

# DETEKSI *Helicobacter pylori* DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION

**Mukh Syaifudin**

Puslitbang Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir - BATAN

**Maria Lina Rosilawati**

Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN

**Murdani Abdullah dan Ari Fachrial Syam**

Bagian Ilmu Penyakit Dalam, RSCM/Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

## ABSTRAK

**DETEKSI *Helicobacter pylori* DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION.** Infeksi *Helicobacter pylori* merupakan penyebab utama *peptic ulcer* (tukak lambung), gastritis (maag) dan kanker saluran pencernaan (*gastric carcinoma* dan *gastric lymphoma*). Deteksi infeksi *H. pylori* dengan teknik konvensional kurang sensitif dan spesifik sehingga penting untuk mendeteksinya dengan teknik biologi molekuler yang didasarkan pada pelacakan asam nukleat. Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis pada 50 sampel biopsi lambung (antrum) penderita dyspepsia dari Bagian Ilmu Penyakit Dalam RSCM. Ekstraksi asam deoksiribonukleat (DNA) dilakukan dengan melisis biopsi lambung dan menginkubasi pada suhu 65°C dan DNA diekstrak dengan kloroform serta dimurnikan dengan etanol dingin. Amplifikasi DNA dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer dari gen untuk protein cytotoxin (*cagA*), dan gen antigen *species-specific* dan DNA dideteksi dengan mengelektroforesis hasil amplifikasi pada gel agarose 1,5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 50 sampel yang dianalisis, 7 diantaranya positif pada medium *motility indol urease* (MIU). Dari 7 sampel tersebut, 4 diantaranya menunjukkan positif berdasarkan analisis PCR untuk gen *species-specific* dan *cagA* sedangkan dua sampel lainnya menunjukkan *band-band* non spesifik yang mungkin disebabkan karena konsentrasi MgCl<sub>2</sub> atau dNTP serta suhu annealing yang kurang tepat sehingga primer justru menempel pada DNA non target (jaringan). Satu sampel MIU positif menunjukkan hasil PCR negatif yang mungkin disebabkan karena kesalahan teknis ekstraksi. Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa ada korelasi positif antara MIU dan PCR serta hasil-hasil pengkajian menunjukkan bahwa uji PCR dapat digunakan untuk mengetahui infeksi *H. pylori* secara lebih cepat dan juga untuk melengkapi hasil diagnosa yang lain seperti serologi, kultur dan histologi.

## ABSTRACT

**DETECTION OF *Helicobacter pylori* WITH POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUE.** The infection of *Helicobacter pylori* is a main causal of peptic ulcer, gastritis and colon cancer (*gastric carcinoma* and *gastric lymphoma*). The detection of *H. pylori* infection with conventional methods is known to be less sensitive and specific so that it is crucial to detect its existence with molecular biology technique based on nucleic acid probing. In this research, the analysis has been done on 50 biopsy samples of stomach (antrum) of dyspepsia patients obtained from Internal Medicine Division RSCM. Extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) was done by lysed the gastric biopsy and incubate them on 65°C and DNA was extracted with chloroform and was purified with cold ethanol. The amplification of DNA has been done by using polymerase chain reaction (PCR) technique with primers designed from genes encoding cytotoxin protein (*cagA*) and antigen for species-specific and DNA was detected with running the amplification results on 1.5% agarose gel. The results showed that from 50 samples analyzed, 7 of them were positive motility indol urease (MIU) medium. Of these 7 samples, 4 of them were positive PCR for *species-specific* and *cagA* genes, while two others showed non specific bands which may be due to non suitable condition/ concentration of MgCl<sub>2</sub> or dNTP and annealing temperature so that the primers were annealed with non target DNA (tissues). One sample of positive MIU showed PCR negative result which may due to the technical error. From this research, it could be known that there is a positive correlation between MIU and PCR and the result of some researches showed that PCR test could be used in early detection of infection caused by *H. pylori* and to be complement for other diagnose results such as serology, culture and histology.

