Jurnal Biologi Tropis

Original Research Paper

Optimization of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Conditions for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex

Iftitahul Hayati[1], Andani Eka Putra[2*], Linosefa[2]

[1]Program Magister Ilmu Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia;

[2]Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia;

Article History
Received: October 25th, 2026
Revised : October 31th, 2026
Accepted : November 02th, 2026

*Corresponding Author: **Andani Eka Putra,** Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia;
Email: andani1508@med.unand.ac.id

Abstract: Tuberculosis (TB) remains a major global health concern, highlighting the need for accessible molecular diagnostic methods. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a DNA amplification technique with potential for TB detection, although its performance depends on appropriate reaction conditions. Objective: This study aimed to evaluate incubation temperature and time for LAMP amplification targeting the *mpt64* (*Rv1980c*) gene. This laboratory experimental study was conducted at the Center for Diagnostic Research and Infectious Diseases Laboratory, Universitas Andalas, Padang, Indonesia. Nine temperature–time combinations were evaluated using three incubation temperatures (63°C, 64°C, and 65°C) and three incubation times (30, 40, and 60 minutes). Amplification results were assessed using SYBR Green I fluorescence and 2% agarose gel electrophoresis and analyzed descriptively. The condition of 65°C for 60 minutes was selected for further evaluation because a clearer DNA band was observed in the positive control, whereas no clear DNA band was detected in the negative control. However, green fluorescence was observed in both controls in some observations, indicating inconsistent visual differentiation using SYBR Green I. The reaction condition of 65°C for 60 minutes was selected as the most suitable condition among those evaluated based on the agarose gel electrophoresis results. Further studies are needed to assess the consistency and specificity of the amplification products.

Keywords: LAMP; *mpt64*; Reaction optimization; SYBR Green I; Tuberculosis.

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan masih menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat utama di dunia. Pada tahun 2023, diperkirakan terdapat 10,8 juta kasus TB secara global, menunjukkan bahwa upaya peningkatan deteksi dan diagnosis TB masih diperlukan (WHO, 2024). Indonesia juga memiliki beban TB yang tinggi, dengan 804.836 kasus baru dilaporkan pada tahun 2023 (Sarasmita *et al*., 2024).

Diagnosis TB yang cepat dan akurat diperlukan untuk mendukung penemuan kasus dan pengobatan secara tepat waktu (WHO, 2024). Pemeriksaan molekuler seperti Xpert MTB/RIF telah memberikan kemajuan dalam diagnosis TB, tetapi penerapannya masih menghadapi keterbatasan berupa kebutuhan peralatan khusus, pasokan listrik yang stabil, pemeliharaan alat, dan biaya pemeriksaan (Khan et al., 2021). Keterbatasan tersebut menunjukkan perlunya metode diagnostik molekuler alternatif yang lebih sederhana dan membutuhkan infrastruktur minimal (Sari & Darfyozanda, 2025).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) merupakan metode amplifikasi asam nukleat yang berlangsung pada suhu konstan

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

© 2026 The Author(s). This article is open access

menggunakan enzim Bst DNA polimerase dan beberapa primer spesifik (Notomi *et al*., 2000). LAMP mampu menghasilkan produk amplifikasi dalam waktu relatif singkat dan memungkinkan hasil dideteksi secara visual melalui indikator fluoresensi atau perubahan warna (Lapierre & Drancourt, 2018). Karakteristik tersebut menjadikan TB-LAMP berpotensi digunakan untuk mendukung diagnosis TB, terutama pada fasilitas dengan keterbatasan sumber daya (WHO,2016).

