

Comparison of Pocket PCR and Water bath-based RT-LAMP assay for SARS-CoV-2 Detection

Ika Afifah Nugraheni¹ , Arif Bimantara¹, Dinar Mindrati Fardhani¹, Arif Yusuf Wicaksana²

¹ Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

² Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

 ikaafifah@unisayogya.ac.id

Abstract

SARS-CoV-2 has caused 133,023 deaths in Indonesia as of August 2021, and 4,089,801 confirmed COVID-19. This massive spread in the community must be balanced with fast and accurate diagnosis. The RT-LAMP (Reverse-Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification) method provides an easy, inexpensive, simple and possible detection alternative that can be accessed by all health facilities in Indonesia. This method takes less than 60 minutes to detect both pathogens and viruses. The purpose of this study was to compare the pocket PCR-based RT-LAMP test with the use of a water bath in detecting the SARS-Cov-2 virus, the cause of the COVID-19 disease which has become a current pandemic. RT-LAMP optimization was carried out using two tools, namely pocket PCR and water bath. Optimization parameters include the optimum temperature and time to detect SARS-Cov-2. The optimization sample used a positive control, in the form of a plasmid that had the SARS-Cov-2 gene inserted, and a negative control. The optimization results of RT-LAMP pocket PCR showed that a temperature of 65°C with a time of 30 minutes was able to produce luminescence in the positive control plasmid sample. Variations in the concentration of the positive control plasmid used, namely 1 ng, 0.1 ng and 0.01 ng, in which all fluorescence appeared in the three concentrations. However, the results of the optimization of the temperature and time of the RT-LAMP when applied using a water bath have not shown the results of luminescence, as in pocket PCR. Therefore, the stages of the RT-LAMP optimization process using a water bath still need to be continued to find the optimum temperature and time so that detection results with high sensitivity are obtained.

Keywords: COVID-19; pocket PCR; RT-LAMP; water bath

Perbandingan uji RT-LAMP berbasis *Pocket*PCR dan *Water bath* untuk Deteksi SARS-CoV-2

Abstrak

SARS-CoV-2 telah menyebabkan 133,023 jiwa meninggal di Indonesia hingga Bulan Agustus 2021, dan 4,089,801 terkonfirmasi COVID-19. Penyebaran yang masif di masyarakat ini harus diimbangi dengan penegakan diagnosa yang cepat dan akurat. Metode RT-LAMP (*Reverse-Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification*) memberikan alternatif deteksi yang mudah, murah, sederhana dan memungkinkan untuk dapat diakses oleh semua fasilitas kesehatan di Indonesia. Metode ini hanya membutuhkan waktu kurang dari 60 menit untuk mendeteksi patogen maupun virus. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui perbandingan uji RT-LAMP berbasis pocket PCR dengan pemanfaatan water bath dalam mendeteksi virus SARS-Cov-2, penyebab penyakit COVID-19 yang menjadi pandemi saat ini. Optimasi RT-LAMP dilakukan menggunakan dua alat, yaitu pocket PCR dan water bath. Parameter optimasi meliputi suhu dan waktu optimum untuk mendeteksi SARS-Cov-2. Sampel optimasi menggunakan kontrol positif, berupa plasmid yang telah terinsersi gen SARS-Cov-2, dan kontrol negatif. Hasil optimasi RT-LAMP pocket PCR menunjukkan bahwa suhu 65°C dengan waktu 30



menit telah mampu menghasilkan pendaran pada sampel plasmid kontrol positif. Variasi konsentrasi plasmid kontrol positif yang digunakan, yaitu 1 ng, 0,1 ng dan 0,01 ng, di mana semua pendar muncul di ketiga konsentrasi tersebut. Meskipun demikian, hasil optimasi suhu dan waktu RT-LAMP tersebut apabila diaplikasikan menggunakan water bath belum menunjukkan hasil pendaran, sebagaimana pada pocket PCR. Oleh karena itu, tahapan proses optimasi RT-LAMP menggunakan water bath masih perlu dilanjutkan untuk menemukan suhu dan waktu optimum sehingga diperoleh hasil deteksi dengan sensitifitas yang tinggi.

