

## DETEKSI CEPAT GEN *INV*A PADA *SALMONELLA* ATCC DENGAN *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION* (LAMP)

Soni Muhsinin\*, Rahma Ziska, Maria Martina Sulastri  
Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

\*Email: [soni.muhsinin@stfb.ac.id](mailto:soni.muhsinin@stfb.ac.id)

Artikel diterima: 7 Januari 2019; Disetujui: 20 Maret 2019

### ABSTRAK

*Salmonella* spp. merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit *typhoid salmonellosis* (demam tifoid). Bakteri ini masuk melalui rute oral, biasanya dengan cara mengkontaminasi makanan dan minuman. *Salmonella* spp. memiliki gen *invA* yang menyebabkan patogenitas pada manusia. Metode kultur digunakan sebagai *gold standard* untuk mendeteksi *Salmonella* spp. Akan tetapi, metode tersebut membutuhkan infrastruktur dan laborious. Tujuan penelitian ini untuk pengembangan deteksi *Salmonella* spp. dengan metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Tahapan penelitian dimulai dari desain primer LAMP, kultur *Salmonella* ATCC, Isolasi DNA kultur *Salmonella* ATCC, dan Optimasi LAMP *Salmonella* ATCC. Primer LAMP yang telah didesain terdiri dari tiga pasang. DNA *Salmonella* ATCC yang telah diisolasi memiliki konsentrasi 4,5 ng/ul. Metode LAMP menunjukkan hasil yang positif dalam mendeteksi gen *InvA* pada *Salmonella* ATCC. Hasil positif ditunjukkan dengan pendaran warna (fluoresensi) pada sampel DNA *Salmonella* ATCC, sedangkan hasil negatif sebaliknya ditunjukkan dengan tidak adanya fluoresensi pada kontrol negatif (*nuclease free water*). Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan, metode LAMP dapat mendeteksi gen *InvA* pada *Salmonella* ATCC.

**Kata kunci:** LAMP, gen *InvA*, *Salmonella* spp., isolasi DNA, demam tifoid.

### ABSTRACT

*Salmonella* spp. is a bacterium that causes *typhoid salmonellosis* (typhoid fever). These bacteria enter through the oral route, usually by contaminating food and drinks. *Salmonella* spp. has an *invA* gene that causes pathogenicity in humans. The culture method is used as a gold standard to detect *Salmonella* spp. However, this method requires infrastructure and is laborious. The purpose of this study is to develop detection of *Salmonella* spp. using the *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) method. The stages of the study began with the primary design of LAMP, *Salmonella* ATCC culture, DNA Isolation of *Salmonella* ATCC culture, and *Salmonella* ATCC LAMP Optimization. Primary LAMP that has been designed consists of three pairs. *Salmonella* ATCC DNA that has been isolated has a concentration of 4,5 ng/ul. The LAMP method shows positive results in detecting the *InvA* gene in *Salmonella* ATCC. Positive results are indicated by fluorescence in *Salmonella* ATCC DNA samples, whereas the negative results are shown in the

*absence of fluorescence in nuclease free water. The conclusion from the research that has been done, LAMP method can detect InvA gene in Salmonella ATCC.*

**Keywords:** LAMP, InvA gene Salmonella spp., DNA Isolation, typhoid fever.

## PENDAHULUAN

*Salmonella* spp adalah bakteri gram negatif motil (aktif bergerak) yang menginfeksi manusia melalui rute oral menyebabkan infeksi saluran pencernaan atau lebih dikenal dengan *Salmonellosis*. Salah satu serovar dari *Salmonella* spp. yaitu *Salmonella thypimurium* merupakan serovar yang dapat menyebabkan penyakit Tifus (Demam Tifoid) (Pham & McSorley, 2015; De Jong *et al.*, 2012). *Salmonella* spp. merupakan penyebab utama dari penyakit yang disebarkan melalui makanan (*foodborne diseases*) (Zhao *et al.*, 2014).

