

DETEKSI *Helicobacter pylori* DENGAN TEKNIK PCR DAN PENERAPAN DNA BERLABEL ³²P UNTUK STUDI RESISTENSINYA TERHADAP OBAT

Mukh Syaifudin, Devita Tetriana dan Masnelli Lubis

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – BATAN

Murdani Abdullah dan Ari Fachrial Syam

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

ABSTRAK

DETEKSI *Helicobacter pylori* DENGAN TEKNIK PCR DAN PENERAPAN DNA BERLABEL ³²P UNTUK STUDI RESISTENSINYA TERHADAP OBAT. Infeksi *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) menyebabkan gastritis kronis dan memperbesar risiko kanker lambung, terutama strain *H. pylori* yang memiliki *cag pathogenicity island* (PAI). Dalam penelitian ini telah dilakukan pendeteksian *H. pylori* secara molekuler pada 73 biopsi lambung segar dan 10 irisan jaringan (*slide*) dari pasien gastritis yang menjalani uji endoskopi di RSCM Jakarta. Ekstrak asam deoksiribonukleat (DNA) diamplifikasi menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk primer gen yang berhubungan dengan kolonisasi bakteri seperti *cagA*, *ureA*, *ureC* dan *16S RNA*. Empat (5,47%) dari 73 sampel menunjukkan hasil positif untuk seluruh gen kecuali *ureA* dimana dua sampel diantaranya menunjukkan pita DNA non spesifik yang juga positif untuk uji urease. Diduga hasil ini dipengaruhi oleh ukuran produk PCR. Tidak ada hasil positif untuk sampel dari *slide*. Teknik uji PCR dapat diandalkan namun masih memerlukan dukungan uji yang lain seperti *urea breath test* atau serologi. Kekebalan bakteri ini terhadap obat dapat diuji dengan penelusuran DNA berlabel radioisotop ³²P menggunakan gel poliakrilamid 7,5%. Perubahan mobilitas pita DNA hasil amplifikasi dengan primer khas menunjukkan bahwa bakteri diduga kebal. Pelabelan ini relatif lebih sensitif dibandingkan dengan pelabelan konvensional, namun memerlukan prosedur yang lebih intensif.

Kata kunci : *Helicobacter pylori*, PCR, dispepsia, *cagA*, *ureC*, DNA berlabel ³²P, SSCP

ABSTRACT

DETECTION OF *Helicobacter pylori* WITH PCR TECHNIQUE AND IMPLEMENTATION OF ³²P-LABELED DNA FOR STUDYING ITS RESISTANCE TO THE DRUG. Infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) could result in chronic gastritis and may increase stomach cancer risk mainly *H. pylori* strains with the *cag pathogenicity island* (PAI). In this research, detection on the presence of *H. pylori* was done in 73 fresh gastric biopsies and 10 paraffin embedded tissues (*slide*) obtained from gastritis patients who underwent endoscopic examination in RSCM Jakarta. Deoxyribonucleic acid (DNA) extract was amplified with *polymerase chain reaction* (PCR) for primer of colonization related genes such as *cagA*, *ureA*, *ureC* and *16S RNA* gene. Four (5.47%) of 73 samples showed positive result for all genes examined except for *ureA* gene which were also positive for urease test, of which 2 other samples showed non-specific bands. It was predicted that this result was affected by the size of PCR product. No positive result for *slide* samples. This PCR examination was applicable but need to be supported by other tests such as *urea breath test* or serology. The resistance of this bacterium to drugs can be assessed by elucidating ³²P-labeled DNA using 7.5% polyacrylamide gel. The alteration of mobility of DNA band amplified with a specific primer means that bacterium is suspected resistant to the drug. This labeling was relatively more sensitive than that of conventional labeling but it needs more intensive procedure.

Keywords: *Helicobacter pylori*, PCR, dyspepsia, *cagA*, *ureC*, ³²P labeled-DNA, SSCP