## I. PENDAHULUAN

*Helicobacter pylori* adalah bakteri berbentuk spiral, bersifat *gram-negative*, dan hidup dalam lingkungan mikroaerofilik dalam lapisan mukosa, epitel dan jaringan lambung pada hampir separo penduduk dunia [1]. Infeksi *H. pylori* telah diketahui sebagai penyebab utama penyakit *peptic ulcer* (tukak lambung dan duodenum), gastritis kronis dan kanker saluran pencernaan seperti *gastric carcinoma* dan *gastric lymphoma* [2-5]. *Peptic ulcer* adalah lubang pada mukosa yang disebabkan oleh tingginya keasaman pada mukosa yang diperparah oleh pembengkakan karena infeksi oleh *H. pylori* atau zat lain seperti aspirin. Infeksi *H. pylori* masih merupakan masalah besar di Indonesia karena sampai saat ini belum diketahui dengan jelas cara penularan dan patofisiologisnya pada saluran pencernaan. Oleh karena itu perlu dikaji seberapa jauh hubungan antara infeksi dengan penyakit yang ditimbulkannya. Meskipun prevalensi infeksi *H. pylori* di Indonesia rendah (36-46%) dengan 5,3-15,4% diantaranya ditemukan pada usia di bawah 5 tahun, sedangkan data terbaru di Jakarta dan Surabaya [6] menunjukkan prevalensi *H. pylori* pada penderita *peptic ulcer* masing-masing sebesar 100% dan 85,7-93,9%.

Infeksi bakteri *H. pylori* dimasukkan dalam daftar kelompok karsinogen I untuk kanker saluran pencernaan (WHO, 1994) [2]. Infeksi disebabkan karena keberadaan bakteri tersebut dalam mukosa lambung dan mengeluarkan sejumlah besar molekul yang sangat antigenik seperti urease. Gastritis kronis akibat infeksi *H. pylori* dapat menyebabkan pembentukan kanker saluran pencernaan. *H. pylori* juga merupakan salah satu kendala besar bagi para peneliti dimana gen-gen yang berhubungan dengan kolonisasi sangat beragam. Meskipun telah banyak informasi mengenai *H. pylori*, akan tetapi pengetahuan mengenai peran khusus dan mendetail dari infeksi *H. pylori* dalam patogenesis penyakit yang ditimbulkan tetap belum memadai sehingga perlu diketahui mekanisme yang mendasari respon pembengkakan akut dan kronik akibat *H. pylori* [7].

Bakteri *H. pylori* dapat dideteksi dengan teknik biokimia seperti urease, histopatologi, kultur, endoskopi dan teknik biologi molekuler. Ada beberapa gen yang ikut bertanggung jawab dalam timbulnya infeksi antara lain gen untuk urease (*ureA* berukuran 411 pasang basa (pb), *ureB* dan *ureC* berukuran 294 pb) [3], serta gen untuk protein sitotoksin (*cagA* berukuran 298 pb) [8]. Uji diagnostik infeksi *H. pylori* dapat dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). PCR dan dapat digunakan untuk

mengkloning dan menentukan gen-gen penting yang terlibat dalam kolonisasi dan patogenesis *H. pylori* sehingga memungkinkan pendekatan baru dalam diagnosa dan telah berhasil digunakan untuk mengetahui skema sederhana penyidikan masing-masing strain bakteri *H. pylori* [7,9].

Gen *cagA* mengkode protein CagA dan ditemukan pada sejumlah strain *H. pylori* dengan karakteristik fenotip berbeda-beda yang juga memproduksi zat sitotoksin. Sekitar 60% strain *H. pylori* memiliki *cagA* dan merupakan gen pertama yang ditemukan di antara strain *H. pylori* [10]. Antibodi pada protein *cagA* pun ditemukan hingga 100% dalam serum pasien *peptic ulcer*, tetapi hanya 60-62% pada pasien gastritis [8]. Dengan demikian adanya *cagA* berhubungan dengan kecenderungan infeksi *H. pylori* yang menyebabkan timbulnya *peptic ulcer* baik secara statistik dan klinik. Disamping itu gen antigen *species-specific* ditemukan pada semua strain *H. pylori* dan deret pengkode dari gen ini tidak berhibridisasi dengan keseluruhan bakteri sehingga bersifat spesifik [2]. Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis gen *cagA* dan *species-specific* pada sampel biopsy lambung pasien gastritis kronis.

## II. BAHAN DAN METODE

Sebanyak 50 buah (7 positif *H. pylori* dan 43 negatif berdasarkan perubahan warna dari kuning menjadi orange dari medium MIU) diperoleh dari Subbagian Gastroenterologi, Bagian Ilmu Penyakit Dalam FKUI/RSCM Jakarta. Sampel tersebut diambil dari antrum lambung pasien gastric arthritis atau kelainan lambung (dyspepsia yakni gangguan pencernaan akibat tingginya asam lambung) bersamaan dengan pemeriksaan/diagnosa menggunakan peralatan endoskopi. *Motility indol urease* (MIU) adalah medium yang spesifik dipergunakan untuk mengetahui keberadaan *H. pylori* berdasarkan perubahan warna medium dari kuning menjadi merah muda.

