

**REVIEW: DETEKSI BAKTERI *Salmonella* MENGGUNAKAN
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DAN LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL
AMPLIFICATION (LAMP)**

Nadya Nur Puspa Permatasari, Norisca Aliza Putriana

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang KM. 21, Jatinangor 45363

Telepon (022) 7796200, Faksimile (022) 7796200

E-mail: nadya.npuspa@gmail.com

Abstrak

Salmonella merupakan salah satu bakteri yang menyebabkan *foodborne disease*. Penyakit bawaan makanan yang disebabkan oleh *Salmonella* dikenal dengan salmonellosis. *Salmonella* sebagian besar ditemukan pada unggas, telur, produk susu, air, buah segar, dan sayuran. Deteksi *Salmonella* dapat dilakukan dengan beberapa cara, baik secara konvensional maupun instrumental. Review ini dilakukan dengan studi pustaka pencarian jurnal internasional berbasis online. Selain metode konvensional standar, metode yang dapat digunakan untuk deteksi *Salmonella* adalah *polymerase chain reaction* (PCR) dan *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Metode LAMP merupakan metode yang lebih efektif jika dibandingkan dengan metode PCR.

Kata Kunci: *Salmonella*, salmonellosis, deteksi, LAMP, PCR.

Abstract

Salmonella is one of bacteria that cause of foodborne disease. Foodborne disease caused by *Salmonella* named salmonellosis. *Salmonella* is mostly found in poultry, eggs, dairy products, water, fresh fruit, and vegetables. Detection of *Salmonella* can be done in several ways, either conventional way or instrumental method. This review is done by using study literature review by searching international online journal. Besides standard conventional method, method that can be used to detection of *Salmonella* are *polymerase chain reaction* (PCR) and *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). LAMP method is more effective than PCR method.

Keywords: *Salmonella*, salmonellosis, detection, LAMP, PCR

Diserahkan: 5 Juli 2018, Diterima 5 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Salmonella merupakan salah satu bakteri yang sangat berperan sebagai penyebab keracunan makanan di banyak negara selama kurang lebih 100 tahun (Alakomi dan Saarela, 2007). Terdapat 16 juta kasus demam tifus setiap tahun, 1,3 miliar kasus gastroenteritis, dan 3 juta kasus kematian di dunia karena *Salmonella* (Bhunia, 2008). Penyakit bawaan makanan

(*foodborne disease*) yang disebabkan oleh *Salmonella* dikenal dengan salmonellosis. Gejala salmonellosis ini ditandai dengan adanya mual, nyeri perut, diare, demam, dan dehidrasi (Popoff *et al.*, 1994).

Salmonella merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, berflagella, dan memiliki ukuran 2-3 x 0,4-0,6 μm (Montville dan Matthews, 2008). Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob yang dapat

tumbuh pada suhu dengan kisaran 5-45°C dengan suhu optimum 35-37°C dan akan mati pada pH di bawah 4,1. *Salmonella* tidak tahan terhadap kadar garam tinggi dan akan mati jika berada pada media dengan kadar garam di atas 9% (Jay *et al.*, 2005). *Salmonella* sebagian besar ditemukan pada unggas, telur, dan produk susu (Silva *et al.*, 2011). Sumber makanan lain yang memungkinkan terkandung *Salmonella* diantaranya air, buah segar, dan sayuran (Pui *et al.*, 2011).

Metode kultur secara konvensional merupakan metode baku emas atau biasa disebut “*gold standard*” untuk deteksi bakteri patogen yang terdiri dari beberapa tahap yaitu pengkayaan non-selektif, pengkayaan selektif, penempatan pada media selektif/ diferensial, dan uji konfirmasi biokimia dan serologi (Jassom *et al.*, 2010; Malorny *et al.*, 2003). Metode ini diketahui sensitif dan murah, namun memerlukan waktu yang lama dalam pengujian karena setidaknya memerlukan tiga hari untuk dapat mengetahui hasilnya, Selain itu, berdasarkan faktor lingkungan, variasi ekspresi gen dari mikroorganisme

dapat mempengaruhi uji biokimia yang dihasilkan (Malorny *et al.*, 2003).

