

KK  
KKA  
TKD 36/11  
Dia  
d

**TESIS**

**DETEKSI HELICOBACTER PYLORI DARI SPESIMEN BLOK  
PARAFIN BIOPSI LAMBUNG PENDERITA DISPEPSIA DI  
PROVINSI NTB DENGAN HASIL HISTOPATOLOGI NEGATIF  
MENGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*  
DENGAN PRIMER GEN *ureC ( glmM)***

**PENELITIAN OBSERVASIONAL ANALITIK**



**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**MARUNI WIWIN DIARTI  
NIM : 090610365M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

**Prasyarat Gelar**

**DETEKSI HELICOBACTER PYLORI DARI SPESIMEN BLOK  
PARAFIN BIOPSI LAMBUNG PENDERITA DISPEPSIA DI  
PROVINSI NTB DENGAN HASIL HISTOPATOLOGI NEGATIF  
MENGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*  
DENGAN PRIMER GEN *ureC (glmM)***

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Dasar pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**MARUNI WIWIN DIARTI  
NIM.090610365M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
Tanggal 27 JUNI 2008**

## LEMBAR PENGESAHAN

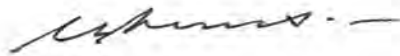
TESIS INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL : 20 JUNI 2008

Oleh  
Pembimbing Ketua



Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD  
NIP. 130 541 984

Pembimbing



Edhi Rianto, dr, MS  
NIP. 130 676 010

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD  
NIP. 130 541 984

Tesis ini telah diujikan dan dinilai  
Oleh panitia penguji pada  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Pada Tanggal 27 JUNI 2008

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua** : Prof Dr Harianto Notopuro, dr, MS

**Anggota** : 1. Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD  
2. Edhi Rianto, dr, MS  
3. Dr H. Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
4. Dr Hari Basuki Notobroto, dr, MKes  
5. Troef Soemarno, dr, MS, SpPA(K)

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taupik, hidayah dan karunia-Nya yang tak terhingga sehingga dapat terselesaikannya pendidikan Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga dengan penyusunan tesis ini. Penelitian dan penyusunan tesis ini dapat terlaksana dan terselesaikan berkat bantuan, dorongan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan kerendahan hati dan ketulusan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan sekaligus sebagai pembimbing ketua, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, tuntunan, saran, dorongan, petunjuk, dan nasehat dalam penelitian serta kemudahan dalam berkonsultasi ditengah kesibukan beliau yang sangat padat, dalam penyelesaian tesis ini.

Edhi Rianto, dr, MS, selaku pembimbing yang penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu dan tidak henti-hentinya memberi semangat, bimbingan, wejangan, masukan, saran dan nasehat dalam penelitian dan penyusunan tesis serta kemudahan dalam berkonsultasi ditengah kesibukan beliau yang sangat padat.

Troef Soemarno, dr, MS, SpPA(K), selaku penguji dan pemilik koleksi spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia yang telah memberikan ijin penggunaan sampel dan atas dorongan, saran, serta bimbingan dalam menyelesaikan tesis ini.

Dr Hari Basuki Notobroto, dr, Mkes, selaku penguji dan konsultan statistik yang telah membantu dan memberikan bimbingan dalam melakukan analisis statistik dalam penyelesaian tesis ini.

Dr H. Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK, selaku penguji atas bimbingan, saran, nasehat dan dorongan dalam penyelesaian tesis ini.

Prof Dr Harianto Notopuro, dr, MS, selaku Ketua Minat Studi Ilmu Biokimia sekaligus sebagai ketua penguji tesis atas bimbingan, saran, pengarahan dan dorongan dalam penyelesaian tesis ini.

Prof. Dr. Indri Safitri, dr., MS., selaku Mantan Ketua Minat Studi Ilmu Biokimia dan team pengajar Minat Biokimia Program Studi Kedokteran Dasar Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya atas bimbingan, saran, nasehat, pengarahan dalam penulisan proposal dan penulisan tesis ini.

Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D. selaku mantan Ketua Departemen Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Dr. Suhartati, dr., MS. selaku Ketua Departemen Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu memberi semangat, bimbingan, masukan dan saran demi terselesaikannya tesis ini.

Prof. Dr. Soewignjo Soemohardjo, dr.,SpPD.,KGEH, selaku konsultan ahli di instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram dan kepala klinik biomedika Mataram, dan Prof. Dra. Dwi Soelistya Dyah Jekti, M.Kes yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, tuntunan, saran, dorongan, petunjuk, dan nasehat dalam penelitian serta kemudahan dalam berkonsultasi ditengah kesibukan beliau yang sangat padat.

Menteri Kesehatan R.I melalui Direktur Politeknik Kesehatan Mataram, Ir. Muchtar Mukarim,M.Sc.Soc yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana

sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan pada Program Magister Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P.(K) dan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Sri Hajati, SH., MS. yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini.

Direktur Rumah Sakit Umum Daerah Mataram, dr. Agus Wijaya, MPH yang telah memberikan ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram.

Ketua Jurusan Analis Kesehatan Mataram, Yunan Jiwintarum, S.Si, M.Kes dan Mantan Direktur Akademi Analis Kesehatan Mataram, Drs. Djoko Soeyono, Apt yang telah memberikan dorongan, doa dan kesempatan pada penulis untuk mengikuti Program Magister.

Mantan koordinator Unit Riset Biomedik Rumah Sakit Umum Mataram, dr.Stephanus Gunawan dan Kepala instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram, dr. I Gede Palgunadi, Sp.PD, yang telah memberikan ijin, bimbingan, saran, dorongan, bantuan dan kemudahan untuk melakukan penelitian di Laboratorium instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram.

Dokter dan staf di Laboratorium instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram, dr. EY Weni Astuti Achwan, M.Kes, Drs. Zainul Muttaqin, Edy Zacharia, SKM, Putu Suryadi, S.Si, Santy Pristianingrum, S.Si, B. Lely Zainiaty, S.Si, Rina Rosalina Dwisanti dan Zaenudin yang telah memberikan dorongan, semangat, bantuan dan kemudahan dalam melakukan penelitian di Laboratorium instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram.

Staf pengajar Departemen Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr, Prof Soetjipto, dr, MS., PhD, Prof. Retno Handajani, dr, MS., PhD, Prof. Dr. Indri Safitri, dr., MS, Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS, Edhi Rianto, dr., MS, Junaidi Soetowo, dr, Sp.BK, Vixkamto Wibowo, dr, Sp.BK, Agus Budiman L, dr, Sp.BK, Tri Martini, dr, Sp.BK, Moh. Hanafi, dr, MBBS, Suwandito, dr, MS, Sudarno, dr. M.Kes, CM. Lokasari Wibowo, dr, Sp.BK, Gwenny Iksan Prabowo, dr, MS, Sutji Kuswarini, dr., M.Kes, Basukihardjo, Drs., MS, Prpto Soetowo, dr, Sp.BK, Ema Qurnianingsih, dr, Lina Lukitasari, dr, yang telah memberikan dengan ikhlas dan penuh kesabaran ilmu, bimbingan, dorongan, semangat dan berbagi pengalaman selama studi dan kariawan Departemen Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Lilik Setiati, Heri Sumantoro, Mawardi, Mustachim, Inatun Yutrlia, Koen Poedjiati, Chairul Anwar, Sodikin dan Heri Susanto, yang telah membantu penulis selama mengikuti studi.

Teman seperjuangan Fransiskus Asisi Subono, S.Si yang telah memberikan dorongan, semangat dan bantuan selama menjalankan studi.

Kawan-kawanku tersayang, dr. Nurhidayati, dr Dwi Utami Anjarwati, dr Titut Harnanik, drh Dahliatul Qosimah, Gunarti, S.Si, Anita Joeliantina, S.Kep.Ns., M.Kes, drg. Yayuk Susilawati, M.Kes, Bambang Fajar Suryadi, S.Si, MSi, Erlin Yustin Tatontos, SKM, Haerul Abdi, SKM dan Ibu Eny Hanafi yang telah memberikan dorongan, masukan, kritikan dan bantuan kepada penulis selama menyelesaikan tesis ini.

Kepada ibunda tercinta Markini dan almarhum bapak Moh. Roendun yang sejak kecil selalu memberikan dorongan, motivasi, semangat, doa serta contoh tauladan kepada penulis tentang pandangan hidup dan perjuangan hidup sehari - hari yang telah memberikan ketegaran dalam menghadapi hidup terutama disaat-saat sulit pada masa studi.

Kepada bapak dan ibu tercinta, H. Imat Barsiman dan Rutini, serta papuk tersayang H. Wahid Hasym yang telah memberikan semangat, bimbingan, dorongan dan doa selama penulis menjalani pendidikan dan sampai terselesaikannya tesis ini.

Kepada suamiku Yunan Jiwintarum, S.Si, M.Kes yang saya cintai dan hormati, yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Magister. Dengan kesabaran, toleransi, kesetiaan, dorongan, semangat dan nasehatnya terutama pada masa - masa sulit merupakan sesuatu yang sangat berarti dan membantu dalam menyelesaikan tesis ini. Kepada ananda tersayang Khovia Yuwina Selinada Harmi, terima kasih atas pengertian, perhatian, dorongan dan doanya.

Kepada saudara - saudaraku Maruni Hidayati, Achmad Fathoni, Maruni Fitriyani, Ifan Bafadhal, Wahidah Sutrisni, Agus Chunanto, Maruni Sekaryanti, Lalu, Zakaria, Maruni Widiastuti, Lalu Bagus wikrama, Indah Susanti, Rahmatullah, Evi Noviani, Kamarulhuda, Karyagus Sugandi, Wirun Dawangi, Kapti Adyani, Wagiah Fahayani, Dais Warsilah, Kadar Kencana, Zustruamin, Mulia Mandria, Salam Budiyatmo, Nurhidayati dan Nuraini yang telah memberikan doa, dorongan dan bantuan selama penulis menyelesaikan studi.

Kepada semua pihak yang penulis tidak dapat sebutkan satu persatu, penulis mengucapkan terima kasih atas segala bantuan yang diberikan sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT membalas budi baik Bapak, Ibu, saudara sekalian serta selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita sekalian. Amin.

## RINGKASAN

**DETEKSI *HELICOBACTER PYLORI* DARI SPESIMEN BLOK PARAFIN BIOPSI LAMBUNG PENDERITA DYSPEPSIA DI PROVINSI NTB DENGAN HASIL HISTOPATOLOGI NEGATIF MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* DENGAN PRIMER GEN *ureC (glmM)***

Dispepsia merupakan suatu gejala klinis dengan keluhan rasa nyeri yang berpusat pada perut bagian atas yang dapat disebabkan oleh berbagai penyebab, baik karena infeksi *Helicobacter pylori* maupun non infeksi *H. pylori*. Kebijakan terapi yang berbeda terhadap penanganan dispepsia yang disebabkan oleh infeksi *H. pylori* dan bukan *H. pylori*, menyebabkan penting dilakukan pemeriksaan *H. pylori* secara tepat dan cepat.

Pemeriksaan *H. pylori* dilakukan dengan cara non-invasif dan invasif. Pemeriksaan non-invasif contohnya *urea breath test* (UBT), pemeriksaan antigen *H. pylori* pada tinja dan uji serologi. Pemeriksaan invasif *H. pylori* dari spesimen biopsi lambung dapat dilakukan antara lain dengan test *campylobacter like organism* (CLO), kultur biopsi lambung, dan histopatologi. Sensitifitas dan spesifisitas dari teknik pemeriksaan *H. pylori* non-invasif dan invasif tersebut sangat dipengaruhi oleh densitas *H. pylori* dan perubahan morfologi *H. pylori* (spiral dan kokoid), sehingga dapat memberikan hasil pemeriksaan negatif palsu.

Pada penelitian pendahuluan, telah dilakukan pengumpulan data 177 spesimen biopsi lambung dari penderita dispepsia di provinsi NTB. Dari 177 spesimen biopsi lambung penderita dispepsia yang diperiksa dengan histopatologi, didapatkan proporsi *H. pylori* positif sebanyak 23 orang (12,99%) dan proporsi *H. pylori* negatif 154 orang (87,01%). Hasil negatif dari pemeriksaan histopatologi ini, kemungkinan disebabkan karena bentuk *H. pylori* telah mengalami perubahan menjadi kokoid dan fragmented sehingga sulit dideteksi. Diperlukan pemeriksaan lain untuk membantu pemeriksaan histopatologi dengan hasil *H. pylori* yang masih negatif, misalnya dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

*Polymerase Chain Reaction* dengan menggunakan *primer* dari daerah gen *ureC (glmM)* memiliki sensitifitas tinggi yaitu dapat mendeteksi DNA *H. pylori* sampai kadar 0,1 pg/ml dan memiliki spesifitas tinggi yaitu dapat membedakan spesies bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengan *H. pylori*, contohnya *Campylobacter jejuni* dan bakteri Gram negatif dengan urease positif, contohnya *Proteus vulgaris* dan *Proteus mirabilis*.

Berdasarkan perbedaan kebijakan dalam penanganan terapi dispepsia karena infeksi *H. pylori* dan bukan *H. pylori*, serta kelemahan yang dimiliki oleh teknik non-invasif dan teknik invasif, maka teknik PCR menggunakan *primer* gen *ureC (glmM)* dapat digunakan sebagai pemeriksaan untuk membantu mendeteksi *H. pylori*, terutama pada spesimen blok parafin penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* yang masih negatif.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik yang bertujuan untuk mendeteksi *H. pylori*, mendapatkan data proporsi hasil PCR positif *H. pylori* dan mengetahui taksiran interval proporsi hasil *H. pylori* positif dengan metode PCR menggunakan *primer* gen *ureC (glmM)* pada populasi dengan interval kepercayaan 95%. Sampel dari penelitian ini adalah 82 spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif (-) yang



diambil menggunakan “*simple random sampling*”, dengan cara diundi dari 139 spesimen.

