

DETEKSI VIRUS DEN-I BERBASIS *LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION* (LAMP) DAN DIPSTIK *NUCLIC ACID LATERAL FLOW* (NALF)

¹Penny Humaidah H., ²Anis Widyasari, dan ³Purwati

¹Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada; ²RSU Dr Soetomo, Surabaya;
³Divisi Tropik Infeksi Bagian Penyakit Dalam, RSU Dr. Soetomo, Surabaya

e-mail : penny_hamid@yahoo.com

Abstrak. Demam berdarah Dengue adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus Dengue (DENV) I, II, III, dan IV yang disebarkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Lebih dari sepertiga populasi dunia yang tinggal di daerah yang memiliki risiko transmisi Dengue. Di Indonesia, mencakup 30 provinsi, wabah dengan angka kejadian yang luar biasa tinggi dilaporkan dari 293 kota dan kabupaten di 17 provinsi. Perlindungan yang paling efektif terhadap dengue adalah menghindari gigitan nyamuk. Saat terjadi infeksi, pengenalan dini dan perawatan suportif yang memadai dapat menurunkan risiko berkembangnya penyakit menjadi lebih berat (CDC, 2010). Hal inilah yang menjadi alasan pentingnya dilakukan deteksi dini pada kasus-kasus DD dan DBD. Penelitian menggunakan metode diagnosa berbasis assay LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) yang merupakan pendekatan baru untuk amplifikasi asam nukleat berdasarkan prinsip reaksi *strand displacement* dan pembentukan struktur loop dalam mengamplifikasi target. Hasil positif dapat divisualisasikan dengan baik pada reaksi *one-step RT* dan LAMP selama 30 menit. Kami menggunakan dipstik berlabel antibodi anti biotin dan probe berlabel FITC sehingga reaksi positif dapat divisualisasikan dengan baik berupa 2 garis keunguan. Kemudahan dan keakuratan dalam melakukan metode deteksi dini serta kemudahan dalam peralatan dan analisis hasil yang dapat diamati tanpa instrumen yang rumit menjadi latar belakang yang kuat untuk memilih pengembangan metode tersebut dalam deteksi dini Dengue di Indonesia.

Kata kunci : RT-LAMP, RT-PCR, Dengue, dipstik

1. Latar belakang

Seluruh wilayah Indonesia mempunyai resiko untuk terjangkit penyakit Demam Berdarah Dengue karena nyamuk sebagai vektornya tersebar luas baik di rumah maupun tempat- tempat umum, kecuali yang ketinggiannya lebih dari 1000 meter diatas permukaan laut. Saat terjadi infeksi, pengenalan dini dan perawatan suportif yang memadai dapat menurunkan risiko berkembangnya penyakit menjadi lebih berat (CDC, 2010). Hal inilah yang menjadi alasan pentingnya dilakukan deteksi dini pada kasus-kasus DD dan DBD.

Metode yang rutin digunakan di laboratorium adalah isolasi dan karakterisasi virus, deteksi antibodi spesifik virus Dengue dan deteksi sekuen genomik dengan teknik amplifikasi asam nukleat (Kuno *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1991; Shu *et al.*, 2003). Isolasi virus melalui *cell line* nyamuk dari serum saat fase akut atau sampel plasma masih membutuhkan waktu hingga 7 hari untuk melakukan proses dan metode hingga selesai. Secara serologis infeksi virus Dengue dapat dideteksi dengan level IgM dan IgG dengan metode ELISA (Innis *et al.*, 1989). Metode *Nucleic acid lateral flow* (NALF)

merupakan kombinasi metode amplifikasi asam nukleat dan *lateral flow dipstick* (LFD). Amplifikasi asam nukleat berbasis Loop Mediated isothermal Amplification (LAMP) yang banyak kelebihan dibandingkan metode amplifikasi lainnya terutama kecepatan, keakuratan, sensitifitas serta kesederhanaan alat. Aplikasi LFD yang terkenal yaitu tes kehamilan yang hasilnya dapat dilihat dalam waktu 10-20 menit. Metode ini menggunakan strip fabrikasi yang sangat sederhana dalam penggunaan. Generasi LFD sekarang memiliki sensitifitas tinggi, selektifitas dan mudah penggunaan. Dengan melihat kesederhanaan alat dan prosedur, metode NALF berbasis LAMP dan LFD sangat menjanjikan untuk dikembangkan sebagai alat deteksi DBD secara dini.