Disebabkan karena keterbatasan bahan kimia dan pengetahuan untuk melakukan kultur bakteri *H. pylori* serta lamanya waktu kultur maka dalam penelitian ini ekstraksi DNA dilakukan langsung dari biopsy lambung. Prosedur ekstraksi DNA *H. pylori* dilakukan sesuai dengan petunjuk Kit *Easy-DNA for genomic DNA isolation* (No. katalog K-1800-01) produk Invitrogene. Secara garis besar, prosedurnya adalah dengan memasukkan jaringan biopsy ke dalam 1,5 ml mikrotube steril berisi 350  $\mu$ l *Solution A*

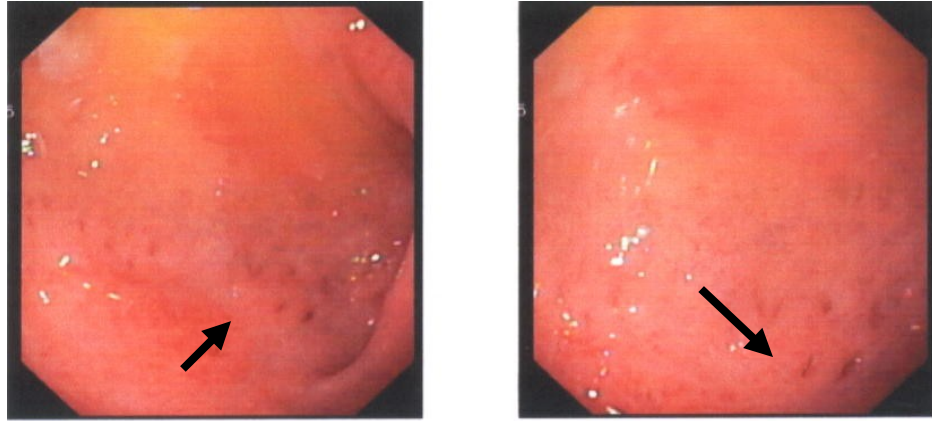
(larutan pelisis), divorteks dan diinkubasi pada 65°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 150 µl *Solution B* (larutan pemurnian), divorteks hingga endapan larut dan diperoleh larutan viscous/bening. Ditambahkan 500 µl kloroform dan divorteks hingga viskositas menurun dan campuran homogen. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan maksimum selama 10-20 menit pada 4°C dan fasa bagian atas dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril baru. Pemurnian DNA dilakukan dengan menambahkan 1 ml etanol 100% dingin (-20°C) dan divorteks kemudian diinkubasi pada es selama 30 menit. Disentrifus pada kecepatan maksimum selama 10-15 menit pada 4°C. Etanol disingkirkan dari pellet dan ditambahkan 500 µl etanol 80% (-20°C) dan dicampur dengan membolak-balikkan tabung 3-5 kali. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan maksimum selama 3-5 menit pada 4°C. Etanol disingkirkan dengan pipet. Disentrifus kembali pada kecepatan maksimum selama 2-3 menit pada 4°C dan residu etanol disingkirkan dan dibiarkan mengering selama 5 menit di udara. Pelet dilarutkan ke dalam 75-100 µl buffer TE serta ditambahkan 1,5 µl RNase 2 mg/ml hingga konsentrasinya 40 µg/ml. Diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan DNA yang diperoleh siap untuk penelitian dengan menyimpannya pada 4°C atau *freezer*.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan tiga primer oligonukleotida untuk gen antigen *species-specific H. pylori*, *cagA* (1) dan *cagA* (2). Primer oligonukleotida untuk gen antigen *species-specific* adalah sebagai berikut : 5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGA-GC-3' untuk *forward* dan 5'-CCTGCTGGGCATACTTCACCATG-3' untuk *reverse* yang masing-masing merupakan residu 474-496 dan 776-754 serta ukuran produk gen adalah 209 pasang basa (pb) [2]. Primer untuk gen *cagA* dibagi menjadi dua residu yakni *cagA*(1) adalah 5'-GATAACAGG-CAAGCTTTTGAGG-3' untuk *forward* dan 5'-CTGCAAAGATTGT-TTGCGAGA-3' (22 bp) untuk *reverse* (residu 1228-1249 dan 1555-1576) serta ukuran gen produknya adalah 349 pb [4]. Primer untuk gen *cagA*(2) adalah 5'-AATACACCAA-CGCCTCCAAG-3' (*forward*) dan 5'-TTGTTGCCGC-TTTTGCTCTC-3' (*reverse*) (residu 2593-2612 dan 2992-2973) dengan ukuran gen produk 400 pb [12]. Konsentrasi akhir pereaksi PCR adalah buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, gelatin 0,001%, dNTP 100 µM, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 0,1 µM dan ampliTaq polymerase 0,5 U sehingga diperoleh volume akhir 50 µl. Proses PCR dilakukan pada mesin *Master cycler*

