

## **Loop-Mediated Isothermal Amplification untuk Mendeteksi Gen $bla_{TEM}$ Sebagai Penyandi Extended-Spectrum Beta-Lactamase pada Isolat *Enterobacteriaceae***

Bayu A. P. Wilopo,<sup>1</sup> Sunarjati Sudigdoadi,<sup>1</sup> Edhyana Sahiratmadja,<sup>2</sup> Intan M. W. Dewi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, <sup>2</sup>Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

### **Abstrak**

*Extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) adalah suatu jenis enzim beta-laktamase yang mampu menghidrolisis penisilin, sefalosprin, dan monobaktam yang dapat dihambat oleh asam klavulanat. Enzim ini disandi oleh banyak gen, salah satunya adalah  $bla_{TEM}$ . Untuk mengamplifikasi gen  $bla_{TEM}$  selain digunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dapat pula dilakukan metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) yang membutuhkan peralatan lebih sederhana dengan prosedur yang cepat dan pembacaan hasil yang lebih mudah. Penelitian ini merupakan uji diagnostik yang bertujuan menilai sensitivitas dan spesifisitas metode LAMP serta melihat kesesuaian hasil antara metode LAMP dan metode PCR dalam mendeteksi gen  $bla_{TEM}$ . Sebanyak 92 isolat *Enterobacteriaceae* yang tersimpan di Rumah Sakit dan Laboratorium Klinik Swasta di Kota Bandung periode Juni 2014 sampai April 2015. diperiksa dengan metode PCR yang kemudian dibandingkan dengan metode LAMP. Didapatkan bahwa metode LAMP memiliki sensitivitas 91,4% dan spesifisitas 91,2%, serta nilai kesesuaian (*kappa*) sebesar 85,4%. Sebagai simpulan, metode LAMP memiliki validitas yang baik dan kesesuaian yang sangat baik dibanding dengan metode PCR. Oleh karena itu, metode LAMP dapat dijadikan pemeriksaan alternatif dalam mendeteksi gen  $bla_{TEM}$  terutama di daerah dengan infrastruktur laboratorium terbatas. [MKB. 2015;47(4):242-9]

**Kata kunci:**  $bla_{TEM}$ , *Enterobacteriaceae*, ESBL, LAMP, PCR

## **Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detecting $bla_{TEM}$ Gene that Encodes Extended-Spectrum Beta-Lactamase in *Enterobacteriaceae* Isolates**

### **Abstract**

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) is a beta-lactamase enzyme that is capable of hydrolyzing penicillin, cephalosporin, and monobactam, and can be inhibited by clavulanic acid. This enzyme is encoded by multiple genes, one of them is  $bla_{TEM}$ . Polymerase chain reaction (PCR) is one of the DNA amplification methods that are frequently used; however, there are other methods that can be used including, among others, loop-mediated isothermal amplification (LAMP). LAMP requires simple equipment with quicker and easy-to-read results compared to PCR. This study was a diagnostic test to explore the sensitivity and specificity of LAMP method compared to PCR in detecting  $bla_{TEM}$  gene. Furthermore, the concordance between LAMP and PCR methods was assessed. A total of 92 *Enterobacteriaceae* isolates were examined by PCR and LAMP methods and compared. The result showed that the LAMP method had a sensitivity of 91.4% and a specificity of 91.2% with a concordance value (*kappa*) of 85.4%. In conclusion, LAMP method has a good validity and a very good conformity compared to the PCR method. Therefore, LAMP method can be used as an alternative diagnostic test, especially in limited settings. [MKB. 2015;47(4):242-9]

**Key words:**  $bla_{TEM}$ , *Enterobacteriaceae*, ESBL, LAMP, PCR

---

**Korespondensi:** Bayu A. P. Wilopo, dr., M.Kes, Departemen Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Jalan Prof. Eijkman No. 38 Bandung/Jalan Raya Bandung Sumedang KM. 21, Jatinangor, Jawa Barat 45363, *mobile* 08180208 7490, *e-mail* bayu.wilopo@fk.unpad.ac.id