Berbagai metode kini telah dikembangkan dengan harapan dapat diperoleh metode yang efektif dan efisien, diantaranya metode berbasis imunologi, *polymerase chain reaction* (PCR), dan -*Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Berdasarkan hal tersebut, maka perlu diketahui metode yang paling efektif yang dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri *Salmonella*.

METODE

Metode yang digunakan dalam penulisan review artikel ini adalah metode studi pustaka menggunakan instrumen pencarian pustaka berbasis online seperti *Elsevier*, *Researchgate*, *NCBI*, *PubMed*, *Google Scholar*, dan *Sciencedirect*. Kata kunci yang digunakan yaitu “*Detection of Salmonella*”, “*PCR method of Salmonella*”, “*LAMP method of Salmonella*”, “*conventional culture method of Salmonella*”, dan “*Salmonella pathogen*”. Pustaka yang telah diperoleh kemudian disusun menjadi sebuah artikel review.

HASIL

Tabel 1. Perbedaan Metode Konvensional, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

No	Jenis Metode	Prinsip Metode dan Kit	Prinsip Metode Deteksi	Persyaratan untuk Konfirmasi Hasil Positif	Waktu Penyelesaian	Referensi
1	Metode Konvensional Standar	ISO 6579, HPA F13	Dengan tahap pengkayaan pada media non-selektif dan media selektif	Dengan uji serologi dan biokimia	Hasil negatif dalam 3 hari, hasil positif dalam 5 hari	(HPA, 2008; ISO, 2002).
2	Automated PCR	BAX system PCR assay for screening <i>Salmonella</i>	Deteksi <i>end-point</i> amplikon PCR dengan interkalasi warna SybrGreen	Dengan analisis kurva pelelehan, uji kultur, serologi dan biokimia	Hasil negatif dalam 24 jam, termasuk tahap pra-pengkayaan. Konfirmasi positif dalam 5 hari.	(Silbernagel et al., 2003).
3	Real-time PCR	- BAX system Q7 for <i>Salmonella enterica</i> detection kit - TaqMan <i>Salmonella enterica</i> detection kit - LightCycler <i>Salmonella</i> detection kit -	<i>Probe-based chemistry for real-time-detection of PCR amplicons</i>	Dengan kultur, serologi, dan biokimia	Hasil negatif dalam 20-24 jam termasuk tahap pra-pengkayaan. Konfirmasi positif dalam 5 hari	(Koyuncu et al., 2010; Cheung et al., 2004; Eyigor et al., 2010; Perelle et al., 2004).

No	Jenis Metode	Prinsip Metode dan Kit	Prinsip Metode Deteksi	Persyaratan untuk Konfirmasi Hasil Positif	Waktu Penyelesaian	Referensi
4	Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	Teknik amplifikasi asam nukleat	Pemanfaatan <i>Bst</i> DNA polymerase large fragment untuk melakukan <i>auto-cycling strand displacement</i> DNA <i>synthesis</i>	Dengan mengukur turbiditas yang dihasilkan magnesium pirofosfat, atau intensitas fluoresensi jika reaksi menggunakan interkalasi warna	Hasil negatif dalam 24 jam, termasuk tahap pra-pengkayaan. Konfirmasi positif dalam 5 hari.	(Hara-Kudo <i>et al.</i> , 2005; Ueda & Kuwabara, 2009; Abdullah <i>et al.</i> , 2014).

Tabel 2. Perbedaan Sensitivitas Metode PCR dan LAMP pada Deteksi *Salmonella*

<i>Bacterial Strain</i>	<i>Target Gene</i>	<i>LAMP detection limit for bacterial culture (CFU/mL)</i>	<i>PCR detection limit for bacterial culture (CFU/mL)</i>	<i>LAMP detection for simulated pork sample (CFU/mL)</i>
<i>Salmonella</i>	<i>invE</i>	2,0 x 10 ¹	2,33 x 10 ³	1,67 x 10 ¹
<i>S. choleraesuis</i>	<i>fliC</i>	1,33 x 10 ¹	1,67 x 10 ²	2,0 x 10 ¹
<i>S. enteridis</i>	<i>lygD</i>	2,33 x 10 ¹	1,33 x 10 ³	1,67 x 10 ¹
<i>S. typhimurium</i>	STM4495	1,67 x 10 ¹	2,17 x 10 ²	2,0 x 10 ¹

POKOK BAHASAN

Metode Konvensional

Metode konvensional terdiri dari beberapa tahap yaitu pengkayaan non-selektif, pengkayaan selektif, penempatan pada media selektif/ diferensial, dan uji konfirmasi biokimia dan serologi (Jassom *et al.*, 2010; Malorny *et al.*, 2003).