Kata kunci: COVID-19; *pocket PCR*; RT-LAMP; *water bath*

1. Pendahuluan

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) diduga masuk ke wilayah Indonesia pada awal tahun 2020. Penyakit ini disebabkan oleh virus jenis baru yang belum pernah teridentifikasi menginfeksi manusia sebelumnya. *Coronavirus* (CoV) adalah keluarga besar virus yang menyebabkan penyakit mulai dari gejala ringan sampai berat. Ada setidaknya dua jenis coronavirus yang diketahui menyebabkan penyakit yang dapat menimbulkan gejala berat seperti *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS) dan *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS). Penyakit tersebut disebabkan oleh virus yang bernama *Severe Accute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2* (SARS Cov-2) [1]. Virus SARS Cov-2 memiliki materi genetik berupa *positive sense* RNA untai tunggal, artinya virus ini dapat langsung memproduksi protein tanpa transkripsi terlebih dahulu [2]. Hingga saat ini, metode *quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) merupakan metode paling direkomendasikan dalam deteksi virus penyebab COVID-19. Metode deteksi inilah yang menentukan pasien berstatus positif atau negatif terinfeksi SARS Cov-2. Kendala yang terjadi saat ini adalah laboratorium yang dianggap mampu sehingga ditunjuk oleh pemerintah Indonesia untuk deteksi SARS Cov-2 menggunakan metode qRT-PCR masih terbatas jumlahnya.

Materi genetik virus yang merupakan molekul RNA, pada metode qRT-PCR, diubah menjadi cDNA terlebih dahulu dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*. cDNA tersebut kemudian diperbanyak melalui suatu siklus berulang yang terdiri dari beberapa tahapan. Masing-masing tahapan tersebut berlangsung di dalam mesin *thermocycler* pada suhu yang berbeda. Sepasang sekuen DNA pendek (*primer*) digunakan untuk menjamin spesifitas reaksi untuk menghindari kesalahan deteksi. Bahan-bahan yang digunakan dalam qRT-PCR memungkinkan setiap salinan materi genetik yang terbentuk akan mengirimkan sinyal *fluorescence* pendar pada sensor yang terdapat dalam *thermocycler*. Sinyal yang ditangkap oleh sensor tersebut dikonversi ke dalam sebuah grafik yang dapat ditampilkan pada sebuah monitor. Pembacaan hasil deteksi didasarkan pada pola grafik yang ditampilkan pada monitor tersebut [3]. Metode qRT-PCR banyak digunakan karena hasilnya spesifik dan dapat langsung diketahui bersamaan dengan berlangsungnya proses perbanyak materi genetik tanpa menunggu proses tersebut selesai. Kelemahan metode ini adalah harga alat dan bahan yang mahal serta diperlukan keahlian khusus dalam pengoperasiannya. Faktor tersebut menjadi salah satu penyebab terbatasnya jumlah laboratorium serta kapasitas deteksi SARS Cov-2 di Indonesia saat ini.

Para pakar epidemiologi membutuhkan data hasil pemeriksaan pasien COVID-19 secara real time dalam membuat prediksi keberlangsungan pandemi ini hingga perencanaan penanganan yang tepat dan cepat. Keterbatasan jumlah laboratorium pemeriksaan COVID-19 di Indonesia menjadi kendala serius karena menyebabkan keterlambatan dalam mengetahui hasil pemeriksaan akibat penumpukan sampel yang terlalu banyak. Sampel