## Pendahuluan

Antibiotik beta-laktam sejak 70 tahun yang lalu dikenal sebagai obat yang selain efektif di dalam mengobati berbagai infeksi bakteri, harganya murah, dan juga mudah didapatkan, serta penggunaannya relatif aman.<sup>1</sup> Penisilin dan juga sefalosporin merupakan antibiotik beta-laktam yang paling sering digunakan. Keduanya mempunyai kesamaan, yaitu strukturnya yang tersusun dari cincin beta-laktam. Cincin beta-laktam itu berikatan dengan *penicillin-binding protein* atau PBP sehingga akan menimbulkan gangguan pada proses sintesis dinding sel dan mengakibatkan kematian bakteri.<sup>2</sup> Resistensi bakteri tersebut terhadap antibiotik beta-laktam diakibatkan oleh produksi beta-laktamase, suatu enzim yang dapat menghidrolisis cincin beta-laktam sehingga proses sintesis dinding sel bakteri tidak terganggu. Hal ini mengakibatkan antibiotik beta-laktam menjadi tidak efektif lagi untuk mengobati penyakit infeksi.<sup>3</sup>

Salah satu enzim yang dihasilkan bakteri adalah *extended-spectrum beta-lactamase* atau ESBL yang merupakan hasil mutasi dari beta-laktamase. Berbeda dengan enzim sebelumnya, ESBL adalah beta-laktamase dengan kemampuan menghidrolisis penisilin, sefalosprin, dan juga monobaktam yang dapat dihambat oleh asam klavulanat.<sup>4</sup> Insidensi ESBL terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Setiap harinya kemungkinan untuk terinfeksi bakteri penghasil ESBL sebesar 44,8% pada 1 per seribu pasien yang dirawat di rumah sakit dan sebesar 10% pada 1 per seratus ribu orang di masyarakat.<sup>5</sup>

Di Asia pada tahun 1999 diperkirakan bahwa sekitar 12–24% isolat *Escherichia coli* positif ESBL, sementara untuk *Klebsiella pneumoniae* penghasil ESBL jumlahnya kurang dari 5%.<sup>6</sup> Persentase serupa ditemukan pada penelitian di RSP Dr. Soetomo Surabaya pada tahun 2010,<sup>7</sup> sementara penelitian di Bandung pada tahun 2012 didapatkan angka yang sangat tinggi, yaitu 72% isolat *Klebsiella pneumoniae* sampel pasien yang menghasilkan ESBL.<sup>8</sup> Penggunaan antibiotik yang sering di masyarakat pun dapat turut meningkatkan risiko penyebaran ESBL.<sup>9</sup> *Extended-spectrum beta-lactamase* dihasilkan sebagian besar oleh bakteri gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*, terutama pada spesies *K. pneumoniae* dan *E. coli*.<sup>7</sup> *Enterobacteriaceae* merupakan salah satu bakteri yang paling sering mengakibatkan penyakit pada manusia, seperti infeksi pada sistem saraf pusat, saluran napas bawah, aliran darah, saluran kemih, dan saluran pencernaan. Bakteri pada famili

ini mempunyai kemampuan untuk menyebar dengan mudah di antara manusia dan dapat memperoleh materi genetik melalui transfer gen horizontal yang kebanyakan dimediasi oleh plasmid.<sup>9</sup> *Enterobacteriaceae* yang berkoloni di saluran pencernaan manusia dianggap sebagai salah satu sumber penyebaran ESBL, hal ini diperkuat dengan penelitian yang telah berhasil mendeteksi ESBL pada sampel feses manusia sehat.<sup>10</sup> Sebagian besar ESBL berasal dari enzim tipe TEM, SHV, dan CTX-M yang disandi oleh gen *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, dan *bla*<sub>CTX-M</sub> dan mengalami mutasi titik yang keduanya pada awalnya hanya dapat menghidrolisis penisilin.<sup>4</sup> Gen *bla*<sub>TEM</sub> merupakan gen penyebab resistensi antimikrob di plasmid yang paling sering terdeteksi pada populasi klinis mikroorganisme gram negatif.<sup>11</sup>