Metode konvensional memerlukan banyak preparasi subkultur untuk keperluan tahap identifikasi dan memerlukan waktu lebih dari lima hari untuk isolasi dan konfirmasi secara lengkap. Selain itu, metode ini dapat memungkinkan terjadinya hasil positif palsu karena flora kompetitif (seperti *S. proteus*) (Naravaneni & Jamil,

2005; Swaminathan & Feng, 1994). Meskipun demikian, metode ini telah diperbaiki untuk dapat mendeteksi dan mengidentifikasi *Salmonella* dengan lebih cepat sehingga dapat mengurangi biaya dan tenaga kerja (Alakomi & Saarela, 2009; Maciorowski *et al.*, 2006; Manafi, 2000; Perry & Freydi, 2007). Metode konvensional banyak digunakan karena mudah dalam penggunaan, perolehan hasil dapat dipercaya, memiliki sensitivitas dan spesifitas tinggi, dan biaya yang dikeluarkan lebih rendah (Gracias & McKillip, 2004; Maciorowski *et al.*, 2006).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode selanjutnya adalah PCR. PCR merupakan teknik yang cepat, bersifat sensitif, dan dapat mengamplifikasi beberapa copy DNA target untuk dapat dideteksi dengan elektroforesis gel. Akan tetapi, ada beberapa hal yang dapat menghambat proses PCR, diantaranya komponen makanan, *humic acid*, urin, garam empedu, dan sebagainya (Jenikova *et al.*, 2000). Mengombinasikan metode pengkayaan konvensional dengan metode PCR dapat mempersingkat waktu penyelesaian untuk deteksi *Salmonella* dalam satu atau dua hari. Meskipun demikian, metode PCR biasa tetap memerlukan kerja laboratorium, waktu, elektroforesis, dan analisis. Untuk mengatasi hal tersebut, kini telah dikembangkan *automated fluorogenic PCR*

(Bailey & Cosbey, 2003). Salah satu contohnya adalah BAX system PCR (Dupont Qualicon, USA) yang mengombinasikan semua reagen PCR esensial, seperti DNA polimerase, nukleotida, primer, kontrol positif internal, dan fluoresensi warna (SybrGreen), menjadi pelet *lyophilized* tunggal kecil di setiap tabung PCR, dan kultur sampel dapat ditambahkan. Pada amplifikasi akhir PCR, instrumen yang sama dapat melakukan deteksi produk PCR dan analisis kurva leleh. Amplifikasi kontrol positif internal dapat digunakan untuk menentukan apakah hasil negatif pada reaksi yang gagal karena pengambatan PCR. Profil kurva peleburan menunjukkan puncak suhu khusus *Salmonella*, juga memungkinkan mendapatkan hasil positif palsu. Waktu penyelesaian deteksi *Salmonella* dapat dikurangi menjadi sekitar 24 jam, termasuk tahap pra-pengkayaan. Sistem ini secara signifikan menyederhanakan dan mempersingkat proses deteksi *Salmonella* dalam makanan dengan mengurangi waktu dan tenaga yang diperlukan untuk transfer reagen dan elektroforesis gel, juga menghilangkan potensi kesalahan teknis dan kontaminasi silang. Penggunaan sistem BAX untuk mendeteksi *Salmonella* dalam makanan divalidasi dan disetujui oleh pihak berwenang, seperti *Association of Official Analytical Chemist International* (AOAC), and *Health Canada*, sebagai metode standar (Silbernagel *et al.*, 2003). Sistem

BAX ditemukan memiliki hasil positif palsu dan negatif palsu yang sangat rendah dan hasil yang diperoleh sebanding dengan metode konvensional standar, ISO 6579, HPA F13, dan MFHB-20 (Cheung *et al.*, 2007; D'Aoust & Purvis, 1998; D'Aoust *et al.*, 2007; Tomazelli *et al.*, 2008). Selanjutnya, untuk bahan baku dengan latar belakang flora yang diinokulasi dengan *Salmonella typhi*, hasil positif palsu dapat diperoleh dengan sistem BAX, sedangkan negatif palsu diperoleh dengan uji Tecra UniqueTM dan metode konvensional standar (Cheung *et al.*, 2007).