hasil swab pasien tersebut harus dikirimkan ke daerah lain yang memiliki fasilitas laboratorium yang memadai [4]. Pemerintah telah berupaya meningkatkan kapasitas deteksi dengan mendatangkan *rapid test kit*. Penggunaan *rapid test kit* relatif mudah dan hasilnya dapat diperoleh dalam waktu yang relatif singkat. Akan tetapi alat pemeriksaan ini memiliki kelemahan substansial yaitu pada sensitivitas dan spesifitas pemeriksaan. WHO telah merilis bahwa penggunaan *rapid test* tidak digunakan sebagai penegak diagnosa hanya membantu proses skrining riset epidemiologi. Oleh karena itu diperlukan suatu metode deteksi SARS Cov-2 yang memiliki sensitivitas dan spesifitas setara dengan qRT-PCR tetapi mudah dan cepat untuk meningkatkan kapasitas pemeriksaan yang akurat agar Indonesia segera bisa keluar dari pandemi COVID-19 ini.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) adalah metode lain untuk memperbanyak materi genetik. Metode ini mulai diperkenalkan oleh Notomi et al. dua puluh tahun yang lalu untuk amplifikasi untai DNA [5]. Keunggulan utama metode ini adalah reaksi berlangsung pada satu suhu (isotermik) sehingga tidak memerlukan peralatan mahal seperti *thermocycler*. Alat yang digunakan bisa berbagai macam dengan syarat dapat mempertahankan suhu secara stabil. Keunggulan metode LAMP adalah pada kebutuhan alat yang sederhana seperti *pocket PCR* maupun *water bath* atau *heating block* yang dapat mempertahankan suhu secara stabil [6]. Bahan yang digunakan mayoritas dapat disimpan pada suhu ruang dan lebih murah dibandingkan dengan bahan qRT-PCR. LAMP memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi karena menggunakan 2 hingga 3 pasang primer serta dapat diselesaikan dalam waktu kurang dari satu jam. Prosedur pengerjaan LAMP juga relatif lebih sederhana dibandingkan qRT-PCR sehingga lebih banyak orang yang dapat melakukannya.

PocketPCR adalah alat *thermocycler* bertenaga USB seukuran telapak tangan untuk amplifikasi DNA [7]. Perangkat *pocketPCR* terbuat dari perangkat kaca fabrikasi mikro dan dicetak 3D. Saat ini, teknologi pencetakan 3D telah disesuaikan dengan kebutuhan industri kesehatan dan dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai penyakit infeksius seperti HIV dan malaria [8]. Sedangkan *water bath* merupakan alat laboratorium yang umum ditemukan di laboratorium untuk berbagai keperluan di berbagai fokus penelitian seperti mikrobiologi, biologi molekuler, kimia dan lain sebagainya. Ji et al. telah melakukan penelitian mengenai deteksi gen *dsbE* pada bakteri *Actinobacillus pleuropneumoniae* menggunakan metode LAMP dengan memanfaatkan alat *water bath*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa LAMP merupakan metode deteksi yang cepat, sangat sensitif, mudah dan murah serta sangat memungkinkan untuk digunakan dalam uji lapang [9].

Perlu adanya solusi akan keterbatasan laboratorium akibat sedikitnya alat uji molekuler COVID-19 yang tersedia di Indonesia. *Reverse Transcription* - LAMP (RT-LAMP) dapat dimanfaatkan sebagai metode deteksi molekuler cepat (*rapid molecular test*) untuk COVID-19. Pemanfaatan alat laboratorium sederhana seperti *pocketPCR* dan *water bath* dalam aplikasi RT-LAMP untuk deteksi COVID-19 akan dapat membantu mempercepat proses deteksi yang dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan uji RT-LAMP menggunakan *pocketPCR* dan *water bath* dalam deteksi molekuler COVID-19. Kontribusi dari optimasi pengujian metode *rapid molecular test* sederhana ini diharapkan mampu meningkatkan kapasitas deteksi COVID-19 yang akurat dan cepat melalui pendayagunaan laboratorium-laboratorium yang tersebar di seluruh Indonesia.

2. Metode

2.1. Lingkup Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Prinsip dari penelitian eksperimental yaitu data-data dari variabel belum ada, sehingga harus dilakukan proses manipulasi melalui pemberian perlakuan terhadap subyek penelitian yang selanjutnya diamati maupun diukur dampak yang dihasilkan. Variabel independen dalam penelitian ini adalah suhu isothermal pada metode RT-LAMP, baik menggunakan *pocket*PCR maupun *water bath*.

