

## Deteksi Mutasi Gen *PBP1A Helicobacter pylori* yang Resisten Amoxicillin pada Pasien Dispepsia

Indah Sulistiyawati<sup>1</sup>, I Gede Arinton<sup>2</sup>, Hendro Pramono<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

<sup>2</sup> Departemen Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Unsoed

email: indahsulistiyawati.s2@gmail.com

### Abstract

*Helicobacter pylori* infection is now becoming an important factor in dealing with cases both organic and functional dyspepsia. The treatment for symptomatic infection of *H. pylori* can be carried out by using a combination of two antibiotics and a proton pump inhibitor or a bismuth component. Amoxicillin is one of the antibiotics commonly used for treatment *H. pylori* infection. Detection of *H. pylori* infection is necessary, by using non-invasive or invasive method. This study was aimed to evaluate the presence of *H. pylori* in patients with dyspepsia by using non-invasive method i.e. *H. pylori* stool antigen (HPSA) and invasive method i.e. *pbp1A* gene amplification, and also evaluate the amoxicillin resistance of *H. pylori* by assessing the *pbp1A* gene mutations. The samples were 26 faeces and 26 gastric biopsies of patients with dyspepsia from the Internal Disease of Prof. Dr. Margono Soekardjo Hospital in Purwokerto. The data showed that a negative interpretation of *H. pylori* infection resulted from all faeces samples by using non-invasive method, HPSA test. *pbp1A* gene amplification by using PCR obtained 12 positive samples of *H. pylori* infection. Negative result or no bands appearance from others samples was caused by there was no *H. pylori* DNA contain in gastric biopsies, it also reveals the results of HPSA test. DNA sequencing analysis of 12 samples showed the presence of a mutations in *pbp1A* gene from 2 samples, in the third motive of *pbp* i.e. amino acid changes, Alanine 599 substituted to Threonin and Threonin 592 to Alanine. Those mutations become a dominant risk factor for resistance of *H. pylori*, toward the bacterial peptidoglycan synthesis. In this research, it was known that the detection of *H. pylori* infection by using PCR remains more accurate and specific method. The presence of *H. pylori* mutant strains in this study may becomes the risk factors of resistance to amoxicillin treatment.

**Keywords:** dyspepsia, *Helicobacter pylori*, amoxicillin, resistance, *pbp1A* genes, mutations

### Abstrak

Infeksi *Helicobacter pylori* saat ini menjadi salah satu faktor penting dalam menangani kasus dispepsia baik organik maupun fungsional. Pengobatan infeksi *H. pylori* dapat dicapai dengan oleh kombinasi dua antibiotik dan pompa proton inhibitor atau komponen bismuth salah satu antibiotik tersebut adalah amoxicillin. Terjadinya mutasi gen *pbp1A* pada *H. pylori* adalah penyebab dominan resistensi terhadap amoxicillin. Deteksi infeksi *H. pylori* sangat diperlukan, dapat menggunakan teknik non invasif dan invasif. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi keberadaan *H. pylori* pada pasien dispepsia dengan metode non invasif (*Helicobacter pylori* stool antigen) HpSA dan invasif PCR amplifikasi gen *pbp1A*, serta mengevaluasi resistensi amoxicillin pada *H. pylori* dengan mengkaji mutasi gen *pbp1A*. Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis pada 26 sampel feses dan 26 sampel biopsi lambung pasien dispepsia dari Bagian Ilmu Penyakit Dalam RS. Prof. Dr. Margono Soekardjo Purwokerto. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 26 sampel yang dianalisis dengan uji non invasif HPSA diperoleh hasil pemeriksaan negatif *H. pylori*. Pada sampel tersebut juga dilakukan PCR amplifikasi gen *pbp1A* dan mendapatkan hasil 12 sampel positif infeksi *H. pylori*, dan 14 sampel negatif kemungkinan terjadi karena dalam sampel biopsi tidak terdapat DNA *H. pylori*, hal ini mempertegas hasil uji HPSA. Analisis sekuensing DNA dari 12 sampel menunjukkan 2 sampel yang mengalami mutasi gen *pbp1A* di *pbp* motif ketiga yaitu perubahan asam amino Alanin 599 tersubstitusi menjadi Threonin, dan perubahan pada Threonin 592 menjadi Alanin, yang terkait dengan kemampuan bakteri *H. pylori* dalam sintesa peptidoglikan dinding sel bakteri. Dalam penelitian ini dapat diketahui bahwa metode deteksi *H. pylori* dengan PCR masih dinilai tetap lebih akurat dan spesifik. Penemuan adanya strain *H. pylori* mutan pada penelitian ini dapat menjadikan faktor resiko resistensi terhadap pengobatan amoxicillin.

