

DETEKSI GEN *cagA* DAN *rpoB* UNTUK DIAGNOSA INFEKSI *Helicobacter pylori* DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Mukh Syaifudin^{*)}, Topo Suprihadi^{*)} dan Maria Lina Rosilawati^{**)}

^{*)} P3KRBiN - BATAN

^{**)} P3TIR - BATAN

ABSTRAK

DETEKSI GEN *cagA* DAN *rpoB* UNTUK DIAGNOSA INFEKSI *Helicobacter pylori* DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION. *Helicobacter pylori* adalah bakteri mikroaerofilik gram negatif berbentuk spiral atau melengkung merupakan penyebab utama gangguan saluran pencernaan antara lain dispepsia. Teknik konvensional untuk mendeteksi *H. pylori* kurang sensitif dan spesifik. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis molekuler gen-gen yang berperan dalam infeksi seperti *cagA* (gen sitotoksin dan merupakan faktor risiko kanker lambung) dan *rpoB* (pengkode sub-unit β polymerase RNA) menggunakan teknik polymerase chain reaction (PCR). Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis dari 50 sampel hasil biopsi lambung (bagian antrum) pada penderita dengan gejala dispepsia diperoleh dari Bagian Ilmu Penyakit Dalam RSCM Jakarta. Amplifikasi deoksiribonukleat (DNA) *H. pylori* dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer yang didesain dari gen-gen tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 50 sampel yang dianalisis, 7 diantaranya positif medium motility indol urease (MIU). Dari 7 sampel tersebut, 4 diantaranya menunjukkan positif berdasarkan analisis PCR untuk gen *cagA*, sedangkan 2 lainnya menunjukkan band-band non spesifik dan satu sampel MIU positif tersebut menunjukkan hasil PCR negatif. Tidak satu pun sampel menunjukkan hasil PCR positif untuk gen *rpoB* yang menandakan bahwa residu (bagian) gen tersebut tidak terdapat dalam semua isolat yang dianalisis karena keragaman genetik dari *H. pylori*. Hasil penelitian ini mendukung peranan PCR untuk diagnosis secara cepat infeksi *H. pylori*, dan 4 pasien dengan menggunakan primer dari gen *cagA* positif diduga memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terjadinya suatu kanker lambung.

ABSTRACT

DETECTION OF GEN *cagA* DAN *rpoB* GENES FOR DIAGNOSING *Helicobacter pylori* INFECTION WITH POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE. *Helicobacter pylori* is a curved or spiral gram-negative microaerophilic bacterium which is a main causal of a defect in gastrointestinal lumen such as dyspepsia. Conventional technique for detecting Hp was proved to be less sensitive and specific. Therefore it is crucial to do molecular analysis of genes responsible in infectious such as *cagA* (cytotoxin gene and an important risk factor for gastric cancer) and *rpoB* (encodes the sub-unit β of RNA polymerase) with polymerase chain reaction (PCR) technique. In this research, analysis on 50 biopsy samples of stomach (antrum) of patients with dyspeptic syndromes obtained from Internal Medicine Division RSCM Jakarta. Amplification of deoxyribonucleic acid (DNA) of *H. pylori* has been done by using PCR technique with primers designed from these two genes. 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 *cagA* gene, while two others showed non specific bands and one sample showed PCR negative result. There was no sample showed positive results of PCR for *rpoB* gene indicated that there was no residue (part) of this gene in all isolates analyzed due to genetic diversity of *H. pylori*. The result of this research supports the role of PCR for fast diagnosing an *H. pylori* infection and these 4 patients with positive *cagA* were predicted to be at higher risk of development of gastric cancer.

