



PROTEKSI ISI PROPOSAL

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi proposal ini dalam bentuk apapun kecuali oleh pengusul dan pengelola administrasi pengabdian kepada masyarakat

PROPOSAL PENELITIAN 2023

Rencana Pelaksanaan Penelitian: tahun 2023 s.d. tahun 2024

1. JUDUL PENELITIAN

Perancangan alat deteksi genotyping HPV berbasis multiplex recombinase polymerase amplification dan nucleic acid lateral flow immunoassay (mRPA- NALFIA) sebagai alternatif metode PCR skrining kanker serviks yang mudah dan murah di fasilitas kesehatan primer

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kesehatan	Teknologi alat kesehatan dan diagnostik	Pengembangan in vivo diagnostic (IVD) untuk deteksi penyakit degenerative	Ilmu Biomedik

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional	Penelitian Fundamental - Reguler	Riset Dasar	SBK Riset Dasar	3	2

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta
RADITYA WRATSANGKA Ketua Pengusul	Universitas Trisakti	Profesi Dokter	Koodinasi pengumpulan sampel dan uji alat di lapangan	5989166
MONICA DWI HARTANTI Anggota Pengusul	Universitas Trisakti	Pendidikan Dokter	Koordinasi analisis sampel di laboratorium	6679344
TJHWA ENDANG DJUANA Anggota Pengusul	Universitas Trisakti	Teknik Elektro	koordinasi analisis data in silico terkait genotyping HPV	5993185
ALVIONITA KOGOYA Anggota Pengusul	Universitas Trisakti	Pendidikan Dokter	Membantu uji sampel di laboratorium	-
Dr. dr Christina Safira Whinie Lestari, M.Kes Anggota Pengusul	Pusat Riset Biomedis, Badan Riset dan Inovasi Nasional	-	Membantu pengembangan alat deteksi genotyping HPV	-
Drh. Didik Tulus Subekti, M.Kes Anggota Pengusul	Pusat Riset Biomedis, Badan Riset dan Inovasi Nasional	-	Koordinasi pengembangan alat deteksi genotyping HPV	-
Dr. Sunarno, M.Si.Med Anggota Pengusul	Pusat Riset Biomedis, Badan Riset dan Inovasi Nasional	-	Membantu uji sampel di laboratorium	-

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra	Dana
-------	------------	------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian	Keterangan
1	Artikel di Jurnal	accepted/published	PeerJ
2	Kekayaan Intelektual (KI)	terdaftar	Alat deteksi genotyping HPV berbasis mRPA-NALFIA

5. ANGGARAN

Rencana Anggaran Biaya penelitian mengacu pada PMK dan buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat yang berlaku.

Total RAB 2 Tahun Rp. 612.011.520,00

Tahun 1 Total Rp. 305.093.100,00

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Primer PCR	Unit	12	350.000	4.200.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Kit Miniprep DNA 200 reaksi	Unit	2	11.000.000	22.000.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	TwistDX	Unit	3	17.000.000	51.000.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	MyTaq Master Mix 1000 reaction	Unit	1	4.750.000	4.750.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Agarose Powder	Unit	2	1.750.000	3.500.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Sybr safe DNA Stain	Unit	2	2.750.000	5.500.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Axygen pipette tips 0.5 - 10 ul	Unit	10	450.000	4.500.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Axygen pipette tips 100 ul	Unit	10	450.000	4.500.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Axygen pipette tips 200 ul	Unit	10	475.000	4.750.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Axygen pipette tips 1000 ul	Unit	10	500.000	5.000.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Axygen Microtube 1.5 ml (500 pcs)	Unit	1	475.000	475.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Axygen PCR tube 0.2 ml flat cap clear (500 pcs)	Unit	1	1.751.000	1.751.000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	Persiapan pelaksanaan pengumpulan data 9 orang x 2 hari	OH	18	130.000	2.340.000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	Honor pembantu peneliti 4 orang x 4 jam	OJ	32	25.000	800.000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
		x 20 hari				
Pengumpulan Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	Honor administrasi pengumpulan data penelitian 1 orang x 3 bulan	OB	3	300.000	900.000
Pengumpulan Data	Transport	Transport dalam kota 9 orang x 5 kali	OK (kali)	45	150.000	6.750.000
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	Honor administrasi analisis data penelitian 1 orang x 3 bulan	OB	3	300.000	900.000
Analisis Data	HR Pengolah Data	honor pengolah data penelitian	P (penelitian)	1	1.540.000	1.540.000
Analisis Data	Transport Lokal	Transport dalam kota 9 orang x 5 kali	OK (kali)	45	150.000	6.750.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	Rapat pembuatan laporan dan luaran 9 orang x 5 hari	OH	45	130.000	5.850.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	Pembuatan artikel di jurnal internasional bereputasi Scopus Q1	Paket	1	25.000.000	25.000.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Pewarna digoxigenin labelling kit	Unit	1	8.474.200	8.474.200
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Anti-Cy3 / Cy5 antibody	Unit	1	11.873.000	11.873.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Anti-Fluorescein antibody	Unit	1	9.789.900	9.789.900
Analisis Data	Biaya analisis sampel	HPV genotyping	Unit	70	1.600.000	112.000.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	Hak Cipta Artikel Ilmiah	Paket	1	200.000	200.000