**Kata kunci :** dispepsia, *Helicobacter pylori*, amoxicillin, resistensi, gen *pbp1A*, mutasi

### Pendahuluan

Penyakit pencernaan pada konteks kesehatan global umumnya bersifat menular, dan merupakan infeksi dari patogen yang melibatkan beberapa bagian dari saluran pencernaan. Adanya gejala umum terkait dengan infeksi saluran pencernaan dikenal dengan gejala dispepsia. Definisi dispepsia menurut Rome II tahun 1999 yaitu keluhan nyeri atau rasa tidak enak yang berpusat pada perut bagian atas, terutama pada

epigastrium atau sekitar linea mediana. Rasa tidak enak terdiri dari rasa penuh pada perut bagian atas, cepat kenyang, kembung atau mual (Talley *et al.*, 2000).

Tahun 2004 dalam profil kesehatan dispepsia menempati urutan ke-15 dari daftar 50 penyakit dengan pasien rawat inap terbanyak di Indonesia dengan proporsi 1,3% dan menempati urutan ke-35 yang menyebabkan kematian 0,6% (Inri *et al.*, 2013). Penyebab dispepsia fungsional adalah "multi factorial" seperti keterlambatan

pengosongan lambung, dismotiliti, gangguan akomodasi lambung terhadap makanan yang masuk, faktor-faktor psikologi dan infeksi *Helicobacter Pylori*.

*Helicobacter pylori* adalah bakteri yang menginfeksi lapisan lendir lambung dan duodenum. Bakteri ini adalah agen penyebab utama penyakit gastritis superfisial kronis dan ulkus peptikum. *H. pylori* dapat terkait dengan perkembangan kanker lambung dan limfoma lambung (Dunn *et al.*, 1997). Namun, banyak yang terinfeksi tetapi tidak menunjukkan gejala penyakit. Bakteri *Helicobacter* adalah mikroorganisme yang hanya dikenal dapat berkembang dalam lingkungan lambung yang sangat asam. Bakteri ini berbentuk heliks (oleh karenanya dikenal dengan nama *helicobacter*). Bakteri ini diduga telah berevolusi untuk dapat menembus dan menjelajah lapisan lendir (Bekir *et al.*, 2009).

Pengobatan atau terapi untuk pasien dengan gejala simptomatik infeksi *H. pylori* dapat dicapai oleh kombinasi dua antibiotik ditambah dengan pompa proton inhibitor atau komponen bismuth. Amoxicillin adalah salah satu agen antimikroba yang digunakan dalam infeksi *H. pylori*. Rejimen *amoxicillin* sering digunakan sebagai lini pertama pengobatan untuk infeksi *H. pylori*. Penggunaan antibiotik di negara-negara berkembang pilihannya sangat terbatas dan ekstensif sehingga dapat diperoleh tanpa resep dengan harga relatif murah (obat generik). Penggunaan antibiotik tersebut dapat menyebabkan peningkatan resistensi terhadap antibiotik. Prevalensi resistensi antibiotik *H. pylori* menunjukkan variasi rasional per antibiotik terapi untuk *amoxicillin* bervariasi 1%-29% tergantung konsentrasinya (Mendoca *et al.*, 2000; Glupczynski *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002). Meningkatnya prevalensi resistensi *amoxicillin* pada *H. pylori* merupakan masalah serius yang dalam waktu dekat dapat menjadi penyebab utama kegagalan terapi.

Bakteri *H. pylori* memiliki mekanisme yang mencakup penurunan permeabilitas membran untuk antibiotik dan penurunan aktivitas antimikroba dari sel bakteri. PBP (*Penicillin Binding Protein*) yang bertanggung jawab untuk perlawanan amoxicillin pada *H. pylori* yang resisten terhadap amoxicillin mengalami perubahan struktural. Hasil analisis yang telah dilakukan oleh Rimbara *et al.* (2008) pada isolat *H. pylori* asal Jepang, yang tahan klinik terhadap amoxicillin menunjukkan adanya perlawanan terhadap amoxicillin pada gen *pbp1A* khususnya di sekitar enzim transpeptidase. Gerrits *et al.* (2006) juga melaporkan adanya perubahan mutasi di *pbp1A* adalah penyebab dominan dari resistensi amoxicillin. PBP adalah enzim sintesis biopetidoglikan yang memicu transpeptidase dalam C-terminal yang akan mengikat  $\beta$ -laktam di