Teknologi LAMP menggunakan empat hingga enam primer khusus untuk amplifikasi DNA pada suhu antara 60 hingga 65°C dengan bantuan Bst DNA polimerase. Proses LAMP terdiri dari empat tahap: desain primer, ekstraksi DNA, reaksi LAMP, dan deteksi hasil. Sensitivitas LAMP sangat bergantung pada kualitas ekstraksi asam nukleat, sehingga langkah ekstraksi DNA sangat krusial. DNA dapat diekstraksi menggunakan kit komersial atau secara manual. Reaksi LAMP memerlukan empat primer, yaitu *outer primers* (F3 dan B3), *inner primers* (FIP dan BIP), dan primer loop opsional (LF dan LB) perangkat lunak perancangan primer khusus dapat membantu merancang desain primer yang kompleks untuk reaksi LAMP (Zeng *et al.*, 2025).

Keberhasilan amplifikasi LAMP dipengaruhi oleh kesesuaian suhu inkubasi, waktu reaksi, konsentrasi primer, ion magnesium, nukleotida, dan aktivitas DNA polimerase. Suhu yang tidak sesuai dapat mengganggu proses penempelan primer dan aktivitas enzim, sedangkan waktu inkubasi yang tidak memadai dapat menghasilkan produk yang belum cukup untuk dideteksi. Sebaliknya, kondisi reaksi yang tidak terkendali dapat menyebabkan munculnya sinyal yang tidak sesuai dengan keberadaan target. Oleh karena itu, optimasi perlu dilakukan secara sistematis dengan mempertahankan komponen lain tetap ketika pengaruh suhu dan waktu dievaluasi (Notomi *et al.,* 2000; Ağel *et al.,* 2020).

Penelitian Ağel *et al.* (2020) menunjukkan pentingnya optimasi kondisi amplifikasi dan evaluasi metode visualisasi dalam pengembangan LAMP untuk deteksi *M. tuberculosis*. Penelitian tersebut mengevaluasi berbagai komponen reaksi dan melaporkan bahwa kondisi suhu tertentu menghasilkan positif palsu pada kontrol negatif. Temuan tersebut menunjukkan bahwa munculnya sinyal pada kontrol negatif merupakan persoalan yang perlu diperhatikan dalam pengembangan metode LAMP. Akan tetapi, suhu optimal yang dilaporkan oleh penelitian tersebut tidak dapat langsung diterapkan pada penelitian ini karena perbedaan target, primer, dan komposisi reaksi dapat memengaruhi hasil amplifikasi.

Deteksi hasil LAMP dapat dilakukan melalui perubahan warna, fluoresensi, atau elektroforesis gel agarosa. SYBR Green I merupakan pewarna yang berinteraksi dengan DNA untai ganda sehingga dapat menghasilkan sinyal fluoresensi ketika produk DNA terbentuk. Namun, sinyal tersebut tidak secara langsung membedakan produk target dari produk amplifikasi nonspesifik atau DNA kontaminan. Penelitian mengenai deteksi amplifikasi menggunakan SYBR Green I juga menunjukkan bahwa sinyal positif palsu dapat muncul pada kontrol tanpa template akibat kontaminasi atau amplifikasi nonspesifik (Li et al., 2017). Dengan demikian, hasil visualisasi perlu ditafsirkan bersama kontrol dan bukti analitik lainnya.

Elektroforesis gel agarosa dapat digunakan untuk mengamati pola produk DNA berdasarkan migrasinya di dalam gel. Produk amplifikasi *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) dapat menghasilkan pola pita yang kompleks akibat terbentuknya struktur DNA berulang dan struktur menyerupai *stem-loop*. Namun, pola pita menyerupai tangga (*ladder-like pattern*) tidak dapat secara mandiri memastikan bahwa produk yang terbentuk merupakan hasil amplifikasi spesifik dari target gen MPT64. Oleh karena itu, interpretasi hasil elektroforesis perlu mempertimbangkan hasil kontrol positif dan kontrol negatif. Apabila diperlukan, identitas produk amplifikasi juga perlu dikonfirmasi menggunakan metode lain yang sesuai.