PENDAHULUAN

Helicobacter pylori (nama sebelumnya adalah *Campylobacter pylori*) merupakan bakteri mikroaerofilik gram negatif berbentuk spiral atau melengkung pertama kali diisolasi dari spesimen biopsi lambung manusia pada tahun 1983 [1]. *H. pylori* ini merupakan salah satu bakteri patogen yang paling banyak ditemukan pada manusia. Data epidemiologik menunjukkan di dalam saluran pencernaan bagian atas pada >50% dari individu, didapatkan koloni bakteri tersebut [2]. *H. pylori* memasuki tubuh sejak masa kanak-kanak dan menetap di dalam tubuh sepanjang hidup seseorang. Infeksi *H. pylori* dapat menyebabkan peradangan kronis pada mukosa lambung yang diikuti dengan luka pada mukosa, serta hilangnya sel parietal, sel yang berfungsi menskresi asam dan selanjutnya berkembang menjadi metaplasia pada sel mukosa. Individu yang terinfeksi *H. pylori* memiliki risiko lebih tinggi terkena kanker lambung, yang merupakan keganasan kedua tertinggi di dunia dan sangat banyak dijumpai di negara Asia antara lain Korea, Jepang, China dan juga Indonesia [3].

H. pylori dapat dideteksi secara kultur, biokimia, histopatologi, akan tetapi diperlukan prosedur yang cukup lama dan sensitivitas metode tersebut rendah [4,5]. Oleh karenanya, diperlukan teknik biologi molekuler yang cepat, sensitif dan spesifik. Teknik ini telah banyak dilakukan oleh para peneliti [6-9], yang dapat digunakan sebagai pelengkap prosedur diagnostik. Gen-gen yang bertanggung jawab terhadap infeksi *H. pylori* antara lain meliputi gen-gen untuk; urease (*ureA*, *ureB* dan *ureC*), protein sitotoksin, protein antigen *species-specific* dan gen *rpoB* yang menyandi sub-unit β dari *RNA polymerase*.

Keberadaan gen A yang berhubungan dengan sitotoksin (*cagA*) dari Hp telah terbukti menjadi salah satu faktor risiko untuk pertumbuhan kanker lambung yang dimediasi oleh *H. pylori* [10]. Sekitar 60% dari strain *H. pylori* membawa *cagA* dan merupakan gen *H. pylori* pertama yang ditemukan di antara strain yang ada [11]. Gen ini merupakan petanda (*marker pathogenecity island* genomik (*cag*) berukuran 40 kpb (kilo pasang basa) yang keberadaannya dikaitkan dengan hasil uji klinis yang lebih jelas dalam mempertahankan terhadap penyakit di esofagus [12]. Antibodi dari protein *cagA* ditemukan dalam serum sampai 100% pada pasien *peptic ulcer* sedangkan pada pasien gastritis hanya 60-62% [13]. Gen *rpoB* adalah gen *rpoB* yang sangat penting untuk transkripsi

pada semua mikroorganisme dan merupakan gen *housekeeping* yang sama stabilnya dengan 16S rDNA [14]. Baru-baru ini bagian gen *rpoB* tersebut yang mengandung daerah Rif dihubungkan dengan terjadinya resistensi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Mycobacterium tuberculosis*, telah digunakan untuk mengidentifikasi spesies lain, seperti *H. pylori*.

Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis gen *cagA* dan *rpoB* untuk mengetahui adanya infeksi *H. pylori* dengan teknik PCR pada 50 sampel dari hasil biopsi lambung (bagian antrum) penderita dengan gejala-gejala dispepsia (gangguan pencernaan akibat tingginya kadar asam lambung) yang menjalani pemeriksaan endoskopi (teropong lambung dan usus).

BAHAN DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan 50 biopsi (7 positif *H. pylori* dan 43 negatif *H. pylori* berdasarkan perubahan warna dari kuning menjadi orange dari medium MIU dengan ijin yang diperoleh dari Subbagian Gastroenterologi, Bagian Ilmu Penyakit Dalam FKUI/RSCM. Sampel tersebut diambil dari bagian antrum lambung pasien dispepsia yang menjalani pemeriksaan dengan endoskopi. Hasil diagnosa patologi anatomi menunjukkan bahwa sebagian besar pasien menderita gastritis kronis.