wilayah transpeptidase sehingga terjadi perubahan dan mungkin memberikan resistensi karena menyebabkan berkurangnya afinitas untuk  $\beta$ -laktam.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat titik multiple point mutasi di gen *pbp1A*, merupakan mekanisme utama resistensi amoxicillin yang menyebabkan hilangnya afinitas antara amoxicillin dan PBP-transpeptidase. Pada penelitian tersebut telah diamati terjadinya substitusi Ser<sub>414</sub> dengan Arg, yang berdekatan dengan motif SKN pada PBP1 yang bertanggung jawab untuk resistensi amoxicillin secara signifikan meningkat dengan nilai MIC (>0,5-1 mg/L) (Gerrits *et al.*, 2006). Identifikasi asam amino substitusi berada pada daerah yang berbeda. Pada satu kelompok dengan lima asam amino substitusi termasuk Ser<sub>414</sub>→Arg, Asn<sub>562</sub>→Tyr, Thr<sub>593</sub>→Ala, Gly<sub>595</sub>→Ser, dan Ala<sub>599</sub>→Thr berada pada daerah perbatasan dengan PBP. Dalam spesies *H. pylori* substitusi asam amino di dekat motif PBP (SXXK, SXN, dan KTG) hal ini dikaitkan dengan perkembangan resistensi  $\beta$ -laktam dimana pengikatan motif (SAIK 368-371), SLN (433-435) dan KTG (555-557). Dari penelitian ini substitusi asam amino Asn<sub>562</sub>→Tyr, mutasi yang terletak dekat KTG (555 untuk 557) motifnya identik ditemukan pada semua strain yang tahan amoksisilin (Gerrits *et al.*, 2002), Substitusi Ser<sub>414</sub>→Arg yang terjadi berdekatan dengan SLN (433-435) motif juga identik di temukan disemua strain resisten.

Deteksi infeksi *H. pylori* sangat penting untuk menilai status pasien dispepsia. Berbagai metode diagnostik telah dimanfaatkan untuk mendeteksi infeksi *H. pylori*. Metode ini meliputi baik tes invasif (membutuhkan endoskopi untuk mendapatkan spesimen biopsi yang digunakan tes histologi, urease tes cepat, kultur, metode molekuler "*Polymerase Chain Reaction*" (PCR) atau tes non invasif (meliputi tes serologi, urea breath tes, uji antigen feses) (Choi *et al.*, 2011). Menurut pedoman eropa dalam Malfertheiner *et al.* (2002) menjelaskan bahwa "*gold standar*" (standar baku emas) untuk mendiagnosis infeksi *H. pylori* secara umum harus diwakili setidaknya 2 (dua) tes yang berbeda. Pada penelitian ini untuk pretreatment mengetahui infeksi *H. pylori* positif pada pasien dispepsia digunakan tes noninvasif dengan sampel feses yaitu tes feses antigen (HpSA), HpSA yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan *H. pylori* aktif, menggunakan Antibodi (Ab) monoklonal (Ricci *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini sampel *spesimen* yang akan digunakan adalah hasil biopsi lambung, yang akan dideteksi resistensi amoxicillin *H. pylori* dengan menggunakan teknik metode PCR dan deteksi resistensinya dapat diketahui dengan adanya perubahan mutasi gen *pbp1A*. Beberapa penelitian telah melaporkan beberapa substitusi asam amino di *pbp1A* pada *H. pylori* resisten

yang menunjukkan transfer resistensi fenotipe melalui transformasi alami. Dalam penelitian ini kami menilai prevalensi *H. pylori* yang resisten terhadap amoxicillin pada pasien terinfeksi *H. pylori* dan meneliti hubungan antara resistensi *H. pylori* dengan mutasi gen *pbp1A*.

## Materi dan Metode

Penelitian ini merupakan studi diskriptif, dengan teknik pengambilan sampling menggunakan metode *consecutive* sampling yaitu seluruh penderita dispepsia yang dirawat di Bangsal Penyakit Dalam RSUD. Prof. Dr. Margono Soekardjo Purwokerto yang telah didiagnosa melakukan endoskopi dan memenuhi kriteria sebagai sampel sehingga mencapai jumlah yang direncanakan yaitu 26 sampel. Kriteria inklusi penelitian ini adalah (1) pasien dengan keluhan dispepsia, (2) bersedia menandatangani informed consent, (3) subyek penelitian belum mendapatkan terapi, (4) pasien yang telah terjadwalkan atau terdiagnosis klinik untuk endoskopi dan biopsi, sedangkan kriteria eksklusinya adalah (1) telah minum obat antibiotik dan anti sekresi penghambat proton, (2) riwayat operasi lambung, (3) peminum alkohol, (4) perokok, (5) penderita penyakit berat. (6) subyek penelitian yang merupakan pasien dari tim peneliti tidak akan diikutsertakan dalam penelitian.

