-CoV-2 yang merupakan selubung yang mengelilingi kapsid. Komponennya berupa molekul lipid dan protein
- EDC : N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
- IgG : *Immunoglobulin G*, tipe antibodi yang paling banyak ditemukan di peredaran darah, dibuat dan dilepaskan oleh sel plasma B, dan memiliki dua paratop.
- K_D : Konstanta keseimbangan (fase dimana semua ligan berikatan dengan analit).

k_{off} atau k_d	:	Konstanta disosiasi (fase dimana larutan analit diganti dengan buffer pencuci, yang menyebabkan interaksi spesifik antara analit dan ligan terputus)
k_{on} atau k_a	:	Konstanta asosiasi (fase dimana analit mulai berikatan dengan ligan yang diamobilisasi).
LFIA	:	<i>Lateral Flow Immunoassay</i> , platform berbasis kertas untuk deteksi dan kuantifikasi analit dalam campuran kompleks, di mana sampel ditempatkan pada perangkat uji dan hasilnya ditampilkan dalam 5-30 menit. Pengujian kekebalan aliran lateral terdiri dari sistem kromatografi (pemisahan komponen campuran berdasarkan perbedaan pergerakan melalui membran reaksi) dan reaksi imunokimia (reaksi antara antibodi-antigen, analit target asam nukleat). Alat ini bekerja didasarkan pada pergerakan sampel melintasi membran melalui gaya kapiler
M	:	<i>Membrane</i> , protein struktural virus SARS-CoV-2 yang komponennya berupa glikoprotein
MERS	:	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i> , penyakit saluran pernapasan yang disebabkan oleh coronavirus pada tahun 2012 di Timur Tengah.
N	:	<i>Nucleocapsid</i> , protein struktural virus SARS-CoV-2 berupa selubung atau pembungkus RNA virus yang banyak diekspresikan selama infeksi dan sangat imunogenik, sehingga cocok sebagai target antibodi atau reagen diagnostik.
NHS	:	N-Hydroxysuccinimide
ORF	:	<i>Open Reading Frame</i> , bagian dari molekul DNA yang, ketika diterjemahkan menjadi asam amino, tidak mengandung stop kodon.
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara in vitro pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida.
pI	:	<i>Isoelectric point</i> , pH di mana suatu molekul tidak bermuatan atau netral
PRP	:	<i>Protein Rich Prolin</i>
PVC	:	<i>Polyvinil Chloride</i>
RNA	:	<i>Ribonucleic Acid</i> , asam nukleat yang berisi informasi yang telah disalin dari DNA. Banyak bentuk RNA memiliki fungsi yang berkaitan dengan pembuatan protein. RNA juga merupakan materi genetik dari beberapa virus, selain DNA
RT-PCR	:	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> , suatu metode laboratorium yang digunakan untuk membuat banyak salinan dari urutan genetik tertentu untuk analisis, dan menggunakan enzim yang disebut <i>reverse transcriptase</i> untuk mengubah bagian tertentu dari RNA menjadi bagian yang cocok dari DNA.

RU	:	<i>Response Unit</i> , pergeseran panjang gelombang atau sudut minimum dalam intensitas cahaya yang dipantulkan yang telah dikaitkan dengan perubahan bergantung waktu dalam indeks bias efektif dan fraksi volume medium yang berdekatan dengan permukaan sensor logam oleh faktor respons.
SARS-CoV	:	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> , virus yang menyebabkan penyakit pernapasan dan menyebabkan wabah SARS pada tahun 2002-2004
SARS-CoV-2	:	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> , virus yang menyebabkan penyakit coronavirus 2019
SPR	:	<i>Surface Plasmon Resonance</i> , fenomena yang terjadi ketika cahaya terpolarisasi mengenai film logam pada antarmuka media dengan indeks bias yang berbeda.
UV-VIS	:	<i>Ultraviolet-Visible</i>

Daftar Lambang

°C	:	Derajat celcius
cm ²	:	Centimeter persegi (satuan luas)
g	:	Gravitasi (satuan gravitasi)
λ	:	Lambda (lambing panjang gelombang)
L	:	Liter (satuan volume)
kDa	:	Kilo Dalton (satuan massa molekul)
M	:	Molaritas (satuan konsentrasi suatu larutan)
mg	:	Mili (1×10^{-3}) gram (satuan berat)
min	:	Minutes (satuan waktu)
mM	:	Mili (1×10^{-3}) molar (satuan konsentrasi)
mL	:	Mili (1×10^{-3}) liter (satuan volume)
μ L	:	Mikro (1×10^{-6}) liter (satuan volume)
ng	:	Nanogram (1×10^{-9}) gram (satuan berat)
nm	:	Nanometer (1×10^{-9})
rpm	:	Rotasi per menit
s	:	Sekon (satuan waktu)
%	:	Persen