I. PENDAHULUAN

H. pylori adalah bakteri patogen penyebab gastritis kronis dan berhubungan erat dengan penyakit ulkus peptikum, gastritis atrofi dan keganasan sistem pencernaan [1]. Bakteri ini berkolonisasi di saluran pencernaan bagian bawah dan juga di saluran hepatobilier [2]. Infeksi *H. pylori* telah ditetapkan sebagai suatu faktor risiko seseorang menderita adenokarsinoma lambung dan limfoma [3]. Berbagai uji diagnostik telah dikembangkan untuk mendeteksi infeksi *H. pylori*, baik bersifat invasif maupun non invasif, meliputi teknik biokimia seperti urease (*urea breath test*, UBT), histopatologi, kultur, endoskopi dan teknik biologi molekuler [4,5] dengan masing-masing kelebihan dan kekurangannya. Uji diagnostik dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) yang sangat sensitif dan spesifik dapat diandalkan untuk mendeteksi melalui analisis gen-gen penting yang terlibat dalam kolonisasi dan patogenesis *H. pylori*. Uji PCR juga telah berhasil digunakan untuk mengetahui skema sederhana penyidikan masing-masing strain bakteri *H. pylori* [6,7]. Ada beberapa gen yang ikut bertanggung jawab dalam infeksi antara lain gen untuk urease (*ureA*, *ureB* dan *ureC*) [8], gen untuk protein sitotoksin (*cagA*) [9], gen *16S ribosomal RNA* [10].

Untuk mengobati infeksi *H. pylori*, sejumlah obat dapat digunakan untuk mengeradikasi bakteri antara lain clarithromycin (metridazole) yang merupakan satu dari komponen pengobatan yang paling banyak digunakan. Akan tetapi prevalensi resistensi primer atau *acquired* (didapat) *H. pylori* terus bertambah di seluruh dunia yang mengancam keberhasilan pengobatan. Laju kesembuhan ditemukan antara 0-50% jika strain *H. pylori* resisten terhadap obat ini, dan mencapai 90% jika strainnya rentan (*susceptible*). Resistensi terhadap obat ini disebabkan karena mutasi titik dalam daerah pengkode peptidiltransferase dari *23S rRNA* [11]. Tiga mutasi utama telah diketahui yakni substitusi residu adenine oleh guanine atau sitosin pada beberapa posisi: A2142C, A2142G, dan A2143G dimana A2142 dan A2143G yang paling banyak ditemukan [12]. Dalam praktek rutin, deteksi resistensi ini didasarkan pada metode fenotipik yang dilakukan setelah kultur bakteri yakni difusi agar untuk e-Test, namun prosedur ini memerlukan waktu yang lama. Teknik berbasis-PCR kemudian dikembangkan oleh banyak peneliti seperti PCR-*restriction fragment length polymorphism* (RFLP), PCR-DNA-*enzyme immnuassay* dan *reverse hybridization line probe assay* [18], dan beberapa peneliti lain menggunakan teknik *single strand conformation polymorphism* (SSCP) [13,14].

Penelusuran mekanisme molekuler resistensi bakteri terhadap obat antimikroba difokuskan pada pendeteksian mutasi gen secara cepat dengan teknik berbasis *polymerase chain reaction* (PCR). PCR diikuti dengan SSCP merupakan metode yang sangat luas digunakan untuk mendeteksi mutasi titik yakni berdasarkan perubahan mobilitas pita DNA pada gel poliakrilamida yang dapat diakibatkan oleh perubahan hanya satu nukleotida. Kelebihan lain dari SSCP adalah banyak produk PCR dapat diketahui jenis-jenis mutasi secara sekaligus dan merupakan metode yang jauh lebih efisien untuk mengetahui *polymorphism* suatu lokus inti [15,16]. SSCP telah menjadi andalan banyak peneliti untuk mendeteksi mutasi gen, baik mutasi penyebab kanker dan penyakit lain [17,18] maupun resistensi bakteri penyebab tuberkulosis [13,19] yang dilakukan dengan melabel DNA menggunakan isotop ^{32}P , yang merupakan isotop paling ideal [4,16], namun sejauh diketahui teknik ini belum dipergunakan untuk uji resistensi *H. pylori*.

Tujuan penelitian ini adalah mendeteksi keberadaan *H. pylori* melalui penggandaan DNA bakteri dengan PCR menggunakan primer-primer yang spesifik *H. pylori* [10,20-22] serta membahas prospek penerapan teknik SSCP berbasis nuklir (pelabelan DNA dengan isotop ^{32}P) untuk menentukan resistensi bakteri seperti telah dipergunakan oleh banyak peneliti.

II. BAHAN DAN METODE

II.1. DNA *H. pylori* standard dan spesimen biopsi.

Dalam penelitian ini, sebagai kontrol positif adalah DNA *H. pylori* strain NCTC11638 yang diperoleh dari DR. Takako Osaki, *Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Jepang* [23].