Prosedur awal penelitian ini adalah peneliti meminta izin kepada Direktur RSUD. Prof. Dr. Margono Soekardjo Purwokerto dan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto (UNSOED). Penelitian selanjutnya dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler UNSOED dari bulan Februari – Juni 2016. Deteksi infeksi *H. pylori* dilakukan dengan memenuhi *gold standar* yaitu metode non invasif HPSA Antigen - (Kit CTK Biotech Catalog number R0192C), dan invasif (amplifikasi gen *pbp1A* dengan PCR).

Pengambilan spesimen feses yang telah diperoleh dilanjutkan dengan pemeriksaan rapid tes antigen feses (HpSA). Sampel biopsi jaringan dari setiap subjek penelitian diisolasi dan diekstraksi untuk mendapatkan DNA bakteri, dengan menggunakan metode ekstraksi DNA yaitu *Phenol Chloroform* (Prabowo, 2008) yang telah dimodifikasi. Dilanjutkan dengan pemeriksaan deteksi resistensi amoxicillin *Helicobacter pylori* dengan metode PCR menggunakan master mix PCR *Phusion High-Fidelity kit Thermo Scientific* dengan primer gen *pbp1A*, primer *Forward* : CCACGCAAGCCAAACGG, primer *Reverse*: CCTTTGGGGACATCAAACCTTT. Dari hasil test PCR akan digunakan untuk sekuensing DNA yang akan dilakukan di First BASE Laboratories Malaysia urutan sekuen yang dihasilkan akan dibandingkan pada data Gen Bank

([www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)) urutan sekuen *H. pylori* strain 51. Untuk dievaluasi perubahan mutasi gen *pbp1A* sebagai penyebab resistensi amoxicillin menggunakan primer resistensi amoxicillin. Pengamatan perubahan susunan basa pada gen *pbp1A* dengan parameter resistensi adanya perubahan : Ser<sub>414</sub> ---- Arg, Asn<sub>562</sub>--- Tyr, Thr<sub>593</sub>---Ala, Gly<sub>595</sub>---Ser, Ala<sub>599</sub>---Thr.

## Hasil dan Pembahasan

Persebaran penderita dispepsia yang menjadi subjek penelitian terjadi pada rentang usia mulai dari 20-79 tahun, berdasarkan pengelompokan usia menurut Depkes RI (2009) dijelaskan bahwa remaja akhir dengan rentang usia 17-25 tahun, dewasa awal 26-35 tahun, dewasa akhir 36-45 tahun, lansia awal 46-55 tahun, lansia akhir 56-65 tahun, dan masa manula 65-sampai atas. Dari 26 subjek penelitian, dengan penderita dispepsia diperoleh data keluhan dispepsia sudah diperoleh sejak dini, hal ini terlihat pada kelompok remaja akhir dengan proporsi penderita mencapai 6 orang. Terjadi peningkatan pada kelompok lansia (lanjut usia) awal sejumlah 8 orang, kemudian tidak ditemukan pada kelompok lansia akhir, akan tetapi meningkat pada kelompok manula sejumlah 5 orang. Penderita laki-laki ditemukan sebanyak 7 orang (26,9%) dan perempuan 19 orang (73,1%).