Deteksi ESBL dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu deteksi fenotip dan deteksi genotip. Deteksi fenotip ESBL biasanya dilakukan dengan metode *double-disk synergy test* (DDST), yang hasilnya dinyatakan positif apabila kerentanan terhadap sefotaksim berkurang yang disertai peningkatan zona hambat di antara cakram sefotaksim dan juga cakram klavulanat. Deteksi fenotip ESBL sering dikerjakan di laboratorium oleh karena murah dan mudah, namun masih memiliki kekurangan, yaitu sering kali memberi hasil positif palsu dan membutuhkan waktu lama karena harus melalui tahapan isolasi bakteri terlebih dahulu.<sup>12</sup>

Dengan teknologi modern, gen penyandi ESBL dapat dideteksi melalui amplifikasi DNA yang dilakukan menggunakan metode molekuler standar, yaitu *polymerase chain reaction* atau PCR. Deteksi genotip memakai metode PCR membutuhkan investasi peralatan khusus yang dapat mengakibatkan kurangnya penggunaan metode ini karena keterbatasan infrastruktur.<sup>13</sup>

Berbagai metode lainnya untuk amplifikasi DNA telah dikembangkan seperti *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA), *strand displacement amplification* (SDA), dan *helicase dependent amplification* (HDA), serta *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP).<sup>14</sup> *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) adalah metode amplifikasi DNA yang paling baru dengan spesifisitas, sensitivitas, dan juga kecepatan yang tinggi pada kondisi isothermal dengan memakai empat buah primer dan DNA polimerase *Bst*. Dibanding dengan PCR, LAMP mempunyai beberapa keunggulan, yaitu hanya membutuhkan peralatan yang cukup sederhana, prosedur cepat, dan pembacaan hasilnya mudah untuk dilakukan sehingga dapat dipergunakan dengan infrastruktur terbatas.<sup>15</sup>

Penelitian sebelumnya telah berhasil dengan metode LAMP untuk mendeteksi gen  $bla_{SHV}$  dan  $bla_{CTX-M}$  dibanding dengan deteksi fenotip ESBL melalui metode DDST yang memakan waktu lebih lama.<sup>8</sup> Untuk gen  $bla_{TEM}$  belum diketahui bagaimana kesesuaian metode LAMP dibanding dengan PCR. Tujuan penelitian ini adalah menilai sensitivitas dan spesifisitas metode LAMP serta melihat kesesuaian hasil antara metode LAMP dan metode PCR dalam mendeteksi gen  $bla_{TEM}$ .

## Metode

Objek penelitian adalah bakteri yang merupakan bahan biologis tersimpan di Rumah Sakit dan Laboratorium Klinik Swasta di Kota Bandung yang dikumpulkan mulai dari Juni 2014 sampai April 2015. Bakteri tersebut sudah diisolasi dan diidentifikasi dari berbagai bahan pemeriksaan klinis sesuai prosedur standar yang berlaku. Penelitian ini telah mendapatkan pembebasan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran No: 533/UN6.C2.1.2/KEPK/PN/2014.

Tabung sentrifuga dengan bakteri yang telah ditumbuhkan kemudian dimasukkan ke dalam mesin sentrifuga untuk disentrifugasi selama 1–2 menit. Setelah disentrifugasi supernatan dibuang dan dilakukan proses isolasi plasmid. Singkatnya, 250  $\mu$ L *XPPD1 buffer* ditambahkan dalam tabung, kemudian ditambahkan 250  $\mu$ L *XPPD2 buffer* lalu tabung dibalik sebanyak 5 kali untuk melisis sel dan didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit yang dilanjutkan dengan menambahkan 350  $\mu$ L *XPPD3 Buffer* lalu tabung dibalikkan sebanyak 5 kali secara perlahan. Kemudian, tabung tersebut disentrifugasi selama 10 menit dan *supernatan* dipindahkan ke *XPPD column* yang sudah dialasi *collection tube* untuk kemudian disentrifugasi lagi selama 1 menit dan cairan yang tersaring kemudian dibuang. Langkah selanjutnya adalah menambahkan 400  $\mu$ L *W1 buffer* dan sentrifugasi selama 1 menit lalu buang cairan yang tersaring. Kemudian *Wash buffer* ditambahkan lalu sentrifugasi selama 1 menit lalu buang cairan yang tersaring. Setelah itu disentrifugasi lagi selama 3 menit dan *XPPD Column* dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga. *Elution buffer* sebanyak 50–100  $\mu$ L ditambahkan pada bagian tengah membran *XPPD column* dan dibiarkan selama 1 menit sebelum disentrifugasi untuk terakhir kalinya selama 1 menit untuk mendapatkan plasmid yang sudah terisolasi.