Hasil penelitian ini menunjukkan proporsi hasil PCR positif adalah 47,6% (39/82). Hasil ini membuktikan peran pemeriksaan *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan *primer ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif, dapat meningkatkan hasil positif *H. pylori*. Taksiran interval proporsi hasil positif *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan *primer gen ureC (glmM)* pada populasi dengan interval kepercayaan 95 % adalah antara 36,75 % – 58,37 %.

Dapat disimpulkan bahwa metode PCR menggunakan *primer gen ureC (glmM)* sangat membantu untuk keperluan pemeriksaan *H. pylori* terutama dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia, dengan hasil histopatologi yang masih negatif.

## SUMMARY

**HELICOBACTER PYLORI DETECTION IN PARAFFIN BLOCK BIOPSY SPECIMEN FROM THE GUT OF DYSPEPTIC PATIENTS IN THE PROVINCE OF WEST NUSA TENGGARA WITH NEGATIVE HISTOPATHOLOGY USING POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD WITH *ureC (glmM)* GENE PRIMER**

Dyspepsia is a clinical symptom with pain focusing at the upper abdomen, which can be caused by various factors, either due to *Helicobacter pylori* or non-*H. pylori* infection. Different therapy to treat *H. pylori* and non-*H. pylori* dyspepsia leads to the importance of rapid and accurate *H. pylori* examination.

*Helicobacter pylori* examination can be undertaken either non-invasively or invasively. The non-invasive examinations are, for example, urea breath test (UBT), fecal *H. pylori* antigen examination, and serologic test. *H. pylori* invasive examination from gut biopsy specimen can be conducted by, among others, campylobacter like organism (CLO) test, gut biopsy culture, and histopathology. The sensitivity and specificity of those non-invasive and invasive *H. pylori* examination is affected much by *H. pylori* density and morphological change (spiral and coccoid), which may result in false negative outcome.

In preliminary study, we had collected data on 177 gut biopsy specimen from dyspeptic patients in the Province of West Nusa Tenggara. The results of histopathological examination to those specimen revealed that 23 persons (12.99%) had positive *H. pylori* and 154 persons (87.01%) had negative *H. pylori*. Negative results of the histopathological examination could be caused by the change of *H. pylori* shape to become coccoid and fragmented, resulting in examination difficulties. Therefore, other examinations are needed to assist the histopathological examinations with negative *H. pylori* results, such as the *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

*Polymerase Chain Reaction* with primer from *ureC (glmM)* gene region has a high sensitivity and able to detect *H. pylori* DNA up to 0,1 pg/ml. It also has a high specificity and able to differentiate bacterial species that have close relativity with *H. pylori*, such as *Campylobacter jejuni* and Gram negative bacterial with positive urease, such as *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*.

Due to different policy for the therapy of *H. pylori* and non-*H. pylori* infection-caused dyspepsia, as well as the shortcomings of non-invasive and invasive methods, PCR using *ureC (glmM)* gene primer can be applied as an examination to assist in the detection of *H. pylori*, in paraffin block specimen from dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathology.

This was an analytic observational study in order to detect *H. pylori*, to obtain data on the proportion of *H. pylori* positive PCR results, and to identify the estimation of positive *H. pylori* proportion interval with PCR method using *ureC (glmM)* gene primer in the population with confidence interval of 95%. Samples were 82 biopsy paraffin block specimens from the gut of dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathological examination results. The samples were taken using simple random sampling by drawing lot in 139 specimens.

The results of this study revealed that the proportion of positive PCR results 47,6% (39/82) from 82 gut biopsy paraffin block samples of dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathological results. This indicated that *H. pylori* examination

with PCR method using *ureC (glmM)* primer from gut biopsy paraffin block samples of dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathological results could improve the results of positive *H. pylori* examination. The interval estimation of *H. pylori* positive result proportion with PCR method using *ureC (glmM)* gene primer in the population with interval confidence of 95% was between 36.75% and 58.37%.

In conclusion, PCR method using *ureC (glmM)* gene primer can be applied to assist *H. pylori* examination, particularly from biopsy paraffin block specimens taken from the gut of dyspeptic patients with negative histopathological results.

## ABSTRAK

**DETEKSI *HELICOBACTER PYLORI* DARI SPESIMEN BLOK PARAFIN BIOPSI LAMBUNG PENDERITA DISPEPSIA DI PROVINSI NTB DENGAN HASIL HISTOPATOLOGI NEGATIF MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION DENGAN PRIMER GEN *ureC (glmM)***

Pemeriksaan *H. pylori* dilakukan dengan cara non-invasif dan invasif. Pemeriksaan non-invasif contohnya *urea breath test* (UBT), pemeriksaan antigen *H. pylori* pada tinja dan uji serologi. Pemeriksaan invasif *H. pylori* dari spesimen biopsi lambung dapat dilakukan antara lain dengan test *campylobacter like organism* (CLO), kultur biopsi lambung, dan histopatologi. Sensitifitas dan spesifisitas dari teknik pemeriksaan *H. pylori* non-invasif dan invasif tersebut sangat dipengaruhi oleh densitas *H. pylori* dan perubahan morfologi *H. pylori* (spiral dan kokoid), sehingga dapat memberikan hasil pemeriksaan negatif palsu.

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan *primer* dari daerah gen *ureC (glmM)* memiliki sensitifitas tinggi yaitu dapat mendeteksi DNA *H. pylori* sampai kadar 0,1 pg/ml dan memiliki spesifitas tinggi yaitu dapat membedakan spesies bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengan *H. pylori*, contohnya *Campylobacter jejuni* dan bakteri Gram negatif dengan urease positif, contohnya *Proteus vulgaris* dan *Proteus mirabilis*.

Telah dilakukan penelitian observasional analitik yang bertujuan mendeteksi *H. pylori*, mendapatkan data proporsi hasil PCR positif *H. pylori* dan mengetahui taksiran interval proporsi hasil *H. pylori* positif dengan metode PCR menggunakan *primer* gen *ureC (glmM)* pada populasi blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* yang masih negatif dengan tingkat kepercayaan 95 %.

Proporsi PCR positif dalam hasil penelitian ini adalah 47,6% (39/82), hasil ini membuktikan peran pemeriksaan *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan *primer ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif, dapat meningkatkan hasil positif *H. pylori*. Taksiran interval proporsi hasil positif *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan *primer* gen *ureC (glmM)* pada populasi dengan interval kepercayaan 95% adalah antara 36,75 % – 58,37 %.

Dapat disimpulkan bahwa metode PCR menggunakan *primer* gen *ureC (glmM)* sangat membantu untuk keperluan pemeriksaan *H. pylori* terutama dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia, dengan hasil histopatologi yang masih negatif.

**Kata kunci : *Helicobacter pylori*, Spesimen blok parafin biosi lambung, PCR, Primer gen *ureC (glmM)*, Histopatologi negatif.**

## ABSTRACT

### **HELICOBACTER PYLORI DETECTION IN PARAFFIN BLOCK BIOPSY SPECIMEN FROM THE GUT OF DYSPEPTIC PATIENTS IN THE PROVINCE OF WEST NUSA TENGGARA WITH NEGATIVE HISTOPATHOLOGY USING POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD WITH *ureC (glmM)* GENE PRIMER**

*H. pylori* examination can be undertaken either non-invasively or invasively. The non-invasive examinations are, for example, urea breath test (UBT), fecal *H. pylori* antigen examination, and serologic test. *H. pylori* invasive examination from gut biopsy specimen can be conducted by, among others, campylobacter like organism (CLO) test, gut biopsy culture, and histopathology. The sensitivity and specificity of those non-invasive and invasive *H. pylori* examination is affected much by *H. pylori* density and morphological change (spiral and coccoid), which may result in false negative outcome.

PCR with primer from *ureC (glmM)* gene region has a high sensitivity and able to detect *H. pylori* DNA up to 0.1 pg/ml. It also has a high specificity and able to differentiate bacterial species that have close relativity with *H. pylori*, such as *Campylobacter jejuni* and Gram negative bacterial with positive urease, such as *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*.

Analytic observational study have been done in order to detect *H. pylori*, to obtain data on the proportion of *H. pylori* positive PCR results, and to identify the estimation of positive *H. pylori* proportion interval with PCR method using *ureC (glmM)* gene primer in the population with confidence interval of 95%. Samples were 82 biopsy paraffin block specimens from the gut of dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathological examination results.

Proportion of positive PCR results 47,6% (39/82) from 82 gut biopsy paraffin block samples of dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathological results. This indicated that *H. pylori* examination with PCR method using *ureC (glmM)* primer from gut biopsy paraffin block samples of dyspeptic patients with negative *H. pylori* histopathological results could improve the results of positive *H. pylori* examination. The interval estimation of *H. pylori* positive result proportion with PCR method using *ureC (glmM)* gene primer in the population with interval confidence of 95% was between 36.75% and 58.37%.

In conclusion, PCR method using *ureC (glmM)* gene primer can be applied to assist *H. pylori* examination, particularly from biopsy paraffin block specimens taken from the gut of dyspeptic patients with negative histopathological results.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, gut biopsy paraffin block specimen, PCR, *ureC (glmM)* gene primer, negative histopathology.

## DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Lembar Pengesahan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Ringkasan .....	ix
Summary.....	xi
Abstrak.....	xiii
Abstract.....	xiv
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR SKEMA.....	xix
DAFTAR TABEL.....	xx
DAFTAR DIAGRAM .....	xxi
DAFTAR GAMBAR .....	xxii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan Umum .....	5
1.3.2 Tujuan Khusus .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Penemuan <i>H. pylori</i> .....	8
2.2 Epidemiologi <i>H. pylori</i> .....	9
2.3 Ciri Biologis, Patogenitas, Penularan dan Cara pemeriksaan <i>H. pylori</i>	10
2.3.1 Ciri Biologis <i>H. pylori</i> .....	10
2.3.1.1 Taksonomi dan karakteristik <i>H. pylori</i> .....	10
2.3.1.2 Habitat <i>H. pylori</i> .....	12
2.3.1.3 Karakteristik biokimiawi <i>H. pylori</i> .....	13
2.3.1.4 Protein <i>H. pylori</i> .....	13
2.3.1.5 Genom <i>H. pylori</i> .....	13
2.3.1.6 Diversitas <i>H. pylori</i> .....	16
2.3.2 Patogenesis kelainan lambung akibat infeksi <i>H. pylori</i> .....	17
2.3.3 Penularan <i>H. pylori</i> .....	18
2.3.4 Pemeriksaan <i>H. pylori</i> .....	19
2.3.4.1 Pemeriksaan <i>non - invasive test</i> .....	19
2.3.4.1.a UBT .....	19
2.3.4.1.b Pemeriksaan <i>H. pylori stool antigen (HPSA)</i> .....	20
2.3.4.1.c Pemeriksaan serologi .....	21
2.3.4.2 Pemeriksaan <i>invasive test</i> .....	23
2.3.4.2.a RUT ( <i>Rapid Urea Tes</i> ) atau CLO ( <i>Campylobacter Like Organism</i> ) .....	23
2.3.4.2.b Kultur <i>H. pylori</i> .....	24
2.3.4.2.c Histopatologi biopsi lambung .....	26
2.3.4.2.d Pemeriksaan <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	27
2.4 Spesimen Blok Parafin Biopsi Lambung .....	28
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	30
2.5.1 Prinsip dasar PCR .....	31
2.5.2 Faktor yang menentukan keberhasilan PCR .....	34
2.5.3 Keunggulan PCR .....	37
2.6 Elektroforesis .....	41
2.6.1 Tinjauan umum elektroforesis .....	41
2.6.2 Elektroforesis gel agarose .....	41

<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konseptual .....	43
3.2 Alur Kerangka Konseptual .....	46
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Rancangan Penelitian .....	47
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel .	47
4.2.1 Populasi penelitian .....	47
4.2.2 Sampel penelitian .....	48
4.2.3 Besar sampel penelitian .....	48
4.2.4 Teknik pengambilan sampel .....	49
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	49
4.3.1 Variabel penelitian .....	49
4.3.2 Definisi operasional .....	49
4.4 Bahan Penelitian .....	50
4.5 Instrumen Penelitian .....	52
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	53
4.6.1 Lokasi penelitian .....	53
4.6.2 Waktu penelitian .....	53
4.7 Prosedur Pengambilan Data .....	54
4.7.1 Tahapan kegiatan untuk memperoleh data .....	54
4.7.2 Kerangka operasional penelitian .....	58
4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data .....	59
<b>BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN</b>	
5.1 Data Penelitian .....	60
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian .....	63
5.2.1 Hasil PCR dengan <i>primer</i> gen <i>ureC (glmM)</i> DNA <i>H. pylori</i> .....	63



## BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Deteksi <i>H. pylori</i> menggunakan metode PCR dengan primer gen <i>ureC</i> ( <i>glmM</i> ) pada sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi <i>H. pylori</i> negatif .....	71
6.2 Keterkaitan umur dan jenis kelamin dengan dispepsia karena infeksi <i>H. pylori</i> dengan hasil PCR positif .....	76
6.3 Keterkaitan kesimpulan pemeriksaan histopatologi dengan infeksi <i>H. pylori</i> .....	78

## BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan .....	81
7.2 Saran .....	81

DAFTAR PUSTAKA.....	83
LAMPIRAN.....	89

## DAFTAR SKEMA

	Halaman
Skema 3.1 Alur Kerangka konseptual penelitian.....	46
Skema 4.1 Kerangka operasional penelitian .....	55

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kadar gel agarose untuk pemeriksaan yang efisien.....	42
Tabel 4.1 Jadwal penelitian.....	53
Tabel 5.1 Frekuensi sampel dengan diagnosis klinik dispepsia berdasarkan kelompok umur .....	61
Tabel 5.2 Frekuensi sampel dengan diagnosis klinik dispepsia berdasarkan Jenis kelamin. ....	61
Tabel 5.3 Frekuensi sampel dengan diagnosis klinik dispepsia berdasarkan kesimpulan pemeriksaan histopatologi .....	62
Tabel 5.4 Proporsi hasil positif <i>H. pylori</i> menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC (glmM)</i> pada sampel berdasarkan umur.....	62
Tabel 5.5 Proporsi hasil positif <i>H. pylori</i> menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC (glmM)</i> pada sampel berdasarkan jenis kelamin.....	66
Tabel 5.6 Proporsi hasil positif <i>H. pylori</i> menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC (glmM)</i> pada sampel berdasarkan kesimpulan pemeriksaan histopatologi.....	68
Tabel 5.7 Taksiran interval proporsi hasil positif DNA <i>H. pylori</i> menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC (glmM)</i> .....	69