Sebanyak 73 buah biopsi lambung (antrum dan corpus) pasien yang menjalani pemeriksaan endoskopi di Subbagian Gastroenterologi, Bagian Ilmu Penyakit Dalam FKUI/RSCM Jakarta dimana 53 sampel diperoleh selama bulan Juli-Desember 2004, sedangkan 20 sampel lainnya diperoleh selama bulan Juli-Oktober 2006. Spesimen biopsi tersebut diambil dari antrum dan corpus lambung pasien dyspepsia yakni gangguan pencernaan akibat tingginya asam lambung dan kemudian satu sampel dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan medium indol urease (MIU) mengandung indikator keasaman untuk uji urease dan satu sample lain diproses untuk pembuatan slide parafin. Dalam

penelitian ini juga diteliti keberadaan *H. pylori* pada 10 sampel *paraffin embedded tissue* (slide) yang diperoleh dari Bagian Pathologi Anatomi FK-UI/RSCM Jakarta.

II.2. Ekstraksi DNA *H. pylori*

Prosedur ekstraksi DNA *H. pylori* dilakukan sesuai dengan petunjuk Kit *Easy-DNA for genomic DNA isolation* (No. katalog K-1800-01) Invitrogene [4]. Secara garis besar, biopsi dimasukkan ke dalam mikrotube steril berisi 350 µl larutan pelisis (*Solution A*), divorteks dan diinkubasi pada 65°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 150 µl larutan pemurnian (*Solution B*), kemudian divorteks hingga diperoleh larutan bening. Ditambahkan 500 µl kloroform dan divorteks hingga campuran homogen. Larutan disentrifus pada 12.000 rpm selama 10-20 menit pada mesin sentrifus yang ditempatkan di dalam lemari pendingin (4°C) dan kemudian fasa bagian atas dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril baru untuk ekstraksi DNA.

Pemurnian DNA dilakukan dengan menambahkan 1 ml etanol 100% dingin (-20°C), divorteks dan kemudian diinkubasi pada es selama 30 menit. Disentrifus pada kecepatan maksimum selama 10-15 menit pada 4°C. Setelah etanol disingkirkan dari pellet, ditambahkan 500 µl etanol 80% (-20°C) dan kemudian 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 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 digunakan sebagai DNA *template*.

II.3. Ekstraksi DNA dari *paraffin embedded tissue* (slide).

Ekstraksi dilakukan dengan mengerik jaringan dari slide preparat menggunakan silet steril dan dimasukkan ke dalam tabung mikro berisi 20% Chelex (asam iminodiasetat peng-chelat). Dididihkan selama 30 menit dan kemudian disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatannya diambil dan digunakan sebagai DNA *template* [24,25].

II.4. Amplifikasi DNA dengan PCR.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan PCR menggunakan lima primer oligonukleotida untuk gen-gen *cagA*, *ureA* dan *ureC* (*glmM*) serta *16S RNA* ribosom (Tabel 1).

Tabel 1. Urutan basa primer oligonukleotida untuk gen-gen yang diuji beserta ukuran produk PCR yang diharapkan, suhu annealing PCR.

Gen	Oligonukleotida	Ukuran produk (pb*)	Suhu annealing (°C)	Pustaka
<i>cagA</i>	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGGAGG-3' 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGCAGAGA-3'	349	55	Monteiro dkk. [20]
<i>ureA</i>	5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3' 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'	491	45	Peek dkk. [21]
<i>ureC</i> (<i>glmM</i>)	5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAA CGC-3''	294	60	Lage dkk. [22]
<i>16S-RNA</i> <i>ribosom</i>	5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3' 5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'	110	60	Mapstone dkk.[10]

*) pb : pasang basa (*basepair*)

Proses PCR dilakukan dengan mencampur Buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, gelatin 0,001%, dNTP 100 µM, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 0,1 µM dan *ampliTaq* polymerase 0,5 U serta DNA template. Proses PCR dilakukan pada mesin *Master cycler gradient* Eppendorf untuk masing-masing primer dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 10 menit diikuti oleh 40 siklus terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 30 detik, annealing pada 45-64°C selama 1 menit (tergantung primer) dan elongasi pada 72°C selama 45 detik. Setelah selesai 40 siklus, kemudian dilanjutkan elongasi akhir pada 72°C selama 7 menit. Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada 2% gel agarose dan kemudian diwarnai dengan etidium bromida 0,5 µg/ml selama 15 menit serta dipotret dengan kamera instant Polaroid.