2.2. Alat Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet, pipet tip, mikrotube, *tube* PCR, rak *tube* PCR, *pocket*PCR®GaudiLabs, *tank* elektroforesis, timbangan analitik, *hotplate*, *coolbox*, *mini spin down*, *mini vortex*, *water bath* dan UV *transilluminator*. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol positif berupa plasmid DNA virus SARS CoV-2, primer gen ORF1a/b dengan rincian tersaji pada [Tabel 1](#), RT-LAMP (*OptiGene ISO-DR004-RT300*), akuades, akuabides, TE Buffer, TBE Buffer, *nuclease free water*, *gel electroforesis 2%*, *loading dye*, DNA *ladder*, SYBR *green*, dan alkohol 70%.

Tabel 1. Sekuen primer gen ORF1ab untuk deteksi SARS-Cov-2

Nama primer	Sekuen
O-F3	AAAGGATTTTGTGACTTAAAAGG
O-B3	TGCACTTACACCGCAAAC
O-FIP	CAGACGGTACAGACTGTGTTTTTACCTACAACCTGTGCTAATGAC
O-BIP	CGGTATGTGGAAAGGTTATGGCAAAAACGATTGTGCATCAGC
O-LF	CAGACGGTACAGACTGTGTTTTT
O-LB	CGGTATGTGGAAAGGTTATGGC

2.3. Penentuan Konsentrasi Kontrol Positif SARS-CoV-2

Konsentrasi kontrol positif yang digunakan ditentukan menggunakan pocket PCR sebelum diterapkan pada *water bath*. Variasi konsentrasi primer yang digunakan yaitu 1 ng, 0,1 ng dan 0,01 ng. Kontrol negatif menggunakan akuabides, sebagai pembanding.

2.4. Pengujian RT-LAMP

Untuk 1 reaksi 25 μ L, sebanyak 5 μ L template ditambahkan ke dalam 15 μ L kit master mix dan set primer sebanyak 5 μ L. Set primer untuk deteksi gen ORF1ab meliputi O-f3, O-B3, O-FIP, O-BIP, O-LF dan O-LB, dengan volume tiap primer disajikan pada Tabel 2. Suhu amplifikasi yang digunakan ada 3 macam, yaitu 63°C, 65°C, dan 67°C, dengan waktu amplifikasi yaitu 20 menit [10]. Hasil amplifikasi selanjutnya diinkubasi pada suhu 94°C selama 1 menit dan kemudian diturunkan suhunya hingga 25°C. Hasil amplifikasi RT-LAMP diamati di bawah UV *Transluminator*. Sampel positif ditunjukkan dengan kemunculan fluoresens atau pendar, sedangkan sampel negatif tidak.

Tabel 2. Komposisi reaksi untuk RT-LAMP

No	Komponen	Volume
1	Master mix	15 μ l
2	Primer mix	
	FIP konsentrasi 40 pmol / μ l	0,71 μ l
	BIP konsentrasi 40 pmol / μ l	0,71 μ l
	LF konsentrasi 40 pmol / μ l	0,36 μ l
	LB konsentrasi 40 pmol / μ l	0,36 μ l
	F3 konsentrasi 20 pmol / μ l	0,18 μ l
	B3 konsentrasi 20 pmol / μ l	0,18 μ l

3	Template	5 μ l
TOTAL		25 μl

2.5. Elektroforesis sampel

Sampel hasil amplifikasi RT-LAMP yang mengeluarkan pendar selanjutnya dielektroforesis menggunakan konsentrasi gel agarose 2% pada tegangan 100 V selama 30 menit. FluoroVue sebanyak 1% ditambahkan ke gel agarose sebagai senyawa pewarna DNA. Sampel ampikon dimasukkan ke sumuran agarose sebanyak 4 μ L, ditambah dengan *loading dye* sebagai sebanyak 1 μ L per sampelnya. Pengamatan hasil elektroforesis dilakukan di bawah UV *Transluminator*.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil

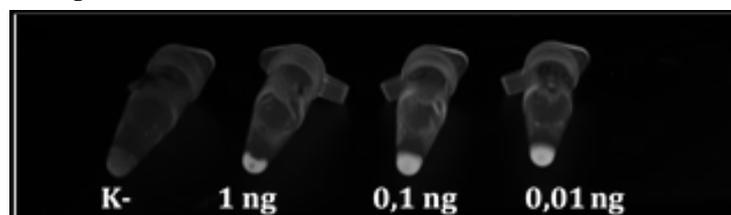
Hasil ampifikasi menggunakan *pocketPCR* pada berbagai suhu menunjukkan hasil yang disajikan pada **Tabel 1**. Pada ketiga suhu yang digunakan, pendaran muncul pada suhu 65°C dengan waktu 20 menit. Suhu lainnya menunjukkan hasil tidak muncul pendaran yang terlihat saat pengamatan UV *Transluminator*.

Tabel 1. Pendaran pada ketiga suhu macam amplifikasi menggunakan *pocketPCR* selama 20 menit

No	Perlakuan Suhu	Konsentrasi			
		Kontrol negatif	1 ng	0,1 ng	0,01 ng
1	Suhu 63°C	-	-	-	-
2	Suhu 65°C	-	+	+	+
3	Suhu 67°C	-	-	-	-

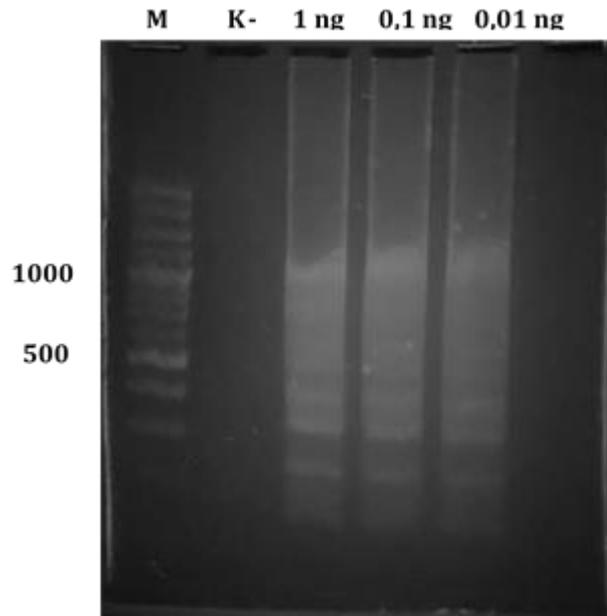
Keterangan : tidak muncul pendar = -
muncul pendar = +

Optimasi plasmid kontrol positif menggunakan *pocketPCR* pada suhu 65°C menunjukkan hasil bahwa ketiga konsentrasi yang digunakan memberikan hasil pendaran pada pengamatan di bawah UV *Transluminator* (**Gambar 1**). Kontrol negatif memberikan hasil yang negatif, yaitu tidak muncul pendaran pada sampel akuabides. Tingkat pendaran pada ketiga konsentrasi memberikan hasil yang sama pada pengujian RT-LAMP menggunakan *pocketPCR*. Kemunculan pendaran dikonfirmasi dengan elektroforesis sampel menggunakan gel agarose 2%. Ketiga konsentrasi plasmid kontrol positif menunjukkan pita band DNA yang sama (**Gambar 2**). Hasil negatif hanya ditunjukkan pada perlakuan kontrol negatif, akuabides.



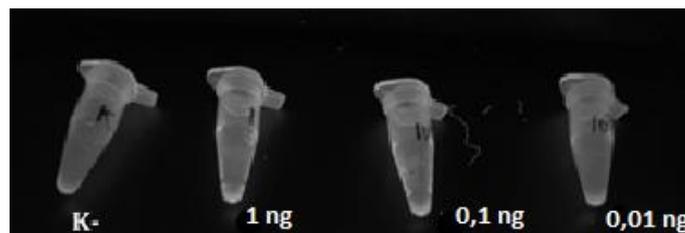
Gambar 1. Visualisasi konsentrasi plasmid kontrol positif menggunakan *pocketPCR*.