Tahun 2 Total Rp. 306.918.420,00

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Universal Lateral Flow Assay Kit	Unit	2	32.051.710	64.103.420
Analisis Data	Biaya analisis sampel	Genotyping HPV	Unit	125	1.600.000	200.000.000
Analisis Data	HR Pengolah Data	Pengolahan data penelitian	P (penelitian)	1	1.540.000	1.540.000
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	Honor administrasi analisis data penelitian 1 orang x 6 bulan	OB	6	300.000	1.800.000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	Biaya konsumsi rapat makan dan snack 9 orang x 5 hari	OH	45	75.000	3.375.000
Analisis Data	Transport Lokal	Transport lokal 9 orang x 3 bulan x 5 kali	OK (kali)	135	150.000	20.250.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran	Uang harian rapat di luar	Rapat pembuatan laporan dan luaran 9	OH	45	130.000	5.850.000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Tambahan	kantor	orang x 5 hari				
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	Hak paten sederhana	Paket	1	3.000.000	3.000.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya penyusunan buku termasuk book chapter	Pembuatan monograf	Paket	1	3.000.000	3.000.000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	Honor pembantu peneliti untuk pengumpulan data 1 orang x 4 jam x 10 hari x 4 bulan	OJ	160	25.000	4.000.000



Isian Substansi Proposal

SKEMA PENELITIAN DASAR

Petunjuk: Pengusul hanya diperkenankan mengisi di tempat yang telah disediakan sesuai dengan petunjuk pengisian dan tidak diperkenankan melakukan modifikasi template atau penghapusan di setiap bagian.

JUDUL

Tuliskan Judul Usulan

Perancangan alat deteksi genotyping HPV berbasis multiplex recombinase polymerase amplification dan nucleic acid lateral flow immunoassay (mRPA-NALFIA) sebagai alternatif metode PCR skrining kanker serviks yang mudah dan murah di fasilitas kesehatan primer

RINGKASAN

Ringkasan penelitian tidak lebih dari 300 kata yang berisi urgensi, tujuan, dan luaran yang ditargetkan.

Urgensi penelitian adalah keberhasilan skrining kanker serviks yang masih rendah sehingga membuat kanker serviks memiliki biaya pengobatan langsung tertinggi di Indonesia berdasarkan data BPJS. Metode skrining yang umumnya diterapkan adalah Pap Smear dan Inspeksi Visual Asam asetat (IVA), namun sensitivitas dan spesifisitas masih rendah, terutama untuk lesi prekanker. Kombinasi tes DNA-HPV direkomendasikan oleh WHO untuk meningkatkan keberhasilan skrining kanker serviks, namun diperlukan reagen dan alat yang mahal sehingga sulit diterapkan di fasilitas kesehatan primer. Metode Recombinase Polimerase Amplification merupakan uji isothermal dengan suhu tunggal 37-42°C sehingga dipercaya dapat menggantikan metode PCR sebagai point of care test. Hasil amplifikasi dapat divisualisasikan dengan perangkat elektroforesis maupun metode nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA). Elektroforesis dan NALFIA telah banyak dikombinasikan dengan metode PCR namun metode RPA umumnya menggunakan metode elektroforesis untuk visualisasi sehingga membutuhkan waktu sekitar 3 jam. Penelitian ini akan mengkombinasikan metode multiplex RPA dengan NALFIA (mRPA-NALFIA) untuk mendeteksi DNA HPV tipe 16, 18 dan 52 yang merupakan tipe HPV terbanyak yang ditemukan pada penderita kanker serviks di Indonesia berdasarkan gen L1, E6 dan E7 sebagai alternatif metode PCR di fasilitas kesehatan primer. **Permasalahan** penelitian ini adalah bagaimana perancangan dan keakuratan alat deteksi genotyping HPV tipe 16, 18 dan 52 berbasis gen L1, E5 dan E6 menggunakan metode kombinasi mRPA-NALFIA sebagai alternatif metode PCR di fasilitas kesehatan primer? **Tujuan** penelitian ini membuat purwarupa alat deteksi HPV tipe 16, 18 dan 52 dengan metode mRPA-NALFIA dengan sensitivitas dan spesifisitas yang mendekati metode PCR sehingga dapat menjadi alternatif metode PCR yang mudah dan murah di fasilitas kesehatan primer. Penelitian ini akan berlangsung selama 2 tahun dengan **luaran penelitian tahun pertama** adalah publikasi internasional di jurnal Scopus Q1 PeerJ dengan status published dan sertifikat Hak Cipta. **Luaran pada tahun kedua** adalah puwarupa alat deteksi HPV mRPA-NALFIA, monograf serta hak paten sederhana dengan status terdaftar.