*gradient* Eppendorf untuk primer *species-specific* dengan kondisi denaturasi awal pada 94°C selama 10 menit diikuti oleh 40 siklus terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 30 detik, annealing pada 64°C selama 1 menit dan elongasi pada 72°C selama 45 detik. Untuk primer *cagA*(1), PCR terdiri dari 40 siklus meliputi denaturasi pada 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 55°C selama 1 menit dan elongasi pada 72°C selama 2 menit. Untuk primer *cagA*(2), 40 siklus terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 55°C selama 1 menit dan elongasi pada 72°C selama 2 menit. Setelah selesai 40 siklus, kemudian dilanjutkan elongasi pada 72°C selama 7 menit. Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada 2% gel agarose dan kemudian diwarnai dengan EtBr selama 15 menit serta dipotret dengan kamera instant Polaroid. Sebagai kontrol positif dan negatif adalah DNA *Helicobacter pylori* strain NCTC11638 yang merupakan sumbangan dari DR. Takako Osaki, Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Jepang [11] dan akuabidest steril.

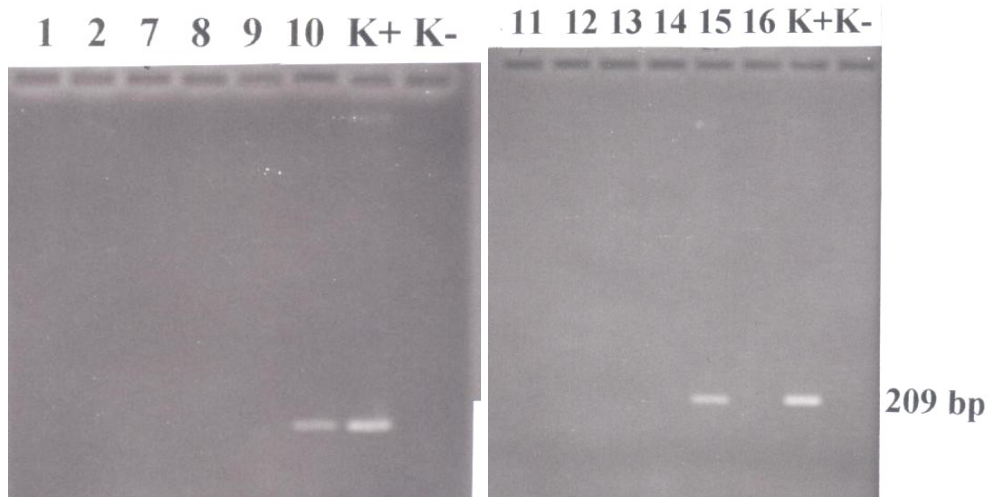
### III. HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan pada bagian dalam lambung salah satu pasien laki-laki berumur 56 tahun dan medium MIU positif yang menunjukkan adanya luka-luka (ulkus) akibat infeksi *H. pylori* ditunjukkan dalam Gambar 1. Dari 50 sampel tersebut, 7 diantaranya menunjukkan uji MIU positif. Dari 7 sampel tersebut, 4 diantaranya juga menunjukkan hasil PCR positif untuk gen *species-specific* (Gambar 2) dan gen *cagA*(1) tetapi tidak untuk gen *cagA*(2) yang menandakan bahwa residu gen *cagA* yang kedua (residu 2593-2973) tidak terdapat dalam sampel. Dua sampel lainnya menunjukkan *band-band* non spesifik (Gambar 3) yang mungkin disebabkan karena kondisi/konsentrasi MgCl<sub>2</sub> atau dNTP serta suhu annealing yang kurang tepat sehingga primer justru menempel pada DNA *non target* yakni DNA dari jaringan tubuh pasien. Pengujian dengan merubah konsentrasi MgCl<sub>2</sub> untuk memperkecil munculnya band non spesifik dan suhu annealing tetap memberikan hasil *band-band* non spesifik (data tidak disajikan). Satu sampel MIU positif menunjukkan hasil PCR negatif yang disebabkan karena DNA bakteri tidak dapat terekstrak atau hilang selama ekstraksi menggunakan prosedur yang cukup panjang.