Primer gen  $bla_{TEM}$  yang dipergunakan adalah *primer forward* 5'-GTATCCGCTCATGGAGACAA-

TAACCCTG-3' (28 basa) dan *primer reverse* 5'-CCAATGCTTAATCAGTGGAGGCACC-3' (25 basa) yang telah dipergunakan pada penelitian sebelumnya<sup>16</sup> dengan reaksi 50  $\mu$ L, terdiri atas 25  $\mu$ L *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*; 0,5  $\mu$ L *primer forward* 10  $\mu$ M dan 0,5  $\mu$ L *primer reverse* 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ L DNA hasil isolasi plasmid; dan 23  $\mu$ L *nuclease-free water*. Kondisi PCR adalah denaturasi awal pada suhu 95°C selama 2 menit; lalu denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik; *annealing* pada suhu 58°C selama 1 menit; ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit; tahapan diulangi sebanyak 30 siklus; lalu diakhiri ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasilnya dibaca dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dan hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA sebesar 861 kb.

Setelah ditemukan sekuens gen target maka dilakukan langkah untuk mendesain primer LAMP dengan bantuan program *Primer Explorer V4*, kemudian program tersebut akan menghasilkan beberapa pilihan primer; setelah dikonfirmasi didapatkan primer LAMP yang disarankan oleh program tersebut. Primer yang digunakan adalah empat buah primer, yaitu primer F3 5'-CGGCATTTTGCCTTCCTGT-3' (19 basa), primer B3 5'-CGACCGAGTTGCTCTTGC-3' (18 basa), primer FIP 5'-ACTCGTGACCCAACTGATCTT-TTGCTCACCCAGAAACGC-3' (41 basa), dan primer BIP 5'-ATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCG-GGATAATACCGACCACAT-3' (42 basa).

Reaksi LAMP dengan total volume 25  $\mu$ L terdiri atas 2,5  $\mu$ L *isothermal amplification buffer* 10x; 3,5  $\mu$ L *dNTP Mix* 10 mM; 2  $\mu$ L  $MgCl_2$  50 mM; 2,5  $\mu$ L primer F3 2  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ L primer B3 2  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ L primer FIP 16  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ L primer BIP 16  $\mu$ M; 1  $\mu$ L *Bst* 2.0 (8.000 U/mL); 5  $\mu$ L akuades steril dan 1  $\mu$ L sampel. Kondisi reaksi LAMP adalah 30 menit pada suhu 65°C yang diakhiri dengan penghentian reaksi pada suhu 80°C selama 2 menit. Proses amplifikasi DNA dengan LAMP dapat menggunakan alat *thermocycler* ataupun penangas air dengan hasil yang sama.

Setelah proses amplifikasi selesai, pembacaan hasil dilakukan dengan menambahkan *SYBR green I* konsentrasi 1.000x sebanyak 1  $\mu$ L. Hasil LAMP yang positif akan berubah warna menjadi kuning kehijauan, sedangkan hasil LAMP yang negatif akan tetap berwarna oranye. Selain itu, perbedaan hasil juga dapat dilihat dengan menggunakan bantuan sinar UV dan hasil positif akan berpendar dengan warna kuning kehijauan terang.

Sensitivitas dan spesifisitas kemudian dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.<sup>17</sup>

**Bayu A.: Loop-Mediated Isothermal Amplification untuk Mendeteksi Gen  $bla_{TEM}$  Sebagai Penyandi Extended-Spectrum**

$$\text{Sensitivitas} = \frac{\text{Positif-Benar}}{\text{Positif-Benar} + \text{Negatif-Palsu}} \times 100\% = \frac{A}{A + C} \times 100\%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{\text{Negatif-Benar}}{\text{Negatif-Benar} + \text{Positif-Palsu}} \times 100\% = \frac{D}{D + B} \times 100\%$$