KATA KUNCI

Kata kunci maksimal 5 kata

Kanker serviks, HPV, mRPA, NALFIA, PCR

PENDAHULUAN

Penelitian Dasar merupakan riset yang memuat temuan baru atau pengembangan ilmu pengetahuan dari kegiatan riset yang terdiri dari tahapan penentuan asumsi dan dasar hukum yang akan digunakan, formulasi konsep dan/ atau aplikasi formulasi dan pembuktian konsep fungsi dan/ atau karakteristik penting secara analitis dan eksperimental.

Pendahuluan penelitian tidak lebih dari 1000 kata yang terdiri dari:

- A. Latar belakang dan rumusan permasalahan yang akan diteliti
- B. Pendekatan pemecahan masalah
- C. *State of the art* dan kebaruan
- D. Peta jalan (*road map*) penelitian 5 tahun kedepan (jika dalam bentuk konsorsium harus dilengkapi dengan roadmap penelitian konsorsium)
- E. Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan, mengikuti format Vancouver

Latar Belakang

Kanker serviks merupakan jenis kanker tertinggi di Indonesia dengan biaya pengobatan langsung yang tertinggi dibandingkan dengan kanker lain, mencapai hampir Rp 400 juta. Berbagai teknik skrining kanker serviks telah diteliti sebagai strategi potensial untuk mengurangi beban ekonomi yang ditimbulkan dari biaya pengobatan langsung kanker serviks(1). Metode skrining yang ada saat ini adalah pemeriksaan sitologi dengan tes Papanicolaou (Pap smear) dan inspeksi visual asam asetat (IVA), namun keduanya memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang relatif rendah dibandingkan dengan tes amplifikasi asam nukleat, yaitu berkisar antar 30 – 87% (2–4). World Health Organization (WHO) merekomendasikan tes DNA-HPV sebagai metode skrining yang utama pada tahun 2021(5), namun diperlukan mesin Polimerase Chain Reaction (PCR) dan perangkat elektroforesis yang harganya mahal(6).

Uji amplifikasi isothermal seperti *polimerase rekombinase amplification* (RPA) diperkenalkan baru-baru ini untuk mengatasi masalah ini. Prinsip kerja RPA mirip dengan PCR, namun lebih mudah dan murah karena menggunakan suhu tunggal 37-42°C(7). Metode RPA telah dikembangkan untuk deteksi berbagai virus dan bakteri, termasuk HPV(8,9). Untuk visualisasi hasil amplifikasi umumnya menggunakan perangkat elektroforesis sehingga diperlukan waktu sekitar 3 jam untuk pengerjaannya. Teknik *nucleic acid lateral flow immunoassay* (NALFIA) sudah sering digabungkan dengan metode PCR, namun belum banyak dimanfaatkan untuk visualisasi mRPA(7). Selain itu, metode mRPA yang ada tidak mendeteksi tipe HPV yang umumnya ditemukan pada penderita kanker serviks di Indonesia, yaitu tipe 16, 18 dan 52(10).

Rumusan Permasalahan

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

- Bagaimana rancangan alat deteksi genotyping HPV tipe 16, 18 dan 52 berbasis gen L1, E5 dan E6 menggunakan metode kombinasi mRPA-NALFIA?
- Apakah hasil deteksi genotyping HPV tipe 16, 18 dan 52 pada alat yang dirancang memiliki keakuratan yang memadai dan dapat diandalkan?