Ekstraksi DNA *H. pylori* dilakukan dengan metode sesuai Kit *Easy-DNA for genomic DNA isolation* (Cat. K-1800-01) produk Invitrogene sebagai berikut. Secara garis besar, prosedurnya adalah dengan menempatkan jaringan biopsi ke dalam 1,5 ml mikrotube steril berisi 350 μ l larutan pelisis *Solution A*, kemudian diinkubasi pada 65°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 150 μ l *Solution B* dan divorteks hingga endapan larut. Ke dalam larutan tersebut, ditambahkan 500 μ l kloroform dan divorteks hingga viskositasnya menurun dan homogen. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan maksimum selama 20 menit pada 4°C dan fasa bagian atas dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril baru. Pemurnian DNA dilakukan dengan etanol dingin (-20°C) Pelet dilarutkan ke dalam 75-100 μ l buffer TE serta ditambahkan 1,5 μ l RNase 2 mg/ml hingga konsentrasinya 40 μ g/ml. Diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dan DNA yang diperoleh dipergunakan untuk penelitian atau disimpan dalam freezer.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan dua gen yakni gen *cagA* (residu 1228-1576) dan

rpoB dengan deret oligonukleotida (primer) seperti dalam Tabel 1. Konsentrasi akhir pereaksi PCR adalah buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, gelatin 0,001%, dNTP 100 µM, primer atas dan bawah masing-masing 0,1 µM dan Taq 0,5 U sehingga diperoleh volume akhir 50 µl. Proses PCR dilakukan pada mesin *Master cycler gradient* Eppendorf dengan kondisi denaturasi awal pada 94°C selama 10 menit diikuti oleh 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 *rpoB*, 40 siklus terdiri dari denaturasi

pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 52°C selama 1 menit dan elongasi pada 72°C selama 2 menit. Setelah 40 siklus, diikuti elongasi pada 72°C selama 7 menit. Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis dan kemudian diwarnai dengan EtBr 1 mg/ml dan dipotret dengan kamera instant Polaroid. DNA *H. pylori* referensi yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *H. pylori* NCTC11638 yang merupakan sumbangan dari DR. Takako Osaki (Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Jepang) [15].

Tabel 1. Oligonukleotida untuk gen *cagA* dan *rpoB* serta suhu annealing PCR untuk amplifikasi DNA *Helicobacter pylori*.

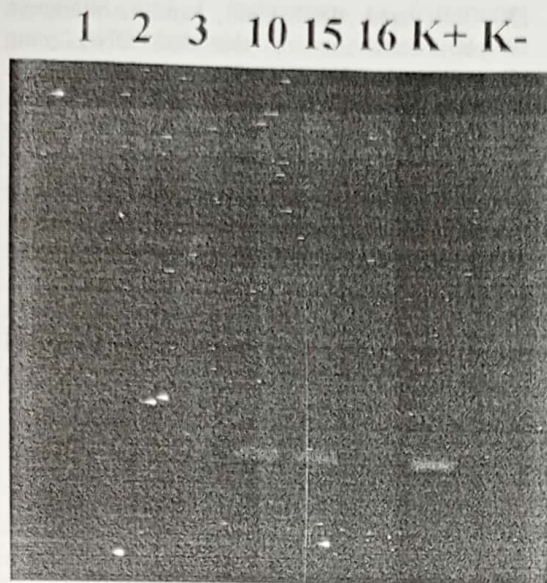
Gen (produk)	Oligonukleotida (deret primer)	Suhu Annealing	Pustaka
<i>cagA</i> (349 bp)	Atas: 5'-GATAACAGGCAA-GCTTTTGAGG-3' Bawah: 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGCAGAGA-3'	55°C	[8]
<i>rpoB</i> (458 bp)	Atas: 5'-ACTTTAACGCATGAAGATAT-3' (HF) Bawah: 5'-ATA1TTTGACCTTCTGGGGT-3' (HR)	52°C	[2]