## DAFTAR DIAGRAM

	Halaman
Diagram 5.1 Proporsi hasil positif <i>H. pylori</i> menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC (glmM)</i> pada sampel berdasarkan umur.....	65
Diagram 5.2 Proporsi hasil positif <i>H. pylori</i> menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC (glmM)</i> pada sampel berdasarkan jenis kelamin.....	67

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi <i>H. pylori</i> bentuk spiral, batang bengkok, dan kokoid ...	12
Gambar 2.2 Reaksi hidrolisis urea .....	13
Gambar 2.3 Genom <i>H. pylori</i> .....	15
Gambar 2.4 Pemeriksaan <i>H. pylori</i> dengan UBT.....	20
Gambar 2.5 Pemeriksaan <i>H. pylori</i> dengan HPSA .....	21
Gambar 2.6 Kit Elisa <i>H.pylori</i> Indonesia ( <i>Pylorindo EIA</i> ) .....	21
Gambar 2.7 <i>H. pylori</i> teknik ICT ( <i>Immunochromatographi Tes</i> ) .....	22
Gambar 2.8 Pemeriksaan <i>H. pylori</i> dengan dipstick .....	22
Gambar 2.9 RUT ( <i>Rapid urea test</i> ) atau test CLO ( <i>Campylobacter like organism</i> ) untuk pemeriksaan <i>H. pylori</i> .....	24
Gambar 2.10 Alat endoskopi , gastritis , morfologi mikroskopis <i>H. pylori</i> dan koloni <i>H. pylori</i> pada media BAP.....	25
Gambar 2.11 Pemeriksaan <i>H. pylori</i> dengan Histopatologi .....	26
Gambar 2.12 Jumlah rantai DNA secara eksponensial dalam 35 siklus PCR .....	32
Gambar 2.13 Tahapan teknik PCR .....	33
Gambar 4.1 Kondisi amplifikasi PCR menggunakan <i>primer</i> gen <i>ureC (glmM)</i> ...	54
Gambar 5.1 Hasil visualisasi PCR DNA <i>H. pylori</i> .....	64

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Pembuatan reagen penelitian .....	89
Lampiran 2 Data sampel blok parafin biopsi lambung dari penderita dispepsia.	70
Lampiran 3 Hasil PCR <i>H. pylori</i> positif dengan primer gen <i>ureC</i> ( <i>glmM</i> ) dari sampel blok parafin biopsi lambung dari penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi negatif.....	92
Lampiran 4 Proporsi hasil deteksi DNA <i>H. pylori</i> positif menggunakan PCR dengan primer gen <i>ureC</i> ( <i>glmM</i> ) .....	95
Lampiran 5 Perkiraan ( <i>estimate</i> ) hasil PCR positif pada populasi .....	96
Lampiran 6 Foto Penelitian.....	97
Lampiran 7 Surat ijin pelaksanaan penelitian.....	99
Lampiran 8 Surat keterangan pelaksanaan penelitian .....	100

## DAFTAR SINGKATAN

- ATGC : Adenin, Timin, Guanin, Sitosin
- ATCC : *American Type Culture Collection*
- BAP : *Blood Agar Plate*
- bp. : *Basepair*
- CAS : *Capillary Assay Solution*
- CagA : *Cytotoxin Associated Antigen*
- CLO : *Campylobacter - like organism*
- CSS : Cairan Serebrospinal
- CO<sub>2</sub> : *Carbon dioksida*
- d-NTP : Deoksiribonukleotida Trifosfat
- dATP : Deoksi-Adenosin Trifosfat
- dGTP : Deoksi-Guanosin Trifosfat
- dCTP : Deoksi- Cytosin Trifosfat
- dTTP : Deoksi- Timidin Trifosfat
- DNA : *Deoxyribo Nucleic Acid*
- DQ : *Diff-Quickk*
- EDTA : *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*
- ELISA : *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- ELP : Elektroforesis
- FLS : *Fibrile Like Strand*
- glmM : *Glucosamine Mutase*
- HCl : *Hydrogen Chloride*
- H. pylori* : *Helicobacter pylori*

- HPSA : *Helicobacter pylori Stool Antigen*
- H<sub>2</sub>S : Hidrogen Sulfida
- IARC : *International Agency For Research On Cancer*
- ICT : *Immuno Chromatography Test*
- IceA* : *Induced by contact with epithelium gene*
- IL-8 : *Interleukin - 8*
- kbp : *Kilo Base Pair*
- kDa : *Kilo Dalton*
- KCl : *Kalium Chlorida*
- LPS : Lipopolisakarida
- MALT : *Mucosa- associated lymphoid tissue*
- Mb : *Mega Base*
- Mg : Magnesium
- MgCl<sub>2</sub> : Magnesium klorida
- MG : *Modified Giemsa*
- mM : *Milli Molar*
- NAD : Nikotinamid Adenin Dinukleotida
- NaOH : Natrium Hidroksida
- NSAID: *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*
- NTB : Nusa Tenggara Barat
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- pg : piko gram
- RNA : *Ribo Nucleic Acid*
- RUT : *Rapid Urea Test*
- RSUD : Rumah Sakit Umum Daerah



SDS - PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*

SOD : *Superoxide Dismutase*

SSA : *Species Spesific Antigen*

TBE : *Tris Borat EDTA*

U : *Unit*

UBT : *Urea Breath Test*

$\mu\text{g}$  : *Mikrogram*

$\mu\text{M}$  : *mikromolar*

UNG : *Uracil N-glycosilase*

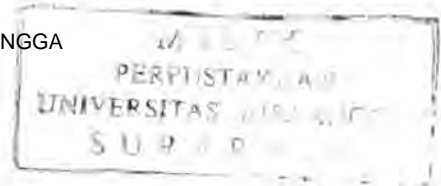
*VacA* : *Vacuolating cytotoxin*

WHO : *World Health Organization*

WS : *Warthin- Starry*

# **BAB I**

# **PENDAHULUAN**



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Dispepsia merupakan suatu kelainan klinik dengan keluhan rasa nyeri yang berpusat pada perut bagian atas. Kelainan klinik yang termasuk dalam dispepsia antara lain adalah gastritis akut, gastritis kronis, ulkus peptikum, ulkus duodenum, *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT) limfoma lambung, dan kanker lambung. Faktor penyebab terjadinya dispepsia antara lain adalah penggunaan obat-obatan seperti misalnya *nonsteroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) dan glukokortikoid, alkohol, rokok, stres, *shock*, pengosongan lambung, dan infeksi *Helicobacter pylori*. Limapuluh sampai enampuluh persen dispepsia disebabkan oleh infeksi *H. pylori* dan 21% kasus dispepsia akan berlanjut menjadi ulkus peptikum (Yuan *et al.*, 2006; Lyana, 2008).

*Helicobacter pylori* adalah bakteri pleomorfik Gram negatif yang dapat berbentuk huruf "S" atau spiral, kurva dan kokoid. Kuman ini pertama kali ditemukan pada tahun 1983 oleh Warren dan Marshall pada sediaan histologi lambung penderita gastritis kronik aktif, dan kemudian mendapat pengakuan sebagai penyebab dari ulkus peptikum, ulkus duodenum dan kanker lambung (Marshall dan Warren, 1984 ; Rathbone dan Heatley, 1989 ; Logan dan Walker, 2001).

Data epidemiologi menunjukkan adanya hubungan antara radang lambung kronis dengan transformasi maligna jaringan radang. Suatu studi epidemiologik multisenter dari " *The Eurogast Study Group* " menyimpulkan bahwa risiko terkena kanker lambung pada populasi dengan infeksi *H. pylori* 100 % adalah 6 kali lipat dibanding dengan populasi tanpa infeksi *H. pylori* (Forman *et al.*, 1991; Indrawan, 1995 ; Coussens dan Werb, 2002; Leite *et al.*, 2005).

Prevalensi *H. pylori* sangat bervariasi antara negara – negara berkembang (80-90%) dan negara – negara maju (< 40 %). Variasi tersebut disebabkan terutama karena faktor sosio – ekonomi (Malaty dan Graham,1994; Feidman, 2001).

Prevalensi infeksi *H. pylori* di Indonesia yang merupakan hasil penelitian menggunakan metode seroepidemiologik pada tahun 1995 berkisar antara 36-41,6 % dan tahun 2000 sebesar 53,8 % (Rani,2002). Di Mataram, Nusa Tenggara Barat (NTB) tingginya angka penderita infeksi *H. pylori* telah dilaporkan oleh Soewignjo *et al*,(1993) dari penelitian menggunakan serum untuk mendeteksi antibodi dari *H. pylori* pada 392 orang donor sehat di Mataram, 134 penderita rawat inap di bangsal penyakit dalam Rumah Sakit Umum (RSU) Mataram, dan 100 orang ibu hamil di RSU Mataram. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil anti *H. pylori* positif 54,3 % pada donor sehat, 51,5 % pada penderita rawat inap di bangsal penyakit dalam RSU Mataram dan 63 % pada ibu hamil. Wenny *et al*,(1994) juga melaporkan bahwa 64,1 % karyawan RSU Mataram mempunyai anti *H. pylori* positif.

Pemeriksaan infeksi *H. pylori* dapat dilakukan dengan cara non-invasif dan invasif. Pemeriksaan non-invasif antara lain *urea breath test* (UBT), pemeriksaan antigen *H. pylori* pada tinja (HPSA) dan uji serologi. Pemeriksaan UBT yang berdasarkan prinsip enzimatik dan radioaktif sangat mahal, memerlukan persyaratan yang sulit, dan dapat menunjukkan hasil negatif palsu. Pemeriksaan antigen pada tinja harganya relatif mahal, memerlukan waktu yang lama dan dipengaruhi oleh jumlah *H. pylori* dalam tinja. Pemeriksaan serologi *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Immunochromatographic Test* (ICT), *dipstick* dan *latex agglutination* untuk deteksi anti-*H. pylori* dalam serum memerlukan reagen impor yang menggunakan antigen *H. pylori* dari negara pembuatnya. Antigen *H. pylori* dari negara pembuat kit tersebut kemungkinan tidak sesuai di negara lain, sehingga dapat

memberikan hasil yang berbeda. Hal ini disebabkan keragaman *H. pylori* yang sangat besar, sehingga menimbulkan keragaman respon imunologik pada tubuh penderita (Hua *et al.*, 1998 ; Rotimi *et al.*, 2000).

Pemeriksaan invasif *H. pylori* dari spesimen biopsi lambung dapat dilakukan antara lain dengan test *campylobacter like organism* (CLO), kultur biopsi lambung, dan histopatologi. Sensitifitas dari ketiga cara ini sangat dipengaruhi oleh densitas dan perubahan morfologi *H. pylori* (Tokunaga *et al.*, 2000 ; Logan dan Walker, 2001).

Pemeriksaan invasif lainnya adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) karena menggunakan sampel biopsi lambung. Teknik ini dipakai untuk melipatgandakan DNA/RNA *in vitro* secara enzimatis dengan adanya enzim polimerase termostabil di dalam suatu mesin pengubah suhu (*thermo cycler*) (White *et al.*, 1993; Purwanta dkk, 1999; Yuwono, 2006).

*Polymerase chain reaction* dapat digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA secara *eksponensial* dalam waktu singkat, selain itu dapat membantu para klinisi dan ahli epidemiologi untuk menegakkan diagnosis kasus-kasus penyakit infeksi yang sulit dengan tepat, sehingga dapat dilakukan tindakan pengobatan dan pencegahan secara dini. PCR mampu mendeteksi 1-5 *copy* DNA ( $\leq 10^3$  CFU/ml atau  $< 2,5 - 3,5$  ug/ml DNA), tahapan kerja cukup sederhana dan memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (94-100 %) (Cherian *et al.*, 1998 ; Soewondo, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian Lu *et al.*, (1999) dengan membandingkan 5 metode PCR yang menggunakan *primer* dari daerah gen *16S rRNA*, *primer* gen *random kromosom squence*, *primer* gen *species-spesific antigen 26-kDa* (SSA), *primer* gen *ureC* (*glmM*) dan *primer* gen *ureA* untuk mendeteksi *H. pylori* pada jaringan lambung, 26-kDa (SSA), *primer* gen *ureC* (*glmM*) dan *primer* gen *ureA* untuk mendeteksi *H. pylori* pada jaringan lambung, didapatkan hasil yang

menunjukkan bahwa penggunaan *primer* dari daerah gen *ureC* (*glmM*) walaupun merupakan metode PCR *single-step*, tetapi mampu mendeteksi DNA *H. pylori* sampai kadar 0,1 pg/ml, dan mengusulkan penggunaan PCR dengan *primer* dari daerah gen *ureC* (*glmM*) untuk penerapan deteksi *H. pylori* dalam spesimen klinik (Lu *et al.*, 1999).

Gen *ureC* (*glmM*) hanya ditemukan pada *H. pylori* dan tidak ada pada bakteri urease positif yang lain sehingga untuk mendiagnosis *H. pylori* dengan menggunakan *primer ureC* (*glmM*) tidak menunjukkan hasil positif palsu atau negatif palsu (Lage *et al.*, 1995).

Penelitian yang dilakukan pada 198 sampel biopsi jaringan lambung segar yang didapat dengan cara endoskopi dari penderita dispepsia di Mataram yang diperiksa dengan PCR mendapatkan hasil *H. pylori* positif sebanyak 85 sampel (42,9%), ini menunjukkan bahwa *H. pylori* merupakan salah satu penyebab penting dispepsia di Mataram dan perlu penanganan yang serius (Soewignjo dkk, 2007).