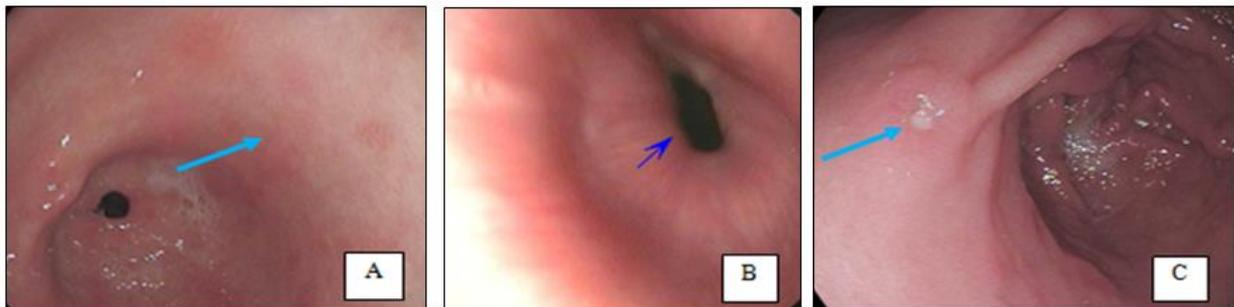
Deteksi status *H.pylori* dalam subyek manusia dari 26 orang dengan menyajikan pemeriksaan endoskopi, dimana jaringan biopsi lambung untuk tes PCR amplifikasi serta pemeriksaan feses dengan metode non invasif dengan menggunakan HPSA diperoleh hasil *H. pylori* stool negatif pada 26 orang (0%), dan hasil PCR amplifikasi menggunakan sampel biopsi lambung dengan primer gen *pbp1A* didapatkan hasil *H. pylori* positif pada 12 orang (46,15%). Dengan rentang usia positif pada usia remaja akhir 17-25 tahun 2 orang (16,67%); dewasa awal 26-35 tahun 3 orang (25%); dewasa akhir 36-45 tahun 2 orang (16,67%); lansia awal 46-55 tahun 3 orang (25%); lansia akhir 56-65 tahun 0 orang (0%); dan manula 65-atas tahun 2 orang (16,67%). Adapun digambarkan bahwa klinisi untuk pasien dengan keluhan pra diagnosis dispepsia memiliki hasil post diagnosis endoskopi yaitu gastritis, ulkus ventrikuli, dan *LES incompetence (Lower Esophageal Sfringter)*.

Hal tersebut sesuai dengan penelitian Leonardo *et al.*, (2014) bahwa keluhan dispepsia dengan indikasi infeksi *H. pylori* dapat terjadi sejak dini, disebutkan bahwa dalam penelitiannya prevalensi *H. pylori* selama beberapa dekade terakhir ini mengalami penurunan, akan tetapi terjadi peningkatan indikasi infeksi pada usia muda. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa faktor resiko atau kendala untuk infeksi *H. pylori*

pada jenis kelamin dan usia tampaknya tidak ada perbedaan yang signifikan dari infeksi *H. pylori* pada laki-laki maupun perempuan ataupun pada skala usia anak-anak, dewasa dan tua (van Blankenstein *et al.*, 2013). Gradien usia tertentu pada prevalensi *H. pylori* dilaporkan oleh beberapa penelitian tampaknya terkait dengan adanya efek *Kohort* (Lim *et al.*, 2013). Beberapa faktor subjek ekonomi telah dikaitkan dengan infeksi *H. pylori* secara khusus dengan status sosial ekonomi yang rendah, mempengaruhi rendahnya faktor pendapatan per kapita, serta pendidikan yang rendah juga berpengaruh pada pola tatalaksana hidup sehat sehingga

memungkinkan memicu faktor infeksi *H. pylori* (Mathewos *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini digunakan tes invasif untuk mendeteksi keberadaan *H. pylori* pada lambung menggunakan teknik endoskopi, biopsi lambung yang digunakan untuk sampel adalah bagian antrum dengan kode A dan corpus dengan kode B. Pada kasus gastritis kronis terkait peradangan dan sekresi asam maka *H. pylori* akan berkolonisasi pada antrum lambung dan secara dominan akan berdistribusi ke corpus lambung (Johannes *et al.*, 2006) dapat dilihat kondisi sampel yang digunakan hasil biopsi lambung pada gambar 1, sesuai dengan kondisi temuan saat endoskopi.



Gambar.1. Post diagnosis temuan endoskopi subyek dengan (A) gastritis kronis (B) *LES Incompeten* dan (C) *ulkus ventrikuli*.

#### Uji hasil HPSA (*H. pylori* Stool Antigen)

Analisa feces untuk keberadaan bakteri *H. pylori* menggunakan metode non invasif dengan HPSA antigen, diperoleh hasil negatif dari 26 subyek penelitian, menurut Kabir (2001) hasil pada uji HPSA seringkali digunakan pada tahapan skrining awal dan memungkinkan tidak handal dalam memprediksi hasil dari pengobatan atau pemberantasan *H. pylori*, pada pasien dengan dispepsia kronis akan sangat sulit ditemukan karena respon imunoglobulin (Ig G) yang tidak terdeteksi saat skrining awal dengan antigen tersebut. Johannes *et al.* (2006) menyatakan bahwa infeksi *H. pylori* dapat ditandai dengan adanya gastritis akut dan kronis. Pada gastritis akut, gejala awal yang muncul adalah gejala mual, muntah, dengan peradangan cukup baik di bagian proximal, hal ini berbeda dengan kasus gastritis kronis yang terjadi secara persisten, berkaitan erat dengan akumulasi *H. pylori* pada bagian lambung dan bersifat menahun, dapat terjadi tanpa disertai gejala dispepsia yang spesifik.