HASIL PENELITIAN

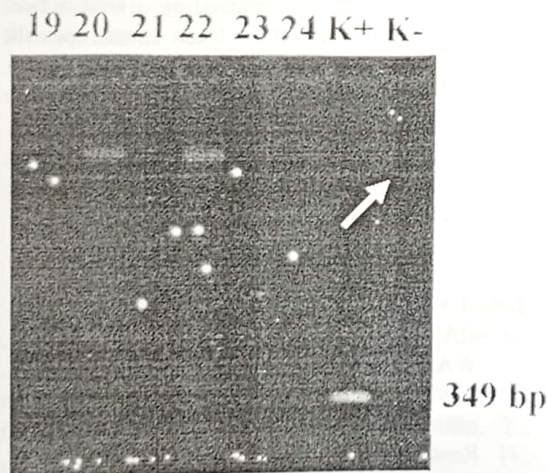
Dalam penelitian ini dipergunakan 50 sampel biopsi antrum yang diperoleh dari pasien dispepsia yang menjalani pemeriksaan dengan endoskopi dengan data selengkapnya disajikan dalam Tabel 2. Menurut catatan di Fakultas Kedokteran UI/RSCM, antara 1997 hingga 2002 terdapat 1.718 pasien dispepsia yang menjalani pemeriksaan dengan teropong saluran cerna bagian atas. Berdasarkan hasil diagnosa patologi anatomi (PA), sebagian besar pasien yang digunakan dalam penelitian ini adalah gastritis kronis. Dari 50 sampel tersebut, 7 diantaranya menunjukkan MIU positif yakni perubahan warna dari medium dari kuning menjadi merah muda. Dari 7 sampel positif tersebut, 4 diantaranya juga menunjukkan hasil PCR positif untuk gen *cagA* (residu residu 1228-1576) (Gambar 1) sedangkan dua sampel lainnya menunjukkan *band-band* non spesifik (Gambar 2) yang mungkin disebabkan karena kondisi/konsentrasi MgCl₂ atau dNTP serta suhu annealing yang kurang tepat sehingga primer justru menempel pada DNA *non target* yakni DNA dari jaringan. Penurunan konsentrasi MgCl₂ menjadi separohnya dan penambahan menjadi dua kalinya juga menghasilkan produk yang sama yakni *non specific bands* (data tidak diperlihatkan). 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.

Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa terdapat korelasi positif antara MIU dan PCR serta uji PCR dapat digunakan untuk mengetahui infeksi *H. pylori* secara lebih cepat dan spesifik serta dapat dipergunakan untuk melengkapi hasil diagnosa yang lain seperti serologi dan kultur. *Motility indol urease* (MIU) adalah medium yang spesifik dipergunakan untuk mengetahui keberadaan *H. pylori* berdasarkan perubahan pH/warna dari kuning menjadi merah muda. Indikator metil merah yang ditambahkan ke dalam medium berubah menjadi merah muda karena timbulnya NH₃ hasil reaksi pemecahan urea oleh *H. pylori* dengan bantuan enzim urease. Namun demikian medium MIU tidak saja merupakan karakteristik biokimia *H. pylori*, tetapi juga dapat berubah oleh berbagai macam bakteri/mikroorganisme lain yang juga mampu memecah urea seperti *Proteus vulgaris*, *Proteus myxofaciens* dll., kecuali *Proteus mirabilis*. *Proteus*, menggunakan enzim urease, memecah urea menjadi ammonium hidroksida yang mempertinggi pH urin pada tingkat yang dapat menyebabkan pembentukan batu yang menimbulkan infeksi saluran kencing [16]. 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 resiko seseorang untuk terjangkit kanker lambung.



Gambar 1. Hasil analisis gen *cagA* dengan teknik PCR pada beberapa sample dengan hasil positif pada sampel nomor 10 dan 15 (keduanya MIU positif). Kontrol positif dan negatif berturut-turut adalah genomik DNA strain *H. pylori* NCTC 11638 dan akuabidest steril.



Gambar 2. Hasil analisis gen *cagA(1)* dengan teknik PCR pada sampel nomor 20 dan 22 (MIU positif) yang menunjukkan band non spesifik (anak panah). Kontrol positif dan negatif berturut-turut adalah genomik DNA strain *H. pylori* NCTC 11638 dan akuabidest steril.