Dalam publikasi ini kami akan memaparkan deteksi serotype DEN-I hasil penelitian kami menggunakan target nukleotida sintesis berdasarkan hasil sekuensing isolat DEN-I yang berasal dari Indonesia. Kemudahan dan keakuratan dalam melakukan metode deteksi dini serta kemudahan dalam peralatan dan analisis hasil yang dapat diamati tanpa instrumen yang rumit menjadi latar belakang yang kuat untuk memilih pengembangan metode tersebut dalam deteksi dini Dengue di Indonesia.

2. Materi dan Metode

2.1 Isolat referen.

Isolat referen serotype virus Dengue yang digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini berasal dari Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada. Virus sebelumnya telah dikultur dalam se line C6/36 A. *albopictus* dan disimpan dalam -80°C .

2.2. Ekstraksi RNA.

Ekstraksi menggunakan konsep pengikatan poliA-*tail* pada mRNA virus yang dideteksi (Sambrook *et al.*, 2000) menggunakan produk Qiaamp Viral RNA Minikit (Qiagen®). Metode isolasi dilakukan sesuai protokol kit sebagai berikut : Isolat virus dari supernatan dan sel line kultur *dithawing* dalam es. Volume sampel sebanyak 140 ul dimasukkan dalam *microtube* dan dicampur dengan 560 ul buffer AVL yang sudah diberi carrier RNA dan divortex. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dan ditambah 560 ul ethanol absolut. Larutan divortex hingga homogen. Campuran dipindah ke spin kolom kit dan disentrifus 8000 rpm selama 1 menit. Filtrat pada *collection tube* dibuang kemudian ditambahkan buffer AW1 pada kolom. Kemudian disentrifus 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan buffer AW2 dan sentrifus 14000 rpm selama 3 menit dan filtrat dibuang. *Collection tube* diganti kemudian lysat pada kolom dielus menggunakan buffer AVE sebanyak 60 ul, disentrifus 8000 rpm selama 1 menit dan disimpan di -80°C sampai digunakan. Semua proses dilakukan dengan kondisi RNase *free* maksimum sehingga RNA yang diperoleh diusahakan tetap *intact*.

2.3. RT-PCR.

RT-PCR secara one step-multiplex dilakukan untuk pengecekan kembali serotype isolat referen sesuai metode Harris *et al.*, 1998 dengan modifikasi sesuai optimasi thermal cycler dan kit yang kami gunakan. Urutan primer (dari 5'→3') yang digunakan adalah :

FDEN Universal TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G
 DEN1 Reverse CGT CTC AGT GAT CCG GGG G

RT-PCR dilakukan dengan kit One-Step RT-PCR (Invitrogen) dengan volume total reaksi sebanyak 25 ul. Komposisi reaksi sebagai berikut : RT-Mix 12,5 ul; RT-Taq enzyme 0,5 ul; MgSO₄ 1 ul; dH₂O 1 ul; template RNA 5 ul (5-10 ng); primer forward DEN 1 ul (40 pmol); primer reverse DEN 1 ul (10 pmol). Program yang digunakan adalah satu siklus 42⁰C, 60⁰ menit, dilanjutkan dengan denaturasi 94⁰C, 30 detik, *annealing* 54⁰C, 1 menit, elongasi 68⁰C, 1 menit sebanyak 30 siklus, ditambah dengan *final extension* 68⁰C selama 10 menit. Elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5 %.

2.4 Sekuensing untuk *mapping* dan “*gold standard*” pengecekan serotype Dengue.

Sekuensing dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida spesifik dari genom virus yang beredar di Indonesia. Selain itu hasil sekuensing dapat dijadikan sebagai “*gold standard*” kebenaran isolat yang terdeteksi adalah isolat Dengue. Sekuensing dilakukan secara *single pass* menggunakan primer forward DEN Universal. Sekuensing menggunakan metode Sanger akan dikerjakan di 1st Base, Singapura menggunakan Analisis hasil sekuensing menggunakan *query* hasil sekuensing dengan BLASTN.

2.5 Rancangan Primer RT-LAMP

Primer oligonukleotida *serotype* spesifik didesain menggunakan beberapa daerah yang berbeda dari masing-masing serotype. Gen tersebut memiliki homologi yang tinggi antara isolat Dengue yang terdaftar dalam *genbank*. Dasar template penyusunan primer adalah isolat Indonesia yang terdaftar dalam *genbank*. Hal tersebut penting karena spesifisitas reaksi sangat penting dalam deteksi dini suatu penyakit. Kandidat isolat sebagai *template* DEN-I dalam penelitian ini adalah *genbank* acc no. EU 848545.