Pemeriksaan histopatologi dapat digunakan untuk mendiagnosis keberadaan *H. pylori* dan kelainan mukosa lambung akibat infeksi *H. pylori*. Sediaan histopatologi dalam bentuk blok parafin dapat digunakan pula sebagai bahan untuk pemeriksaan secara PCR. DNA *H. pylori* dari sediaan histopatologi dalam bentuk blok parafin tidak rusak selama proses infiltrasi parafin pada suhu 61°C (Price, 1996; Koehler *et al.*, 2003)

Hasil pemeriksaan *H. pylori* secara histopatologi bersifat subyektif karena pemeriksaan ini ditentukan oleh ukuran biopsi, ketepatan dalam lokasi penyayatan jaringan, jenis pewarnaan jaringan, jenis pewarnaan bakteri dan bentuk kokoid *H. pylori* lebih sulit dideteksi. Pada penelitian pendahuluan, telah dilakukan

pengumpulan data 177 infeksi *H. pylori* yang diperiksa secara histopatologi menggunakan pewarnaan *Giemsa* dari biopsi lambung penderita dispepsia di provinsi NTB, pada bulan Agustus 2004 sampai dengan Agustus 2007. Dari 177 sampel tersebut, didapatkan *H. pylori* positif sebanyak 23 orang (12,99%). Rendahnya hasil pemeriksaan histopatologi ini memerlukan pemeriksaan lain untuk membantu konfirmasi hasil diagnosis *H. pylori*, misalnya dengan teknik PCR menggunakan primer *ureC (glmM)*.

Berdasarkan uraian latar belakang permasalahan di atas, maka perlu dilakukan penelitian " Deteksi *Helicobacter pylori* dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di Provinsi NTB dengan hasil histopatologi negatif menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* dengan primer gen *ureC (glmM)*".

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang permasalahan tersebut maka rumusan masalah yang dikemukakan adalah :

Berapa besarkah proporsi hasil positif pada deteksi *H. pylori* dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di provinsi NTB dengan hasil histopatologi negatif menggunakan metode PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui proporsi hasil positif pada deteksi *H. pylori* dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di provinsi NTB dengan hasil histopatologi negatif menggunakan metode PCR dengan primer gen *ureC (glmM)*.

### 1.3.2 Tujuan khusus

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendeteksi *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan *primer* gen *ureC* (*glmM*) dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di Provinsi NTB, dengan hasil histopatologi negatif.
2. Mendapatkan data proporsi hasil PCR positif *H. pylori* menggunakan *primer* gen *ureC* (*glmM*) dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di Provinsi NTB, dengan hasil histopatologi negatif.
3. Melakukan perkiraan (*estimate*) hasil PCR *H. pylori* positif dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di Provinsi NTB, dengan hasil histopatologi negatif.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Teoritis

Hasil penelitian ini memberikan manfaat teoritis berupa :

1. Melengkapi pengetahuan tentang proporsi infeksi *H. pylori* khususnya di Provinsi NTB.
2. Memberikan sumbangan tambahan pengetahuan mengenai pemeriksaan *H. pylori* secara biologi molekuler menggunakan metode PCR dengan *primer* gen *ureC* (*glmM*) dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil histopatologi negatif.



### 1.4.2 Praktis

Adanya penemuan cara deteksi *H. pylori* dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia, maka penelitian ini mempunyai manfaat praktis sebagai berikut :

1. Diharapkan dapat memberikan gambaran yang lebih tepat mengenai proporsi infeksi yang disebabkan oleh *H. pylori*, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai upaya peningkatan kesehatan dalam mencegah penderita dispepsia di Provinsi NTB.
2. Dapat dipertimbangkan, di kemudian hari deteksi genom *H. pylori* dari penderita dispepsia dengan metode PCR menggunakan *primer* gen *ureC* (*glmM*) dapat membantu pemeriksaan *H. pylori* terutama dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia, dengan hasil histopatologi negatif.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Sejarah Penemuan *H. pylori*.

Adanya kuman berbentuk spiral dalam lambung manusia telah dilaporkan sejak tahun 1906 oleh Kreinitz, tetapi laporan tersebut kurang mendapat perhatian karena bertentangan dengan dogma yang banyak dianut oleh para dokter saat itu, bahwa tidak ada kuman yang dapat bertahan hidup di dalam lambung yang suasananya asam (Soewignjo, 2002). Tahapan perkembangan riset sampai tahun 1910 masih didominasi oleh konsep bahwa asam lambung berfungsi menjaga lumen tetap steril dan dapat menyebabkan lesi mukosa lambung. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan “*no acid, no ulcer*” dari Schwarz. Awal tahun 1875 ilmuwan anatomi dari Jerman menemukan kolonisasi bakteri berbentuk spiral pada mukosa lambung manusia, tetapi bakteri tersebut tidak dapat ditumbuhkan pada media kultur. Pada tahun 1924 Luck dan Seth melaporkan bahwa pada lambung manusia terdapat banyak aktifitas urease yang akan menghilang setelah pengobatan antibiotika, namun hubungan ensim tersebut dengan mikroorganisme spiral lambung belum diketahui sampai tahun 1982 (Konturek, 2003; Blaser, 2005).

Pada tahun 1983 Warren, seorang ahli patologi dan Marshall, seorang residen penyakit dalam di rumah sakit Perth Australia yang mempelajari bahan-bahan biopsi endoskopik yang berasal dari penderita-penderita gastritis kronik aktif dan ulkus duodeni melaporkan adanya kuman Gram negatif berbentuk spiral pada sediaan-sediaan tersebut. Kuman yang ditemukan tersebut dinamai *Campylobacter pyloridis*, dan kemudian diubah menjadi *Campylobacter pylori*. Selanjutnya, pada tahun 1984 Warren dan Marshall berhasil menemukan cara untuk membiakkan kuman tersebut,

yang diketahui kuman tersebut hanya dapat hidup pada suasana *mikroaerofilik* (Marshall dan Warren, 1984).

Penelitian yang dilakukan kemudian menunjukkan bahwa bahwa *Campylobacter pylori* mempunyai beberapa sifat yang berbeda dengan kuman-kuman genus *Campylobacter* pada umumnya. Beberapa perbedaan yang terlihat pada genus *Helicobacter* antara lain adalah adanya *flagella* berselubung (*sheated*) dan adanya kemampuan untuk memproduksi urease. Genus *Campylobacter* pada umumnya memiliki *flagella* yang tak berselubung dan tak memproduksi urease. Berdasarkan temuan-temuan tersebut, kuman ini akhirnya dinamai *H. pylori* (Marshall dan Warren, 1984).

## 2.2 Epidemiologi *H. pylori*

Data epidemiologi menunjukkan adanya hubungan antara radang lambung kronis dengan transformasi maligna pada jaringan radang, dan *H. pylori* telah diidentifikasi sebagai salah satu faktor etiologi dari kanker lambung tersebut. Pada tahun 1994 *International Agency for Research on Cancer* (IARC) dari *World Health Organization* (WHO) memasukkan *H. pylori* sebagai karsinogen tipe 1 (Forman *et al.*, 1991 ; Coussens dan Werb, 2000 ; Leite *et al.*, 2005).

Prevalensi *H. pylori* sangat bervariasi di antara negara-negara berkembang (80-90%) dan negara-negara maju (< 40 %). Variasi tersebut disebabkan terutama oleh faktor sosio-ekonomi (Malaty dan Graham, 1994; Feidman, 2001).

Prevalensi infeksi *H. pylori* di Nigeria rata-rata adalah 78%, di Amerika Serikat pada penderita berumur 40 - 50 tahun rata-rata 50%, di Vietnam rata-rata 80%. Beberapa penelitian melaporkan bahwa, infeksi *H. pylori* didapatkan pada 90% - 100% kasus dengan ulkus duodeni, lebih dari 75% kasus dengan ulkus lambung, dan

50% – 60% kasus dengan dispepsia non ulkus. Frekuensi infeksi *H. pylori* pada gastritis kronik sekitar 50% - 96% (Tytgat *et. al.*, 1990).

Prevalensi infeksi *H. pylori* di Indonesia pada tahun 1995 seperti yang terlihat dari hasil beberapa penelitian seroepidemiologik adalah antara 36-41,6 %. Pada tahun 2000, dari populasi sebesar 7902 orang didapati prevalensi sebesar 53,8% (Rani,2002). Di Mataram, NTB tingginya angka penderita *H. pylori* telah dilaporkan oleh Soewignjo dkk, (1993). Penelitian seroepidemiologik yang dilakukannya di RSUD Mataram mengungkapkan bahwa 54,3 % dari 392 donor sehat, 51,5 % dari 134 penderita rawat-inap di bangsal penyakit dalam, dan 63 % dari 100 orang ibu hamil memiliki anti *H. pylori* positif. Wenny dkk, (1994) melaporkan bahwa 64,1 % karyawan RSUD Mataram memiliki anti *H. pylori* positif. Pemeriksaan PCR mendapati hasil *H. pylori* positif pada 85 sampel (2,9 %) dari 198 sampel biopsi segar jaringan lambung penderita-penderita dispepsia di Mataram yang diambil dengan cara endoskopi (Soewignjo dkk., 2007). Ini menunjukkan bahwa *H. pylori* merupakan penyebab penting dispepsia di Mataram, yang memerlukan penanganan serius.

### **2.3 Ciri Biologis, Patogenitas, Penularan dan Cara Pemeriksaan *H. Pylori*.**

#### **2.3.1 Ciri biologis *H. pylori***

Ciri biologis *H. pylori* meliputi taksonomi, karakteristik, habitat, protein, genom, dan diversitas antigen adalah sebagai berikut :

##### **2.3.1.1 taksonomi dan karakteristik *H. pylori* .**

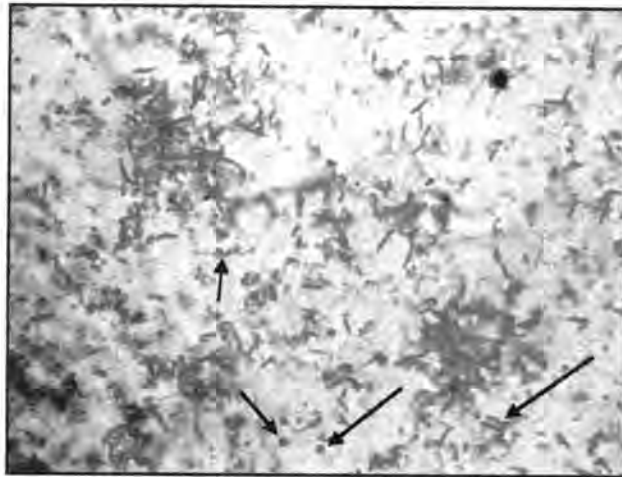
Taksonomi *H. pylori* termasuk dalam :

- Kingdom : Prokariota
- Divisi : *Bacteria*
- Subdivisi : *Proteobacteria*

Kelas : *Epsilonproteobacteria*  
Ordo : *Campylobacteriales*  
Famili : *Helicobacteriaceae*  
Genus : *Helicobacter*  
Spesies : *Helicobacter pylori*.

(Marshall dan Warren, 1984; Holt *et al.*, 1994)

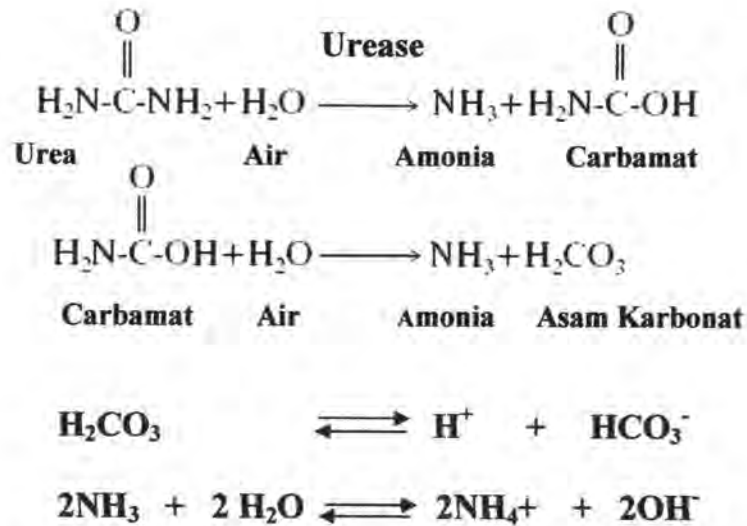
Sampai saat ini telah diketahui adanya 20 spesies yang merupakan anggota dari genus *Helicobacter*, dan *H. pylori* merupakan spesies yang ditemukan pada mukosa lambung manusia. Bakteri ini bersifat Gram negatif, dengan panjang rata-rata 2,9  $\mu\text{m}$  (3 –5  $\mu\text{m}$ ), berdiameter 0,8  $\mu\text{m}$  (0,5–1  $\mu\text{m}$ ) dilapisi selubung (mantel) tipis, dengan 4 – 5 buah flagella berdiameter 30 – 35 nm sepanjang 3 –5  $\mu\text{m}$  yang memiliki *bulbus* di ujungnya. Bakteri ini bersifat *pleomorfik* karena dapat berbentuk huruf “S” atau spiral, bentuk kurva dan bentuk kokoid. Pertumbuhannya membutuhkan suasana *mikroaerofilik*. Gambaran morfologis bentuk bakteri ini dapat dilihat pada gambar 2.1. Pada keadaan yang kurang baik, *Helicobacter* akan berubah menjadi bentuk kokoid yang dapat dijumpai misalnya pada kultur yang sudah lama atau pada populasi kuman yang mendapatkan stresor seperti misalnya akibat pemberian antibiotika atau pada populasi kuman yang hidup di lingkungan aerobik. Bentuk kokoid ini tidak menghasilkan enzim urease sehingga bisa menghasilkan hasil negatif palsu pada test diagnosis *H. pylori* yang menggunakan prinsip reaksi enzimatik urease, seperti misalnya antara lain CLO, RUT dan UBT (Marshall dan Warren, 1984; Dunn *et al.*, 1997; Kusters *et al.*, 1997; Jekti, 2003 ; Cesar *et al.*, 2005).