Pendekatan Pemecahan Masalah

Untuk memecahkan masalah dalam penelitian ini akan dilakukan beberapa pendekatan yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut:

- Pengembangan protokol yang meliputi desain primer mRPA yang spesifik untuk gen L1, E5 dan E6 HPV dan penentuan kondisi optimal reaksi mRPA dan NALFIA.
- Pengujian klinis alat rancangan untuk menilai keakuratan, sensitivitas, dan spesifisitas metode yang diusulkan pada sampel yang representatif.

State of The Art

Metode Pap smear dan IVA adalah metode standard yang digunakan untuk skrining kanker serviks. Walaupun murah, namun prosedur ini tidak nyaman dan memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang lebih rendah, khususnya untuk lesi prekanker(2–4). Seiring dengan meningkatnya pemahaman terhadap peran HPV tipe *High Risk* dalam karsinogenesis serviks, tes molekuler DNA HPV secara bertahap diakui sebagai alat yang lebih sensitif daripada tes Pap saja, terutama untuk lesi prekanker(11,12). Beberapa studi menunjukkan bahwa tes DNA HPV dapat memungkinkan interval skrining kanker serviks diperpanjang hingga ≥ 5 tahun(2,6,13,14). Beragam tes DNA HPV yang sudah tersedia di laboratorium klinis di Indonesia seperti COBAS 4800 dan *Abbot Real-time*, mampu mendeteksi HPV tipe 16 dan 18 serta kumpulan 12 HR lainnya berdasarkan gen L1 yang mengkode capsid HPV dengan waktu antara 5 – 6 jam per reaksi(6). Karena diperlukan mesin PCR, harga tes ini cukup mahal, dengan kisaran 15,16. harga Rp 500.000,- sampai Rp. 1.400.000,- dan tidak termasuk dalam BPJS(15). Baru-baru ini, sebuah uji amplifikasi isothermal seperti recombinase polimerase amplification (RPA) muncul untuk mengatasi masalah ini. RPA menggunakan 3 enzim, rekombinase, protein pengikat DNA beruntai tunggal, dan polimerase pengganti untai, untuk memungkinkan amplifikasi isothermal dari target primer tertentu pada suhu tunggal 37-42°C . Pada tahun 2018, Ma dkk. mengembangkan RPA untuk tipe HPV HR 16 dan 18, dan pada tahun 2021(9), Gong dkk. mengembangkan RPA untuk 13 tipe HPV HR berdasarkan gen L1(8). Tahun 2023, Wongsamart dkk mengembangkan mRPA berdasarkan gen L1, E6 dan E7 yang mencakup 20 tipe HR dan 14 tipe LR. Gen E6 dan E7 dipergunakan karena dianggap merupakan biomarker progresivitas kanker serviks(16). Untuk visualisasi hasil amplifikasi, umumnya digunakan perangkat elektroforesis sehingga dibutuhkan waktu pengerjaan sampai 3 jam. NALFIA merupakan cara memvisualisasi pita DNA dengan teknik lateral flow yang umumnya dikombinasikan dengan metode PCR, namun jarang dikombinasikan dengan mRPA(7). Pada penelitian ini, tim peneliti merancang alat deteksi genotyping HPV tipe 16, 18, dan 52 berdasarkan gen L1, E6 dan E7 dengan kombinasi metode mRPA-NALFIA. Tipe-tipe HPV tersebut merupakan tipe HPV HR terbanyak di Indonesia sehingga dapat menjadi alat skrining tambahan untuk kanker serviks yang dapat dipakai di puskesmas(10).