Berdasarkan pertimbangan tersebut, penelitian ini bertujuan mengevaluasi respons amplifikasi LAMP yang menargetkan gen *mpt64* untuk deteksi tuberkulosis (TB) pada variasi suhu reaksi 63°C, 64°C, dan 65°C serta waktu inkubasi 30, 40, dan 60 menit. Hasil

amplifikasi dievaluasi secara awal berdasarkan perubahan warna menggunakan SYBR Green I dan pola pita elektroforesis gel agarosa, dengan mempertimbangkan hasil kontrol positif dan kontrol negatif. Evaluasi ini diarahkan untuk mengidentifikasi kondisi reaksi yang menunjukkan indikasi amplifikasi berdasarkan parameter yang diamati. Kondisi yang diperoleh belum dapat dinyatakan sebagai kondisi optimal secara definitif karena konsistensi hasil, spesifisitas analitik, sensitivitas analitik, dan kinerja diagnostik klinis belum dievaluasi secara menyeluruh..

Bahan dan Metode

Desain Penelitian dan Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan mengevaluasi kondisi reaksi LAMP untuk deteksi TB dengan target gen *mpt64* (*Rv1980c*).

Penelitian dilaksanakan di di Laboratorium Pusat Diagnostik Riset dan Penyakit Infeksi, Universitas Andalas, Padang, Indonesia. Tahapan penelitian meliputi persiapan reaksi, pengujian variasi suhu dan waktu inkubasi, serta evaluasi hasil amplifikasi menggunakan SYBR Green I dan elektroforesis gel agarosa**.**

Desain Primer LAMP

Urutan gen target *mpt64* diperoleh dari GenBank dengan nomor aksesi NC_000962.3. Enam primer LAMP, yaitu F3, B3, FIP, BIP, LF, dan LB, dirancang menggunakan perangkat lunak PrimerExplorer V5 (Eiken Genome). Kombinasi primer tersebut dirancang untuk mengenali delapan daerah pada urutan target. Primer FIP terdiri atas daerah F1c dan F2, sedangkan primer BIP terdiri atas daerah B1c dan B2. Urutan dan panjang primer yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Desain Primer LAMP

Primer Name	Sequence (5'-3')	Lenght
F3	GCGCATCAAGATCTTCATGC	19
B3	CGGTATCGGTGCCTTTCAAC	20
FIP (F1c+F2)	CCGGGAGTAGTTTGCAGCACCACTCAGATATCGCGGCAATC	41
BIP (B1c+B2)	ATCTTCATGCTGGTCACGGCTGTCCTCGCAGTAGGTCTTGG	41
LF	GCGACACCCGAACAACAGA	19
LB	CCAGGCGTGCCAGATTCAA	19

Uji LAMP

Reaksi TB-LAMP dilakukan dalam volume akhir 25 µL. Komponen reaksi meliputi *10× Isothermal Amplification Buffer*, $MgSO_4$ dengan konsentrasi akhir 4 mM, dNTP dengan konsentrasi akhir 1,4 mM, primer FIP dan BIP masing-masing 1,6 µM, primer F3 dan B3 masing-masing 0,2 µM, primer LF dan LB masing-masing 0,8 µM, 8 U Bst 2.0 DNA Polymerase (New England Biolabs, Amerika Serikat), betaine dengan konsentrasi akhir 0,6 M, serta 5 µL DNA hasil ekstraksi sebagai templat. *Nuclease-free water* (NFW) ditambahkan hingga mencapai volume akhir 25 µL.

Reaksi diinkubasi menggunakan *water bath* pada tiga variasi suhu, yaitu 63°C, 64°C, dan 65°C, dengan tiga variasi waktu inkubasi, yaitu 30, 40, dan 60 menit. Kombinasi kedua faktor tersebut menghasilkan sembilan kondisi pengujian. Konsentrasi akhir setiap komponen dan volume yang ditambahkan disesuaikan dengan konsentrasi stok reagen yang digunakan.

Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif (*positive control*, PC) berupa DNA yang diekstraksi dari isolat kultur *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), sedangkan kontrol negatif (*negative control*, NC) menggunakan NFW tanpa penambahan DNA templat. Kontrol positif digunakan untuk mengevaluasi kemampuan sistem reaksi dalam menghasilkan produk amplifikasi, sedangkan kontrol negatif digunakan untuk mengamati kemungkinan terbentuknya sinyal atau produk amplifikasi tanpa penambahan DNA target.