Gambar 2.1 Gambar morfologi *H. pylori* bentuk spiral, batang bengkok dan kokoid dari kultur *H. pylori* pada media BAP menggunakan pewarnaan Giemsa (Dikutip dari : Iswidhani dan Jiwintarum,2007)

### 2.3.1.2 habitat *H. pylori*

*H. pylori* adalah bakteri ekstraseluler dan dikenal sebagai bakteri penghuni lambung, tepatnya pada sel epitel mukosa antrum dari lambung. Kemampuan bakteri ini untuk dapat tinggal di lambung disebabkan oleh enzim urease yang dihasilkannya, yang memecah urea menjadi amonia dan *carbamate*, yang selanjutnya berubah menjadi amonia dan asam karbonat. Dalam larutan, asam karbonat dan dua molekul amonia yang dilepas akan mencapai kondisi keseimbangan dengan bentuk pengurangan proton dan penambahan proton. Hasil akhir dari reaksi ini akan meningkatkan pH. Reaksi lengkap hidrolisis urea oleh enzim urease dapat dilihat pada gambar 2.2. Amonia berfungsi sebagai *buffer* bagi *H. pylori* dalam menghadapi pH asam lambung yang rendah, sehingga *H. pylori* dapat bertahan hidup dalam lambung dan menyebabkan kerusakan jaringan mukosa, mengakibatkan terjadinya radang. Radang tersebut menyebabkan terkumpulnya nutrien yang berguna sebagai bahan makanan untuk *H. pylori* (Moblely *et al*,1995).



Gambar 2.2 Reaksi Hidrolisis urea (dikutip dari : Mobley *et al.*, 1995)

Infeksi *H. pylori* pada lambung terjadi melalui 3 tahapan, yaitu tahap pelekatan, tahap pengikatan, dan tahap penetrasi. Pada tahap pelekatan terjadi kontak dengan sel target melalui *glikokaliks*, yang selanjutnya menghancurkan selaput permukaan mikrovili yang berisi granula mukoid. Tahap pengikatan dilakukan dengan menggunakan *fibril-like strand (FLS)* yang juga disebut *pedestal*. Tahap penetrasi dimulai dengan perlekatan kuman pada sel. Perlekatan *H. pylori* pada sel epitel lambung terjadi dengan tiga cara, yaitu perlekatan *pedestal*, fusi membran dan hubungan filamen. Bentuk spiral menggunakan *pedestal* dan fusi membran untuk melakukan pelekatan pada sel epitel lambung, sedangkan bentuk kokoid melekat dengan hubungan filamen (Dunn *et al.*, 1997 ; Bodger dan Crabtree, 1998).

Bakteri *H. pylori* hanya dapat hidup dan membentuk koloni pada sel-sel epitel mukosa lambung. Kolonisasi *H. pylori* didapatkan pada daerah *duodenum*, umumnya pada daerah *metaplasia* sel lambung ke *duodenum*. Karena itu kolonisasi bakteri *H.*

*pylori* dapat terjadi di bagian saluran pencernaan mana saja asalkan ada *metaplasia* sel lambung, termasuk pada *oesophagus* (Morgan dan Leunk, 1989).

#### 2.3.1.3 karakteristik biokimiawi *H. pylori*

*Helicobacter pylori* menunjukkan reaksi positif terhadap oksidase, katalase, nitrat reduktase dan urease, tetapi bereaksi negatif atau tidak memfermentasi glukosa, maltosa, laktosa, manitol dan sukrosa. *H. pylori* juga tidak membentuk indol dari triptofan dan tidak memproduksi H<sub>2</sub>S dari *triple sugar iron* (Jekti, 2003; Fiche, 2007).

Menurut Mori *et al* (1997) bakteri *H. pylori* memiliki aktivitas *superoxide dismutase* (SOD) yang terdeteksi pada supernatan biakan cair setelah 1 jam inkubasi dalam suasana *mikroaerofilik*.

#### 2.3.1.4 protein *H. pylori*

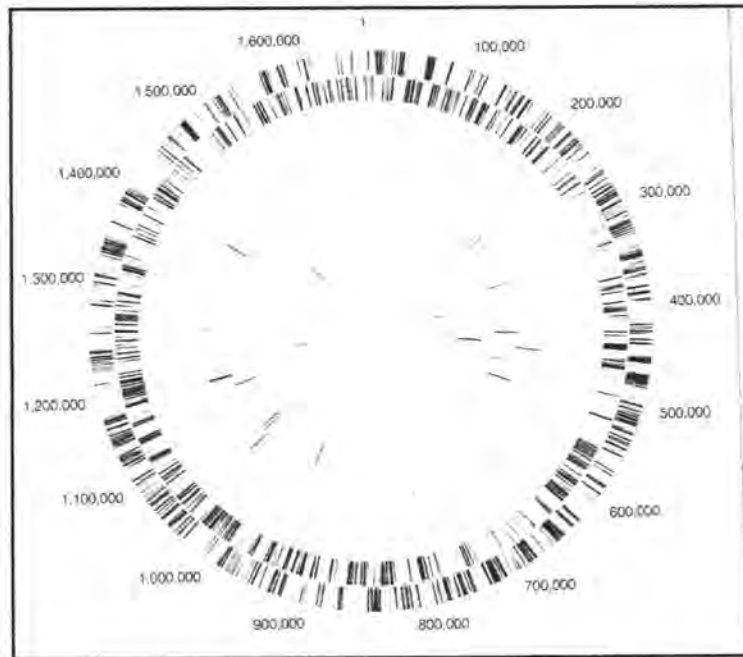
Pearson *et al* dalam Kist (1991) mendapatkan pola protein yang sama pada semua galur *H. pylori* yang dideteksi dengan *SDS – PAGE*, dan pita protein yang dominan adalah 13 kDa, 14 kDa, 21 kDa, 25 kDa, 29 kDa, 39kDa, 50 kDa, 61 kDa, 62 kDa, 87 kDa dan 120 kDa. Dari pita-pita tersebut terdapat pita-pita yang spesifik, seperti misalnya pita-pita 20 kDa protein *CagA*, 87 kDa protein *VacA*, 29 kDa protein urease A, 61 kDa protein urease B dan 13 kDa protein *ureC*. Menurut Marchetti *et al* (1995), *H. pylori* yang mempunyai kemampuan untuk dapat menimbulkan ulkus peptikum ataupun keganasan lambung adalah kuman yang mampu membentuk *vacuolating cytotoxin* (*VagA*) dan antigen yang berkaitan dengan sitotoksin, *cytotoxin associated antigen* (*CagA*).

#### 2.3.1.5 genom *H. pylori*

Genom *H. pylori* menunjukkan peranan penting *H. pylori* sebagai bakteri patogen pada manusia serta memungkinkan adanya variasi mekanisme antigenik



(Logan dan Walker,2001 ; Jawet *et al*, 1996). Gambaran bentuk genom *H. pylori* dapat dilihat pada gambar 2.3



Gambar 2.3 Gambar genom *H. pylori* (dikutip dari : Logan and Walker,2001)

Genom *H.pylori* memiliki ukuran antara 1,667 – 1,736 Mb, mengandung 1.590 “coding sequence” dengan bentuk sirkuler beruntai tunggal. Duplikasi DNA dimulai pada suatu tempat spesifik pada DNA *H. pylori* yang dikenal sebagai titik mula penggandaan (*origin of replication*). Di dalam genom *H. pylori* terdapat gen *ureC* (*glmM*) yang dapat digunakan untuk mendeteksi *H. pylori* spesifik. Gen *ureC* (*glmM*), dengan panjang 1.338 bp, terletak pada urutan nukleotida 76447...77784. Gen ini tidak terlibat dalam aktifitas enzim urease namun menyandi enzim fosfoglukosamin mutase yang berfungsi mengkatalisis konversi *glukosamine-6-phosphate* menjadi *glukosamine-1-phosphate*, yang kemudian diubah menjadi *UDP-N-acetylglukosamine*, yang selanjutnya menghasilkan *N-acetylglukosamine* yang

merupakan *prekursor* sitoplasmik pada peptidoglikan dinding sel dan bagian luar lipopolisakarida bakteri *H. pylori*. Selain itu fungsi molekuler dari enzim fosfoglukosamin mutase adalah mengkatalisis reaksi-reaksi *isomerisasi* dalam sel dan merupakan bagian yang penting untuk pertumbuhan sel (De Reuse *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997; GLMM\_HELPY, 2007).

Nama gen *ureC* telah diusulkan untuk diubah menjadi gen *Glukosamine mutase (glmM)*, karena gen *ureC* tidak terlibat dalam aktifitas enzim urease. Gen *ureC* hanya ditemukan pada *H. pylori* dan tidak didapati pada bakteri urease positif yang lain sehingga diagnosis *H. pylori* menggunakan *primer ureC* tidak menghasilkan hasil positif palsu atau negatif palsu (Lu *et al.*, 1999 ; He *et al.*, 2002).

#### 2.3.1.6 diversitas *H. pylori*

Berdasarkan toksin yang dihasilkan, diketahui terdapat 2 kelompok galur *H. pylori*. Kelompok pertama adalah galur *H. pylori* yang bersifat sitotoksik dengan 87-94 kDa protein antigen *VacA* dan 120-128 kDa protein antigen *CagA*. Kelompok kedua adalah galur *H. pylori* non sitotoksik dengan *VacA* positif dan *CagA* negatif. Penelitian menunjukkan bahwa sekitar 60 % galur *H. pylori* memproduksi *CagA* sedangkan *VacA* terdapat pada semua galur yang diteliti. Infeksi dengan galur yang mengekspresikan *VacA* dan *CagA* dikaitkan dengan peningkatan sekresi IL-8 oleh sel-sel epitel lambung (Dunn *et al.*, 1997 ; Bodger dan Crabtree, 1998 ; Arherton *et al.*, 2001).

Diversitas genetik pada *H. pylori* dapat dianalisis dari variasi genom antargalur yang berasal dari individu yang berbeda, serta variasi pada populasi yang ada dalam individu inang. Hal tersebut telah dipelajari pada profil plasmidnya, potongan fragmen DNA-nya ataupun dengan PCR yang menunjukkan adanya variasi antar-isolat *H. pylori* (Doorn *et al.*, 2000).

### 2.3.2 Patogenesis kelainan lambung akibat infeksi *H. pylori* .

Gambaran makroskopik lambung normal dan gastritis ditentukan sesuai dengan klasifikasi *Sydney System*. Pada lambung yang normal seluruh mukosa terlihat halus, berwarna merah muda. Karakteristik endoskopi radang lambung (gastritis) bila pada mukosa lambung terlihat adanya edema, eritema, erosi, mudah rapuh (*friability*), eksudatif, hiperplasi, atrofi, pembuluh darah tampak, titik-titik perdarahan intramural dan nodul. Karakteristik radang lambung terlihat pembuluh darah yang disertai dengan atrofi didiagnosis sebagai atrofi lambung. Diagnosis gastritis erosif ditegakkan bila pada mukosa lambung ditemukan erosi, dan diagnosis gastritis hemoragika ditetapkan bila terlihat titik-titik perdarahan intramural. Diagnosis metaplasia intestinal ditegakkan bila terlihat nodul *cobblestone-like* berwarna abu-abu. Diagnosis ulkus ditegakkan bila ditemukan ulkus dengan tepi membengkak dengan permukaan yang dilapisi fibrin, sedangkan diagnosis kanker lambung ditegakkan bila dijumpai tumor dengan mukosa ireguler dengan fisura, atau dengan bentuk bunga kol ( Robbins and Cotran, 2005 ).

Pada saat ini diketahui bahwa infeksi *H. pylori* dapat menyebabkan gastritis kronik aktif, ulkus duodenum, MALT limfoma dan keganasan lambung. Patogenesis terjadinya gastritis kronik karena infeksi *H. pylori* dimulai dengan berhasilnya *H. pylori* bertahan dalam asam lambung dan masuk ke dalam dinding lambung untuk kemudian mengadakan kolonisasi. *H. pylori* mengadakan kontak dengan epitel mukosa lambung melalui bagian bakteri yang disebut adesin, yang berikatan dengan gliserolipid pada epitel lambung. *H. pylori* menghasilkan berbagai enzim seperti misalnya urease, katalase, protease dan fosfolipase. Protease dan fosfolipase dapat merusak mukosa lambung. Disamping itu, bakteri ini juga memproduksi toksin yang menyebabkan reaksi radang, kerusakan jaringan dan gastritis kronik ( Testerman *et al*,

2001 ). Infeksi *H. pylori* kronik akan menimbulkan gangguan fungsi sekretorik lambung sehingga dapat mengakibatkan terjadinya hipergastrinemia yang menyebabkan hiperasiditas dalam lambung dan duodenum. Hiperasiditas duodenum ini memungkinkan hidupnya sel-sel mukosa lambung di dalam duodenum, atau metaplasia sel epitel lambung di lokasi ini. Terbentuklah kemudian *island* sel mukosa lambung di dalam duodenum sehingga bakteri *H. pylori* dapat hidup dan berkolonisasi di dalamnya, menyebabkan duodenitis dan akhirnya menimbulkan ulkus di daerah tersebut (Testerman *et al.*, 2001).

Faktor virulensi yang dimiliki *H. pylori* seperti misalnya gen *VagA*, *CagA*, adhesin, sitotoksin, protein pengaktif neutrofil, dan ekspresi protein pengikat matriks ekstraseluler seperti kolagen tipe IV, dan laminin dapat menyebabkan terjadinya gastritis kronis, ulkus peptikum dan kanker lambung (Jekti,2003).

### 2.3.3 Penularan *H. pylori*

Banyak faktor berpengaruh pada jalur infeksi *H. pylori*. Sumber penularannya bervariasi, dapat berasal dari dalam keluarga, dari luar keluarga, dari tetangga dan dari lingkungan. Semua anggota keluarga yang terinfeksi *H. pylori* dan faktor-faktor lingkungan berpotensi menjadi sumber infeksi *H. pylori* (Soebagyo, 2004).