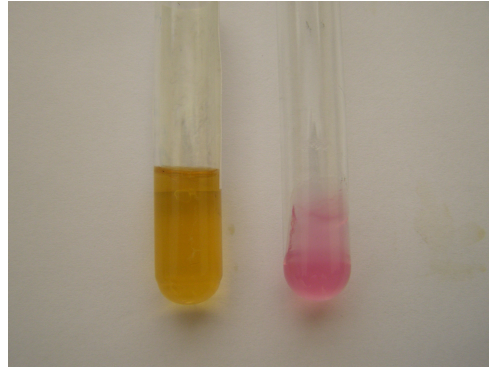
II.5. Deteksi resistensi dengan SSCP

Dalam penelitian ini dilakukan tinjauan/studi kelayakan metode SSCP untuk melokalisasi DNA mutan. Enam mikroliter produk DNA yang telah dilabel ³²P radioaktif melalui proses PCR menggunakan alfa-³²P-dCTP 1µCi/µl, dicampur dengan 2 µl SSCP

loading dye dan 4 µl formamide 95% (Biorad) yang mengandung *denaturant urea* (Biorad). Sampel didenaturasi pada 95°C selama 4-5 menit dan kemudian diletakkan di atas es, selanjutnya dielektroforesis pada gel poliakrilamid 7,5% pada tegangan 50-51 Volt dan suhu kamar selama 5-7 jam (tergantung primer). Gel diambil dengan menempelkan kertas saring Whatman, kemudian ditutup dengan plastik saran wrap dan dikeringkan dengan vakum-panas selama 1 jam. Setelah kering, gel diletakkan dalam kaset film dan di atasnya diletakkan film sinar-X. Kaset disimpan pada pendingin suhu -80°C selama 24 jam hingga 2 hari. Selama proses ini, sistem proteksi radiasi harus dilakukan seperti penempatan perisai plexiglass dan penggunaan kaca mata khusus (*google*) serta mikropipet khusus. Setelah pemajanan, film dicetak dengan merendam dalam larutan *developer* dan *fixer*.

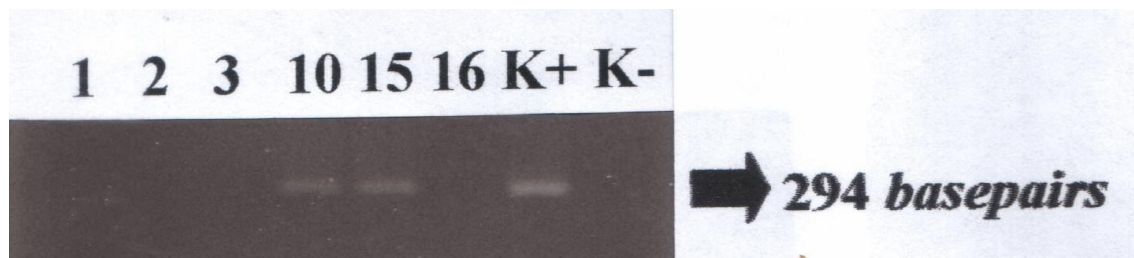
III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, telah terkumpul 73 sampel biopsi dari pasien dispepsia berumur antara 22 hingga 85 tahun yang sebagian besar menderita gastritis antrum berdasarkan hasil uji patologi anatomi. Dalam penelitian ini telah dilakukan pendeteksian *H pylori* dalam biopsi lambung pasien dengan teknik PCR menggunakan primer gen antara lain *cagA*, *ureA*, *ureC* dan *16S RNA ribosom* yang berhubungan erat dengan kolonisasi dan aktivitas patogenisasi bakteri dalam saluran cerna. Dari 73 sampel biopsi yang diuji, empat atau 5,47% sampel menunjukkan hasil positif untuk tiga gen yakni *cagA*, *ureC* dan *16S RNA*, tetapi tidak menghasilkan produk PCR positif untuk gen *ureA*. Dari empat sampel tersebut, dua diantaranya menunjukkan pita DNA non spesifik dengan berat molekul tinggi. Primer *ureA* yang digunakan tampaknya kurang sensitif disebabkan karena jumlah *ureA* RNA yang lebih rendah dalam masing-masing sel bakteri. Temuan ini konsisten dengan hipotesis bahwa jumlah produksi urease *H pylori* secara *in vivo* mungkin rendah. Penyebab lainnya adalah bahwa ukuran produk PCR lebih besar daripada produk PCR untuk gen lain. Hasil uji positif untuk gen selain *ureA* ini sesuai dengan hasil uji urease dimana hanya 4 yang menunjukkan perubahan pH/warna medium motility indol urease (MIU) dari kuning menjadi merah muda (Gambar 2).



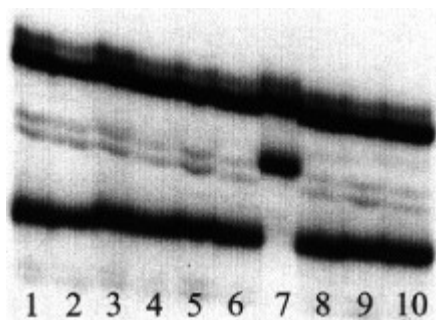
Gambar 2. Hasil pengujian urease menggunakan medium MIU yang dapat menunjukkan keberadaan bakteri *H. pylori* yakni perubahan pH medium kuning (kiri, negatif) menjadi pink (kanan, positif).