Hasil kedua kontrol dievaluasi menggunakan SYBR Green I dan elektroforesis gel agarosa. Berdasarkan pengamatan awal, elektroforesis menunjukkan pita DNA pada kontrol positif, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan pita DNA yang jelas. Namun, visualisasi SYBR Green I terkadang

menghasilkan fluoresensi hijau pada kedua kontrol. Oleh karena itu, hasil kedua metode dibandingkan secara bersamaan dan diinterpretasikan secara hati-hati.

Optimasi Suhu dan Waktu Inkubasi

Evaluasi kondisi reaksi dilakukan menggunakan kombinasi tiga suhu inkubasi (63°C, 64°C, dan 65°C) dan tiga waktu inkubasi (30, 40, dan 60 menit). Dengan demikian, terdapat sembilan kombinasi kondisi pengujian. Setiap kombinasi dievaluasi berdasarkan hasil visualisasi SYBR Green I dan pola pita DNA pada elektroforesis gel agarosa.

Jumlah ulangan untuk setiap kombinasi suhu dan waktu inkubasi ditetapkan berdasarkan pelaksanaan eksperimen dan harus dicantumkan secara eksplisit. Pemilihan kondisi reaksi dilakukan berdasarkan hasil pengamatan awal, tanpa menganggap kondisi terpilih sebagai kondisi optimal definitif sebelum konsistensi dan spesifisitas amplifikasi dievaluasi lebih lanjut.

Deteksi Produk LAMP

Produk amplifikasi dideteksi menggunakan SYBR Green I dengan pengenceran 1:10. Sebanyak 1 µL larutan pewarna ditambahkan pada produk reaksi, kemudian perubahan fluoresensi diamati menggunakan sinar ultraviolet. Hasil pengamatan dicatat berdasarkan munculnya fluoresensi dan perbedaan tampilan antara kontrol positif dan kontrol negatif.

Selanjutnya, produk amplifikasi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%. Pola pita DNA diamati untuk membandingkan hasil amplifikasi pada setiap kombinasi suhu dan waktu inkubasi. Pola pita menyerupai tangga (*ladder-like pattern*) diperlakukan sebagai karakteristik yang dapat ditemukan pada produk LAMP, tetapi tidak digunakan sebagai satu-satunya bukti spesifisitas terhadap gen target *mpt64*.

Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif berdasarkan pengamatan terhadap hasil amplifikasi kontrol positif dan kontrol negatif pada setiap variasi suhu dan waktu inkubasi. Hasil visualisasi menggunakan SYBR Green I dibandingkan dengan pola pita DNA pada elektroforesis gel agarosa untuk menentukan kondisi reaksi yang dipilih untuk evaluasi lebih lanjut.

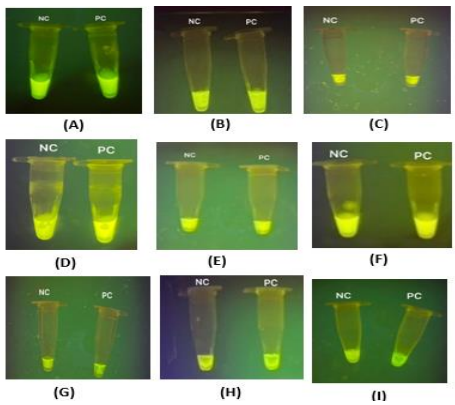
Hasil dan Pembahasan

Hasil Optimasi Suhu dan Waktu Inkubasi

Optimasi dilakukan pada suhu 63°C, 64°C, dan 65°C dengan variasi waktu inkubasi 30, 40, dan 60 menit. Hasil pengamatan dievaluasi berdasarkan visualisasi SYBR Green I dan pola pita DNA pada elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pada kondisi inkubasi 65°C selama 60 menit, menunjukkan adanya amplifikasi DNA pada kontrol positif, yang ditandai dengan pola pita DNA yang terlihat lebih jelas, sedangkan pada kontrol negatif tidak terdeteksi pita DNA. Berdasarkan hasil tersebut, kondisi 65°C selama 60 menit dipilih untuk evaluasi lebih lanjut.