Penilaian kesesuaian hasil deteksi gen  $bla_{TEM}$  dan metode PCR dan LAMP menggunakan nilai  $\kappa$  yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.<sup>17</sup>

$$\text{Kesesuaian nyata (KN)} = \frac{(A + D)}{A + B + C + D}$$

Kesesuaian karena peluang (KKP)

$$= \frac{[(A + B) \times (A + C) + (A + B + C + D)] + [(C + D) \times (B + D) + (A + B + C + D)]}{A + B + C + D}$$

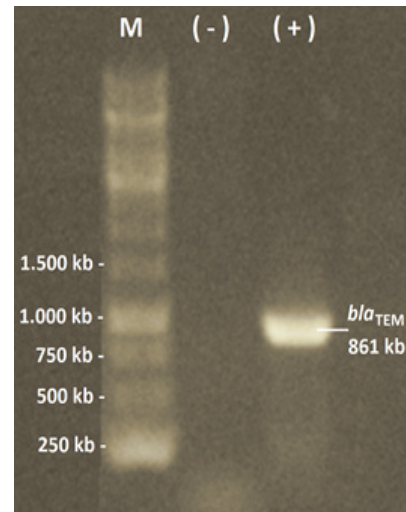
Kesesuaian bukan akibat peluang (KBAP)=KN-KKP  
Kesesuaian bukan peluang (KBP)=100%-KKP  
Kappa=KBAP÷KBP

## Hasil

Selama bulan Juni 2014 sampai dengan April 2015 berhasil dikumpulkan *Enterobacteriaceae* sebanyak 92 isolat yang didominasi *Escherichia coli* sebanyak 51 isolat (55%) dan *Klebsiella pneumoniae* sebanyak 24 isolat (26%). Deteksi gen  $bla_{TEM}$  dengan metode PCR mendapatkan hasil sampel positif sebanyak 38% atau 35 dari total 92 isolat (Tabel 1) yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA dengan ukuran 861 kb (Gambar 1).

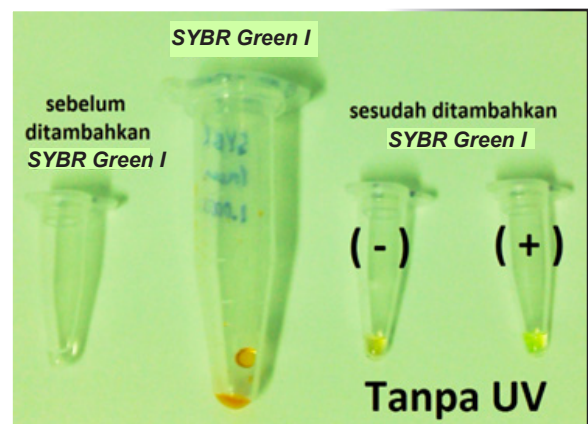
Pada deteksi gen  $bla_{TEM}$  dengan metode LAMP didapatkan hasil sampel positif sebanyak 40% atau 37 dari total 92 isolat (Tabel 2) yang ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi kuning kehijauan dan berpendar terang saat disinari UV (Gambar 2 dan 3).

Hasil deteksi gen  $bla_{TEM}$  dengan kedua metode di atas dibandingkan dan berdasarkan hasil perhitungan didapatkan bahwa metode LAMP memiliki sensitivitas sebesar 91,4%; spesifisitas sebesar 91,2%; *positive predictive value* (PV<sup>+</sup>) sebesar 86,5%; serta *negative predictive value* (PV<sup>-</sup>) sebesar 94,5% (Tabel 3). Untuk menilai kesesuaian hasil deteksi gen  $bla_{TEM}$  antara metode PCR dan LAMP dilakukan perhitungan nilai  $\kappa$  dengan hasil nilai  $\kappa$  sebesar 85,4%.