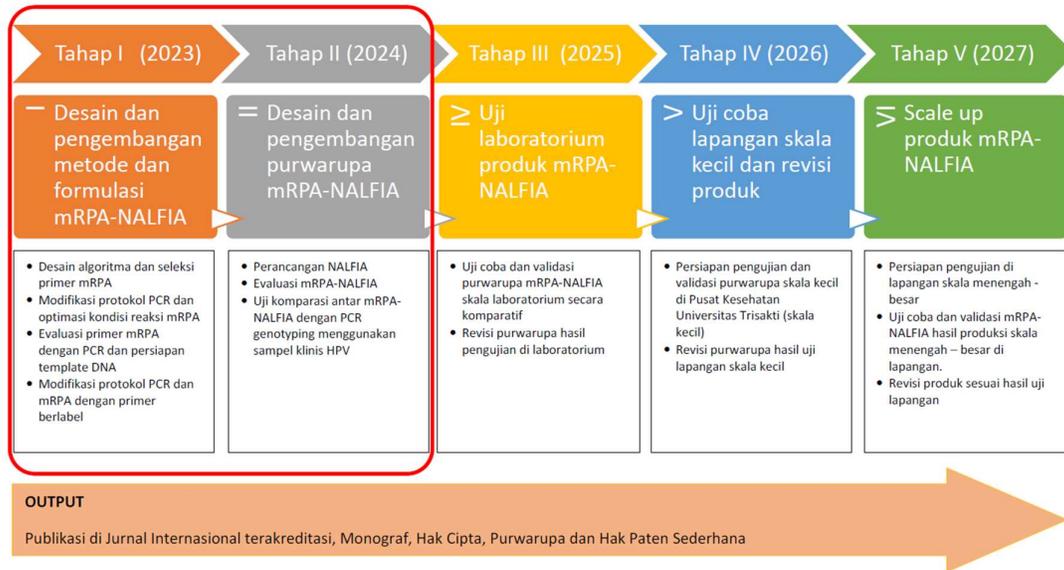
Kebaruan

Kebaruan dari penelitian ini adalah penggunaan teknologi mRPA-NALFIA untuk memudahkan visualisasi hasil pita DNA dalam deteksi HPV HR khas Indonesia, yaitu HPV tipe 16, 18 dan 52. Teknik ini mengkombinasikan amplifikasi DNA isothermal menggunakan mRPA dengan deteksi cepat produk amplifikasi menggunakan lateral flow. Reaksi mRPA mengamplifikasi urutan DNA spesifik gen L1, E6 dan E7 HPV tipe 16, 18 dan 52 dari sampel target. Produk DNA yang diamplifikasi kemudian dicampur dengan probe deteksi spesifik yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas. Probe ini dirancang untuk mengenali dan mengikat produk DNA yang diamplifikasi, membentuk kompleks yang bermigrasi sepanjang jalur lateral flow. Ketika kompleks bergerak sepanjang jalur, ia bertemu dengan zona deteksi di mana reagen penangkap yang diimobilisasi pada jalur mengenali dan mengikat kompleks tersebut, membentuk pita yang terlihat. Intensitas pita berkorelasi dengan jumlah produk DNA yang di-amplifikasi yang hadir dalam sampel. mRPA-NALFIA adalah metode yang sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi beberapa target secara simultan. Metode ini telah

digunakan untuk mendeteksi penyakit menular, patogen penyebab keracunan makanan, dan gangguan genetik. Metode ini sederhana, cepat, dan membutuhkan peralatan minimal, sehingga cocok untuk digunakan di lingkungan dengan keterbatasan sumber daya.

Peta Jalan (Road Map) Penelitian

Penelitian ini adalah riset dasar yang dalam rangka pengembangan inovasi alat deteksi HPV dengan metode mRPA-NALFIA sebagai alternatif metode PCR di fasilitas kesehatan primer seperti yang tertuang pada peta jalan berikut (Gambar 1).



Gambar 1. Peta Jalan periset dalam inovasi mRPA-NALFIA untuk deteksi HPV tipe 16, 18 dan 52. Kotak merah menunjukkan posisi penelitian yang diajukan pada proposal ini.

Untuk memulai peta jalan pengembangan inovasi ini, tim peneliti mengawali dengan pengembangan metode mRPA pada tahun 2023 dan dilanjutkan dengan pengembangan metode NALFIA dengan target purwarupa alat deteksi HPV pada tahun 2024. Tiga tahun berikutnya didedikasikan untuk *scale-up* produk dengan uji di laboratorium dan lapangan.

METODA

Metode atau cara untuk mencapai tujuan yang telah ditetapkan ditulis tidak melebihi 1000 kata. Bagian ini dapat dilengkapi dengan diagram alir penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan yang akan dikerjakan selama waktu yang diusulkan. Format diagram alir dapat berupa file JPG/PNG. Metode penelitian harus dibuat secara utuh dengan penahapan yang jelas, mulai dari awal bagaimana proses dan luarannya, dan indikator capaian yang ditargetkan yang tercermin dalam Rencana Anggaran Biaya (RAB).

Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian observasional deskriptif dengan desain potong lintang untuk uji alat deteksi HPV dengan metode mRPA-NALFIA.