2.6 Reaksi RT-LAMP.

Reaksi RT-LAMP dilakukan secara *one-step* menggunakan 2 enzim sekaligus yaitu *AMV reverse transcriptase* Fermentas untuk sintesis cDNA dan *BSt polymerase* untuk aktivitas strand displacement LAMP. Komposisi reaksi dalam 25 ul volume adalah : Bst polymerase 1 ul; Bst buffer 2,5 ul; Betaine monohydrate(1 M) 3 ul; dNTPs (100mM) masing-masing 0,5 ul; primer mix (6) masing-masing 1 ul, enzyme AMV-RT 1 ul; MgCl 3 ul; template 2 ul; buffer i-Taq 4,5 ul. Reaksi dilakukan menggunakan satu suhu heat lock 60⁰C dan penelitian menggunakan setting waktu selama maksimal 30 menit untuk menyelesaikan satu reaksi lengkap RT- LAMP. Optimasi dilakukan dengan penambahan dan pengurangan beberapa komponen konsolven seperti betaine dan MgCl serta dNTPs.

2.7 Analisis Reaksi LAMP.

Hasil reaksi LAMP dianalisis menggunakan beberapa metode :Metode yang pertama adalah penggunaan elektroforesis gel agarose 3% dengan penambahan *SYBR green*. Visualisasi dilakukan dibawah UV dengan diindikasikan adanya pola migrasi *band-band* DNA target.Metode yang kedua adalah pengamatan dengan mata langsung dengan penambahan 1: 1000 *SYBRgreen* pada *tube* hasil reaksi. Hasil yang diharapkan adalah visualisasi yang lebih sederhana tanpa menggunakan alat elektroforesis untuk

mengetahui hasil positif. Reaksi positif akan menghasilkan **warna kuning kehijauan** karena interkalasi DNA dengan SYBRgreen sedangkan reaksi negatif menghasilkan warna yang tetap *orange*.

2.8 Hibridisasi probe dengan amplicon hasil reaksi RT-LAMP

Probe didesain pada target sekuen yang berhasil diamplifikasi dengan RT-LAMP dan dilabel pada ujung 5' dengan FITC. Sedangkan primer forward RT-LAMP disintesis dengan label biotin (Biomers®, Germany). Primer dan probe berlabel didesain berdasarkan isolat dengan kekerabatan tertinggi virus Dengue di Indonesia. Hibridisasi dilakukan dengan menambahkan 20 pmol probe pada larutan RT-LAMP selama 5 menit pada suhu yang sama dengan reaksi RT-LAMP yaitu 63°C. Dalam publikasi ini kami menggunakan nukleotida sintesis sebagai target amplifikasi.

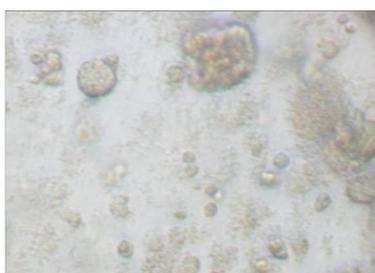
2.9 Deteksi dengan testrip

Selanjutnya 20 ul hasil hibridisasi ditambahkan ke dalam 100 ul HybriDetect Assay Buffer ® dan strip Milenia HybriDetect® (Germany) dicelupkan ke dalam larutan hibridisasi selama 10 menit. Hasil reaksi yang tervisualisasi dianalisis dan dibandingkan dengan kontrol.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolat Referen.

Virus yang digunakan sebagai kontrol diperoleh dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada. Isolat tersebut sudah digunakan sebagai standar secara serologis dengan uji imunositokimia menggunakan *antibody monoclonal* (Umniyati *et al.*, 2008). Serotype DEN-I diperoleh dari biakan kultur C6/ 36, *A. albopictus* yang diinfeksi dengan virus dan disimpan dalam -80°C. Dari hasil biakan bisa dilihat bahwa semua menunjukkan pembentukan giant cel dan *cytopathic effect* khas sifat kultivasi virus dengue pada sel C6/36 .