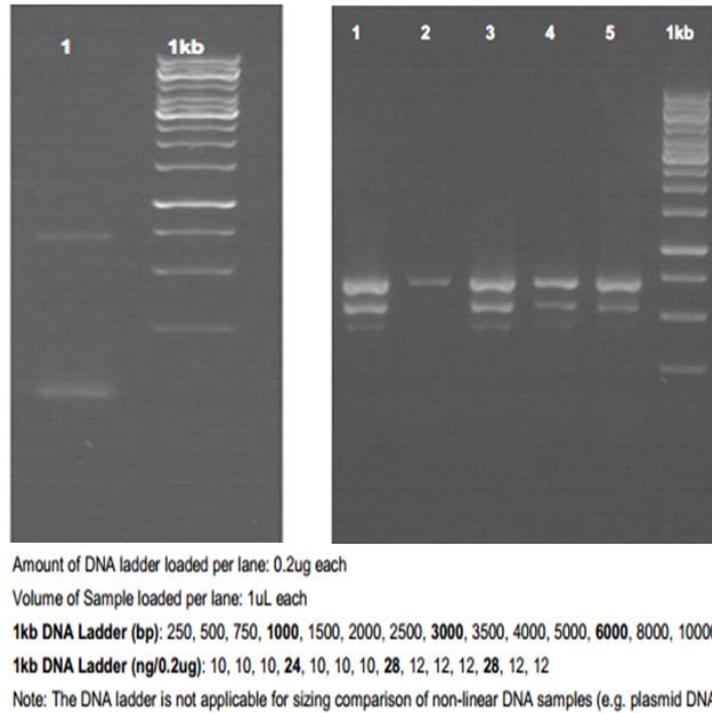
#### Amplifikasi DNA pada gen *pbp1A* dengan metode PCR

Amplifikasi DNA dari seluruh sampel biopsi lambung dilakukan dengan metode PCR sebanyak 12 sampel dari 26 sampel berhasil di amplifikasi pada gen *pbp1A* yang memiliki panjang ~ 800 *base pare*. Pengambilan titik

sampling dari 26 subyek penelitian dari 2 (dua) lokasi yang berbeda pada lambung yaitu bagian antrum dengan kode (A), dan bagian corpus dengan kode (B). Pada sampel 1A, 2A, 3A muncul *band single* tipis; sampel 24 A muncul *band smear single*; sampel 9 B *multi band* dan hasil *gel extraction smear*, selanjutnya sampel tersebut dikirim untuk disekuensing di *First Base Malaysia Company*. Hasil agarose quantification di *First Base Malaysia Company* menunjukkan bahwa hanya 5 sampel dari 6 sampel yang dapat disekuensing karena 1 sampel lainnya yaitu 8B sampel hasil *gel extraction* memiliki konsentrasi dan volume DNA yang terlalu rendah untuk dapat disekuensing kelima sampel tersebut yaitu; 5A, 7B, 25B, 10A, 11A (Gambar 2).

Primer yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada Byoungtrak *et al.* (2014) dengan primer khusus gen *pbp1A* yang telah dikonfirmasi dengan NCBI Gen Bank untuk genom *Helicobacter pylori* strain 15 CP000012 dengan desain : *pbp1A-F* --CCACGCAAGCCAAACGGC — dengan panjang nukleotida 18 nukleotida, dan untuk primer *pbp1A-R* — CCTTTGGGGACATCAAACCTTT — dengan panjang nukleotida 21 nukleotida. Posisi primer oligonukleotida tersebut pada resistensi antibiotic yang menyebabkan mutasi *H. pylori*, forward 1076-1093, dan reverse 1857-1877. Konsentrasi G+C pada primer tersebut untuk primer forward 66,67% dan reverse 42,86%, panjang nukleotida

yang digunakan terdiri dari 18-28 nukleotida yang mempunyai basa Guanin (G) dan Sitosin (C) sebesar ± 50-60%.



Gambar 2. Hasil *agarose quantification* di First Base Malaysia Company (1) Gel 1 sampel 8B sampel hasil *gel extraction* konsentrasi dan volume DNA yang terlalu rendah; (2) Gel2: sampel proses sekuensing (1)5A, (2)7B, (3) 25B, (4) 10A, (5) 11A

Keberhasilan mengisolasi DNA merupakan hal yang paling penting dalam metode PCR. Proses ekstraksi yang cukup panjang prosedurnya menjadi kurang tepat dalam uji rutin laboratorium, seringkali menyebabkan hilangnya DNA selama prosesnya. Kemungkinan hilangnya DNA saat ekstraksi dapat menjadi penyebab negatifnya hasil deteksi *H. pylori* pada PCR. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena sampel mengandung sangat sedikit atau memang tidak ada bakteri *H. pylori* dalam biopsi.