Untuk mengidentifikasi faktor risiko yang dapat mempengaruhi keamanan pangan dan untuk memperkirakan penyakit yang disebabkan patogen, diperlukan metode analitik yang dapat menghasilkan data kuantitatif (Malorny *et al.*, 2008). Dengan pengembangan *automated fluorogenic PCR assay*, monitoring *real-time* amplikon PCR telah menjadi layak dan mengarah pada kemungkinan kuantifikasi konsentrasi DNA bakteri awal pada sampel pengujian. Sistem BAX dikembangkan menjadi *real-time PCR platform—the BAX system Q7*, yang memungkinkan deteksi berbasis probe dan kuantifikasi patogen yang lebih spesifik (Koyuncu *et al.*, 2010). Platform *real-time* PCR lainnya atau kit yang biasa digunakan untuk deteksi dan kuantifikasi *Salmonella* dari sampel makanan atau lingkungan adalah *the TaqMan Salmonella enterica detection kit*

(Applied Biosystems, USA), *the molecular beacon-based iQ-Check Salmonella II kit* (Bio- Rad, USA), and *the LightCycler Salmonella Detection Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Germany) (Cheung *et al.*, 2004; Eyigor *et al.*, 2010; Koyuncu *et al.*, 2010; Perelle *et al.*, 2004).

Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Metode selanjutnya adalah *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) LAMP. Metode ini dapat mengamplifikasi asam nukleat dalam waktu 10 menit dengan sirkulasi perpindahan DNA polimerase di bawah kondisi isothermal. Dalam penelitian (Chen *et al.*, 2015), amplifikasi untuk gen *fliC*, *lygD*, dan STM4495 dengan LAMP dapat mendeteksi serotipe *Salmonella* masing-masing, namun tidak bereaksi silang dengan serotipe *Salmonella* yang tidak relevan atau strain non-*Salmonella*. Hal ini menunjukkan bahwa urutan primer *invE* spesifik terhadap gen *fliC*, *lygD*, dan STM4495. *Detection limit* dengan primer *invE* pada pengujian LAMP adalah 2.0×10^1 CFU/mL, sedangkan pada pengujian PCR adalah $2,33 \times 10^3$ CFU/mL. Hal ini mengindikasikan bahwa pengujian LAMP lebih sensitif dibandingkan PCR. Reaksi LAMP dapat dicapai pada suhu konstan 63-65°C dengan waktu 45-70 menit dan diakhiri dengan menonaktifkan enzim pada 80°C selama 10 menit, dan hanya sebuah penangas air termostat yang berfungsi. Metode deteksi

dengan LAMP bersifat spesifik, sensitif, sederhana, cepat, dan hemat biaya (Chen *et al.*, 2015).

SIMPULAN

Metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) merupakan metode yang paling efektif untuk deteksi bakteri *Salmonella* karena memiliki beberapa kelebihan yaitu bersifat spesifik, sensitif, sederhana, cepat, dan hemat biaya.

SARAN

Metode LAMP merupakan metode yang memiliki efektivitas dan sensitivitas yang lebih tinggi untuk mendeteksi bakteri *Salmonella* jika dibandingkan dengan metode PCR. Namun, pengembangan metode deteksi *Salmonella*, baik secara konvensional maupun instrumental perlu terus dilakukan agar diperoleh metode yang lebih efektif dan efisien.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya ucapkan terima kasih kepada ibu Norisca Aliza Putriana, M.Farm., Apt. yang telah memberikan arahan dan dukungan sehingga saya dapat menyelesaikan *review* artikel ini. Semoga artikel ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, J., Saffie, N., Husin, A., Rahman, A.Z., Ismail, A., Aziah, I., Mohamed, M. 2014. Rapid detection of *Salmonella typhi* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

method. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (4): 1385-1391.

Alakomi, H.L. & Saarela, M. 2009. *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1: 142-152.

Bailey, J. S., & Cosby, D. E. 2003. Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR system. *Journal of Food Protection*, 66: 2138-2140.

Bhunia, A. K. 2008. *Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis*. United States of America: Springer Science + Business Media, LLC.

Chen, Z., Ke Zhang., Huan, Y., Li, Q., Wang, Lan., & Zhiguo, Liu. 2015. Detection of *Salmonella* and several common *Salmonella* serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Science and Human Wellness*, 4: 75-79.