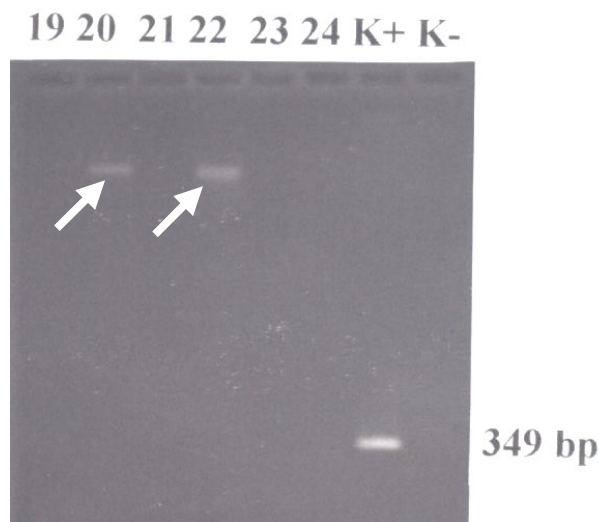


**Gambar 1.** Pemeriksaan endoskopi pasien dispepsia (laki-laki, 56 tahun, MIU positif) yang menunjukkan adanya ulkus/luka (anak panah) pada dinding lambung.

Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa ada korelasi positif antara MIU dan hasil dari PCR. Uji PCR dapat digunakan untuk mengetahui infeksi *H. pylori* dan untuk melengkapi hasil diagnosa yang lain seperti serologi dan kultur. Uniknya semua sampel MIU positif adalah berasal dari pasien dengan etnik sama yang mungkin disebabkan karena faktor genetik atau gaya hidup. Namun demikian medium MIU tidak saja merupakan karakteristik biokimia *H. pylori*, tetapi juga dapat berubah oleh berbagai macam bakteri/mikroorganisme lain yang mampu memecah urea seperti *Proteus vulgaris*, *Proteus myxofaciens* dll., kecuali *Proteus mirabilis*. *Proteus*, menggunakan enzim urease, mampu memecah urea menjadi ammonium hidroksida yang mempertinggi pH urin pada tingkat yang dapat menyebabkan pembentukan batu yang menimbulkan infeksi saluran kencing [12]. Oleh karena itulah penelusuran melalui uji PCR menjadi sangat penting untuk memastikan bahwa sampel benar-benar mengandung *H. pylori* yang membawa gen *cagA* yang menjadi faktor paling penting resiko seseorang untuk terjangkit kanker lambung.



**Gambar 2.** Hasil analisis PCR untuk gen antigen *species-specific* (produk berukuran 209 *base-pair*) pada sampel nomor 10 dan 15 (MIU positif) dan 1, 2, 7-9, 11-14 (MIU negatif). Kontrol positif (K+) adalah DNA genomik strain *H. pylori* NCTC 11638 dan kontrol negatif (K-) adalah akuabidest steril.



**Gambar 3.** Hasil analisis PCR terhadap gen *cagA(1)* (produk berukuran 349 *base-pair*) dimana sampel nomor 20 dan 22 (MIU positif) menunjukkan *band* non spesifik (anak panah). Kontrol positif (K+) adalah DNA genomik strain *H. pylori* NCTC 11638 dan kontrol negatif (K-) adalah akuabidest steril.

#### IV. PEMBAHASAN

*H. pylori* diketahui sebagai penyebab utama gastritis kronis dan tukak lambung serta faktor utama penyebab kanker lambung. Sejumlah metode saat ini dapat dipergunakan untuk mendeteksi *H. pylori* adalah serologi, kultur, histologi dan uji nafas

isotop serta uji antigen tinja. Semua metode tersebut memiliki keunggulan dan kekurangan baik sensitivitas, spesifisitas, kemudahan prosedur, maupun biayanya [13]. PCR yang merupakan salah satu prosedur pilihan sangat banyak digunakan di berbagai laboratorium untuk mendukung hasil diagnosa dengan metode lain dengan lebih cepat. Meskipun dalam penelitian ini tidak dilakukan perbandingan dengan metode lain, banyak peneliti membuktikan bahwa teknik PCR lebih sensitif dan spesifik daripada teknik yang lain. Tanpa memperhatikan primer dari gen yang digunakan, Hammar M. dkk [2] misalnya mendapatkan hasil 100% (19 dari 19 sampel) positif untuk uji keberadaan *H. pylori* dengan PCR sementara uji kultur hanya 78,9% (15 dari 19) dan 52,6% (10 dari 19) dengan uji serologi. Demikian juga hasil penelitian oleh He dkk [14] yang menemukan 89% (24 dari 27 sampel negatif dalam kultur) sampel positif dengan PCR kuantitatif menggunakan gen *ureC*. Zhang dkk [1] menemukan adanya *H. pylori* pada 31 dari 31 sampel sel epitel lambung pasien dari China yang diuji menggunakan PCR untuk gen *cagA* yang dimiliki oleh sebagian besar strain *H. pylori* di wilayah Asia Timur.