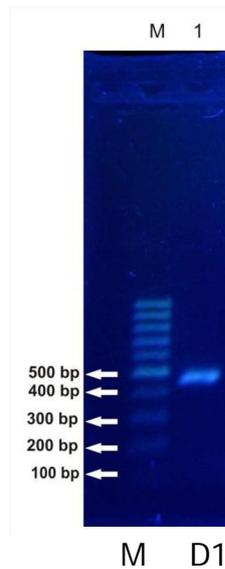


Gambar 1. Kultur Virus Dengue pada C6/ 36, *A. albopictus* yang diinfeksi dengan virus Dengue, terlihat *cythopathic effect* pada DEN-I.

3.2 Amplifikasi multiplex-one step RT-PCR.

Ekstraksi sampel menggunakan kit dari Qiaamp Viral RNA Minikit dari Qiagen® yang memisahkan RNA virus dengan pengikatan pada *poliA-tail* dari genom virus. Isolasi tersebut menghasilkan RNA genom viral yang digunakan sebagai cetakan (*template*) bagi reaksi RT-PCR yang akan dilakukan. Amplifikasi ini dilakukan untuk memberikan kepastian standar yang digunakan secara *genomic* (molekuler) untuk dijadikan sebagai kontrol. Reaksi menggunakan desain primer Harris *et al*, 1998, yang

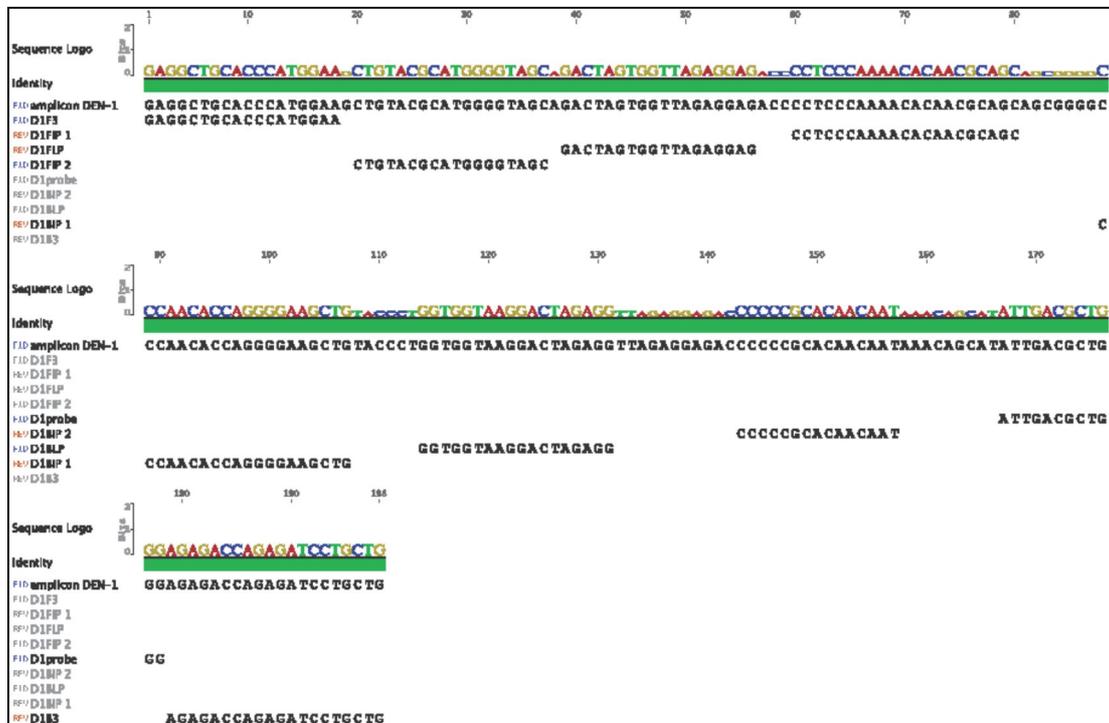
merupakan modifikasi dari primer Lanciotti *et al.*, 1992, dan dapat digunakan sebagai salah satu alat penegakan diagnosa sesuai protokol WHO 2009.