PEMBAHASAN

Sejumlah metode saat ini dapat dipergunakan untuk mendeteksi *H. pylori* meliputi serologi, kultur, histologi dan uji nafas isotop serta *stool antigen test* yang masing-masing memiliki keunggulan dan kekurangan baik sensitivitas, spesifitas, kemudahan, biaya maupun kecepatannya [17]. PCR yang merupakan salah satu pilihan (*gold standard*) ternyata sangat berguna di banyak laboratorium klinis untuk mendukung hasil diagnosa dengan lebih cepat. Banyak peneliti membuktikan bahwa teknik PCR lebih sensitif dan spesifik daripada teknik yang lain. Dengan menggunakan primer dari gen *cagA* sebagai target, sejumlah peneliti [6, 8,12,18] mengidentifikasi keberadaan *H. pylori*. Zhang dkk [6] menemukan strain *H. pylori* pada 31 dari 31 sampel sel epitel lambung dari China yang diuji menggunakan PCR untuk gen *cagA* yang dimiliki oleh sebagian besar strain di wilayah Asia Timur yang mungkin juga termasuk Indonesia sehingga penelitian ini perlu dilakukan. Peek dkk [8] menemukan 14 dari 25 sampel mengandung strain *H. pylori* yang membawa *cagA* dan hampir sama sensitifnya dengan hasil deteksi serologi, histologi dan kultur (13 dari 25 sampel). Zhou dkk [18] mendeteksi *cagA* pada 28 (100 %) dari 28 strain dari pasien tukak peptikum, dua (100 %) dari dua strains dari pasien kanker lambung, 32 (94.1 %) dari 34 strain dari pasien gastritis kronis serta 17 (94.4 %) dari 18 strains dari sukarelawan sehat.

Jika ditinjau secara umum (tanpa melihat gen yang dianalisis) maka banyak sekali peneliti menggunakan teknik PCR untuk identifikasi dan diagnosa *H. pylori*. Hammar, M. dkk [1] 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 uji serologi hanya 52,6% (10 dari 19). Dan Lim dkk [14] mengidentifikasi *H. pylori* sedikit lebih tinggi (53,7%) dengan PCR menggunakan gen *rpoB* dibandingkan dengan dengan uji *campylobacter-like organism* (CLO) (50,4%). Hasil penelitian oleh He dkk [19] menemukan 89% (24 dari 27 sampel negatif dalam kultur) sampel positif dengan PCR secara kuantitatif menggunakan gen *ureC*.

Penelitian ini tidak berhasil mengidentifikasi keberadaan *H. pylori* melalui gen *rpoB* yang mungkin disebabkan karena residu (bagian gen) yang digunakan tidak sesuai atau tidak ada dalam isolat karena keaneka ragaman genetik dari *H. pylori*. *rpoB* yang merupakan target resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin

dan *E. coli*. Jumlah sampel yang dianalisis pun masih terlalu sedikit dibandingkan dengan jumlah penderita dispepsia di Indonesia yang jumlahnya mencapai kurang lebih 5 juta orang, sehingga penelitian ini penting untuk ditindak lanjuti.

Uji keandalan PCR untuk identifikasi patogen telah dikembangkan seperti dalam penelitian ini dimana kondisi PCR harus dipastikan pada kondisi optimum yakni 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 aktivitas 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 [20]. Hasil pengujian dengan menurunkan konsentrasi magnesium tetap menghasilkan *band* yang non spesifik (hasil tidak disajikan) sehingga mungkin ada faktor yang lain seperti suhu annealing.

Pentingnya teknik yang lebih cepat seperti PCR juga disebabkan karena lambatnya perkembangan 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 uji deteksi secara lebih cepat yang didasarkan pada pelacakan asam nukleat. Spesifitas PCR dapat dianalisis dengan mengevaluasi produksi fragmen sasaran terhadap produk lain. Faktor lain yang mempengaruhi homogenitas produk adalah konsentrasi deret sasaran dalam *template* genomik [21]. 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.

Dalam penelitian ini, satu sampel MIU positif ternyata negatif dengan PCR yang menunjukkan tidak adanya DNA yang terekstrak.

Hal ini dapat disebabkan karena hilangnya sampel sasaran dalam ekstraksi DNA yang merupakan andalan utama untuk keberhasilan PCR. Hal ini mungkin disebabkan karena sampel mengandung sangat sedikit bakteri *H. pylori* dan hilangnya DNA target selama prosedur pemurnian hingga di bawah batas ambang deteksi. Pada sampel negatif PCR (yakni sebagian besar dalam penelitian ini) dapat dikonfirmasi dengan menambahkan DNA kontrol (standard) ke dalam sampel untuk kemudian diamplifikasi dengan PCR. Uji penambahan standard internal juga menghasilkan produk PCR yang sama.