Visualisasi Produk Amplifikasi LAMP

Visualisasi menggunakan SYBR Green I menunjukkan terbentuknya fluoresensi setelah reaksi amplifikasi, tetapi perbedaan intensitas antara kontrol positif dan kontrol negatif belum konsisten. Kondisi ini dapat berkaitan dengan kemampuan SYBR Green I yang berikatan dengan DNA untai ganda tanpa membedakan urutan target secara spesifik, sehingga fluoresensi tidak selalu menunjukkan amplifikasi gen MPT64. Selain itu, kemungkinan terbentuknya produk amplifikasi nonspesifik, kontaminasi DNA, atau perbedaan kondisi reaksi juga perlu dipertimbangkan sebagai faktor yang dapat memengaruhi interpretasi hasil.

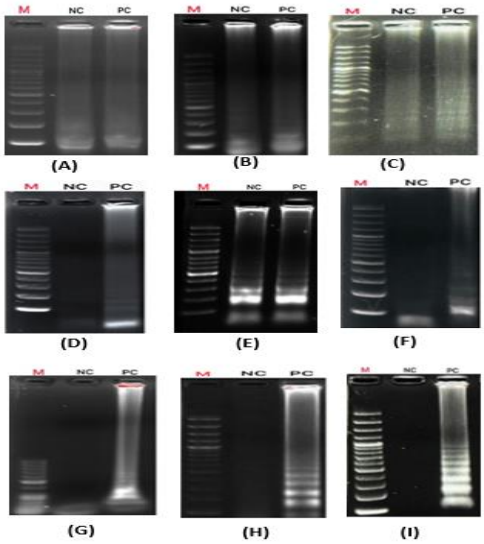


Gambar 1. Hasil visualisasi fluoresensi SYBR Green I pada kontrol negatif (NC) dan kontrol positif (PC) pada berbagai kondisi suhu dan waktu inkubasi: (A) 63°C selama 30 menit; (B) 63°C selama 40 menit; (C) 63°C selama 60 menit; (D) 64°C selama 30 menit; (E) 64°C selama 40 menit; dan (F) 64°C selama 60 menit; (G) 65°C selama 30 menit; (H) 65°C selama 40 menit; (I) 65°C selama 60 menit.

Oleh karena itu, fluoresensi SYBR Green I tidak dapat digunakan sebagai satu-satunya dasar untuk memastikan keberhasilan amplifikasi target. Hasil visualisasi selanjutnya dibandingkan dengan pola pita DNA pada elektroforesis gel agarosa untuk memperoleh gambaran yang lebih menyeluruh mengenai hasil reaksi. Meskipun demikian, kesesuaian kedua metode tersebut belum secara definitif membuktikan spesifisitas produk terhadap gen MPT64, sehingga diperlukan konfirmasi lebih lanjut apabila spesifisitas amplifikasi hendak dipastikan.

Konfirmasi Produk LAMP dengan Elektroforesis

Hasil elektroforesis gel agarosa 2% menunjukkan pola pita bertingkat (*ladder-like pattern*) pada kontrol positif dan sampel positif, sedangkan kontrol negatif dan sampel negatif tidak menunjukkan pola pita tersebut. Pola ini merupakan karakteristik produk LAMP yang terbentuk dari berbagai fragmen DNA dengan ukuran berbeda akibat mekanisme amplifikasi berulang dan pembentukan struktur *stem-loop* (Notomi et al., 2000; Park, 2022).