Waktu dan Lokasi Penelitian

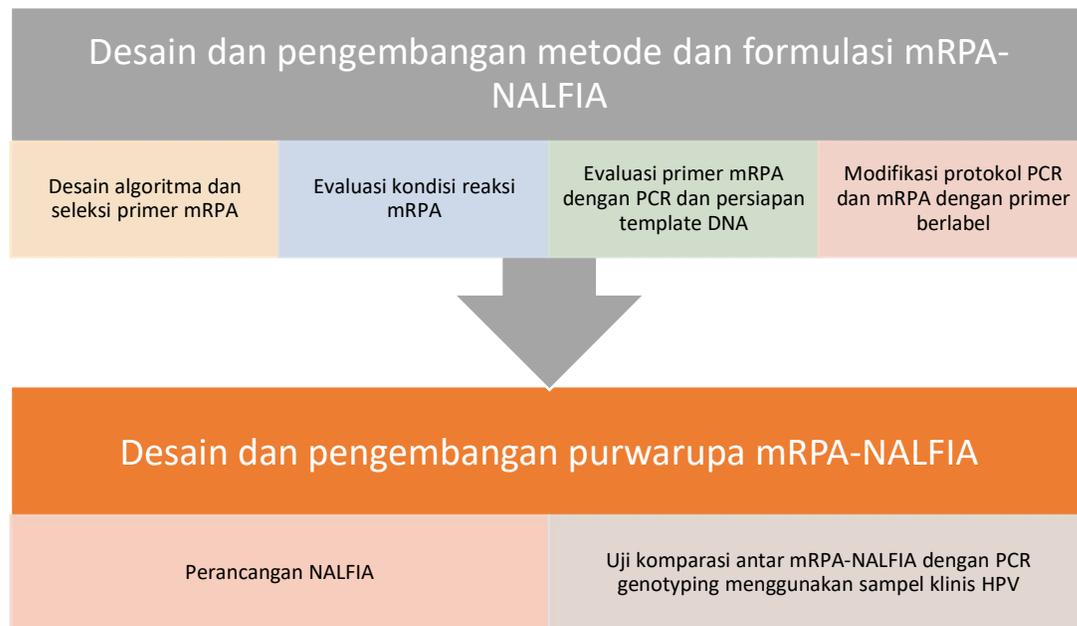
Penelitian ini berlangsung selama 2 tahun yang memiliki luaran purwarupa yang siap uji di laboratorium Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti Jakarta sebagai tempat persiapan template DNA dan uji komparasi dan Laboratorium Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor sebagai tempat pengembangan purwarupa.

Sampel Penelitian

Dalam pengembangan purwarupa ini, digunakan sampel penelitian berupa swab serviks dari wanita dengan dan tanpa kanker serviks tersimpan yang berasal dari penelitian sebelumnya.

Tahapan Penelitian

Penelitian ini berlangsung dalam beberapa tahap yang tertera pada gambar 2.



Gambar 2. Alur penelitian pengembangan alat deteksi HPV tipe 16, 18 dan 52 dengan metode mRPA-NALFIA

Tahap I (2023): Desain dan pengembangan metode dan formulasi mRPA-NALFIA

- Desain Algoritma dan seleksi primer mRPA
Langkah awal mendesain primer adalah mengambil semua sekuens L1, E6 dan E7 HPV tipe 16, 18 dan 52 dari semua database gen dan disejajarkan dengan menggunakan *ClustalW*. Primer mRPA akan didesain menggunakan Primer-BLAST yang akan meliputi HPV tipe 16, 18 dan 52. Setiap pasangan primer yang didesain akan diuji spesifisitasnya dengan BLASTN.
- Isolasi DNA dan HPV genotyping
Isolasi DNA dilakukan untuk semua sampel swab serviks tersimpan dengan menggunakan kit *quick miniprep DNA* (Zymo, CA, USA) untuk selanjutnya dilakukan HPV genotyping dengan menggunakan Cobas 4800 HPV test (Roche Diagnostics).