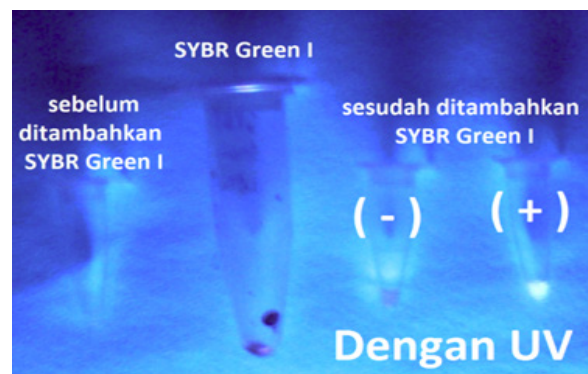
**Gambar 1 Hasil PCR**

Keterangan: M: marker/ladder; (-): hasil negatif; (+): hasil positif



**Gambar 2 Hasil LAMP tanpa UV**

Keterangan: (-): hasil negatif; (+): hasil positif



**Gambar 3 Hasil LAMP dengan UV**

Keterangan: (-): hasil negatif; (+): hasil positif



**Tabel 1 Distribusi Hasil Amplifikasi dengan Metode PCR**

Spesies Bakteri	Positif	Negatif	Jumlah
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3	7
<i>Escherichia coli</i>	22	29	51
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	15	24
<i>Klebsiella sp</i>	0	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	0	2	2
<i>Salmonella sp</i>	0	1	1
<i>Serratia sp</i>	0	1	1
Total	35 (38%)	57 (62%)	92

### Pembahasan

Penelitian ini telah berhasil melakukan deteksi gen *bla<sub>TEM</sub>* dengan menggunakan metode LAMP yang dibandingkan dengan PCR sebagai metode standar. LAMP merupakan metode yang dapat mengamplifikasi DNA untai ganda dengan kondisi suhu yang sama atau isothermal dengan alat sederhana yaitu penangas air maupun alat yang modern seperti *thermocycler*. Kondisi isothermal

ini dimungkinkan karena pada suhu sekitar 65°C, DNA untai ganda berada dalam kesetimbangan dinamis sehingga memungkinkan salah satu primer untuk berhibridisasi dengan sekuens komplementernya, lalu menginisiasi terjadinya sintesis DNA. Selain itu, dibutuhkan juga  $Mg^{2+}$  dengan konsentrasi yang tinggi agar amplifikasi optimal.  $Mg^{2+}$  dapat meningkatkan aktivitas *Bst* polimerase karena merupakan ko-faktor enzim tersebut.<sup>18</sup>

**Tabel 2 Distribusi Hasil Amplifikasi dengan Metode LAMP**

Spesies Bakteri	Positif	Negatif	Jumlah
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3	7
<i>Escherichia coli</i>	22	29	51
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	14	24
<i>Klebsiella sp</i>	0	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	2
<i>Salmonella sp</i>	0	1	1
<i>Serratia sp</i>	0	1	1
Total	37 (40%)	55 (60%)	92

**Tabel 3 Deteksi Gen *bla<sub>TEM</sub>* Menggunakan Metode PCR Dibanding dengan LAMP**

Hasil LAMP	Hasil PCR		Total
	Positif	Negatif	
Positif	32	5	37
Negatif	3	52	55
Total	35	57	92

Proses amplifikasi DNA dengan metode LAMP pada penelitian ini hanya membutuhkan waktu 30 menit, ini tergolong lebih cepat dibanding dengan reaksi LAMP pada penelitian lainnya yang biasanya membutuhkan waktu sekitar 60 menit.<sup>8</sup> Perbedaan waktu amplifikasi DNA pada berbagai penelitian yang menggunakan metode LAMP diakibatkan oleh berbagai faktor. Salah satunya adalah pengaruh komposisi *master mix* yang digunakan karena sampai saat ini masih belum banyak terdapat *master mix* yang sudah terstandarisasi dan juga dijual secara komersil untuk LAMP sehingga para peneliti sering kali membuat komposisinya masing-masing. Pada penelitian ini, *master mix* ditambahkan MgCl<sub>2</sub> sehingga konsentrasi akhirnya mencapai 6 mM. Seperti yang diketahui sebelumnya, peningkatan Mg<sup>2+</sup> akan meningkatkan aktivitas *Bst* polimerase yang menyebabkan reaksi LAMP berlangsung lebih cepat.<sup>18</sup>

