

Teknik Pemeriksaan DNA dengan Metode *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

Tri Umiana Soleha

Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Abstrak

Metode *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) menggunakan sebuah polimerase DNA dan empat primer yang didesain untuk mengenal enam sekuens DNA target. Sintesis DNA dengan pemindahan untai dimulai oleh primer bagian dalam dan luar yang dihibridisasi kepada ujung akhir dari target yang menghasilkan struktur DNA *stemloop*. Metode ini sangat spesifik dan mempunyai sensitivitas yang tinggi, cepat, dan ekonomis. LAMP memiliki selektivitas yang tinggi karena mengenali target 6 urutan yang berbeda pada awal reaksi. Metode LAMP juga berpotensi untuk memfasilitasi tes genetik pada berbagai penyakit infeksi. Metode LAMP merupakan metode uji diagnostik molekuler cara langsung berdasarkan uji identifikasi asam nukleat bakteri.

Kata kunci: amplifikasi, isothermal, LAMP

The Technique of DNA Examination Using *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

Abstract

The LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) method uses a DNA polymerase and four primers designed to recognize six target DNA sequences. DNA synthesis with strand displacement is initiated by the inner and outer primer that hybridized to the tip end of the target DNA produces structural stemloop. This method is very specific and has a high sensitivity, fast, and economical. LAMP has a high selectivity for the target recognizes 6 different sequences at the start of the reaction. LAMP method also has the potential to facilitate genetic testing on a variety of infectious diseases. LAMP method is the method of molecular diagnostic tests based on the direct method of nucleic acid bacterial identification test.

Keywords: amplification, isothermal, LAMP

Korespondensi: dr. Tri Umiana Soleha, M.Kes., Bumi Puspa Kencana Blok E 7 Gedongmeneng Bandar Lampung, 085269043993, dr.triumiana.unila@gmail.com

Pendahuluan

Metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (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.^{1,2}

Isi

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

(pada proses reaksi ditambahkan reagen fluoresensi) dengan menggunakan bantuan sinar UV.¹⁻³

Metode LAMP merupakan metode uji diagnostik molekuler cara langsung berdasarkan uji identifikasi asam nukleat bakteri yang mulai dikembangkan pada tahun 1999 oleh Notomi, et.al. Pengembangan metode mengacu pada beberapa metode amplifikasi asam nukleat sebelumnya yang efisien dan memiliki kemudahan teknologi, yaitu dari metode: *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA), *self-sustained sequence replication* (3SR), dan *strand displacement amplification* (SDA).^{1,4,5}

Metode NASBA dan 3SR menerapkan amplifikasi asam nukleat pada suhu tetap dengan teknik pemanfaatan *set primer transcription* dan *reverse transcription* sementara metode SDA juga meniadakan siklus denaturasi dengan memanfaatkan penyediaan enzim restriksi dan substrat DNA. Ketiga

metode memungkinkan proses amplifikasi berlangsung tanpa perlu menunggu suhu denaturasi serta dapat meniadakan alat *thermocycler* dalam pelaksanaan reaksi. Gabungan dari ketiga mekanisme kerja ini kemudian menjadi prinsip kerja dari metode LAMP.^{6,7}

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 = B 1, 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 F1c 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.^{8,9}

Backward Outer Primer, terdiri dari daerah B3 yang merupakan komplementer daerah B3c, disebut primer B3. Untuk mempercepat reaksi dapat ditambahkan untai komplementari dari *BIP-linked* dan *FIP-linked* untuk membentuk struktur *stem-loops* (Loop-B dan Loop-F). Struktur primer ini akan menjadi struktur awal pembentukan siklus amplifikasi pada metode LAMP.^{8,9}

Teknik LAMP mengidentifikasi sekuens bakteri dengan mekanisme *rolling circle amplification* (RCA) yang merupakan metode gabungan dari multiplex PCR dan nested PCR, dimana menggunakan minimal 2 set primer (multi primer) serta *outer primer* (*standard primer*) dan *inner primer* (*nested primer*) serta reagen amplifikasi yang sesuai. Prinsip untuk mendesain primer LAMP adalah memastikan jarak daerah primer dari Ujung 5' di F2 ke daerah B2 sekitar 120- 180bp, dan jarak antara F2 dan F3 sebagaimana B2 dan B3 adalah 0-