*Salmonella* spp. memiliki gen *invA* yang berperan dalam menyebabkan sakit pada manusia. Gen tersebut terletak di daerah yang disebut *Salmonella pathogenicity island* (SPI-R). Gen *invA* pada *Salmonella* spp. terletak di kromosom yang mampu menghasilkan protein yang dapat memberikan sifat invasif pada sel epitel yang terdapat di dalam usus. Keberadaan gen *InvA* ini yang menyebabkan *Salmonella* spp bersifat

pathogen pada tubuh manusia. (Pham & McSorley, 2015)

Deteksi *Salmonella* spp. biasanya dilakukan dengan metode kultur sebagai *gold standard*. Akan tetapi metode ini memiliki kelemahan seperti, waktu deteksi yang cukup lama, hasil pengujian yang terkadang tidak konsisten, dan memerlukan lab pengujian dengan level Biosefty yang tinggi (Bugarel *et al.*, 2017; Kokkinos *et al.*, 2014).

Pengembangan metode deteksi cepat menjadi alternatif untuk mengatasi kelemahan tersebut. Salah satu metode yang telah dikembangkan oleh para peneliti yaitu metode molekuler berbasis asam nukleat, seperti Metode *LoopMediated Isothermal Amplification* (LAMP). LAMP adalah salah satu teknik diagnostik molekuler yang telah dikembangkan dari tahun 1999 di Jepang. Teknik LAMP menggunakan amplifikasi DNA pada suhu tetap, sehingga penggunaan alat *thermocycler* yang mahal tidak diperlukan. Amplifikasi

pada suhu tetap dapat terjadi dengan menggunakan jumlah primer yang lebih banyak berdasarkan prinsip *nested* dan *reverse transcriptase* PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Proses amplifikasi pada metode LAMP menggunakan enzim yang dapat menjadi substrat selama proses reaksi amplifikasi berlangsung. Analisis hasil metode LAMP ini sangat sederhana karena dapat dideteksi secara visual dengan melihat endapan (pada proses reaksi ditambahkan reagen pengendap) atau dapat berupa perubahan pendar warna fluoresensi. (Li et al., 2017; Wu et al., 2015; Zhuang et al., 2014). Berdasarkan latar belakang tersebut telah dilakukan penelitian untuk pengembangan deteksi cepat gen *InvA* pada *Salmonella* spp. dengan menggunakan metode LAMP.

## **METODE PENELITIAN**

### **Kultur *Salmonella* ATCC**

Kultur *Salmonella* ATCC didapatkan dari POLTEKES Bandung. Kultur tersebut kemudian disubkultur dengan menggunakan media pertumbuhan Nutrien Agar (NA). Koloni *Salmonella* ATCC yang

tumbuh setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, kemudian diambil untuk dilakukan isolasi DNA.

### **Desain dan Proyeksi Primer LAMP**

Primer LAMP untuk mendeteksi *Salmonella* terdiri dari enam buah primer. Primer didesain untuk mendeteksi gen *InvA* pada *Salmonella* yang berhubungan dengan sifat patogenitas dari bakteri tersebut. Primer didesain dengan menggunakan Software PrimerExplorer V5 secara online di web: <https://primerexplorer.jp/e/>. Hasil dari software tersebut kemudian dibandingkan dengan literatur yang telah melakukan penelitian LAMP. Primer yang telah didesain kemudian dilakukan proyeksi atau mapping primer dengan menggunakan software SnapGene Viewer 4.2.4.

### **Isolasi DNA *Salmonella* sp.**

Isolasi DNA pada sampel kultur positif *Salmonella* sp menggunakan KIT isolasi DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Hasil isolasi DNA ini dijadikan kontrol positif yang akan digunakan pada tahapan pengembangan assay yaitu optimasi LAMP.

### **Analisis Kuantitatif DNA**

DNA yang telah diisolasi kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan instrument Nanodrop. Pengukuran DNA dilakukan untuk mengetahui konsentrasi DNA dan tingkat kemurnian DNA (Sambrook *et al.*, 2001).

### **Optimasi LAMP**

Optimasi LAMP diawali dengan optimasi protokol LAMP pada tahapan penentuan suhu inkubasi yang tepat. Kemudian dilanjutkan optimasi waktu inkubasi karena semakin lama waktu inkubasi dapat menghasilkan produk PCR yang semakin banyak. Pada tahapan optimasi LAMP ini menggunakan sampel DNA yang positif *Salmonella* ATCC. Hasil produk LAMP yang positif ditunjukkan dengan adanya fluoresensi.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Desain dan Proyeksi Primer LAMP**

Primer LAMP sebanyak tiga pasang didapat berdasarkan studi literatur Hara-kudo *et al.* (2005) (gambar 1) . Primer tersebut dilakukan pemetaan pada gen *InvA* yang urutan nukleotidanya

didapatkan pada NCBI. Primer yang telah didapat kemudian diproyeksikan dengan menggunakan software *SnapGene*. Hasil dari proyeksi primer dapat dilihat bahwa tiga pasang primer dapat menempel pada gen *InvA* (gambar 2).