Keterangan: K- = kontrol negatif, akuabides.



Gambar 2. Visualisasi hasil elektroforesis optimasi konsentrasi plasmid kontrol positif. Keterangan: M = marker; K- = kontrol negatif, akuabides. DNA ladder menggunakan 100 bp.

Optimasi dilanjutkan dengan menguji keefektifan primer ORF1ab menggunakan RT-LAMP berbasis *water bath*. Hasil RT-LAMP dengan *water bath* menunjukkan jika kontrol positif dengan berbagai konsentrasi tidak menunjukkan kemunculan pendaran di bawah pengamatan UV *Transluminator* (**Gambar 3**). Hal ini mengindikasikan bahwa proses optimasi deteksi SARS-CoV-2 dengan gen target ORF1ab menggunakan RT-LAMP *water bath* belum optimal.



Gambar 3. Visualisasi optimasi RT-LAMP plasmid kontrol positif pada *water bath*. Keterangan K- = kontrol negatif, akuabides.

Rangkaian proses optimasi masih diperlukan untuk mengoptimalkan kerja RT-LAMP menggunakan *water bath*. Suhu dan waktu amplifikasi sangat berperan penting dalam proses RT-LAMP. Suhu sangat mempengaruhi proses penempelan primer pada gen target. Suhu yang terlalu rendah atau terlalu tinggi tidak mendukung untuk proses amplifikasi sekuen. Selain itu, waktu amplifikasi juga sangat mempengaruhi jumlah ampikon yang terbentuk, Hal ini dikarenakan fluoresens akan terbentuk apabila ampikon telah memenuhi LOD (load of detection) dari virus. LOD yang terpenuhi untuk memunculkan fluoresens pada sampel sekitar 100 copy/ μ L (Mautner et al., 2020).

3.2. Pembahasan

Sejak diumumkan pertama kali oleh WHO pada awal Tahun 2020, COVID-19 telah menyerang sebanyak 223 negara. Di Indonesia, pasien terkonfirmasi COVID-19 sebanyak 1.066.313 jiwa, dengan tingkat kematian 2,79%, lebih tinggi dibandingkan tingkat kematian global sebesar 2,16% [11]. Hal ini didukung dengan masih adanya perilaku buruk dari masyarakat yang tidak menerapkan protokol kesehatan untuk pencegahan penyebaran

COVID-19 [12]. Jumlah sekuen genom SARS-CoV-2 asal Indonesia hingga September 2020 telah diperoleh sebanyak 60 sekuen, berdasarkan panjang genom virus dan waktu koleksinya [13]. Angka ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan negara lain seperti Singapura, Thailand maupun Kenya [14].

RT-LAMP adalah salah satu metode alternatif amplifikasi materi genetik dengan karakteristik hanya menggunakan satu suhu saja (isotermik). RT-LAMP merupakan salah satu teknik molekuler yang bisa digunakan untuk deteksi SARS-CoV-2. Tingkat sensitivitas dan spesifitas RT-LAMP untuk deteksi SARS-CoV-2 sebesar 100%, dibandingkan dengan metode qRT-PCR. Selain itu, RT-LAMP lebih mudah dalam proses penanganan (*handling*) dan tidak membutuhkan peralatan maupun instrumen yang tinggi, sebagaimana pada qRT-PCR [15]. Salah satu komponen penting dalam reagen yang digunakan dalam metode RT-LAMP adalah primer. Primer adalah komponen yang sangat penting dalam amplifikasi DNA seperti PCR. Dengan kata lain, jika primer tidak didesain dengan benar akan memberikan hasil amplifikasi yang tidak sesuai [16]. Primer yang digunakan dalam LAMP secara umum terdiri dari empat sekuen yang mengenali 6 daerah DNA target sehingga desain primer LAMP lebih kompleks dibandingkan desain primer PCR [17]. Primer yang digunakan dalam amplifikasi harus terhindar dari *self-looping*, *primer-dimer*, dan *cross hybridization* [18]. Berdasarkan penelitian, penggunaan *loop primer* mempengaruhi reaksi LAMP menjadi 76% lebih cepat [19].