- Evaluasi kondisi reaksi mRPA
Reaksi mRPA sebanyak 25 μ L diinkubasi selama 40 menit pada suhu 39°C. Untuk mengevaluasi kondisi reaksi mRPA, diperlukan penentuan konsentrasi minimal primer yang dihasilkan amplicon gen L1 dan E6/E7, serta waktu inkubasi terpendek dengan batas deteksi tertinggi dan spesifisitas yang benar. Reaksi dihentikan dengan pemanasan pada suhu 80 °C selama 2 menit. Hasilnya dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 3%. Ukuran amplicon untuk RPA L1 dan E6/7 adalah masing-masing sekitar 250 bp dan 170 bp.
- Evaluasi primer mRPA dengan PCR dan persiapan template DNA
PCR multiplex L1-E6/E7 (mPCR) digunakan sebagai eksperimen amplifikasi nukleotida paralel untuk primer mRPA. Reaksi PCR (50 μ L) terdiri dari 25 μ L MyTaq HS Red Mix, 2 μ L air dan 1 μ L masing-masing primer dan ~ 100 ng DNA. Kondisi PCR adalah 95 °C selama 5 menit diikuti oleh 35 siklus pada suhu 95 °C selama 15 detik, 56 °C selama 30 detik, dan 72 °C selama 30 detik, dengan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. Produk amplicon dengan ukuran yang sesuai dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa 3%. Untuk persiapan template DNA HPV L1 (dan E6/E7) sebagai representasi HPV tipe 16, 18 dan 52, primer PCR yang melingkupi wilayah amplifikasi RPA akan digunakan. Kondisi PCR serupa dengan yang telah disebutkan sebelumnya, kecuali suhu perpanjangan dan ukuran produk yang akan disesuaikan. Produk PCR dipurifikasi dengan agarosa dan diukur kuantitasnya.
- Modifikasi protokol PCR dan mRPA dengan primer berlabel
Primer berlabel yang akan digunakan pada tahapan ini adalah primer *forward* berlabel biotin pada ujung 5' untuk ketiga pasang primer. Adapun pada primer reverse akan dilabel dengan digoxigenin, Cy3/5 dan fluorescein pada ujung 3' dari masing-masing pasang primer. Langkah ini dilakukan untuk menguji apakah protokol PCR dengan primer berlabel akan menghasilkan hasil yang sama dengan primer tanpa label yang telah didesain sebelumnya.

Tahap II (2024): Desain dan pengembangan purwarupa mRPA-NALFIA

- Perancangan NALFIA
Perancangan untuk NALFIA dengan Universal Lateral Flow (AbCam) menggunakan protokol dasar sebagaimana telah ditetapkan produsen. Perancangan NALFIA ini menghasilkan satu lateral flow untuk satu amplicon, sehingga apabila untuk mendeteksi dua amplicon dari penggunaan 2 pasang primer membutuhkan dua strip lateral flow. Sepasang primer pertama dilabel dengan digoxigenin pada ujung 5' (untuk forward) dan fluorescein pada ujung 3' (untuk reverse). Adapun sepasang primer kedua akan dilabel dengan digoxigenin pada ujung 5' (untuk forward) dan Cy3/5 pada ujung 3' (untuk reverse). Selanjutnya sebagai penangkap digunakan antibodi anti fluorescein dan antibodi anti Cy3/5 yang terlebih dahulu harus dikonjugasikan dengan Lightning-Link® Ulfa-Tag (AbCam). Antibodi lainnya yaitu antibodi anti digoxigenin akan dikonjugasikan terlebih dahulu dengan *gold nanoparticle* untuk visualisasi.
- Uji komparasi antar mRPA-NALFIA dengan PCR genotyping menggunakan sampel klinis HPV
Tahap ini membandingkan hasil yang didapat dari pengembangan mRNA-NALFIA dengan metode PCR genotyping komersial (Cobas). Sampel yang digunakan adalah sampel swab serviks positif dan negatif HPV tipe 16, 18 dan 52 yang dikumpulkan dalam tabung berisi buffer. Efikasi uji dihitung berdasarkan persamaan berikut: sensitivitas = positif \div (positif + negatif palsu), spesifisitas = negatif \div (negatif + positif palsu), positif

palsu = 1 – spesifisitas, negatif palsu = 1 – sensitivitas, dan akurasi = (positif + negatif) ÷ total sampel. Hasil akhir dari evaluasi ini adalah purwarupa.

Tabel 2. Metodologi Inovasi alat deteksi HPV tipe 16, 18 dan 52 dengan metode mRPA-NALFIA setiap tahun secara detail

No.	Aktivitas	Pelaksana	Bukti Luaran	Target Indikator Capaian
TAHUN PERTAMA				
1	Desain algoritma dan seleksi primer mRPA	ED, DS	Primer yang siap digunakan	Tersedia
2	Modifikasi protokol PCR dan optimasi kondisi reaksi mRPA	WL, S	Protokol PCR dan reaksi mRPA yang siap digunakan	Tersedia
3	Evaluasi primer mRPA dengan PCR dan persiapan template DNA	MDH, AK	Primer mRPA dan template DNA yang siap digunakan	Tersedia
4	Modifikasi dan uji protokol PCR dan mRPA dengan primer berlabel	WL, MDH	PCR dan mRPA dengan primer berlabel memiliki hasil yang sama dengan primer tanpa label	Tersedia
5	Pembuatan laporan lengkap dan luaran	RW, MDH, ED, LM, DS, WL, S, AK	Publikasi di jurnal internasional terindex SCOPUS Q1 PeerJ	Published
			Hak Cipta artikel ilmiah	Sertifikat terbit
TAHUN KEDUA				
6	Perancangan NALFIA	DS, S, WL	NALFIA yang siap untuk digabungkan dengan mRPA	Tersedia
7	Uji komparasi antar mRPA-NALFIA dengan PCR genotyping	RW, MDH, ED, AK	Purwarupa	Tersedis