Gambar 2. Hasil elektroforesis gel agarosa produk amplifikasi LAMP pada kontrol negatif (NC) dan kontrol positif (PC) pada berbagai kondisi suhu dan waktu inkubasi: (A) 63°C selama 30 menit; (B) 63°C selama 40 menit; (C) 63°C selama 60 menit; (D) 64°C selama 30 menit; (E) 64°C selama 40 menit; dan (F) 64°C selama 60 menit; (G) 65°C selama 30 menit; (H) 65°C selama 40 menit; (I) 65°C selama 60 menit. M menunjukkan penanda ukuran DNA (DNA ladder) 100 bp.

Temuan tersebut menunjukkan bahwa sistem TB-LAMP yang dikembangkan mampu menghasilkan produk amplifikasi yang dapat dikonfirmasi secara elektroforesis. Perbedaan antara hasil visualisasi SYBR Green I dan elektroforesis menunjukkan bahwa keterbatasan utama pada penelitian ini lebih berkaitan dengan interpretasi visual produk amplifikasi, bukan semata-mata kegagalan proses amplifikasi.

Pembahasan

Metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) memiliki keunggulan berupa kemampuan mengamplifikasi DNA pada suhu konstan tanpa memerlukan proses denaturasi berulang seperti pada PCR konvensional. Metode ini menggunakan DNA polimerase dengan aktivitas *strand displacement* serta empat primer utama yang mengenali enam daerah berbeda pada DNA target, sehingga memungkinkan amplifikasi yang cepat dan selektif apabila desain primer serta kondisi reaksi telah dioptimalkan (Notomi et al., 2000). Selain itu, penggunaan suhu konstan dan metode deteksi yang relatif sederhana menjadikan LAMP berpotensi diterapkan pada pemeriksaan molekuler di fasilitas dengan keterbatasan peralatan (Rymaszewska dan Wąsowicz, 2021).

Suhu dan waktu inkubasi merupakan parameter penting dalam reaksi Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) karena memengaruhi aktivitas DNA polimerase, penempelan primer pada DNA target, dan pembentukan produk amplifikasi. LAMP menggunakan DNA polimerase dengan aktivitas strand displacement sehingga amplifikasi dapat berlangsung pada suhu konstan tanpa siklus perubahan suhu seperti pada PCR konvensional. Notomi et al. (2000) menjelaskan bahwa metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) menggunakan DNA polimerase dengan aktivitas *strand displacement* dan empat primer yang mengenali enam daerah berbeda pada DNA target. Becherer et al. (2020) menyebutkan bahwa LAMP umumnya berlangsung pada rentang suhu 60–65°C. Berdasarkan landasan tersebut, penelitian ini mengevaluasi suhu 63°C, 64°C, dan 65°C pada beberapa waktu inkubasi untuk menentukan kondisi reaksi yang sesuai bagi amplifikasi DNA target *mpt64*. Pemilihan kondisi reaksi selanjutnya didasarkan pada hasil

visualisasi SYBR Green I dan pola pita DNA pada elektroforesis gel agarosa.

Pada penelitian ini, optimasi dilakukan pada suhu 63°C, 64°C, dan 65°C dengan waktu inkubasi 30, 40, dan 60 menit. Variasi suhu digunakan untuk mengamati kondisi yang mendukung amplifikasi, sedangkan variasi waktu digunakan untuk membandingkan hasil reaksi pada durasi inkubasi yang berbeda. Menurut Wong *et al*. (2018), kondisi reaksi dan desain primer merupakan faktor penting dalam penerapan LAMP, termasuk dalam mengendalikan pembentukan produk nonspesifik. Oleh karena itu, waktu inkubasi yang lebih lama tidak selalu menjamin hasil yang lebih spesifik.