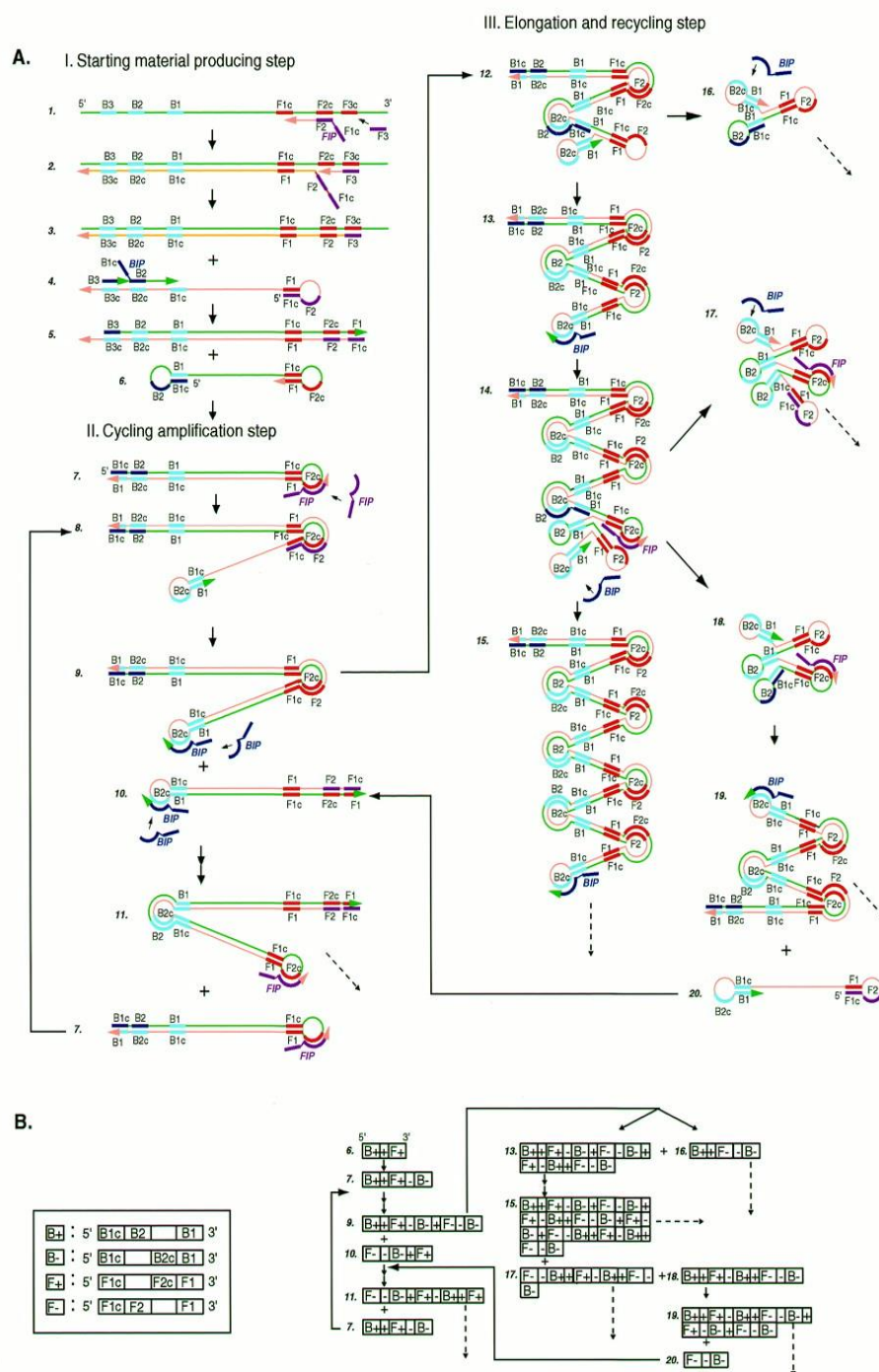
20bp. Jarak untuk daerah pembentuk loop (Ujung 5' di F2 ke Ujung 3' di F1, dan Ujung 5' di B2 ke Ujung 3' di B1) sebesar 40-60bp. Tahap-tahap pada prinsip kerja LAMP dapat dilihat pada gambar 1.^{11,12}

Mekanisme amplifikasi LAMP: 1. Untai ganda dalam keadaan *dynamic equilibrium*; suhu sekitar 65°; annealing sekuens komplement oleh FIP; dilanjutkan inisiasi sintesis DNA oleh DNA polimerase membentuk untai tunggal DNA baru; 2. DNA polimerase menginisiasi sintesis DNA komplement dari template DNA; dimulai dari ujung 3' F pada FIP; 3. Primer F3 meng-annealing daerah F3c di luar FIP dan target DNA, lalu menginisiasi sintesis untai DNA baru dan melepas untai baru dari 18 FIP; 4. Untai ganda terbentuk sebagai hasil sintesis F3 Primer terhadap template DNA; 5. Untai komplementer dari FIP dilepas dalam bentuk tunggal karena akan bergabung dengan untai DNA yang disintesis oleh primer F3.^{11,12}

Kemudian, bentuk untai tunggal membentuk formasi struktur *stem-loop* di ujung 5' karena adanya komplementer dari daerah F1c dan F1; 6. Untai DNA tunggal di (5) bersifat sebagai template yang dengan DNA BIP-initiated, juga akan membentuk untai subsekuens dari sintesis B3-primer DNA. Annealing oleh BIP bertujuan membentuk untai DNA di tahap (5).^{1,5}