Dalam penelitian ini sebagian besar pasien yang diuji adalah penderita gastritis kronis berdasarkan diagnosa patologi anatomi. Penyebab gastritis kronis masih belum diketahui dengan pasti sehingga diperlukan beberapa uji seperti serologi, histologi dan metode molekuler seperti penelitian ini. Jumlah sampel pun masih sangat sedikit dibandingkan dengan jumlah pasien dispepsia di Indonesia yang mencapai kurang lebih 5 juta. Namun demikian, penelitian ini sangat bermanfaat dan sangat membantu dalam menegakkan diagnosa. Uji dengan MIU pun juga merupakan pendukung diagnosa tersendiri. Kombinasi uji yang banyak direkomendasikan adalah minimal dua uji jika memungkinkan. Uji PCR yang ideal untuk bakteri seperti *H. pylori* yang memiliki strain yang bervariasi akan sangat sensitif, spesifik dan murah jika digunakan untuk sejumlah besar sampel sekaligus seperti DNA dari hasil kultur atau sampel klinis yang dapat menghasilkan produk yang jauh lebih cepat daripada kultur. Satu alasan kelebihan PCR dibanding kultur adalah bahwa ada bentuk lain dari *H. pylori* yang sulit dideteksi dengan kultur dan histopatologik. *H. pylori* juga dapat berada dalam dua bentuk yakni bentuk spiral yang aktif membelah dan *coccoid*. Yang kedua ini sulit dibedakan dari bakteri bentuk kokus patogenik dan non-patogenik, spora fungi, dan kriosporidia [14] sehingga uji yang spesifik seperti PCR sangat diperlukan. Menurut pengetahuan penulis, uji PCR ini



baru pertama kali dilakukan di Indonesia dimana jumlah pasien dengan gejala dispepsia yang berobat atau menjalani diagnosa di RSCM Jakarta cukup tinggi (antara tahun 1997 hingga 2002 terdapat sekitar 1.718 pasien menjalani pemeriksaan dengan teropong saluran cerna bagian atas).

Uji PCR untuk *H. pylori* telah banyak ditinjau oleh para peneliti dengan menggunakan sejumlah sasaran genomik seperti gen urease (*ureA* dan *ureC*), *hpaA* dan *vacA* [14] dan gen yang menyandi faktor sitotoksin seperti *cagA*, *cagB* hingga *cagW* [2]. Peneliti yang lain menggunakan gen RNA ribosom 16S dari *H. pylori* sebagai gen sasaran PCR karena informasi deretnya telah dapat diperoleh dengan mudah dan gen ini menjadi dasar klasifikasi *H. pylori* sebagai organisme tersendiri [15]. Dalam penelitian ini, satu sampel MIU positif ternyata negatif dengan PCR yang menunjukkan tidak adanya DNA yang terekstrak. Tidak adanya indikasi kontaminasi forsep untuk pengambilan biopsi atau kontaminasi antar sampel dapat dilihat dari *band* kontrol negatif yang tidak muncul. Di samping itu, lamanya penyimpanan sampel juga merupakan faktor tersendiri dalam sensitivitas deteksi DNA *H. pylori* dengan PCR.

Kondisi uji PCR yang dikembangkan dalam penelitian ini harus dilakukan pada kondisi yang optimum seperti konsentrasi magnesium yang sangat mempengaruhi munculnya *band-band* non spesifik. Ion magnesium mempengaruhi aspek PCR meliputi aktivitas polimerase DNA yang akan menentukan hasil dan annealing primer sehingga mempengaruhi spesifisitas. Komponen dNTP dan *template* mengikat magnesium dan menurunkan jumlah magnesium bebas yang diperlukan untuk mengaktifkan enzim. Konsentrasi optimum magnesium bervariasi untuk masing-masing pasangan primer dan *template*. Konsentrasi ion magnesium yang lebih tinggi tidak saja dapat menyebabkan hasil PCR yang lebih tinggi tetapi juga dapat memperbesar munculnya amplifikasi *band* non spesifik dan menurunkan ketelitian [16] seperti ditemukan dalam penelitian ini. Hasil pengujian dengan menurunkan konsentrasi magnesium tetap menghasilkan *band* non spesifik (hasil tidak disajikan) sehingga mungkin ada faktor yang lain seperti suhu annealing atau justru yang teramplifikasi bukan DNA dari *H. pylori* tetapi dari jaringan biopsi antrum.