LAMP mengamplifikasi DNA target dalam jumlah yang sangat besar dan memproduksi magnesium pirofosfat sebagai hasil sampingan. Magnesium pirofosfat terbentuk akibat reaksi antara ion magnesium dan ion pirofosfat yang dilepaskan oleh dNTP saat polimerisasi asam nukleat.<sup>19</sup> Magnesium pirofosfat yang terbentuk kemudian akan mengendap dan memiliki warna putih sehingga akan membuat cairan menjadi keruh. Kekeruhan ini tidak mudah untuk diamati oleh mata telanjang dan memerlukan bantuan turbidimeter, yaitu alat yang dapat mengukur turbiditas atau kekeruhan. Pada penelitian ini digunakan pewarna DNA SYBR *green I* yang akan berikatan dengan DNA untai ganda dan berpendar saat terkena sinar UV.<sup>20</sup> Sebelum disinari dengan UV sudah dapat terlihat perbedaan warna antara hasil positif dan negatif, namun dengan bantuan sinar UV akan terlihat lebih jelas perbedaannya.

Karena keberhasilan metode LAMP di dalam mengamplifikasi DNA dan hasil perhitungan nilai sensitivitas dan spesifisitasnya, dapat dikatakan bahwa metode LAMP memiliki validitas yang baik dengan kesesuaian yang sangat baik antara hasil deteksi gen *bla*<sub>TEM</sub> dengan metode PCR dan metode LAMP. Nilai *kappa* yang melebihi 80% dianggap sangat baik.<sup>17</sup>

Simpulan, metode LAMP memiliki validitas yang baik dalam mendeteksi gen *bla*<sub>TEM</sub> sebagai penyandi ESBL pada isolat *Enterobacteriaceae* sehingga dapat dikatakan mempunyai validitas yang baik dengan kesesuaian yang baik dibanding dengan metode PCR. Hal ini memperlihatkan bahwa metode LAMP mampu dijadikan metode alternatif selain metode PCR terlebih di daerah dengan kondisi infrastruktur yang terbatas.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dany Hilmanto, Ida Parwati, Yunia Sribudiani, Herry Herman, dan juga Andri Rezano atas masukannya yang sangat berharga. Penelitian mendapatkan dana dari Hibah Internal Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran (Unpad) Nomor 4141/UN6.C/HK/2014.

## Daftar Pustaka

1. Kong K-F, Schnepfer L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 2010;118(1):1-36.
2. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):160-201.
3. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol*. 2013;4(128):1-9.
4. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):933-51.
5. Aldeyab MA, Harbarth S, Vernaz N, Kearney MP, Scott MG, Darwish Elhaggi FW, dkk. The impact of antibiotic use on the incidence and resistance pattern of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in primary and secondary healthcare settings. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74:171-9.
6. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2015;17:11-22.
7. Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, Lemmens-Den Toom N, dkk. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya, Indonesia. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(3):465-9.
8. Komariah N. Validitas loop-mediated isothermal amplification (LAMP) untuk mendeteksi extended-spectrum beta lactamase (ESBL) pada isolat *Klebsiella pneumoniae* [tesis]. Bandung: Universitas Padjadjaran; 2012.
9. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657-86.
10. Severin JA, Lestari ES, Kloezen W, Lemmens-

- den Toom N, Mertaniasih NM, Kuntaman K, dkk. Faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae among humans in Java, Indonesia, in 2001-2002. *Trop Med Int Health*. 2012;17(4):455-61.
11. Mroczkowska JE, Barlow M. Fitness trade-offs in blaTEM evolution. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2340-5.
  12. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 (Suppl 1):90-103.
  13. Tsering DC, Das S, Adhiakari L, Pal R, Singh TS. Extended spectrum beta-lactamase detection in gram-negative bacilli of nosocomial origin. *J Glob Infect Dis*. 2009;1(2):87-92.
  14. Laohasinnarong D. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an alternative molecular diagnosis. *J Appl Anim Sci*. 2011;4:9-19.
  15. Fakruddin M. Loop mediated Isothermal amplification (LAMP)-An Alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Res Pub J*. 2011;5:425-39.
  16. Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae with their in vitro antimicrobial susceptibility. *Indian J Med Microbiol*. 2011;29(2):161-4.
  17. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Edisi ke-4. Jakarta: CV. Sagung Seto; 2011.
  18. Yang W, Lee JY, Nowotny M. Making and breaking nucleic acids: two-Mg<sup>2+</sup>-ion catalysis and substrate specificity. *Mol Cell*. 2006;22(1):5-13.
  19. Arunrut N, Suebsing R, Withyachumnarnkul B, Kiatpathomchai W. Demonstration of a very inexpensive, turbidimetric, real-time, RT-LAMP detection platform using shrimp Laem-Singh virus (LSNV) as a model. *PLoS One*. 2014;9(9):e108047.
  20. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e103.