Dari ujung 3' BIP sintesis komplementer DNA dimulai. Setelah proses ini, DNA kembali dari struktur loop ke bentuk struktur linear. Saat annealing B3 Primer keluar dari BIP, kemudian inisiasi dimulai di ujung 3' dengan adanya DNA polimerase. Sintesis DNA diganti BIP dan dilepas dalam bentuk untai tunggal sebelum sintesis DNA oleh Primer B3; 7. Untai ganda DNA terbentuk seperti gambar (6); 8. Untai komplementari dari BIP-linked terjadi di tahap (6) dan membentuk struktur *stem-loops* di setiap ujung, yang menyerupai struktur halter. Struktur ini menjadi struktur awal pembentukan siklus amplifikasi pada metode LAMP; 9-11. Amplifikasi berulang pada suhu tetap.¹²

Aplikasi metode LAMP untuk deteksi TB telah diuji menggunakan primer set dari beberapa gen penyandi, yaitu gen 19 protein *gyrB* molekul 16S rRNA.¹



Gambar 1. Mekanisme Metode *Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*

Optimasi yang dilakukan di Badan Litbangkes dari tahun 2009-2010 terhadap metode LAMP menggunakan primer gyr B diujikan terhadap 122 sampel spesimen dahak pasien TB Indonesia. Uji dilakukan menggunakan peralatan laboratorium sederhana; yaitu untuk instrumen amplifikasi adalah penangas air dan sistem deteksi menggunakan lampu uv fluo esensi, memberikan sensitifitas hasil (*positivity rate*) sebesar 4,2% (114/121), yang sekaligus membuktikan diagnostik LAMP dapat diaplikasi

pada pasien TB di Indonesia. Pengembangan desain primer LAMP berdasarkan karakteristik bakteri *Micobacterium tuberculosis (Mtb)* di Indonesia (*sequence highly conserved*) kemudian dilakukan dan diperoleh primer LAMP spesifik Indonesia. Uji optimasi primer gyrB LAMP Indonesia pada serial larutan DNA Mtb H37Rv menunjukkan bahwa primer set dapat meng amplifikasi sampai dengan [100 fg/pl] DNA Mtb H37Rv.⁷

Uji optimasi primer gyrB LAMP Indonesia kemudian dilakukan terhadap 85 sampel

spesimen dahak pasien TB Indonesia, yang merupakan bagian dari sampel uji validasi LAMP, memberikan hasil sensitivitas atau positivity rate lebih kurang 97,6% (82/84), dimana basil ini membuktikan bahwa 20 primer set LAMP Indonesia mampu mengenali seluruh tipe dan sub-tipe Mtb di Indonesia dan lebih sensitif dibanding primer gyrB LAMP yang terhadap sampel yang sama memberikan nilai sensitivitas atau positivity rate lebih kurang 95,2% (80/84).⁷

Ringkasan

Metode *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) menggunakan sebuah polimerase DNA dan empat primer yang didesain untuk mengenali enam sekuens DNA target. Metode ini sangat spesifik dan mempunyai sensitivitas yang tinggi, cepat, dan ekonomis. LAMP memiliki selektivitas yang tinggi karena mengenali target 6 urutan yang berbeda pada awal reaksi. Metode LAMP juga berpotensi untuk memfasilitasi tes genetik pada berbagai penyakit infeksi.

Kesimpulan

Dari beberapa penelitian tentang LAMP ini disimpulkan bahwa metode ini sangat spesifik dan mempunyai sensitivitas yang tinggi, cepat, dan ekonomis. LAMP memiliki selektivitas yang tinggi karena mengenali target 6 urutan yang berbeda pada awal reaksi.

Daftar Pustaka

1. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 15;28(12):E63.
2. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Principles of disease and epidemiology. In: *Microbiology an introduction*. 8th ed. San Francisco: Pearson Education Inc; 2004. p. 408-31.
3. Herwaldt LA, Wenzel RP. Dynamics of hospital-acquired infection. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 1995. p.169-76.
4. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, *Diagnostic Microbiology: Bailey & Scotts*, 12th edition, Mosby, Missouri, 2007.
5. Mori Y, Tsuyoshi H, Tsugunoei N. Sequence specific visual detection of LAMP. Reaction by addition of cationic polymers. *Journal BMC Biotechnology*, 2006; 10:1472-6750.
6. Saleh M, Halem S, Mansoer El-M. Loop mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *Journal Bioomed.* 2008; 10: 1186-748.
7. Boehme CC, Pamela N, German H, Rubhana R, Zeur R, Martinab et al. Operational feasibility of using loop mediated isothermal amplification for diagnostic or pulmonary tuberculosis in microscopic centers of development centers. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007; 45:1936-40.
8. Ken-Ichi Hanaki, Jun-Ichiro Sekiguchi, Kayo Shimada, Ayako Sato, Hajime Watari, Tadashi Kojima. Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of antiseptic and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbial Methods.* 2010.
9. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ.* 2000; 163(3):301-9.
10. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TJ. *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, inc; 1990.p.3-12,84-91.
11. Boddour MM, Abu Elkheir MM, Fatani AJ. Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology.* 2007; 55:473-9.
12. Eiken Chemical Co Ltd. The principle of LAMP method [internet]. 2010 [diakses tanggal 22 Maret 2011]. Tersedia dari: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>.