Penggunaan *pocketPCR* dan *waterbath* dalam penelitian ini bertujuan untuk memudahkan deteksi SARS-CoV-2 agar dapat dilakukan oleh semua fasilitas kesehatan. Karena kedua alat tersebut cenderung murah dan sederhana. Pada penelitian ini, *pocketPCR* dan *water bath* digunakan sebagai alat untuk mempertahankan suhu isothermal agar terjadi proses amplifikasi sesuai pengaturan pada interval waktu tertentu [20]. . Pemanfaatan *pocketPCR* dan *water bath* sebagai alat penahan panas pada RT-LAMP sangat dimungkinkan dan berpotensi untuk diaplikasikan di Indonesia, sebagai alat deteksi SARS-CoV-2. Dengan demikian, penegakan diagnosa pasien dapat lebih cepat berikut dengan penanganan maupun upaya tracing dan pencegahannya.

Hasil RT-LAMP dengan *pocketPCR* pada **Gambar 1** menunjukkan kondisi reaksi memang sudah optimal, yaitu dengan suhu 65°C selama 20 menit. Selain menunjukkan kondisi optimal reaksi RT-LAMP, hasil tersebut juga menunjukkan bahwa seluruh reagen baik kit RT-LAMP maupun primer mix dapat bekerja dengan baik ditunjukkan dengan munculnya pendaran pada kontrol positif, dikonfirmasi dengan elektroforesis (**Gambar 2**). Suhu 630C dan 670C belum optimal untuk amplifikasi cDNA dari SARS-CoV-2, sehingga tidak memunculkan pendaran pada hasil.

Hasil RT-LAMP dengan *water bath* pada **Gambar 3** menunjukkan bahwa tidak ada pendaran yang muncul setelah reaksi amplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa RT-LAMP menggunakan *water bath* tidak bekerja secara optimal sehingga amplifikasi tidak berjalan jika diamati berdasarkan pendaran yang terjadi. Ada dua faktor utama yang menyebabkan amplifikasi pada reaksi RT-LAMP menggunakan *water bath* dalam penelitian ini tidak berjalan dengan baik. Faktor pertama adalah setiap alat yang digunakan dalam metode RT-LAMP memerlukan optimasi masing-masing. Hal ini dapat mengakibatkan produk RT-LAMP yang dihasilkan tidak memenuhi LOD (*Load Of Density*) sehingga tidak muncul pendaran [10]. Oleh karena itu diperlukan optimasi reaksi RT-LAMP menggunakan *water bath* untuk mendapatkan kondisi reaksi yang ideal. Faktor kedua adalah *water bath* yang digunakan perlu dikalibrasi ulang untuk mengetahui kesesuaian suhu pada tombol pengaturan dengan suhu air sebenarnya. Kalibrasi *water bath* diperlukan untuk

memastikan bahwa suhu air sebenarnya sesuai dengan pengaturan dan suhu tersebut terdistribusi secara merata pada seluruh badan air. Kalibrasi seharusnya dilakukan setiap dua kali dalam setahun dan dilakukan dengan interval waktu tertentu serta didokumentasikan sehingga diketahui suhu air secara real time [20].

4. Kesimpulan

RT-LAMP berbasis *pocket*PCR dan waterbath berpotensi untuk dikembangkan sebagai alat deteksi SARS-CoV-2 yang sederhana, murah, mudah, dan dapat diakses oleh semua fasilitas kesehatan di Indonesia. Hasil optimasi deteksi SARS-CoV-2 menggunakan *pocket*PCR berhasil memunculkan pendar pada suhu amplifikasi 65°C selama 20 menit. Namun, metode deteksi RT-LAMP menggunakan *water bath* masih perlu dilakukan tahapan optimasi untuk menghasilkan sensitifitas yang tinggi. Penelitian lanjutan masih diperlukan untuk melakukan optimasi RT-LAMP berbasis *water bath* ini. Sehingga, penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mengoptimalkan peran RT-LAMP menggunakan berbagai alat amplifikasi yang murah dan sederhana.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Majelis Diktilitbang PP Muhammadiyah yang telah mendanai seluruh penelitian melalui program Hibah RisetMu Batch 4. Selain itu, ucapan terima kasih disampaikan kepada seluruh pimpinan Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta yang telah mendukung pelaksanaan penelitian ini. Serta seluruh mahasiswa Program Studi Bioteknologi yang telah berpartisipasi dan memberikan dukungan terhadap kemajuan penelitian.