Hasil PCR positif tersebut diperoleh dari sampel yang menunjukkan hasil uji urease positif. Bahkan hasil PCR negatif ditemukan pada satu sampel yang menunjukkan hasil uji UBT positif dan satu sampel dari pasien penderita kanker lambung. Berbagai kendala atau penyebab mungkin menjadi alasan yang akan diuraikan secara mendetail dalam paragraf di bawah. Dengan demikian uji PCR ini memerlukan uji yang lain seperti UBT yang merupakan metode baku emas untuk diagnosis infeksi *H. pylori* meskipun tetap memiliki kekurangan yakni kurang spesifik atau serologi dan atau uji serologi.



Gambar 2. Hasil analisis PCR untuk gen *ureC* (produk berukuran 294 bp) pada sampel nomor 10 dan 15 (MIU positif). Kontrol positif (K+) adalah DNA strain *H. pylori* NCTC 11638 dan kontrol negatif (K-) adalah akuabidest steril.

Kekebalan bakteri ini terhadap obat clarithromisin dapat diuji dengan penelusuran DNA berlabel radioisotop P-32 menggunakan gel poliakrilamid 7,5%. Jika mobilitas pita DNA hasil amplifikasi dengan primer khas untuk resistensi clarithromisin berbeda dengan pita standard DNA (*wild type*) maka hal ini menunjukkan bakteri diduga kebal terhadap obat {Gambar 3}. Pelabelan dengan radioisotop terbukti lebih sensitif dibanding pelabelan konvensional, namun memerlukan prosedur yang lebih intensif dan sistem proteksi radiasi.



Gambar 3. Salah satu contoh hasil pendeteksian mutasi gen suatu mikroorganisme dengan teknik SSCP menggunakan DNA berlabel ^{32}P radioaktif dimana untuk sampel nomor 7 mengalami perubahan migrasi pita DNA yang berbeda dengan lainnya.

H. pylori masih terus ditelusuri keberadaannya oleh banyak peneliti sebagai penyebab infeksi. Bakteri ini mampu melakukan adaptasi terhadap lingkungan yang sangat asam di dalam lambung hingga bertahun-tahun hingga muncul manifestasi klinis dimana bakteri mendiami bagian mukus yakni komponen polipeptida dan telah menjadi topik yang menarik pada berbagai penelitian sejak 1991. *H. pylori* dapat memasuki tubuh manusia pada masa kanak-kanak dan dapat bertahan hingga dewasa serta tidak mudah untuk dikultur atau memerlukan kondisi kultur yang sangat spesifik. Oleh karena itu salah satu teknik yang dipergunakan untuk mendeteksi secara cepat adalah PCR yang spesifik karena mampu menelusuri gen-gen yang sangat khas untuk *H. pylori* dan sangat sensitif karena mampu menggandakan DNA hingga berjuta kalinya meskipun hanya berasal dari 1 atau 2 bakteri [5,24]. Dalam penelitian ini, pendeteksian *H. pylori* didasarkan pada asam deoksiribonukleat yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam diagnosis menggunakan petanda yang merupakan struktur umum dan faktor patogenetik bakteri seperti gen *species specific*, urease (*ureA* dan *ureC*), protein sitotoksin (*cagA*) dan (*16S RNA*) serta masih banyak gen lain seperti *vacA*. Sebenarnya PCR dapat menghasilkan produk secara kuantitatif dan genotipe dengan sensitivitas dan spesifisitas mendekati 100% dibandingkan metode konvensional. Namun ada kalanya karena sesuatu dan lain hal sensitivitas ini justru tidak diperoleh atau konsentrasi produk DNA sangat rendah [4,5,8].