Pentingnya teknik yang lebih cepat seperti PCR juga disebabkan karena lambatnya berkembang biakan organisme *H. pylori* dalam kultur yang memerlukan kondisi yang

sangat spesifik (*microaerophilic*). Maka penelitian seperti ini sangat diperlukan dengan tujuan untuk menguji suatu teknik/sistem deteksi secara lebih cepat yang didasarkan pada analisa asam nukleat. Spesifisitas PCR dapat dianalisis dengan mengevaluasi produksi fragmen sasaran terhadap produk lain. Faktor lain yang mempengaruhi homogenitas produk adalah konsentrasi deret sasaran dalam template genomik. Data yang disajikan dalam penelitian ini berasal dari sampel dengan jumlah yang sangat sedikit dan masih merupakan studi awal yang akan menjadi titik tolak penelitian selanjutnya untuk mendeteksi mikroorganisme penyebab infeksi seperti *H. pylori* dilengkapi dengan uji MIU dan endoskopi untuk memonitor seberapa besar jumlah pasien dengan kelainan pada lambung/saluran pencernaan di Indonesia khususnya di Jakarta.

Keberhasilan mengisolasi DNA merupakan hal yang paling penting dalam uji PCR. Namun kadangkala DNA hilang selama proses ekstraksi yang cukup panjang yang kurang tepat untuk uji rutin di laboratorium. Dalam penelitian ini, prosedur ekstraksi DNA cukup mudah dan sederhana serta meliputi prosedur umum untuk ekstraksi. Insidensi hilangnya DNA pada waktu ekstraksi mungkin menjadi penyebab negatifnya hasil deteksi PCR. Hal ini mungkin disebabkan karena sampel mengandung sangat sedikit atau memang tidak ada bakteri *H. pylori* dalam biopsi dan hilangnya DNA sasaran selama prosedur pemurnian hingga di bawah batas ambang deteksi. Pada sampel dimana PCR-nya negatif (seperti sebagian besar dalam penelitian ini) dapat dikonfirmasi dengan menambahkan DNA kontrol (standard) ke dalam sampel untuk kemudian diamplifikasi dengan PCR serta mengenyampingkan kemungkinan bahwa negativitas disebabkan karena kotoran yang berlebihan yang menghambat PCR [17]. Sejumlah aditif juga dapat ditambahkan untuk memperbaiki hasil PCR meskipun optimisasi temperatur annealing, desain primer dan konsentrasi magnesium sudah cukup untuk memperoleh amplifikasi DNA yang sangat spesifik dari target yang diinginkan. Akan tetapi untuk beberapa gen sasaran yang banyak mengandung gugus GC memerlukan kondisi lain. Aditif PCR seperti formamida, DMSO, gliserol, betaine dan *enhancer* spesifik dapat digunakan untuk memperbaiki hasil. Dalam penelitian ini digunakan gelatin yang diharapkan akan mempertinggi kualitas hasil PCR. Aditif yang mempengaruhi temperatur leleh DNA juga diperlukan untuk memperbaiki spesifisitas dan hasil produk. Denaturasi *template* yang sempurna juga diperlukan untuk memperoleh hasil yang baik. Penambahan aditif disini dimaksudkan untuk menurunkan

suhu leleh, dan oleh karenanya membantu menurunkan suhu *annealing* primer dan *polymerase* DNA sehingga lebih efisien [18,19].

## V. KESIMPULAN

Berdasarkan uji MIU ternyata 7 dari 50 sampel yang diuji menunjukkan positif mengandung *H. pylori*. Dari ke tujuh sampel positif tersebut, 4 diantaranya menunjukkan positif terinfeksi bakteri berdasarkan analisis PCR untuk peta fragmen DNA yang berhubungan dengan infeksi *H. Pylori* seperti gen antigen *species-specific* dan *cagA*. Dua sampel menunjukkan *band* non spesifik dan satu sampel negatif. Ada korelasi yang positif antara PCR dengan medium MIU yang dipergunakan dan analisis PCR perlu dilakukan untuk mendukung hasil diagnosa dengan metode lain. Uji PCR menggunakan fragmen gen yang lain seperti *ureC* dan *recA* masih diperlukan untuk lebih meyakinkan dalam diagnosa *H. pylori* menggunakan teknik PCR.