KESIMPULAN

Dari 50 sampel biopsi antrum yang diuji, 7 sampel menunjukkan hasil positif keberadaan *Helicobacter pylori* berdasarkan hasil uji dengan medium MIU. Dari ke tujuh sampel positif tersebut, 4 diantaranya menunjukkan positif untuk uji PCR menggunakan primer dari gen *cagA*, dua sampel menunjukkan *band* non spesifik dan satu sampel negatif. Tidak satu pun sampel yang menunjukkan positif untuk gen *rpoB*. Meskipun demikian dapat dikatakan bahwa ke tujuh sampel tersebut mempunyai korelasi positif antara uji PCR dengan indikator perubahan warna dari medium MIU dan dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan *Helicobacter pylori* dengan lebih cepat, spesifik dan sensitif. Karena *cagA* merupakan indikator risiko terjangkitnya kanker lambung, maka diduga ke empat pasien dengan biopsi mengandung strain *H. pylori* yang membawa *cagA* memiliki risiko terjangkit kanker lambung yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. 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.
2. LEE, K.H., CHO, M.J., YAMAOKA, Y., GRAHAM, D.Y., YUN, Y.J., WOO, S.Y., LIM, C.Y., KO, K.S., KIM, B.J., JUNG, H.C., LEE, W.K., RHEE, K.H., and KOOK, Y.H. Alanine-threonine polymorphism of *Helicobacter pylori* RpoB is correlated with differential induction of interleukin-8 in MKN45 cells. J. Clin. Microbiol. 42 (8): 3518-3524, 2004.

3. COVACCI, A., TELFORD, J.L., GIUDICE, G.D., PERSONNET, J., and RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography, *Science* 284: 1328-1333, 1999.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. BLASER, M.J., PEREZ-PEREZ, G.I., KLEANTHOUS, H., COVER, T.L., PEEK, R.M., CHYOU, P.H., STEMMERMANN, G.N., and NOMURA, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research* 55: 2111-2115, 1995.
11. 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 injury, *Clin. Exp. Immunol.* 93 : 448-451, 1993.
12. VAN DOORN, L.J., FIGUEIREDO, C., SANNA, R., BLASER, M.J., and QUINT, G.V. Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 37 (7): 2306-2311, 1999.
13. 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.
14. LIM, C.Y., LEE, K.H., CHO, M.J., CHANG, M.W., KIM, S.Y., MYONG, N.H., LEE, W.K., RHEE, K.H. and KOOK, Y.H. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase gene (*rpoB*), *J. Clin. Microbiol.* 41: 3387-3391, 2003.
15. 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.
16. 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.
17. MAPSTONE, N.P. The detection of *H. Pylori* by the Polymerase Chain Reaction. Dalam : Methods in Molecular Medicine, *Helicobacter pylori* Protocols (C.L. Clayton and H.L.T. Mobley Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ.
18. ZHOU, J., ZHANG, J., XU, C. and HE, L. cagA genotype and variants in Chinese *Helicobacter pylori* strains and relationship

- to gastroduodenal diseases, *J Med Microbiol* 53: 231-235; 2004.
19. 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.
20. ECKERT, K.A. and KUNKEL, T.A., High fidelity DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA polymerase, *Nucleic Acid Research* 18: 3739, 1990.
21. ELRICH, H.A. Polymerase Chain Reaction, *J. Clinical Immunology* 9: 437-447, 1989.

TANYA JAWAB

M. Yazid

- *Penyebab tukak lambung tidak hanya infeksi H.P. tetapi masih banyak. Kenapa perlu dilakukan deteksi ini?*

- *Jika ditemukan positif, dikasih antibiotika apa yang spektrumnya relatif sempit?*

Mukh. Saifudin

- *Penyebab tukak lambung selain Hp adalah obat peredam rasa sakit, seperti aspirin dan non steroid, minuman mengandung alkohol, makanan yang pedas, bahan korosif dan lain-lain. Deteksi dilakukan jika ada keraguan hasil diagnosa dengan PA, UBT atau edoskopi. Hampir semua pasien yang diperiksa adalah penderita gastritis kronis yang penyebabnya tidak diketahui dengan pasti sehingga deteksi PCR juga perlu.*
- *Antibiotika yang digunakan antara lain klaritromisin, raitridin, simetidin, tetapi belum dipelajari dari segi spektrumnya.*