Dalam penelitian ini hanya empat sampel menunjukkan hasil positif keberadaan *H. pylori* baik pita spesifik maupun non spesifik Hal ini mungkin disebabkan beberapa hal sebagai berikut. Pertama, pengambilan biopsi hanya satu atau dua buah dan kurang tepat pada tempat dimana diduga *H. pylori* berada, hal ini dapat diatasi atau minimal diperkecil dengan mengambil biopsi lebih dari 2 tempat (antrum dan corpus) tetapi tindakan ini dapat membahayakan pasien karena dapat melukai dinding lambung. Oleh karena itu uji *urea*

breath test (UBT) tetap menjadi "gold standard" dalam menganalisis keberadaan / mendeteksi *H pylori* yang hanya cocok untuk dewasa, sedangkan untuk pasien anak-anak dapat dilakukan dengan uji feces [5,26]. Kedua, biopsi kemungkinan mengandung sangat sedikit atau beberapa bakteri *H pylori* yang kemudian hilang selama proses ekstraksi DNA yang cukup panjang dimana konsentrasi DNA bakteri dapat menjadi jauh lebih rendah karena terencerkan (*diluted*) oleh DNA jaringan sehingga konsentrasinya berada di bawah ambang batas deteksi [10]. Hal ini dapat diatasi dengan melakukan PCR *nested* menggunakan primer "inner" dan menggunakan DNA hasil amplifikasi pertama sebagai template dimana sensitivitasnya dapat mencapai 100 kali [5]. Cara lain adalah menggunakan *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) yang juga digunakan oleh beberapa peneliti [21,22].

Ketiga, kondisi amplifikasi PCR seperti primer yang kurang spesifik, artinya bakteri *H. pylori* tidak mengandung gen yang dianalisis atau sedang tidak mengekspresi gen yang bersangkutan. Penggunaan primer yang lebih banyak dapat membantu mengatasi hal ini. Gen *16S RNA* diusulkan sebagai gen yang paling cocok untuk digunakan dalam uji PCR karena jumlah molekul *template*-nya paling tinggi ditemukan pada *H pylori* [21]. Keempat, bakteri kemungkinan mengandung gen yang dituju tetapi suhu annealing PCR kurang tepat untuk menghasilkan DNA yang diinginkan mengingat banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan PCR, termasuk kemungkinan DNA terkontaminasi. Dan kelima, DNA mungkin dapat teramplifikasi dengan PCR, tetapi dalam elektroforesis dan visualisasi terkadang muncul masalah yang justru menyebabkan hilangnya atau tidak dapat terdeteksinya pita DNA. Pengambilan sampel lain seperti feces juga dapat digunakan untuk mendukung atau melengkapi hasil uji PCR ini.

Dalam penelitian ini ditelusuri keberadaan *H pylori* berdasarkan gen penyandi sitotoksin *cagA*. Strain *H. pylori* yang memiliki *cag* PAI dapat menyebabkan respon pembengkakan intensif pada epitel gastrik dan dihipotesiskan sebagai mekanisme pembentukan gastritis atropik dan kanker lambung [26]. Strain *H. pylori* yang memiliki *cag* PAI menghasilkan suatu protein dengan berat molekul tinggi yang bersifat imunogenik yakni gen *cytotoxin-associated* produk A (*cagA*), dan infeksi oleh strain ini dapat dideteksi dengan uji serologis untuk antibodi anti-CagA. Baru-baru ini, beberapa studi menunjukkan bahwa CagA memasuki sel epitel gastrik dan setelah melakukan fosforilasi, memacu

perubahan di dalam sitoskeleton dari sel inang, yang mengakibatkan peningkatan virulensi strain CagA⁺ *H. pylori* [26].

Studi prevalensi infeksi bakteri *H. pylori* menunjukkan variasi dari negara satu ke negara lainnya dan berkisar antara 25% sampai 90% di negara-negara berkembang [1,27]. Di Indonesia, walaupun hasil penelitian menunjukkan bakteri pembawa *cagA* ditemukan cukup tinggi berdasarkan uji dengan teknik PCR pada sampel biopsi pasien, tetapi jumlah penderita ulkus duodenum tidak terlalu tinggi, sehingga perlu penelitian lebih lanjut [28]. Di samping itu, hasil penelitian dengan prevalensi yang rendah ini mirip dengan hasil penelitian di Yogyakarta yang juga menunjukkan rendahnya hasil uji seroprevalensi dan UBT yakni 5% dan 3% pada kelompok dewasa dimana jumlah penderita kanker lambung jarang ditemukan [29]. Hasil yang sama juga ditemukan oleh penelitian Syam, A.F. dkk [30] yang menemukan bahwa prevalensi *H. pylori* berdasarkan uji HpSA (*H. pylori stool antigen*) adalah sebesar 9,5% dan uji endoskopi menemukan prosentase tertinggi pada penderita gastritis (77,7%), ulkus duodenum 7,9% dan kanker saluran cerna 1,6%. DNA spesifik bakteri ini juga ditemukan di air sungai Jepang dimana prevalensinya tergantung pada jarak aliran sungai dari hulu [31].