Penularan infeksi *H. pylori* dapat terjadi secara oral-oral maupun secara faekal-oral. Penelitian menunjukkan bahwa *H. pylori*, selain pada lambung, dapat ditemukan dalam mulut, seperti misalnya pada kotoran gigi, sehingga mulut dapat merupakan tempat perhentian sementara untuk *H. pylori*. Perpindahan sekret oral yang mengandung *H. pylori* secara langsung atau tidak langsung ke dalam mulut orang lain, misalnya melalui alat endoskopi yang dipakai berturut-turut pada beberapa pasien yang berbeda (Soewignjo,2002). Bukti adanya penularan secara fekal-oral telah dibuktikan oleh Thomas *et al.*, (1992) yang berhasil melakukan pembiakan

bakteri *H. pylori* dari 9 sampel tinja di antara 23 sampel tinja anak-anak Gambia yang menderita infeksi *H. pylori*. Berarti tinja yang mengandung *H. pylori* berpotensi mencemari lingkungan dan sumber air yang bisa dikonsumsi manusia.

Jalur penularan dan transmisi *H. pylori* dapat terjadi melalui air. *H. pylori* mampu bertahan hidup pada air tap dan limbah domestik selama enam hari. Pada air sumur, walau dalam jumlah kecil dan berada dalam bentuk kokoid, memasuki hari ke sembilan *H. pylori* masih mampu bertahan hidup (Roekiandari dkk, 1999).

#### **2.3.4 Pemeriksaan *H. pylori***

Pemeriksaan *H. pylori* dapat dilakukan dengan cara *non invasive* tanpa menggunakan endoskopi, seperti misalnya dengan cara serologi dan UBT maupun dengan cara *invasive*, antara lain dengan teknik CLO, kultur biopsi lambung, pemeriksaan histopatologi dan PCR. Rincian masing-masing cara pemeriksaan tersebut adalah sebagai berikut :

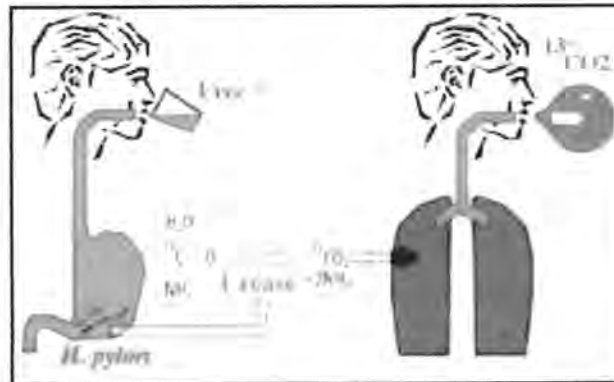
##### **2.3.4.1 *non invasive test***

*Non invasive test* adalah pemeriksaan yang digunakan untuk mendeteksi kuman *H. pylori* tanpa melakukan biopsi atau pengambilan jaringan mukosa lambung. Pemeriksaan *non-invasive* untuk pemeriksaan *H. pylori* contohnya adalah UBT dan beberapa pemeriksaan serologi seperti misalnya ELISA, ICT, HPSA dan lateks aglutinasi (Lage *et al.*, 1995).

##### **2.3.4.1.a *urea breath test (UBT)***

Pemeriksaan UBT selain sangat mahal, memerlukan persyaratan yang ketat. Penderita tidak boleh minum antibiotik dan obat penekan asam lambung selama satu bulan. Pada tes ini penderita diberi urea yang mengandung isotop  $C^{13}$  atau  $C^{14}$ . Bila di dalam lambung terdapat aktivitas urease yang dihasilkan oleh *H. pylori* maka urease tersebut akan memecah urea menjadi  $CO_2$  dan  $H_2O$ . Kemudian kadar  $CO_2$  radioaktif

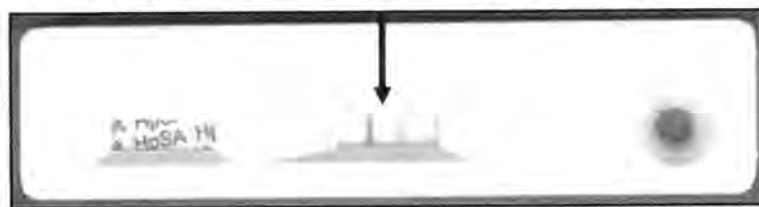
yang dikeluarkan diukur. Tes ini sangat berguna untuk tujuan diagnosis maupun *follow up* setelah terapi. Namun demikian, selain mahal, tes ini dapat memberikan hasil negatif palsu jika *H. pylori* yang diperiksa berbentuk kokoid. Bentuk ini tidak menunjukkan aktifitas enzimatis urease, sehingga tak menghasilkan CO<sub>2</sub> dan dengan demikian akan menunjukkan hasil yang negatif (Soewignjo,2002). Secara skematis, diagnosis dengan UBT dapat dilihat pada gambar 2.4



2.4 Gambar pemeriksaan *H. pylori* dengan UBT  
(Dikutip dari : Fieh de diagnostik,2007)

#### 2.3.4.1.b pemeriksaan *H. pylori* stool antigen (HPSA)

Adapun prinsip pemeriksaan *H. pylori* stool antigen (HPSA) adalah mendeteksi antigen *H. pylori* dalam tinja. Tinja yang telah dihomogenisasi ditetaskan pada strip yang telah ditemplei dengan antibodi. Reaksi positif ditandai dengan munculnya 2 pita, dapat dilihat pada gambar 2.5. Pemeriksaan dengan HPSA memerlukan waktu yang lama dalam memproses tinja untuk preparasi sampel.



Gambar 2.5 Pemeriksaan *H. pylori* dengan HPSA  
(Dikutip dari : Fieh de diagnostik,2007)

### 2.3.4.1.c pemeriksaan serologi

Uji-uji serologi contohnya adalah ELISA, ICT, uji *dipstick*, dan uji *latex agglutination*. Pada ELISA reaksi antigen dan antibodi (IgG) terhadap bakteri *H. pylori* dikenali dengan adanya perubahan warna pereaksi di dalam sumuran (*well*) sebagai akibat aktifitas enzim yang dilekatkan pada konjugat. *Kit* ELISA untuk pemeriksaan *H. pylori* telah diproduksi di Indonesia (*PylorindoEIA*), seperti dapat dilihat pada gambar 2.6



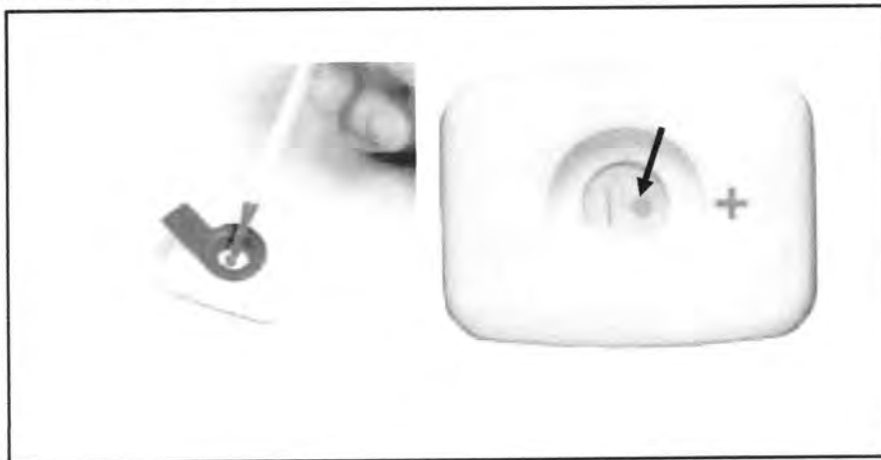
Gambar 2.6 *Kit* Elisa *Pylorindo EIA*  
(Dikutip dari : Soewignjo,2002)

*Immunochromatographic Test* (ICT) menggunakan membran *nitrocellulosa*, tempat antigen *H. pylori* dibubuhkan dalam bentuk garis. Hasil positif ditandai dengan munculnya 2 garis berwarna merah (satu garis tes dan satu garis kontrol). Bentuk tes ICT ini dapat dilihat pada gambar 2.7



Gambar 2.7 Pemeriksaan *H. pylori* teknik *Immunochromatographic Test (ICT)*  
(Dikutip dari : Soewignjo,2002)

Uji *dipstick*, berbahan dasar *polystirene* yang berbentuk sisir (*comb*). Antigen *H. pylori* dibubuhkan dalam bentuk *dot* pada ujung kaki sisir. Hasil positif ditandai dengan munculnya bintik (*spot*) berwarna merah. Bentuk tes *dipstick* dapat dilihat pada gambar gambar 2.8



Gambar 2.8 Pemeriksaan *H. pylori* dengan *dipstick*  
(Dikutip dari : Fieh de diagnostik,2007)



Uji *latex agglutination* menggunakan partikel lateks sebagai pengikat antigen dan antibodi. Reaksi ditandai dengan adanya penggumpalan partikel lateks yang membentuk butiran ataupun gumpalan.

Berbagai uji serologi yang ada umumnya menggunakan antigen *H. pylori* yang diperoleh dari negara pembuatnya, sehingga seringkali tak dapat dipakai di negara lain, yang dapat memberikan hasil berbeda akibat adanya diversitas kuman *H. pylori* yang sangat besar (Hua *et al.*, 1998 ; Rotimi *et al.*,2000).

#### **2.3.4.2 pemeriksaan *invasive test***

*Invasive test* adalah tes yang digunakan untuk mendiagnosis bakteri *H. pylori* dengan melakukan biopsi menggunakan endoskopi, yang kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan lanjutan seperti misalnya RUT atau CLO, kultur mikrobiologi, pemeriksaan histopatologi dan PCR.

##### **2.3.4.2.a *Rapid urea test (RUT) atau Campylobacter like organism (CLO)***

Pada pemeriksaan *H. pylori* dengan tehnik RUT atau CLO spesimen hasil biopsi lambung yang diperoleh dengan endoskopi di masukkan ke dalam medium agar atau kit agar yang mengandung urea dan *phenol red* sebagai indikator. urease yang ada di dalam spesimen biopsi yang mengandung *H.pylori* akan memecah urea dalam kit menjadi ammonia yang bersifat basa dan mengubah warna indikator dari kuning menjadi merah, seperti terlihat pada gambar 2.9



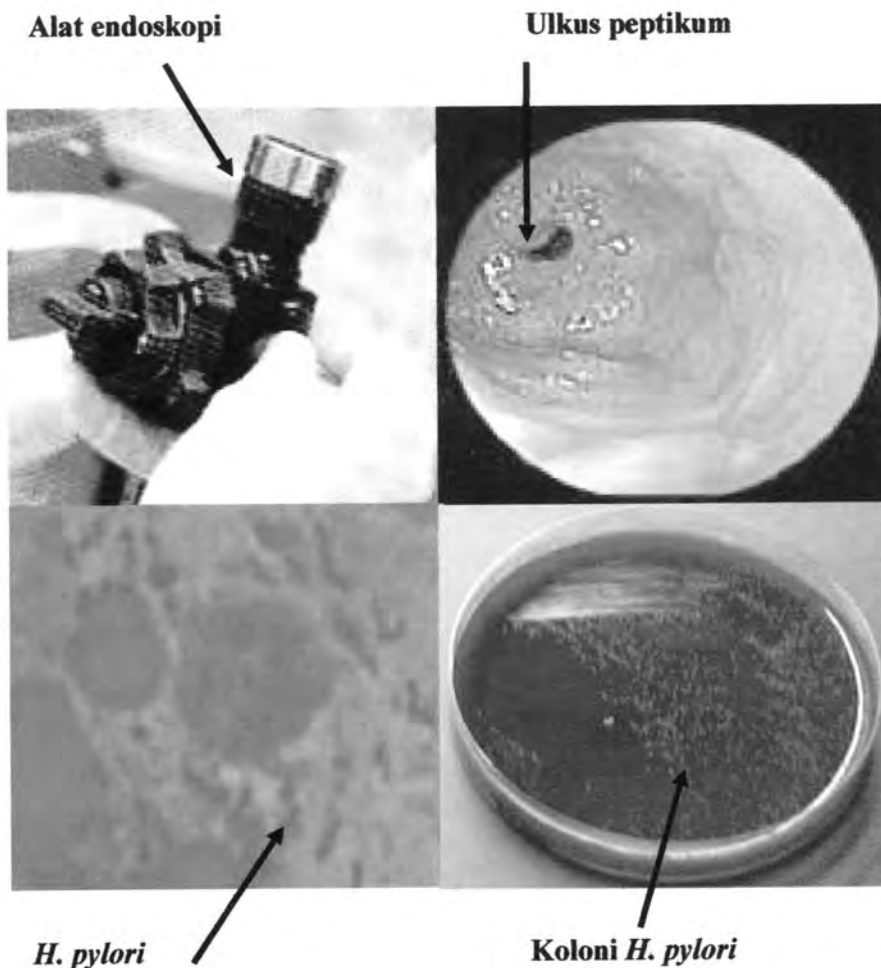
Gambar 2.9 RUT atau CLO untuk pemeriksaan *H. pylori*  
(Dikutip dari : Logan dan Walker, 2001)

#### 2.3.4.2.b kultur mikrobiologi *H. pylori*

Kultur mikrobiologi merupakan pemeriksaan baku emas (*gold standard*) untuk pemeriksaan *H. pylori*, karena memiliki spesifisitas tinggi. Dengan kultur, diusahakan menemukan bakteri *H. pylori* dengan memanfaatkan ciri-ciri morfologi dan mikrobiologi bakteri *H. pylori*. Kultur mikrobiologi ini dapat disertai uji kepekaan antimikroba. Kelemahan teknik kultur mikrobiologi ini terletak pada panjangnya waktu inkubasi, biaya kultur yang mahal, sulitnya mengkultur bentuk kokoid dan sensitivitasnya relatif rendah (Wasito *et al*, 2001).