Kondisi reaksi pada suhu 65°C selama 60 menit dipilih berdasarkan hasil pengamatan elektroforesis yang menunjukkan adanya amplifikasi ditandai munculnya pita DNA pada kontrol positif dan tidak adanya amplifikasi pada kontrol negatif. Pengujian dilakukan beberapa kali untuk mengevaluasi hasil amplifikasi pada kondisi yang diuji. Selain itu, visualisasi SYBR Green I menunjukkan intensitas fluoresensi hijau yang lebih tinggi pada kontrol positif dibandingkan kontrol negatif, meskipun perbedaannya belum menunjukkan kontras yang optimal. Oleh karena itu, hasil visualisasi SYBR Green I diinterpretasikan bersama pola pita DNA pada elektroforesis gel agarosa. Kondisi 65°C selama 60 menit dipilih sebagai kondisi terpilih berdasarkan evaluasi awal. Namun, evaluasi lebih lanjut masih diperlukan untuk menilai konsistensi hasil pada setiap kombinasi suhu dan waktu, serta memastikan spesifisitas produk amplifikasi dan kemungkinan amplifikasi nonspesifik.

SYBR Green I merupakan pewarna fluoresen yang berikatan dengan DNA untai ganda (*double-stranded* DNA atau dsDNA). Pewarna ini dapat digunakan untuk membantu mendeteksi pembentukan produk amplifikasi LAMP melalui pengamatan fluoresensi. Namun, SYBR Green I tidak mengenali urutan DNA tertentu sehingga sinyal fluoresensi tidak secara langsung membuktikan bahwa DNA target telah teramplifikasi secara spesifik (Fischbach *et al*.,2018).

Meskipun demikian, LAMP memiliki beberapa keterbatasan, antara lain kompleksitas desain primer, kemungkinan amplifikasi nonspesifik, dan risiko kontaminasi *carry-over*. Kontaminasi *carry-over* terjadi ketika produk amplifikasi dari reaksi sebelumnya mencemari reaksi berikutnya sehingga berpotensi menyebabkan hasil positif palsu (Kim et al., 2023; Quyen et al., 2022). Selain itu, penggunaan SYBR Green I sebagai indikator fluoresensi tidak dapat memastikan bahwa DNA yang terdeteksi merupakan produk spesifik dari gen target *mpt64*, karena pewarna tersebut berinteraksi dengan DNA tanpa mengenali urutan target secara spesifik.

Penggunaan SYBR Green I dan elektroforesis gel agarosa memberikan informasi yang saling melengkapi dalam evaluasi kondisi reaksi TB-LAMP. Visualisasi SYBR Green I digunakan untuk mengamati fluoresensi yang terbentuk setelah reaksi, sedangkan elektroforesis gel agarosa digunakan untuk mengamati pola pita DNA pada hasil amplifikasi. Dalam penelitian ini, kedua metode tersebut dipertimbangkan secara bersama-sama untuk mengevaluasi hasil pada berbagai kombinasi suhu dan waktu inkubasi serta menentukan kondisi reaksi yang paling sesuai berdasarkan hasil pengamatan.

Kesimpulan

Kondisi reaksi TB-LAMP dengan target gen *mpt64* (*Rv1980c*) pada suhu 65°C selama 60 menit dipilih sebagai kondisi kerja terpilih berdasarkan pengamatan pola pita DNA melalui elektroforesis gel agarosa dan visualisasi menggunakan SYBR Green I. Elektroforesis menunjukkan pita DNA yang lebih jelas pada kontrol positif, sedangkan pada kontrol negatif tidak teramati pita amplifikasi yang jelas. Sementara itu, visualisasi SYBR Green I menunjukkan perbedaan fluoresensi antara kedua kontrol, tetapi kontrasnya belum optimal. Hasil ini memberikan indikasi awal bahwa kondisi reaksi yang diuji dapat mendukung amplifikasi DNA, tetapi belum cukup untuk memastikan spesifisitas amplifikasi terhadap gen *mpt64* maupun menetapkan kinerja analitik dan diagnostik metode TB-LAMP. Oleh karena itu, diperlukan optimasi dan pengujian lanjutan, termasuk evaluasi konsistensi hasil, spesifisitas analitik, sensitivitas analitik, dan batas deteksi, sebelum kinerja metode untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dapat disimpulkan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. dr. Andani Eka Putra, M.Sc, Dr. dr Linosefa, Sp, MK, dan Laboratorium Pusat Diagnostik dan Riset Penyakit Infeksi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas atas dukungan fasilitas dan pelaksanaan penelitian ini.