Referensi

- [1] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, "Pedoman Kesiapsiagaan Menghadapi Coronavirus Disease (COVID-19)," *Direkorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit*. pp. 1–88, 2020.
- [2] WHO, "Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19," no. April, pp. 1–6, 2020.
- [3] S. A. Bustin, "Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, 2000, doi: 10.1677/jme.0.0250169.
- [4] Kumparan News, "Kelabakan Mengidentifikasi Sebaran Corona - kumparan," *Kumparan News*, 2020. [Online]. Available: <https://kumparan.com/kumparannews/kelabakan-mengidentifikasi-sebaran-corona-1tAZlnyjJ8n/full>.
- [5] T. Notomi *et al.*, "Notomi et al LAMP.pdf," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 12, p. e63, 2000, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [6] Y. P. Wong, S. Othman, Y. L. Lau, S. Radu, and H. Y. Chee, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 124, no. 3, pp. 626–643, 2018, doi: 10.1111/jam.13647.
- [7] T. Pocketpcr, "PocketPCR Kit Instructions."
- [8] G. Mulberry, K. A. White, M. Vaidya, K. Sugaya, and B. N. Kim, "3D printing and milling a real-time PCR device for infectious disease diagnostics," *PLoS One*, vol. 12, no. 6, pp. 1–18, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0179133.
- [9] H. Ji *et al.*, "Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of actinobacillus pleuropneumoniae based the dsbE-like gene," *Pesqui. Vet. Bras.*, vol. 32, no. 8, pp. 757–760, 2012, doi: 10.1590/S0100-736X2012000800014.

- [10] V. L. Fowler *et al.*, “A highly effective reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the rapid detection of SARS-CoV-2 infection,” no. January, 2020.
- [11] Satgas Covid -19, “Beranda Satgas Penanganan COVID-19,” *Satgas Covid -19*. pp. 1–43, 2020.
- [12] Sukesih, L. Maiza, and A. Sopyan, “Tingkat Pendidikan dan Pengetahuan dengan Perilaku Upaya Pencegahan Covid-19 pada Masyarakat,” in *The 13th University Research Colloquium*, 2021, pp. 1–7.
- [13] U. G. Mada, H. Wibawa, D. I. Centre, U. G. Mada, M. S. Hakim, and U. G. Mada, “virus strains from Indonesia Full-length genome characterization and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 virus strains from Indonesia,” no. September, 2020, doi: 10.21203/rs.3.rs-77212/v2.
- [14] Y. Furuse, “Genomic sequencing effort for SARS-CoV-2 by country during the pandemic .pdf,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 103, pp. 305–307, 2021.
- [15] C. Yan *et al.*, “Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 26, no. 6, pp. 773–779, 2020, doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001.
- [16] C. Basu, “Preface. PCR primer design,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1275, p. vii, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2365-6.
- [17] B. Jia *et al.*, “GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. December, pp. 1–9, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02860.
- [18] P. De Benedictis and C. De Battisti, *Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acids by Pyrosequencing*, vol. 1. Elsevier Inc., 2014.
- [19] Y. Zou, M. G. Mason, and J. R. Botella, “Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics,” *PLoS One*, vol. 15, no. 6 June, pp. 1–19, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0235216.
- [20] M. Rofi'i, S. Syaifudin, D. Titisari, and B. Utomo, “Waterbath Calibrator with Nine Channels Sensor,” *Indones. J. Electron. Electromed. Eng. Med. informatics*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2019, doi: 10.35882/ijeemi.v1i1.1.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)