Pemeriksaan *H. pylori* dengan teknik kultur memerlukan biopsi lambung yang diambil dengan cara endoskopi. Media pembawa untuk *H. pylori* antara lain adalah *charcoal* agar, *Stuart transport medium*, *dextrose* 20%, dan *saline*. Media pertumbuhan untuk *H. pylori* antara lain adalah *blood agar plate* dengan 5% darah domba, suplemen antibiotik *Dent* atau *Skirrow*, dan suplemen pertumbuhan *Vitox* atau *Isovitalex*. Inkubasi dilakukan dalam suasana mikroaerofilik, menggunakan *anaerobic jar* dengan *campylobacter gas pack*. Inkubasi dapat juga menggunakan inkubator CO<sub>2</sub> dengan kadar CO<sub>2</sub> 10%, O<sub>2</sub> 5%, N<sub>2</sub> 85% dan kelembaban 95%. Lama

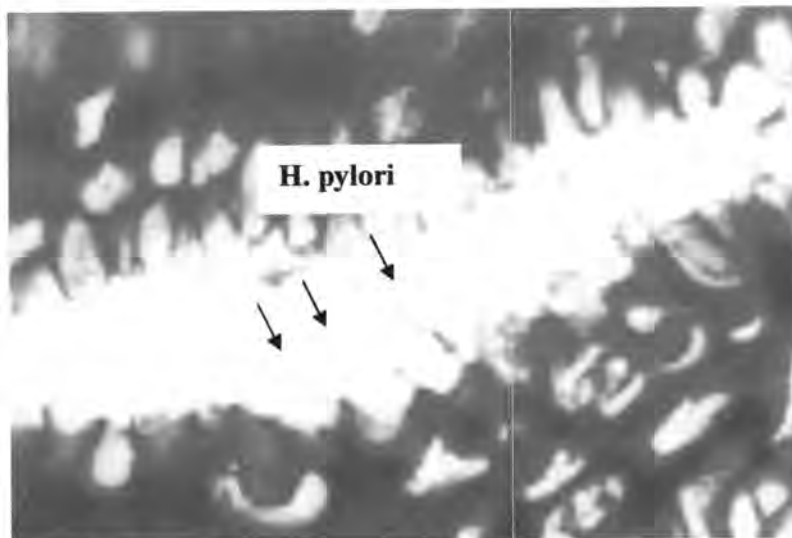
waktu inkubasi berkisar antara 4 sampai 7 hari. Koloni *H. pylori* akan berwarna keabuan, transparan, mengkilat dan tampak basah dengan diameter 1–2 mm (Dunn *et al*, 1998 ; Makristathis *et al*, 2004). Alat endoskopi, gambaran endoskopik ulkus peptikum, morfologi *H. pylori* dan koloni *H. pylori* pada media BAP dapat dilihat pada gambar 2.10



Gambar 2.10 Gambar endoskopi, ulkus peptikum, morfologi *H. pylori* dan koloni *H. pylori* pada media BAP (Dikutip dari : Fieh de diagnostik,2007)

### 2.3.4.2.c histopatologi biopsi lambung

Dengan pemeriksaan histopatologi dapat ditemukan adanya *H. pylori* dan kelainan–kelainan mukosa lambung akibat infeksi *H. pylori*. Bakteri *H.pylori* dapat dijumpai di daerah dengan inflamasi yang dapat dilihat dengan pewarnaan khusus, seperti misalnya pewarnaan *Warthin-Starry* (WS) dan *Modified Giemsa* (MG). Gambaran histopatologis *H. pylori* dapat dilihat pada gambar 2.11



Gambar 2.11 Hasil pemeriksaan *H. pylori* dengan histopatologi dengan pewarnaan *Diff-Quick* (DQ)(Dikutip dari : Soewignjo, 2002)  
Sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan CLO, kultur mikrobiologi dan

pemeriksaan histopatologi sangat dipengaruhi oleh densitas kuman dalam sampel (Tokunaga *et al.*,2000;Logan dan Walker,2001).

Penderita yang mendapat pengobatan penekan asam lambung atau antibiotik dan tak menghentikannya sebelum endoskopi seringkali menunjukkan hasil negatif palsu pada test CLO. Hal ini disebabkan karena bentuk spiral *H. pylori* berubah menjadi bentuk kokoid yang tidak menunjukkan aktifitas urease (Jekti,2003). Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa bentuk kokoid *H. pylori* tidak

menunjukkan aktifitas enzimatis urease, walau masih memiliki gen urease yang positif dan masih menunjukkan adanya protein urease pada pemeriksaan *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Elektrophoresis* (SDS PAGE).

Kultur *H. pylori* merupakan baku emas untuk pemeriksaan, dengan spesifisitas yang tinggi (100%), walau sensitifitasnya rendah. Sensitifitas yang rendah ini dapat disebabkan karena ukuran spesimen biopsi yang kecil, kelambatan dalam pengiriman biopsi, terpaparnya spesimen pada lingkungan aerobik, kurang berpengalamannya teknisi mikrobiologi. Pemeriksaan ini masa kultur 1 minggu untuk dapat mendeteksi adanya *H. pylori* (Perez, 2000 ;Ricci *et al.*, 2007).

Deteksi *H. pylori* dengan histopatologi spesifisitasnya tinggi namun ketepatan pemeriksaan ditentukan oleh ukuran biopsi dan, ketepatan lokasi penyayatan jaringan. *H. pylori* yang berbentuk kokoid lebih sulit dideteksi dengan cara ini dan mungkin membutuhkan pengecatan imunohistokimia (Soewignjo *et al*, 2007).

#### 2.3.4.2.d pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Teknik biologi molekuler menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) mampu mendeteksi 1-5 *copy* DNA ( $\leq 10^3$  CFU/ml atau  $< 2,5 - 3,5$  ug/ml DNA), memerlukan waktu yang relatif singkat ( $\leq 24$  jam), memiliki tahapan kerja yang cukup sederhana dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (94-100 %). Namun teknik ini memiliki kelemahan karena tidak dapat membedakan mikroorganisme yang masih hidup atau telah mati, dan tidak dapat memberikan informasi tentang kepekaan *H. pylori* terhadap antibiotika (Cherian *et al.*,1998; Wasito dkk, 2001).

Penelitian Lu *et al.*,(1999) dengan membandingkan 5 metode PCR yang menggunakan *primer* dari daerah gen *16S rRNA*, gen *random kromosom squence*, gen *species-specific antigen 26-kDa* (SSA), gen *ureC* (*glmM*) dan gen *ureA* untuk mendeteksi *H. pylori* pada jaringan lambung mendapatkan hasil yang menunjukkan

bahwa penggunaan *primer* dari daerah gen *ureC* (*glmM*) memiliki sensitifitas yang lebih tinggi daripada penggunaan *primer* dari daerah gen lainnya (Lu *et al.*, 1999; Lage *et al.*, 1995).

#### 2.4 Spesimen Blok Parafin Biopsi Lambung.

Proses pembuatan sediaan blok parafin biopsi lambung dilakukan dari hasil biopsi lambung, baik pada bagian antrum, corpus maupun pilorus, dengan cara dan tahapan sebagai berikut :

1. Fiksasi : Biopsi dibersihkan dengan larutan PZ steril dan dimasukkan kedalam larutan fiksasi atau direndam dalam larutan *formalin* dan *buffer phosphat* (1 : 9). Fiksasi juga dapat dilakukan dalam *bouin solution* dengan formula : *picric acid* 75 ml, *formaldehid* 25 ml, *glacial acetic acid* 5 ml. Fiksasi dilakukan selama 24 jam.

2. Pengolahan bahan atau jaringan

- a. Dehidrasi

Tahapan perendaman jaringan biopsi lambung dapat dilakukan dalam larutan dengan urutan tersebut di bawah ini :

<i>Ethanol</i> 70%	60 menit
<i>Ethanol</i> 80%	30 menit
<i>Ethanol</i> 90%	30 menit
<i>Ethanol</i> 95%	30 menit
<i>Ethanol</i> 100%	30 menit
<i>Ethanol</i> 100%	25 menit
<i>Ethanol</i> 100%	25 menit
<i>Ethanol</i> : <i>xylol</i> (3 : 1)	40 menit
<i>Ethanol</i> : <i>xylol</i> (1 : 1)	30 menit

*Ethanol : xylol (1 : 3)* 20 menit

b. *Clearing* (penjernihan)

*Clearing* (penjernihan) dapat dilakukan dalam larutan dengan urutan tersebut di bawah ini :

*Xylol I* 40 menit

*Xylol II* 30 menit

*Xylol III* 20 menit

c. Infiltrasi pada suhu 61 °C

Infiltrasi pada suhu 61 °C dapat dilakukan dalam parafin cair dengan urutan tersebut di bawah ini :

Parafin I 1 jam

Parafin II 1 jam

Parafin III 1 jam

d. *Embedding* (penanaman) pada parafin cair suhu 61 °C.

Penanaman biopsi lambung yang sudah diproses dengan tahapan di atas, dilakukan penanaman pada parafin cair suhu 61 °C sampai terbentuk blok parafin yang beku dan padat.

3. *Penyayatan (sectioning)*

Penyayatan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dari pabrik *Shibuya Optical Co* dengan ketebalan rata-rata 5 µm. Dengan kriteria yaitu:

a. Hasil sayatan harus membentuk pita lurus dan tipis.

b. Hasil sayatan yang tidak baik adalah:

1) Potongan pita mengkerut

2) Potongan pita melengkung kekanan dan kekiri

- 3) Irisan berganti-ganti tebal dan tipis
- 4) Irisan mengembung ditengah
- 5) Bagian jaringan ada yang hancur atau lepas dari parafin

(Jiwintarum, 2006)

## 2.5 *Polymerase Chain Reaction (PCR).*

*Polymerase chain reaction* adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA/RNA) *in vitro* secara enzimatik menggunakan *polymerase* termostabil di dalam suatu mesin pengubah suhu (*thermo cycler*). PCR merupakan teknik yang handal dalam mempersingkat jalan pengerjaan kloning DNA dan pemetaannya dan kemudian berkembang menjadi teknik utama dalam laboratorium biologi molekuler, yang digunakan antara lain untuk transkripsi *in vitro* dari PCR *template*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis (Whiteet al.,1993; Purwantadkk, 1999;Yuwono,2006).

PCR dapat digunakan untuk menggandakan fragmen DNA secara eksponensial dalam waktu singkat. Teknik ini, selain cepat juga memiliki sensitifitas, spesifisitas dan nilai prediksi serta akurasi yang tinggi. PCR sangat berguna untuk membantu para klinisi dan ahli epidemiologi untuk menegakkan diagnosis kasus-kasus sulit atau “*outbreak*” penyakit infeksi dengan cepat dan akurat sehingga dapat dilakukan tindakan pengobatan dan pencegahan yang spesifik secara dini (Soewondo, 2002).

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa posisi DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses tersebut dilakukan. Pengetahuan tentang posisi DNA tersebut penting untuk merancang *primer* yang sesuai. Primer adalah suatu sekuen oligonukleutida pendek yang berfungsi untuk mengawali sintesis rantai DNA dalam PCR (Yuwono,2006).



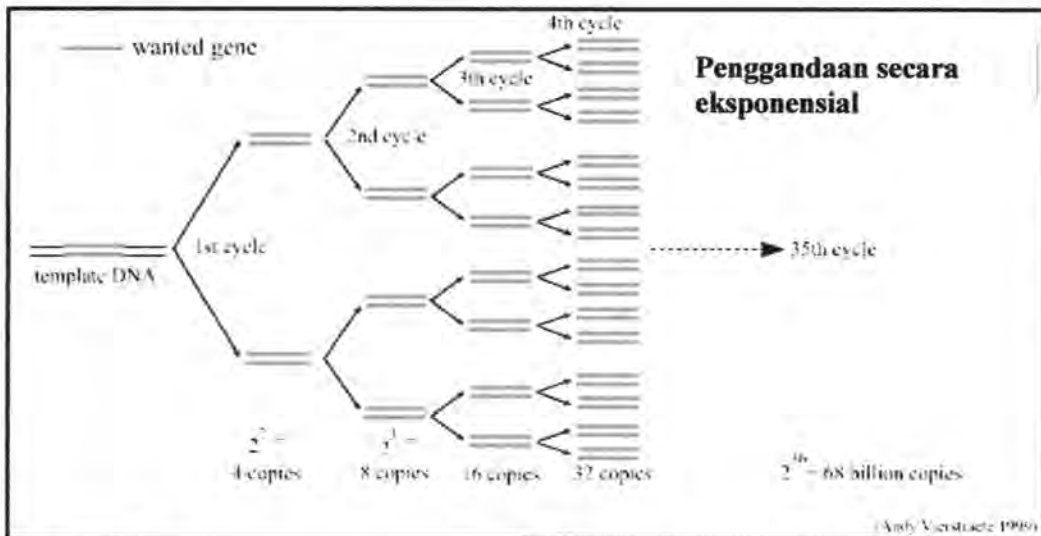
### 2.5.1 Prinsip dasar *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Prinsip dari teknik *polymerase chain reaction* (PCR) adalah pelipatgandaan segmen DNA target dalam tabung reaksi dengan bantuan enzim DNA polimerase. Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) *primer*, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) *deoksiribonukleotida trifosfat* (dNTP) yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, serta (4) DNA *polymerase*, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen penting lainnya adalah *buffer* PCR (Yuwono,2006).

Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui 3 tahap, yaitu denaturasi (*denaturation*), pelekatan (*annealing*), dan pemanjangan (*extension*). Tahap denaturasi terjadi pada suhu tinggi ( $90^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$ ) di mana untaian ganda DNA terpisah menjadi untaian tunggal. Proses ini dilangsungkan selama 1-2 menit. Kemudian, pada tahap pelekatan, suhu diturunkan menjadi sekitar  $55^{\circ}\text{C}$ . Pada tahap ini *primer* akan menempel pada cetakan yang telah terpisah menjadi untai tunggal melalui ikatan hidrogen pada *sekuen* yang komplementer. Suhu pelekatan *primer* yang lebih tepat dapat dihitung dari jumlah dan jenis nukleotida penyusun *primer*. Sebenarnya pelekatan dapat berlangsung lebih efisien jika dilakukan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , tetapi suhu yang lebih rendah ini dapat menyebabkan *mispriming*, yaitu penempelan *primer* pada tempat yang salah.