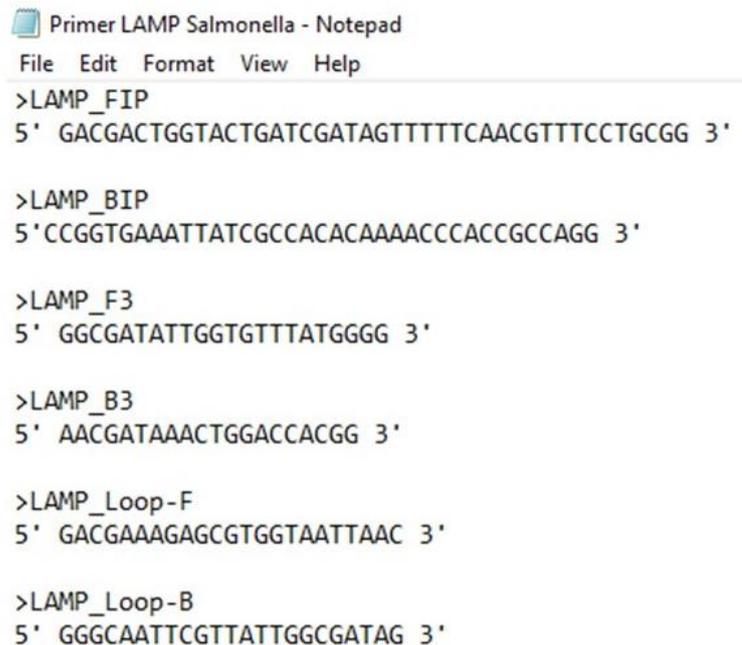
### **Isolasi DNA *Salmonella* sp.**

Tahapan isolasi dilakukan untuk mendapatkan DNA murni baik pada *Salmonella* ATCC. Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Lisis dinding sel; (2) Purifikasi; dan (3) Presipitasi. Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan protocol KIT Promega. *Salmonella* merupakan bakteri gram negatif sehingga isolasi menggunakan protokol khusus untuk bakteri gram negatif.

Langkah awal 1 ml kultur di sentrifugasi dengan kecepatan 14.500 rpm. Sentrifugasi bertujuan untuk mengendapkan sel dari komponen lainnya berdasarkan berat jenis molekul. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel dengan

penambahan *Nuclei Lysis* (Wilson, 2001). Tahap selanjutnya yaitu penambahan *RNAse* untuk menghilangkan RNA pada larutan DNA. *RNAse* merupakan enzim pendegradasi RNA dan *protein precipitation* digunakan untuk mengendapkan protein (Sambrook dkk., 2001). Supernatan yang mengandung DNA dipisahkan dan ditambahkan larutan *isopropanol*