Selama dekade terakhir, perspektif aplikasi radioisotop telah mengalami transformasi total, selain digunakan dalam pencitraan untuk memperoleh informasi fungsional suatu zat senyawa, juga untuk mendalami berbagai macam proses fisiologi dan patologi. Pelabelan radioisotop dalam biologi molekuler, imunologi dan biokimia dimaksudkan untuk menelusuri fenomena mendasar suatu penyakit yang ditunjang dengan perkembangan yang menakjubkan akan senyawa yang dilabel radioisotop dengan desain yang baik. Aplikasi dalam rekayasa genetik, genomik dan proteomik telah lebih luas lagi seperti untuk pelabelan biomolekul antibodi, oligonukleotida, peptida, dan lain sebagainya [32].

Dalam makalah ini dibahas penggunaan teknik SSCP yang relatif lebih sederhana menggunakan gel poliakrilamid dalam larutan TBE dibandingkan teknik deteksi mutasi seperti yang dikembangkan oleh banyak peneliti, sedangkan peneliti lain lebih mengandalkan *sequencing* langsung dari DNA hasil amplifikasi PCR. Teknik SSCP dapat diandalkan untuk menganalisis resistensi dengan lebih cepat dan spesifik serta memungkinkan untuk mengetahui spektrum mutasi gen yang lebih luas yang mungkin ditemukan secara spesifik di Indonesia dengan perbedaan kondisi kehidupan manusia dan

lingkungan serta gaya hidup, yang artinya jenis mutasi gen penyandi resistensi clarithromisin dapat berbeda dengan yang ditemukan oleh peneliti lain. Keberhasilan SSCP juga dipengaruhi oleh suhu saat elektroforesis yang konstan, kondisi pH dimana DNA biasanya didenaturasi dalam larutan dengan pH tinggi (aditif gliserol dapat menurunkan pH dan menggunakan buffer Tris-borat) dan ukuran fragmen (ukuran DNA yang paling baik adalah sekitar 150 pasang basa). Dengan kondisi optimal, 80-90% perubahan basa yang terjadi dapat dideteksi dengan SSCP. Dalam penelitian ini terbukti SSCP radioaktif lebih sensitif dibandingkan SSCP konvensional atau non radioaktif yakni pewarnaan EtBr (data tidak disajikan). Meskipun berbagai macam penelitian membuktikan sensitivitas probe radioaktif yang jauh lebih tinggi, namun memiliki keterbatasan yakni waktu paro isotop yang pendek dan bahaya radiasi yang dimilikinya, sehingga metode *chemiluminescence* lebih banyak digunakan [4].

V. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah bahwa hanya empat (5,47%) dari 73 sampel yang diuji menunjukkan hasil positif untuk seluruh gen kecuali gen *ureA*. Dari ke empat sampel tersebut, dua diantaranya menunjukkan pita DNA non spesifik. Hal ini sesuai dengan hasil uji urease yang menunjukkan rendahnya prevalensi *H pylori* di Indonesia. Hasil dengan prevalensi rendah ini sama dengan penelitian lain yang pernah dilakukan di Indonesia. Masih diperlukan uji penunjang yang lain seperti *urea breath test*, serologi untuk mendukung hasil uji PCR atau menggunakan sampel lain seperti darah dan feces. Kekebalan bakteri terhadap obat seperti clarithromisin dapat diuji dengan penelusuran DNA yang dilabel dengan radioisotop ^{32}P menggunakan gel poliakrilamid 7,5% dimana terjadinya perubahan mobilitas pita DNA hasil amplifikasi dengan primer khas untuk resistensi obat ini berarti bahwa bakteri diduga resisten. Pelabelan ini terbukti relatif lebih sensitif dibandingkan pelabelan konvensional, namun memerlukan prosedur yang lebih intensif.

DAFTAR PUSTAKA

1. BLASER, M.J. and PARSONNET, J., Parasitism by "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia, *Journal of Clinical Investigation*, 94, 4-8, 1994.