**Identifikasi mutasi gen *pbp1A* yang terlibat dalam resistensi Amoxicillin**

Hasil sekuensing DNA menunjukkan bahwa pada sampel 5A, 7B, 25B, 10A, dan 11 A untuk gen *pbp1A* pada *H. pylori* terjadi substitusi asam amino pada sampel 7B dan 25 B, dengan substitusi (tabel 4.9) sampel 7B mengalami mutasi pada gen *pbp1A*, Alanin 599 (A 599) tersubstitusi menjadi Threonin (T) dan pada sampel 25 B perubahan Threonin 592 (T592) tersubstitusi menjadi Alanin (A).

Tabel 1. Tinjauan perbedaan asam amino dalam gen *pbp1A* resisten amoxicillin didasarkan pada sekuensing genetic dari genom *H. pylori* strain 51 Gen Bank CP000012

<i>H.pylori</i> strain 51 Gen Bank CP000012	S-K-N	414	K-T-G	562	592	595	599
		S		N	T	G	A
5 A	----	--	----	--	--	--	--
7 B	----	--	----	L	--	--	T
25 B	----	--	----	L	A	M	H
10 A	----	--	----	Q	Y	--	L
11 A	----	--	----	--	--	--	--

Titik mutasi gen terjadi sebagai bentuk perlawanan terhadap amoxicillin terjadinya frameshift pada 2 sampel tersebut menunjukkan adanya penghapusan atau penyisipan. Analisis urutan sekuen DNA dari daerah sekitar kedua

motif PBP SKN untuk S 414 tidak ditemukan adanya mutasi tetap pada daerah motif ketiga KTG di urutan A 599, tersubstitusi menjadi Threonin (T) untuk sampel kode 7.

Pada sampel positif infeksi *H. pylori* tidak banyak ditemukan mutasi gen *pbp1A*. *H. pylori*, sampai saat ini karena prevalensi resistensi *H. pylori* terhadap amoxicillin masih sangat rendah, maka amoxicillin masih dapat digunakan dalam terapi eradikasi *H. pylori*. Namun demikian pada penelitian ini resistensi amoxicillin muncul pada sampel pasien dengan hasil endoskopi gastritis kronis untuk sampel 7 B, dan hasil ulkus untuk sampel 25 B. Pada bakteri gram negatif, resistensi terhadap antibiotik jenis beta laktam seperti amoxicillin sering terjadi karena proses enzimatis  $\beta$ -laktamase yang dapat mendegradasi antibiotik. Selain adanya mekanisme seperti perubahan struktur dalam *pbp* serta adanya penurunan permeabilitas membrane untuk antibiotik. Meskipun genom *H. pylori* mengandung enzim  $\beta$ -laktamase tetapi tidak adanya aktivitas  $\beta$ -laktamase yang signifikan dapat menyebabkan rentan terhadap amoxicillin, penelitian Gerrits *et al.* (2006) menyatakan bahwa kemampuan *H. pylori* untuk bertahan terhadap antibiotik jenis beta laktam khususnya antibiotik amoxicillin sangat

bergantung pada perolehan ekspresi enzim  $\beta$ -laktamase.

## Simpulan

Hasil dan pembahasan penelitian ini dapat diambil secara rinci kesimpulan sebagai berikut : (1). Keberadaan *H. pylori* pada pasien dispepsia dengan metode non invasif HpSA (uji antigen feses) dapat dievaluasi menunjukkan hasil negatif dari 26 sampel feses pasien dan invasif PCR amplifikasi gen *pbp1A* diperoleh hasil positif *H. pylori* sejumlah 12 sampel dari 26 sampel biopsi lambung. Metode PCR masih dinilai tetap lebih akurat dan spesifik dalam penentuan keberadaan *H. pylori*. (2). Berdasarkan hasil analisis sekuensing DNA terdapat Mutasi gen *pbp1A* pada *H. pylori* diperoleh 2 sampel dari 12 sampel positif. Titik mutasi terjadi pada *pbp* motif ketiga yaitu substitusi pada Alanin 599 -- Threonin, dan Threonin 592--Alanin. Strain mutan *H. pylori* yang ditemukan dari sampel biopsi dapat menjadi faktor resiko resistensi amoxicillin pada pasien dispepsia.