sebagai agen presipitasi lanjutan *Pellet* DNA kemudian dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan pengotor (Wilson, 2001). Supernatan dipisahkan dan *pellet* DNA dikeringkan kemudian ditambahkan DNA *rehidrase* sebagai pelarut dan mencegah degradasi DNA, selanjutnya dilakukan analisis kualitas dan kuantitas DNA.



```
Primer LAMP Salmonella - Notepad
File Edit Format View Help
>LAMP_FIP
5' GACGACTGGTACTGATCGATAGTTTTTCAACGTTTCCTGCGG 3'

>LAMP_BIP
5' CCGGTGAAATTATCGCCACACAAAACCCACCGCCAGG 3'

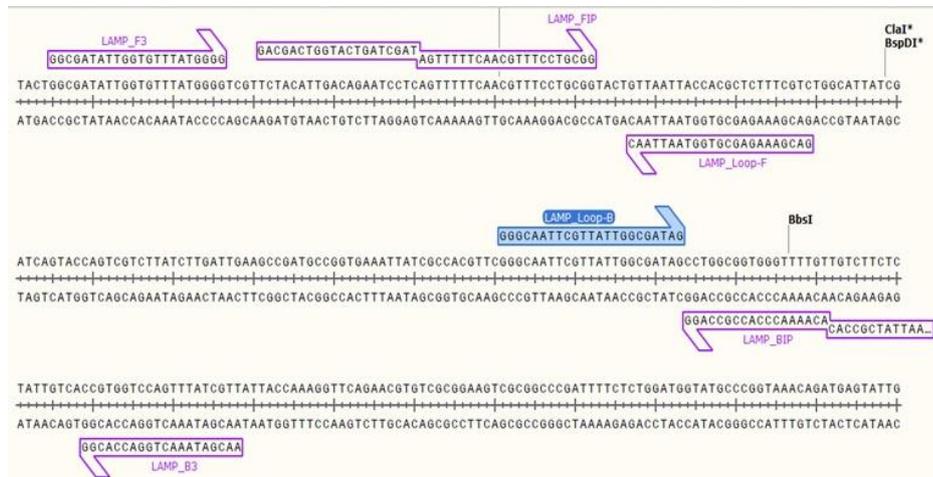
>LAMP_F3
5' GGCATATTGGTGGTTTATGGGG 3'

>LAMP_B3
5' AACGATAAACTGGACCACGG 3'

>LAMP_Loop-F
5' GACGAAAGACGTGGTAATTAAC 3'

>LAMP_Loop-B
5' GGGCAATTCGTTATTGGCGATAG 3'
```

**Gambar 1.** Urutan Primer LAMP



**Gambar 2.** Hasil proyeksi Primer LAMP pada gen InvA

### Analisis Kuantitatif DNA

Konsentrasi DNA dapat dihitung dengan alat Nanodrop (*Thermo Scientific*) yang memiliki prinsip seperti spektrofotometer. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan A260 nm dengan A280 nm. Hasil isolasi DNA dikatakan murni apabila rasio perbandingan A260 nm dan A280 nm adalah 1,8- 2,0 (Sambrook *dkk.*, 2001). Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh kemurnian DNA 1,66 yang menunjukkan adanya sedikit kandungan protein, sehingga masih dapat digunakan untuk proses amplifikasi (Sambrook *dkk.*, 2001). DNA dapat menyerap cahaya ultraviolet karena keberadaan basa-basa purin dan pirimidin. Penyerapan sinar ultraviolet oleh nukleotida

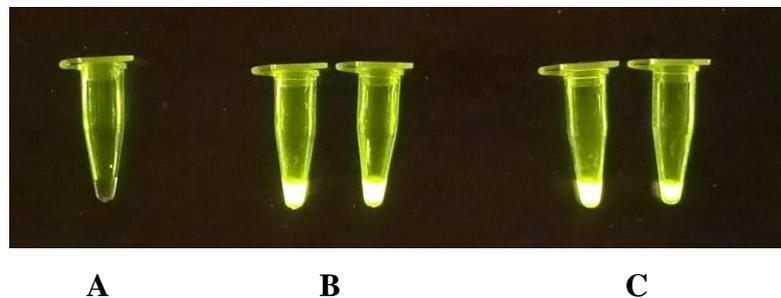
secara maksimal dapat dicapai pada panjang gelombang A260 nm, sedangkan penyerapan sinar ultraviolet maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang A280 nm. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada  $\lambda$  260 nm dan kontaminan protein akan menyerap cahaya pada  $\lambda$  280 nm.

Pengukuran kuantitas DNA selanjutnya adalah pengukuran konsentrasi DNA, yang bertujuan untuk mengetahui banyak sedikitnya DNA yang terkandung dalam larutan. Banyaknya radiasi ultraviolet yang diserap oleh larutan DNA berbanding lurus dengan banyaknya DNA dalam sampel yang diisolasi (Sambrook *dkk.*, 2001). Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi DNA yang didapat yaitu 4,5 ng/ $\mu$ l.