2. KIKUCHI, S. and DORE, M.P., Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 10 (Supplement), 1-4, 2005.
3. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Infection with *Helicobacter Pylori*. In : International Agency for Research on Cancer (IARC) (ed.) *IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. IARC Scientific Publications, No. 61, IARC, Lyon, 1994, pp. 177–241.
4. SYAIFUDIN, M., MARIALINA, R., ABDULLAH, M., and SYAM, A.F., Deteksi *Helicobacter pylori* dengan teknik *polimerase chain reaction*, Risalah Seminar Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi, P3TIR BATAN, Jakarta 12 April 2005, 41-47.
5. RUZSOVICS, A., MOLNAR, B., and TULASSAY, Z., Review article: deoxyribonucleic acid-based diagnostic techniques to detect *Helicobacter pylori*, *Aliment Pharmacol Ther*, 19, 1137-1146, 2004.
6. 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.
7. 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.
8. HAMMAR, M., TYSKIEWICZ, 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.
9. 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*, 90, 5791-5795, 1993.
10. 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. Mobely Ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2000.
11. OLEASTRO, M., MENARD, A., SANTOS, A., LAMOULIATTE, H., MENTEIRO, L., BARTHELEMY, P., and MEGRAUD, F., Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 397-402, 2003.
12. VERSALOVIC, J., SHORTRIDGE, D., KIBLER, K., GRIFFY, M.V., BEYER, J., FLAMM, R.K., TANAKA, S.K., GRAHAM, D.Y. and GO, M.F., Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycine resistance in *Helicobacter pylori*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 477-480, 1996.
13. KIM, B.J., LEE, K.H., PARK, B.N., KIM, S.J., PARK, E.M., PARK, Y.G., BAI, G.H., KIM, S.J., and KOOK, Y.H., Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by nested PCR-linked single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2610-2617, 2001.
14. 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.

15. KASYAP, V.K., SITALAKSMI, T., CHATTOPADDHYAY, P. and TRIVEDI, R. DNA profiling technologies in forensic analysis, *Int. J. Human Genet*, 4(3), 11-30, 2004.
16. LOVLIE, R. and EIKEN, H.G., Increased P-32 SSCP sensitivity by combining RE digestion and extended X-ray film exposures, *Biotechniques*, 22(4): 598-600, 1997.
17. PINHEIRO, N.A. and VILLA, L.L., Low frequency of *p53* mutations in cervical carcinomas among Brazilian women, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 727-733, 2001.
18. YILDIRIM-TORUNER, C., SUBRAMANIAN, K., EL MANJRA, L., CHEN, E., GOLDSTEIN, S., and VITALE, E., A novel frameshift mutation of *FOXC2* gene in a family with hereditary lymphedema-distichiasis syndrome associated with renal disease and diabetes mellitus, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 131A (3), 281-286, 2004.
19. SYAIFUDIN, M. dan ROSILAWATI, M., Identifikasi *M. tuberculosis* dengan PCR dupleks dan analisis resistensinya dengan SSCP radioaktif, Prosiding Presentasi Ilmiah Keselamatan Radiasi dan Lingkungan XI, 21 Desember 2005, 168-182.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. STEIN, A., and RAOULT, D., A simple method for amplification of DNA from paraffin embedded tissues, *Nucleic Acids Research*, 20, 5237-5238, 1992.
25. LI, T., HONGYO, T., SYAIFUDIN, M., NOMURA, T., DONG, Z., SHINGU, N., KOJYA, S., NAKATSUKA, S., and AOZASA, K., Mutations of the *p53* gene in nasal NK/T-cell lymphoma, *Laboratory Investigation*, 80, 493-499, 2000.
26. KUIPERS, E.J., PEREZ-PEREZ, G.I., MEUWISSEN, S.G. and BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J. Natl Cancer Inst.*, 87, 1777-1780, 1995.
27. VAN DOORN, L.J., HENSKENS, Y., NOUHAN, N., VERSCHUUREN, A. et al., The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 13-17, 2000.
28. SUMOHARDJO, S., INANINGSIH, S., MUTTAQIN, Z., et al., Detection of the *Helicobacter pylori cagA* gene in gastric biopsies from dyspeptic patients using PCR method in Mataram General Hospital, *Indonesian Journal of Gastroenterology Hepatology and Digestive Endoscopy*, 1, 8-9, 2000.
29. TOKUDOME, S., SOERIPTO, TRININGSIH, F.X., et al. Rare *Helicobacter pylori* infection as a factor for the very low stomach cancer incidence in Yogyakarta, Indonesia, *Cancer Letter*, 219, 57-61, 2005.

30. SYAM, A.F., RANI, A.A., ABDULLAH, M., MANAN, C., MAKMUN, D., SIMADIBRATA, M., DJOJONINGRAT, D., DALDIYONO, and SATO, T., Accuracy of *Helicobacter pylori* stool antigen for the detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients, *World Journal of Gastroenterology*, 11, 386-388, 2005.
31. FUJIMURA, S., KATO, S., KAWAMURA, T. *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children, *Lett Appl Microbiol*, 38, 517-521, 2004.
32. SIVAPRASAD, N., Application of radioisotope in Healthcare – An Overview, Board of Radiation and Isotope Technology, BARC Vashi Complex, Navi Mumbai India, 2006.