## Daftar Referensi

- Bekir, K., A. Avci., dan A. T. Yabanigul. 2009. Classification of *Helicobacter pylori* According to National Strains Using Bayesian Learning. *Mathematical and Computational Applications*. 14(3): 241-251.
- Byoungkrak An, B.S Moon, H.C. Lim, dan Y.C Lee, H. Kim., G. Lee., S. Kim., M. Park., dan J.B.Kim. 2014. Analysis of Gene Mutations Associated with Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Korean Patients. *The Korean Journal of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research*. 14(2):95-102.
- Choi. J, C.H. Kim, D. Kim, S.J. Chung, J.H.Song, J.M. Kang, J. I. Yang, M. J. Park, Y.S. Kim, J. Y. Yim, S.H. Lim, J.S.Kim, H.C. Jung, dan I.S. Song. 2011. Prospective Evaluation of New Stool Aantigen Test for The Detection of *Helicobacter pylori*, in Comparison With Histology, Rapid Urease Test, C-Urea Breath Test, and Serology. *Journal Of Gastroenterology and Hepatology*. 26:1053-1059.
- Depkes RI. 2009. Profil Kesehatan Indonesia. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Dunn, B. E., H. Cohen., dan M. J. Blaser. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbial Rev.* (10): 720-741.
- Gerrits M.M, Godoy A.P, Kuipers E.J, M. L. Ribeiro, J. Stoof, S. Mendoca, A.H.M Van Vilet, J. Pedrazzoli Jr, dan J. G. Kusters. 2006. Multiple Mutations in or Adjacent to the Conserved Penicillin-Binding Protein Motifs of The Penicillin-Binding Protein 1 A Confer Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 11:181-187.
- Glupczynski, Y., Megraud, F., Lopez-Brea, M., dan Andersen, L.P. 2001. European Multicentre Survey of *in vitro* Antimicrobial Resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbial Infect Dis*. 20: 820-823.
- Inri, M.S., Pangemanan, D.H.C., dan Untu, F.M. 2013. Hubungan Antara Pola Makan dengan Kejadian Pada Siswa-Siswi kelas XI di SMA Negeri 1 Manado. *Ejournal keperawatan (e-Kp)*. Vol.1(1)1-6.
- Johannes, G.K., Amoud, H.M., V. Uliet., dan E.J. Kuipers. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Review*. p: 449-490.
- Kabir, S. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* in Feces by Culture, PCR, and Enzyme Immunoassay. *J. Med Microbial.* (50)1021-1029.
- Leonardo, H.E., M. Rocco., Zagari dan F. Bazzoli. 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Review Article. *Helicobacter* 19(1):1-5.
- Lim, S.H., Kwon, J.W., dan Kim, N. 2013. Prevalance and Risk Factors of *Helicobacter pylori* in Korea: Nation Wide

- Multicenter Study Over 13 Years. *BMC Gastroenterol.*13:104.
- Malfertheiner. P, Megraud. F, O'Morain. C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, dan Kuipers E J.2002. Current Concepts in The Management of H. pylori Infection-The Maastricht 2-2002 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther.* 16:167-180.
- Mathewos, B., Meges, B., dan Dagneu, M. 2013. Seroprevalance and Trend of Helicobacter pylori Infection in Gondar University Hospital among Dyspeptic Patients, Gondar North West Ethiopia. *BMC. Res Note*; 6:346.
- Mendoca S., Ecclissato C., Sartori M.S., Godoy. A.P., Gierzoni, R.A., Degger M., dan Pedrazzoli J. Jr. 2000. Prevalence of *Helicobacter pylori* Resistance to Metronidazole, Clarithromycin, Amoxicillin, Tetracycline, and Furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 5 : 79-83.
- Meyer, J.M., Silliman, N.P, Wang W., Siepman, N.Y., Sugg J. E., dan Morris D. 2002. Risk Factors for Helicobacter pylori Resistance in The United State: The Surveillance of H. pylori Antimicrobial Resistance Partnership (SHARP) Study, 1993-1999. *Ann Int Med.* 136: 13-24.
- Rimbara, E., N. Noguchi.,T. Kawali., dan M. Sasatsu. 2008. Mutations in Penicillin-Binding Protein 1,2,3 are Responsible for Amoxicillin Resistance in Helicobacter pylori. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* (61); 995-998.
- Ricci. C, J. Holton, dan D. Vaira. 2007. Diagnosis of Helicobacter pylori: Invasive and Non-Invasive Test. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 21(2) 299-313.
- Van Blankenstein, M., van Vuurem, A.J., Looman, C.W., Ouwendi, J.K.M., dan Kuipers, E.J. 2013. The Prevalence of Helicobacter pylori Infection in The Netherlands. *Scan J Gastroenterol.* 48:794-800.