Gambar 2. Hasil amplifikasi *multiplex-one step* RT-PCR pada isolate referen virus DEN-I; M : marker; D1 : DEN-I

3.3 Reaksi RT-LAMP pada kontrol virus.

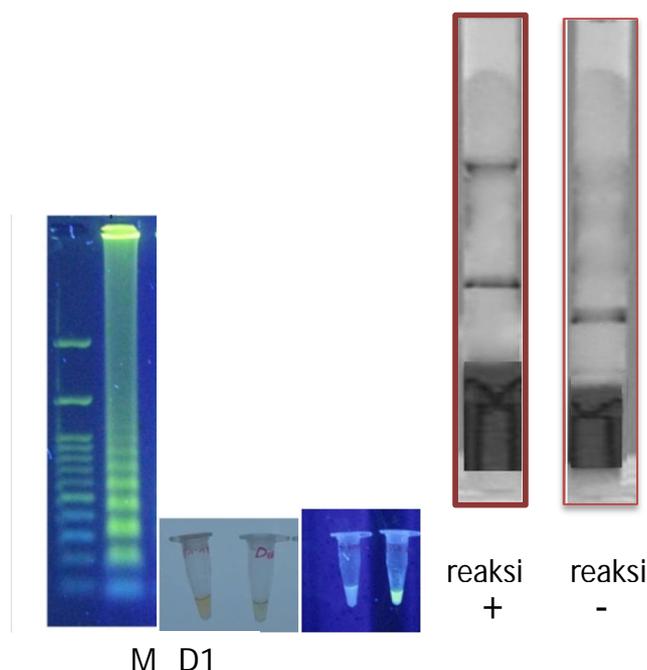
Hasil sekuensing amplicon DEN-I menggunakan BLASTN menunjukkan kekerabatan yang tinggi (98,4%) dengan isolat genbank EU 848545. Desain primer dan probe serotype DEN-I dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Posisi primer dan probe pada isolate genbank EU 848545. Desain diatas divisualisasikan menggunakan software Geneious®

Primer dan probe didesain 100% *match* dengan target sehingga tidak mengurangi efisiensi reaksi dengan target. Aktifitas *reverse-transcriptase* dan *strand displacement* untuk membentuk amplicon dilakukan secara one-step pada suhu 63⁰C (dengan optimasi). Pada suhu tersebut enzyme RT dan BSt bisa bekerja bersama dan dan keduanya tetap aktif hingga amplifikasi dihentikan. Reaksi positif terlihat pada hasil elektroforesis gel agarose 1,5 % yang membentuk pola seperti marker dikarenakan terjadinya pembentukan loop yang menerus pada amplicon (Gambar 3.). Visualisasi reaksi positif dapat dilakukan dengan beberapa cara selain elektroforesis gel agarose. Diantaranya adalah dengan visualisasi langsung dengan penambahan Sybr green 1 dengan perbandingan 1 : 1000 seperti ditunjukkan pada Gambar 4.

Isolasi virus adalah metode dengan pendekatan paling definitif, tetapi teknik ini memerlukan keahlian tinggi dan peralatan dengan standard yang tinggi pula. Selain itu membutuhkan waktu yang cukup lama (7 hari) (Kuno *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1991; Shu *et al.*, 2003). Secara serologis infeksi virus Dengue dapat dideteksi dengan level IgM dan IgG dengan metode ELISA. Metode ini cukup sederhana dan bisa dilakukan dalam waktu cepat, tetapi reaksi silang antar antibodi dengue dan dengan flavivirus yang lain akan memberikan hasil *false positive* (positif palsu) (Innis *et al.*, 1989). Rasio IgM/IgG bisa digunakan untuk membedakan infeksi virus dengue primer dan sekunder. Teknik molekuler berdasarkan pada deteksi sekuen genom menggunakan *reverse transcription* (RT)-PCR, *nested* PCR, *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA) dan *real time* PCR telah banyak digunakan untuk diagnosa cepat dan diasumsikan sebagai standar baru dalam deteksi definitif Dengue. Perkembangan selanjutnya adalah *real-time* PCR yang memiliki lebih banyak keunggulan seperti kecepatan, kuantifikasi, kontaminasi yang rendah, spesifitas yang tinggi serta kemudahan melakukan standardisasi (Kuno *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1991; Shu *et al.*, 2003). Namun metode tersebut membutuhkan alat dengan kualitas yang tinggi sehingga tidak bisa diterapkan untuk laboratorium dengan peralatan yang terbatas.