Referensi

Ağel, H. E., Sağcan, H., Ceyhan, İ., & Durmaz, R. (2020). Optimization of isothermal amplification method for Mycobacterium tuberculosis detection and visualization method for fieldwork. *Turkish Journal of Medical Sciences,* 50(4), 1069–1075. https://doi.org/10.3906/sag-1910-6

Becherer, L., et al. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)—Review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods,* 12, 717–746. https://doi.org/10.1039/C9AY02246E

Fischbach, J., et al. (2015). Shining a light on LAMP assays—A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*, 58(4), 189–194. https://doi.org/10.2144/000114275

Khan, A., Singh, R., Sharma, S., Singh, V., Sheoran, A., Soni, A., Dhull, V., Gill, P. S., Yadav, A., Chaudhary, D., Gupta, M. C., & Mehta, P. K. (2022). Diagnosis of osteoarticular tuberculosis by immuno-PCR assay based on mycobacterial antigen 85 complex detection. *Letters in Applied Microbiology,* 74(1), 17–26. https://doi.org/10.1111/lam.13567

Kim, S.-H., Lee, S.-Y., Kim, U., & Oh, S.-W. (2023). Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1280, 341693. https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341693

Kohan, L., Shahhosseiny, M. H., Razavi, M. R., Parivar, K., Moslemi, E., & Werngren, J. (2011). Evaluation of loop mediated isothermal amplification for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples. *African Journal of Biotechnology,* 10(26), 5096–5101. https://doi.org/10.9790/0853-1706146368

Lapierre, S. G., & Drancourt, M. (2018). rpoB targeted loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for consensus detection of mycobacteria associated with pulmonary infections. *Frontiers in Medicine,* 5, Article 332. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00332

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research,* 28(12), Article e63. https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63

Park, J.-W. (2022). Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests. *Biosensors,* 12(10), Article 857. https://doi.org/10.3390/bios12100857

Quyen, T. L., et al. (2022). Elimination of carryover contamination in real-time reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of the SARS-CoV-2 virus in point-of-care testing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 12, Article 856553. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.856553

Sarasmita, M. A., Sudarma, I. W., & Susanty, S. (2024). Leveraging Google Trends to identify Indonesian tuberculosis trends before and after the implementation of a national mandatory notification system. *Indian Journal of Tuberculosis*, 71(3), 276–283. https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2023.05.009

Sari, R. P., & Darfyozanda, N. A. (2025). Manajemen program penanggulangan dan parak karakah. 9(April), 2648–2663.

Sharma, G., Tewari, R., Dhatwalia, S. K., Yadav, R., Behera, D., & Sethi, S. (2019). A loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Letters in Applied Microbiology.* https://doi.org/10.1111/lam.13115

Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? Cells, 10(8), Article 1931.

https://doi.org/10.3390/cells10081931

Tucci, P., González-Sapienza, G., & Marin, M. (2014). Pathogen-derived biomarkers for active tuberculosis diagnosis. *Frontiers in Microbiology,* 5, Article 549. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00549

Wan, L., Chen, T., Gao, J., Dong, C., Wong, A. H.-H., Jia, Y., Mak, P.-I., Deng, C.-X., & Martins, R. P. (2017). A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection. *Scientific Reports,* 7, Article 14586. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14698-x

Wong, Y., Othman, S., Lau, Y., Radu, S., & Chee, H. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology.* https://doi.org/10.1111/jam.13647

World Health Organization. (2016). The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: Policy guidance. https://apps.who.int/iris/handle/10665/249154

World Health Organization. (2024). Global tuberculosis report 2024. https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024

Zeng, M., et al. (2025). A novel rapid detection method for Mycobacterium tuberculosis based on scattering-light turbidity using loop-mediated isothermal amplification. *Biosensors,* 15(3), Article 162. https://doi.org/10.3390/bios15030162