## VI. DAFTAR PUSTAKA

1. ZHANG, Y., ARGENT, R.H., LETLEY, D.P., THOMAS, R.J. and ATHERTON, J.C. Tyrosine phosphorylation of CagA from Chinese *Helicobacter pylori* isolates in AGS gastric epithelium cells, J. Clin. Microbiol. 43: 786-790, 2005.
2. LAMOULIATTE, H., CAYLA, R., and DASKALOPOULOS, G. Upper digestive tract endoscopy and rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. In : *Helicobacter pylori* : techniques for clinical diagnosis & basic research, Edited by Adrian Lee and Francis Megraud, WB Saunders Company Ltd, London, 1996.
3. HAMMAR, M., TYSZKIEWICZ, T., WADSTROM, T., and O'TOOLE, P.W. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by Polymerase Chain Reaction, J. Clinical Microbiology 30: 54-58, 1992.
4. MONTEIRO, L., BIRAC, C. And MEGRAUD, F. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy by polymerase chain reaction, In : *Helicobacter pylori* : techniques for clinical diagnosis & basic research, Edited by Adrian Lee and Francis Megraud, WB Saunders Company Ltd, London, 1996.
5. PEEK, R.M. Jr., MILLER, G.G., THAM, K.T. PEREZ-PEREZ, G.I., COVER, T.L., ATHERTON, J.C., DUNN, G.D., and BLASER, M.J., Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa, J. Clin. Microbiol. 33(1), 28-32, 1995.
6. SIHOMBING, M., BARUS, P., ZAIN, L.H. and TARIGAN, P., Perubahan konsentrasi urea dan ammonia pada cairan lambung sebagai deteksi infeksi Helikobakter pylori, Biosain 2 (2): 94-96, 2002.
7. AZUMA, T., YAMAKAWA, A., YAMAZAKI, S., OHTANI, M., ITO, Y., MURAMATSU, A., SUTO, H., YAMAZAKI, Y., KEIDA, Y., HIGASHI, H., and

- HATAKEYAMA, M. Distinct diversity of the *cag* pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan, *J. Clin. Microbiol.* 42: 2508-2517, 2004.
8. COVACCI, A., CENSINI, S., BUGNOLL, M., PETRACCA, R., BURRONI, D., MACCHIA, G., MASSONE, A., PAPINI, E., XIANG, Z., and FIGURA, N., Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5791-5795, 1993.
  9. DAVIN, C., PORTA, N., MICHETTI, P., BLUM, A.L. and THEULAZ, I.C., Cloning and expression of recombinant protein from *Helicobacter pylori*, In : *Helicobacter pylori : techniques for clinical diagnosis & basic research*, Edited by Adrian Lee and Francis Megraud, WB Saunders Company Ltd, London, 1996.
  10. ZHAO, X.M., FRIST, W.H., YEOH, T.K., and MILLER, G.G. Expression of cytokine genes in human cardiac allografts: correlation of IL-6 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) with histological injection, *Clin. Exp. Immunol.* 93 : 448-451, 1993.
  11. OSAKI, T., TAGUCHI, H., YAMAGUCHI, H., and KAMIYA, S. Detection of *Helicobacter pylori* in fecal samples of gnotobiotic mice infected with *H. Pylori* by immunomagnetic-bead separation technique, *J. Clin. Microbiol.* 36: 321-323, 1998.
  12. EINSTEIN, B.I., Enterobacteriaceae, In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Editor: Gerald L. Mandell, R. Gordon Douglas, John E. Bennett) edisi ketiga, Churchill Livingstone, New York, 1990, hal. 1668-1673.
  13. LAGE, A.P., GODFROID, E., FAUCONNIER, A., BURETTE, A., BUTZLER, J.P., BOLLEN, A., and GLUPCZYNSKI, Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens, *J. Clin. Microbiol.* 33: 2752-2756, 1995.
  14. HE, Q., WANG, J.P., OSATO, M., and LACHMAN, L.B. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*, *J. Clin. Microbiol.* 40: 3720-3728, 2002.
  15. COVACCI, A. And RAPPUOLI, R. PCR amplification of gene sequences from *Helicobacter pylori* strains, In : *Helicobacter pylori : techniques for clinical diagnosis & basic research*, Edited by Adrian Lee and Francis Megraud, WB Saunders Company Ltd, London, 1996.
  16. ECKERT, K.A. and KUNKEL, T.A., High fidelity DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA polymerase, *Nucleic Acid Research* 18: 3739, 1990.
  17. HUA, J., BIRAC, C. And MEGRAUD, F. PCR-based RAPD (random amplified polymorphic DNA) "fingerprinting" of clinical isolates of *Helicobacter pylori*, In : *Helicobacter pylori : techniques for clinical diagnosis & basic research*, Edited by Adrian Lee and Francis Megraud, WB Saunders Company Ltd, London, 1996.
  18. ELRICH, H.A. PCR technology, *Principles and Applications for DNA amplification*, Stockton Press, New York, 1989.
  19. ELRICH, H.A. Polymerase Chain Reaction, *J. Clinical Immunology* 9: 437-447, 1989.