Gambar 4. Hasil reaksi RT-LAMP pada DEN-I, M : marker, D1 : amplicon DEN-I. Visualisasi hasil amplifikasi menggunakan Sybr green 1, kiri : cahaya vis; kanan : cahaya uv

Metode LAMP memiliki tingkat selektifitas dan spesifitas yang tinggi serta hanya menggunakan satu suhu sehingga tidak memerlukan *thermal cycler* dan sudah diterapkan untuk deteksi SARS coronavirus dan West Nile virus (Nagamine *et al.*, 2002; Parida *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini akan digunakan RT (Reverse-Transcriptase) LAMP karena materi genetik virus adalah RNA. Efisiensi amplifikasi dalam RT-LAMP disebabkan karena tingginya amplifikasi yang bersifat terus-menerus menghasilkan banyak target (amplikon) DNA serta *magnesium pyrofosfat* yang menghasilkan tingkat kekeruhan pada *tube* reaksi. Pengamatan reaksi positif tidak harus menggunakan elektroforesis gel agarose tetapi dapat menggunakan mata telanjang dibawah lampu UV dengan menambahkan penggunaan SYBR *green*. Reaksi akan selesai dalam waktu kurang dari 1 jam (30 menit-45 menit) dibandingkan dengan PCR yang memerlukan waktu 2-3 jam per reaksi (Notomi *et al.*, 2000). Visualisasi dengan testrip (Gambar 4) dengan hasil hibridisasi target dengan amplikon menambah keutamaan penelitian ini. Probe didesain pada target yang berada pada lokasi amplikon target serotype virus DEN-I (Gambar 3). RT-LAMP. Spesifitas reaksi dengan adanya probe spesifik menjadi lebih tinggi. Selain itu kemudahan dalam analisis hasil yang berupa munculnya warna ungu pada dipstick membuat kemungkinan aplikasi sistem yang kami desain memungkinkan di laboratorium dengan peralatan yang terbatas.

4. Kesimpulan dan Saran

Primer yang digunakan dalam penelitian ini bisa diaplikasikan untuk : serotyping virus DEN-I. Hasil positif dapat divisualisasikan dengan baik pada reaksi one-step RT dan LAMP selama 30 menit dengan tingkat sensitivitas 100%. Hasil tersebut didukung dengan keberhasilan visualisasi menggunakan dipstick berlabel antibodi anti FITC pada probe spesifik DEN-I. Penelitian memerlukan analisis ambang deteksi menggunakan real-time sistem untuk mengembangkan hasil yang telah dicapai dalam tingkat aplikasi yang lebih mudah di kalangan praktisi. Penelitian dilakukan dengan pendanaan dari hibah strategis nasional Ditjen DIKTI tahun anggaran 2012.

5. Daftar Pustaka

- CDC. Epidemiology of Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. <http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>. Download 28 Juli 2010
- Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop mediated Isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16:223–229
- NIAID. 2009. Dengue Fever : Overview. <http://www.nih.in/iaf/to5/i2/print.html>. Download 28 Juli 2010
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:e63 (i–vii).
- Parida, M. M., P. Guillermo, S. Inoue, F. Hasebe, and K. Morita. 2004. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 42:257–263.
- Hong, T. C. T., Q. L. Mai, D. V. Cuong, M. M. Parida, M. Harumi, M. Tsugunori, F. Hasebe, and K. Morita. 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1956–1961.
- Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V. Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisi, and C. H. Hoke. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize Dengue infections where Dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:418–427.
- Kuno, G. 1998. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J. Virol. Methods* 72:27–41

- Morita, K., M. Tanaka, and A. Igarashi. 1991. Rapid identification of Dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:2107–2110.
- Shu, P. Y., S. F. Chang, Y. C. Kuo, Y. Y. Yueh, L. J. Chein, C. L. Sue, T. H. Lin, and J. H. Huang. 2003. Development of group and serotype specific one-step SYBR Green based real-time reverse transcription PCR assay for Dengue virus. *J. Clin. Microbiol.* 41:2408–2416.
- Soegijanto, S. 2006. Demam Berdarah Dengue edisi 2. Surabaya : Airlangga University Press
- Umniyati, S.R., Sutaryo, Wahyono, D., Artama, W.T., Mardihusodo, S.J., Soeyoko, Mulyaningsih, B., Utoro, T. 2008. Application of monoclonal antibody DSSC7 for detecting dengue infection in *Aedes aegypti* based on immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex assay (ISBPC). *Dengue bulletin vol 3.*
- WHO, 2009. Dengue Guidelines for Treatment, Prevention and Control.