Cheung, P. -Y., Chan, C. W., Wong, W., Cheung, T. L., & Kam, K. M. 2004. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction pathogen detection kits for *Salmonella* spp. in food. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 509-515.

Cheung, P. -Y., Kwok, K. K., & Kam, K. M. 2007. Application of BAX system, Tecra Unique™ *Salmonella* test, and a conventional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 219-227.

D'Aoust, J. -Y., & Purvis, U. 1998. Isolation and identification of *Salmonella* from foods (MFHPB-20). *Compendium of analytical methods*, Vol. 2, Ottawa: Health Canada.

D'Aoust, J. -Y., Pagotto, F., Akhtar, M., Bussey, J., Cooper, C., McDonald, C., *et al.* 2007. Evaluation of the BAX gel and fluorometric systems for the detection of foodborne *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 70: 835-840.

Eyigor, A., Temelli, S., & Carli, K. T. 2010. Evaluation of ISO 6579 and FDA-BAM methods to complement real-time polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* in naturally

- contaminated poultry meat and red meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7: 921–927.
- Gracias, K. S., & McKillip, J. L. 2004. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 883–890.
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., & Ikeda, M. 2005. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 155–161.
- Health Protection Agency (HPA) 2008. Detection of *Salmonella* species. National standard method F13 issue 3.1. Available online at http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops_Asp [Diakses pada 29 Juni 2018].
- International Organization for Standardization (ISO). 2002. ISO 6579:2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. *Modern Food Microbiology*. Ed ke- 7. USA: Springer Science and Bussiness Media Inc.
- Jenikova, G., Pazlarova, J., & Demnerova, K. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *International Microbiology*, 3: 225–229.
- Koyuncu, S., Andersson, M. G., & Häggblom, P. 2010. Accuracy and sensitivity of commercial PCR-based methods for detection of *Salmonella enterica* in feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2815–2822.
- Koyuncu, S., Andersson, M. G., & Häggblom, P. 2010. Accuracy and sensitivity of commercial PCR-based methods for detection of *Salmonella enterica* in feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2815–2822.
- Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F. T., Pillai, S. D., & Ricke, S. C. 2006. Cultural and immunological detection for *Salmonella* spp. in animal feeds e a review. *Veterinary Research Communications*, 30: 127–137.
- Malorny B., Bunge C., Helmuth R. 2007. A real-time PCR for the detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods*. 2007 Aug;70(2): 245–51.
- Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N., & Hoorfar, J. 2008. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1299–1304.
- Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 205–218.
- Montville TJ, Matthews KR. 2008. *Food microbiology: an introduction*. 2nd ed. Washington, USA: ASM Press.
- Naravaneni, R., & Jamil, K. 2005. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 51–54.
- Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J., & Fach, P. 2004. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. In milk and meat samples. *Molecular and Cell Probes*, 18: 409–420.
- Perry, J. D., & Freydi_ere, A. M. 2007. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2046–2055.
- Popoff M.Y., Bockemuhl, J., and McWhorter-Murlin A. 1994. Supplement 1993 (no. 37) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 145:711–716
- Pui CF, Wong WC, Chai LC, Nillian E, Ghazali FM, Cheah YK, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Radu S. 2011. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*. 22: 337–342.
- Silbernagel, K., Jechorek, R., Carver, C., Barbour, W. M., & Mrozinski, P. 2003. Evaluation of the BAX system for detection of *Salmonella* in selected

- foods: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 86: 1149–1159.
- Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*. 2.
- Swaminathan, B., & Feng, P. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 48: 401-426.
- Thorns, C. J., McLaren, I. M., & Sojka, M. G. 1994. The use of latex particle agglutination to specifically detect *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 21: 47-53.
- Tomazelli, I. B., De Freitas, J. B., Fabbi, L. M., Filipini, T. A., Da Silva, C. M., Bedin, J. M., et al. 2008. Comparison of the BAX system PCR method to Brazil's official method for the detection of *Salmonella* in food, water, and environmental samples. *Journal of Food Protection*, 71: 2442–2447.
- Ueda, S., & Kuwabara, Y. 2009. The rapid detection of *Salmonella* from food samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biocontrol Science*, 14: 73–76.