## Kadar Interleukin-18 pada Kultur Limfosit Penderita Dermatitis Atopik yang Distimulasi *Staphylococcal Enterotoxin B* (SEB)

Oki Suwarsa,<sup>1</sup> Sudigdoadi,<sup>1</sup> Endang Sutedja,<sup>1</sup> Ponpon Idjradinata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, <sup>2</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung

### Abstrak

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mempunyai peranan penting pada patogenesis dermatitis atopik (DA). Peran *S. aureus* tersebut tidak hanya sebagai pencetus DA, tetapi juga menyebabkan inflamasi kronik. Peran tersebut berhubungan dengan dihasilkannya protein antara lain toksin poten oleh *S. aureus*, yaitu *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB). Interleukin-18 (IL-18) merupakan regulator penting dari produksi sitokin Th-1 yaitu interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kadar IL-18 pada kultur limfosit pasien DA yang distimulus dengan SEB. Penelitian ini dilakukan pada 20 orang penderita DA (7 laki-laki dan 13 perempuan) dan 20 orang sehat (9 laki-laki dan 11 perempuan) di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, merupakan penelitian eksperimental secara *in vitro* pada kultur limfosit yang distimulus dengan SEB di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Terjadi peningkatan kadar IL-18 rata-rata pada kultur limfosit antara sebelum dipapar dan setelah dipapar SEB, baik pada kelompok DA maupun kelompok kontrol. Setelah dilakukan uji statistik perbandingan antara kadar IL-18 rata-rata sebelum dan sesudah dipapar SEB antara kelompok DA dan kontrol, didapatkan hasil kadar IL-18 kelompok DA lebih tinggi bermakna dibanding dengan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan kadar IL-18 meningkat tinggi pada kelompok DA yang dipapar SEB. [MKB. 2015;47(4):249-54]

**Kata kunci:** Dermatitis atopik, interleukin-18 (IL-18), *Staphylococcus enterotoxin B*

## Interleukin-18 Levels in Lymphocytes Cultures from Atopic Dermatitis Patients Stimulated by *Staphylococcal Enterotoxin B*

### Abstract

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) has an important role in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD). *S. aureus* acts as a triggering factor for AD and also causes chronic inflammation. These roles of *S. aureus* are related to various proteins such as *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB) as a potent toxin. Interleukin-18 (IL-18) is an important regulator of cytokine production of Th-1, which is interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). The aim of this study was to reveal the levels of IL-18 in cultured lymphocytes from AD patients exposed by SEB. This study was conducted on 20 people with DA (7 men and 13 women) and 20 healthy volunteers (9 men and 11 women) in Dr. Hasan Sadikin General Hospital. The *in vitro* experimental study on cultured lymphocytes exposed with SEB was performed at the Integrated Research and Testing Laboratory of Gadjah Mada University. The average levels of IL-18 in cultured lymphocytes before and after being exposed to SEB increased both in AD group and control group. After the statistical tests was performed on the ratio of the average levels of IL-18 before and after being exposed to SEB between AD and control groups, it was shown that the levels of IL-18 AD group was significantly higher than the control group ( $p < 0.05$ ). Therefore, it can be concluded that the levels of IL-18 increased higher in AD group exposed by SEB. [MKB. 2015;47(4):249-54]

**Key words:** Atopic dermatitis, interleukin-18, *Staphylococcal enterotoxin B*

---

**Korespondensi:** Dr. Oki Suwarsa, dr., Sp KK(K), M.Kes Departemen Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, Jalan Pasteur No. 38 Bandung, *mobile* 08122357949 *e-mail* okispkk@yahoo.co.id