### Optimasi LAMP

Hasil dari isolasi DNA *Salmonella* ATCC kemudian dideteksi gen *InvA* dengan menggunakan metode LAMP. Tiga pasang primer ditambahkan pada mix LAMP, kemudian dilakukan optimasi waktu inkubasi 30 menit dan 45 menit

pada suhu 65 °C. Hasil LAMP menunjukkan hasil positif pada waktu inkubasi 30 menit dan 45 menit yang ditunjukkan dengan pendaran warna (gambar 3). Hasil positif tersebut menunjukkan bahwa LAMP dapat mendeteksi gen *InvA* pada *Salmonella* ATCC.



**Gambar 3.** Hasil LAMP

Keterangan: A: Kontrol negatif (NFW); B: inkubasi 30 menit; C: inkubasi 45 menit

Prinsip metode LAMP merupakan metode modifikasi amplifikasi PCR pada suhu tetap dengan menggunakan empat sampai enam pasang primer dari gen dengan sekuens *highly conserved* pada spesies target. Primer yang digunakan terdiri dari *inner primer* (FIP = F1, F2), *backward primer* (BIP = B1, B2), *outer primer* (F3 dan B3) dan untuk mempercepat reaksi dapat pula dengan cara menambahkan *sekuens loop primer* (loop F & B). Primer LAMP mencakup *Forward Inner*

*Primer* (FIP), yang terdiri dari daerah F2 (di bagian 3' ujung) yang merupakan komplementer daerah F2c serta daerah Flc di bagian 5' ujung dari sekuens yang sama, disebut primer FIP dan merupakan gabungan dari primer F2 dan F1. *Forward Outer Primer* terdiri dari daerah F3 yang merupakan komplementer daerah F3c, dikenal juga dengan primer F3. *Backward Inner Primer* (BIP), terdiri dari daerah B2 (di bagian 3' ujung) yang merupakan komplementer daerah B2c serta

daerah B1c di bagian 5' ujung dari sekuens yang sama disebut primer BIP. (Fan *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015).

## KESIMPULAN

Metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) dapat digunakan untuk mendeteksi gen *InvA* pada bakteri *Salmonella* ATCC pada waktu inkubasi 30 menit dan suhu 65 °C.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada KEMENRISTEK DIKTI yang telah memberikan dana Penelitian Dosen Pemula (PDP) untuk anggaran tahun 2018.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bugarel, M., Tudor, A., Loneragan, G. H., & Nightingale, K. K. (2017). Molecular detection assay of five *Salmonella* serotypes of public interest: Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, and Hadar. *Journal of microbiological methods*, 134, 14-20. doi:10.1016/j.mimet.2016.12.011
- De Jong, Hanna K., Chris M. Parry, Tom van der Poll, and W. Joost Wiersinga. 2012. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens* 8(10)
- Fan, F., Du, P., Kan, B., Yan, M., 2015. The Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *PLOS ONE* 10, e0124507. doi:10.1371/journal.pone.0124507
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., & Ikedo, M. (2005). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS microbiology letters*, 253(1), 155-161.
- Kokkinos, P. A., Ziros, P. G., Bellou, M., & Vantarakis, A. (2014). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food. *Food Analytical Methods*, 7(2), 512-526.
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S., & Zhang, L. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial pathogenesis*, 107, 54-61.
- Pham, O.H., McSorley, S.J., 2015. Protective host immune responses to *Salmonella* infection. *Future Microbiol.* 10, 101-110. doi:10.2217/fmb.14.98
- Sambrook, J., Russell, D. W., Janssen, K., & Argentine, J. (2001). *Molecular cloning: a*

- laboratory manual on the web.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sun, Y., Quyen, T. L., Hung, T. Q., Chin, W. H., Wolff, A., & Bang, D. D. (2015). A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella* spp. in food samples. *Lab on a Chip, 15*(8), 1898-1904.
- Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology, 56*(1), 2-4.
- Wu, G.P., Chen, S.H., Levin, R.E., 2015. Application of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead cells of *Salmonella enterica* by real-time loop-mediated isothermal amplification. *J. Microbiol. Methods 117*, 41–48. doi:10.1016/j.mimet.2015.07.012
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol, 24*(3), 297-312.
- Zhuang, L., Gong, J., Li, Q., Zhu, C., Yu, Y., Dou, X., Liu, X., Xu, B., Wang, C., 2014. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcfD* gene. *Lett. Appl. Microbiol. 59*, 658–664. doi:10.1111/lam.12328