DAFTAR PUSTAKA

Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan, mengikuti format Vancouver. Hanya pustaka yang disitasi pada usulan penelitian yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

- [1] Andriani Y, Kristina SA, Wiedyaningsih C. Estimasi Biaya Pengobatan Langsung Penyakit Kanker di Indonesia: Estimasi Direct Medical Cost (DMC) Estimation of Direct Medical Cost of Cancer in Indonesia: Estimasi Direct Medical Cost (DMC). | *Maj Farm.* 2021;17(3):251–5.
- [2] Boone JD, Erickson BK, Huh WK. New insights into cervical cancer screening. *J Gynecol Oncol.* 2012;23(4):282–7.
- [3] Mayrand M-H, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007 Oct;357(16):1579–88.
- [4] Spence AR, Goggin P, Franco EL. Process of care failures in invasive cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Prev Med (Baltim).* 2007;45(2–3):93–106.
- [5] World Health Organization. WHO recommends DNA testing as a first-choice screening method for cervical cancer prevention [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 12]. Available from: <https://www.who.int/europe/news/item/11-09-2021-who-recommends-dna-testing-as-a-first-choice-screening-method-for-cervical-cancer-prevention>
- [6] Liu SS, Chan KKL, Wei TN, Tse KY, Ngu SF, Chu MMY, et al. Clinical performance of the Roche Cobas 4800 HPV test for primary cervical cancer screening in a Chinese population. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(8 August):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0272721>
- [7] Pecchia S, Da Lio D. Development of a rapid PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay (PCR-NALFIA) based on rDNA IGS sequence analysis for the detection of *Macrophomina phaseolina* in soil. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2018;151:118–28. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770121830263X>.
- [8] Gong J, Zhang G, Wang W, Liang L, Li Q, Liu M, et al. A simple and rapid diagnostic method for 13 types of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) detection using CRISPR-Cas12a technology. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92329-2>
- [9] Ma B, Fang J, Wang Y, He H, Dai M, Lin W, et al. Isothermal Method of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Most Common High-Risk Human Papillomavirus Type 16 and Type 18 DNA. *Clin Lab.* 2017 Jan;63(1):27–38.
- [10] Marlina M, Aldi Y, Putra AE, Sopiandi DS, Hari DG, Arfiandi A, et al. Identifikasi Type Human Papillomavirus (HPV) pada Penderita Kanker Serviks. *J Sains Farm Klin.* 2016;3(1):54.
- [11] Katyal S, Mehrotra R. Complementary procedures in cervical cancer screening in low resource settings. *J Obstet Gynaecol India.* 2011 Aug;61(4):436–8.
- [12] Oh JK, Shin HR, Gong G, Sohn JH, Khang SK. Diagnostic accuracy of conventional Pap test, liquid-based cytology and human papillomavirus DNA testing in cervical cancer screening in Korea: a meta-analysis. *Korean J Epidemiol.* 2008;30(2):178–87.
- [13] Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet (London, England).* 2014 Feb;383(9916):524–32.
- [14] Vink MA, Bogaards JA, Meijer CJLM, Berkhof J. Primary human papillomavirus DNA screening for cervical cancer prevention: Can the screening interval be safely extended? *Int J Cancer.* 2015;137(2):420–7.

- [15] Winahyu A. HPV DNA Lebih Akurat daripada Pap Smear [Internet]. 2020. Available from: <https://mediaindonesia.com/humaniora/287884/hpv-dna-lebih-akurat-dari-pap-smear>.
- [16] Wongsamart R, Bhattarakasol P, Chaiwongkot A, Wongsawaeng D, Okada PA, Palaga T, et al. Multiplex recombinase polymerase amplification for high-risk and low-risk type HPV detection, as potential local use in single tube. *Sci Rep* [Internet]. 2023;13(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28038-9> .

PERSETUJUAN PENGUSUL

Tanggal Pengiriman	Tanggal Persetujuan	Nama Pimpinan Pemberi Persetujuan	Sebutan Jabatan Unit	Nama Unit Lembaga Pengusul
-	-	-	-	-

Komentar : -