Ada dua jenis *primer* yang digunakan dalam PCR, masing-masing memiliki sekuen oligonukleotida yang identik dengan sekuen rantai DNA cetakan yang komplementer. Proses pelekatan biasanya dilakukan selama 1-2 menit. Setelah tahap pelekatan, suhu dinaikkan menjadi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 – 2 menit. Pada saat ini DNA *polymerase* melakukan proses pemanjangan (*extension*) kedua *primer* dengan arah

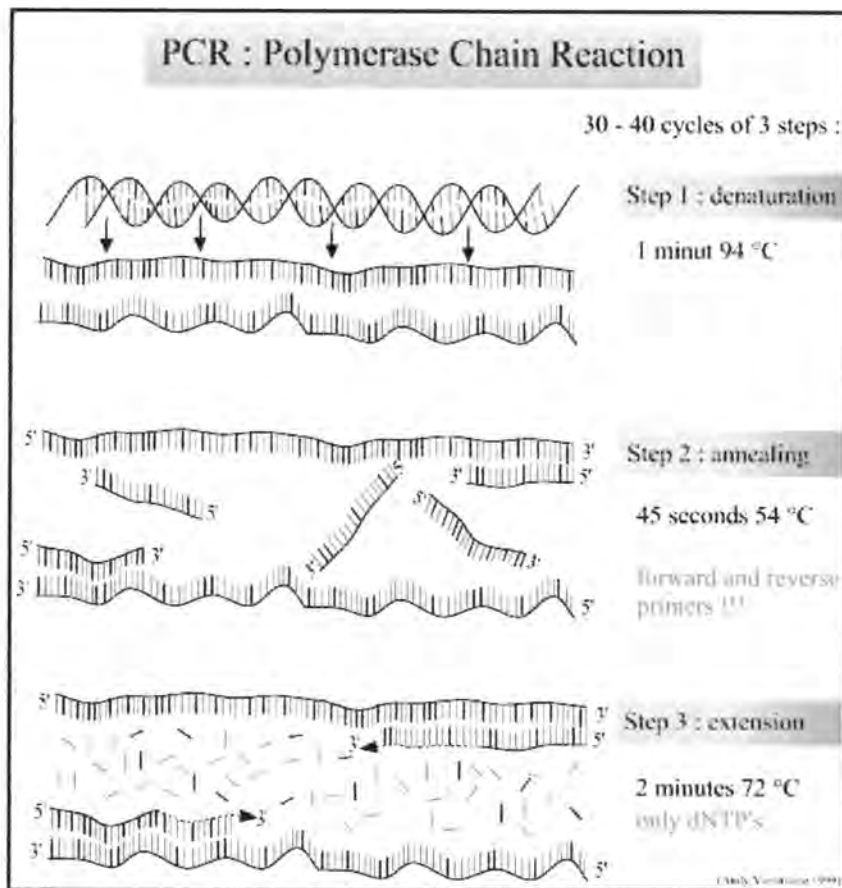
dari 5' ke 3', sehingga terbentuklah 2 untai DNA ganda baru. Ketiga tahap reaksi tersebut diulang sampai 25 – 30 siklus sehingga pada akhir proses di peroleh molekul–molekul DNA rantai ganda baru dalam jumlah yang jauh lebih banyak, karena jumlahnya meningkat secara *eksponensial* (Prihartini,1996; Yuwono,2006). Contoh penggandaan DNA secara *eksponensial* dalam 35 siklus dapat dilihat pada gambar 2.12



Gambar 2.12 Penambahan jumlah rantai DNA secara eksponensial dalam 35 siklus(dikutip dari : Laimore,1990)

Hasil pelipatgandaan DNA ini dapat divisualisasikan dengan berbagai cara, misalnya dengan elektroforesis pada gel agarose (DNA dengan pewarnaan *ethidium bromida* sehingga tampak berpendar di bawah sinar ultra violet). DNA sasaran yang telah dilipat gandakan ini dapat digunakan lebih lanjut untuk berbagai keperluan, misalnya di karakterisasi sifat-sifatnya, dicari urutan nukleotidanya (*sequencing*) ataupun dipotong dengan enzim tertentu dan ditempelkan pada DNA organisme lain untuk membentuk DNA rekombinan. Karena spesifisitas dan sensitifitasnya yang sangat tinggi, PCR banyak dipakai sebagai alat untuk mendiagnosis berbagai penyakit, baik yang disebabkan oleh bakteri maupun virus (Supargiyono, 1997 ;

Yuwono,2006). Adapun gambaran tahapan proses teknik PCR dapat dilihat pada gambar 2.13



Gambar 2.13 Tahapan teknik PCR (dikutip dari : Laimore,1990)

### 2.5.2 Faktor yang menentukan keberhasilan PCR

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor, misalnya:

#### 1. *Deoksiribonukleotide triphosphat(dNTP).*

*Deoksiribonukleotide triphosphat(dNTP)* terdiri atas deoksi-Adenosin Trifosfat (dATP), deoksi-Guanosin Trifosfat (dGTP), deoksi-Cytosin Trifosfat (dCTP) dan deoksi-Timidin Trifosfat (dTTP). Kadar masing-masing dNTP yang diperlukan dalam PCR adalah 200  $\mu$ M dan keempatnya sebaiknya berkadar yang sama untuk memperkecil

kemungkinan kesalahan penggabungan nukleotida selama proses polimerisasi (Gelfand dan White,1990 ; Promega,2000).

## 2. *Primer* oligonukleotida.

Kadar akhir *primer* yang optimal berkisar antara 0,1-1  $\mu\text{M}/50\mu\text{l}$ . Kadar *primer* di atas 1,0  $\mu\text{M}$  dapat menyebabkan terkumpulnya hasil polimerisasi yang nonspesifik. Harus dihindari kemungkinan terbentuknya hibrid antara *primer* yang satu dengan *primer* lainnya. Jumlah G + C pada *primer* berkisar antara 50 – 60 % dari jumlah keseluruhan nukleotida yang ada. Perlu dihindari pula rancangan *primer* dengan tiga atau lebih nukleotida C atau G yang terletak berurutan pada ujung 3', karena dapat menyebabkan *mispriming*, terutama pada daerah–daerah yang kaya akan sekuen G + C. *Primer sense* dan *primer antisense* yang digunakan sebaiknya mempunyai nilai  $T_m$  (*melting temperature*) yang berdekatan.  $T_m$  adalah suhu saat setengah dari molekul DNA mengalami denaturasi. Nilai  $T_m$  oligonukleotida dapat dihitung dengan rumus:  $T_m = 2^{\circ\text{C}} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ\text{C}} \times (\text{G} + \text{C})$  (Gelfand dan White,1990 ; Promega,2000).

## 3. DNA *template* (DNA cetakan).

Kadar DNA *template* yang digunakan sebaiknya berkisar antara  $10^5$ –  $10^6$  molekul/ $\mu\text{l}$ . DNA *template* dapat berujud *single strand* atau *double strand*. DNA target dari spesimen klinik yang efisien untuk diamplifikasi adalah antara 100–400 bp. DNA target yang lebih panjang dapat pula diamplifikasi walau kurang efisien, karena produknya yang panjang lebih rentan terhadap inhibitor yang mempengaruhi kerja enzim *polymerase*. Selain itu, waktu untuk amplifikasi jadi lebih panjang. Fragmen DNA yang terlalu panjang dapat dipotong dulu dengan enzim restriksi. DNA dalam bentuk murni

paling baik digunakan sebagai *template* dan karena itu DNA *template* harus dimurnikan dari komponen penyertanya. Ketidakmurnian DNA dapat mengganggu reaksi, dan menghambat kerja polimerase. Dalam memilih target yang akan diamplifikasi, yang paling penting diperhatikan adalah stabilitas genetik target. Perubahan atau hilangnya sekuen target akan berakibat hilangnya reaktivitas. Efisiensi amplifikasi biasanya lebih tinggi jika menggunakan molekul DNA yang sudah linier. DNA *template* perlu di denaturasi dulu pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 5 menit (*hot start*), dengan tujuan menghindari pembentukan produk nonspesifik dan membuat DNA *template* terpisah sempurna.

#### 4. Komposisi larutan *buffer*.

*Buffer* yang dianjurkan untuk PCR adalah *buffer* Tris-HCl pH 8,3-8,8 dengan kadar 10–50 mM, (pada suhu 20 <sup>0</sup>C). Untuk membantu proses penempelan *primer* (*primer annealing*), ditambahkan KCl sampai kadar 50 mM. Di atas kadar ini, KCl justru akan menghambat aktivitas Taq DNA *polymerase*. Komponen lain yang perlu ditambahkan adalah gelatin atau BSA (*bovine serum albumin*) sebanyak 0,1 % b/v dan deterjen non-ionik seperti misalnya *Tween* 20 sebanyak 0,05 – 0,1 % untuk menstabilkan enzim Taq DNA *polymerase* (Prihartini,1996; Yuwono,2006).

#### 5. Jumlah siklus reaksi

Banyaknya siklus dalam PCR yang diperlukan bergantung terutama pada kadar awal molekul DNA target yang akan dilipatgandakan. Siklus yang terlalu banyak dapat menyebabkan meningkatnya kadar produk yang tidak spesifik, sedangkan siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas

produk yang diharapkan. Sebagai patokan,  $3,0 \times 10^5$  molekul target memerlukan 25 – 30 siklus,  $1,5 \times 10^4$  molekul target memerlukan 30 – 35 siklus dan  $1,0 \times 10^3$  molekul target memerlukan 35-40 siklus (Yuwono,2006).

#### 6. Enzim yang digunakan.

Enzim yang digunakan adalah *Taq polymerase* dengan kadar 1,25 -2,5 unit/ reaksi atau 1,25 -2,5 unit/ 50  $\mu$ l dan sebaiknya tidak melebihi 2,5 U/50 $\mu$ l karena kadar enzim yang terlalu tinggi akan menurunkan spesifitas PCR (Yuwono,2006 ; Promega, 2000).

#### 7. Faktor teknis dan non – teknis lainnya.

Teknik PCR rawan kontaminasi yang dapat terjadi pada bahan, reagen dan peralatan yang digunakan. Oleh karena itu semua pekerjaan harus dilakukan secara hati-hati. Semua bahan, reagen dan peralatan yang digunakan harus dijaga sterilitasnya dan hanya digunakan untuk satu kali pemakaian (Yuwono,2006).

### 2.5.3 Keunggulan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR umumnya digunakan apabila tes atau pemeriksaan lain hasilnya meragukan. Kuman patogen yang sulit dibiakkan atau memerlukan waktu untuk respons antibodi yang lama dapat dideteksi secara akurat dengan PCR (Soewondo, 2002).

Keunggulan dan keuntungan PCR , antara lain yaitu:

1. Lama waktu yang digunakan untuk pengenalan penyebab patogen cukup pendek, rata-rata < 10 jam
2. Jumlah spesimen yang diperlukan sedikit.
3. Cara cukup sederhana dan praktis

4. Tingkat kepekaan dan kekhasan tergantung pada urutan sasaran (*target sequence*) dari untaian molekul
5. Tidak mengandung bahan radioaktif

(Giovannoni, 1991; Persing *et al.*, 1993).

Soewondo (2002), menyebutkan manfaat PCR dalam penelitian epidemiologi, yaitu:

1. Dapat menentukan secara langsung tipe organisme atau produknya
2. Dapat mendeteksi gen yang mengkode toksin, faktor virulensi, dan kekebalan terhadap antimikroba
3. Dapat mendiagnosis dengan cepat
4. Dapat mendeteksi organisme dalam jumlah yang sedikit atau organisme yang sudah diobati dengan antimikroba
5. Dapat mendeteksi organisme yang tumbuh lambat (*slow growing*)
6. atau tidak tumbuh sama sekali dalam media *in vitro*
7. Tidak memerlukan respon antibodi terhadap mikroba penyebab infeksi
8. Dapat dipakai untuk penelitian sumber infeksi dan cara penularan mikroba patogen yang sulit dilacak
9. Dapat mendeteksi organisme di dalam cairan tubuh (CSS, cairan mata, darah janin).

Keterbatasan dan kelemahan metode PCR yang perlu dicermati (Soewondo, 2002), adalah:

1. Kemungkinan terjadinya hasil positif palsu yang disebabkan oleh amplifikasi DNA yang mengkontaminasi
2. Kemungkinan terjadinya hasil positif palsu yang disebabkan oleh deretan asam nukleat dari organisme yang tidak sama (tidak berhubungan)

3. Kemungkinan terjadinya hasil negatif palsu yang disebabkan oleh urutan nukleotida primer yang tidak adekuat

Untuk mengatasi keterbatasan dan kelemahan metode PCR tersebut, maka penggunaan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-) sangatlah penting. Dengan menggunakan kontrol positif untuk mengetahui pasangan basa (bp) dari gen yang dideteksi, dan kontrol negatif dengan menggunakan reagen yang ditambahkan aquadest steril atau dengan internal kontrol.

Penggunaan kontrol dalam PCR untuk membuktikan :

1. PCR yang kita kerjakan tersebut telah dikerjakan atau berjalan dengan benar.
2. DNA yang diamplifikasi adalah target yang memang diinginkan dan bukan kontaminan atau *Carry-over*.
3. Penggunaan kontrol negatif yaitu dengan mencampurkan komponen – komponen reaksi, tetapi tidak ditambahkan DNA cetakan (ditambahkan aquadest steril) , kemudian dilakukan inkubasi. Selain itu, dapat juga digunakan kontrol yang lain yaitu suatu fragmen DNA , misalnya DNA plasmid, yang secara teoritis bukan merupakan DNA cetakan. Fragmen DNA tersebut digunakan untuk menggantikan DNA cetakan dalam reaksi kontrol.
4. Untuk mengetahui kompetensi PCR pada suatu spesimen, digunakan intrinsik kontrol. Bila suatu spesimen klinik tidak teramplifikasi dan diduga ada inhibitor PCR dalam spesimen, masukkan sekuen kontrol dengan *low copy number* (misal 20 kopi) ke dalam spesimen, kemudian PCR dijalankan kembali (Purwantadkk, 1999;Yuwono,2006).



Positif palsu dan negatif palsu kemungkinan dapat terjadi pada saat pembacaan hasil elektroforesis. Cara mengatasi positif palsu dan negatif palsu antara lain adalah :

1. Ada kontrol positif yang sudah di ketahui pasti positif atau memiliki nilai kepositipan dan ketepatan yang tinggi.
2. Ada kontrol negatif dengan menggunakan reagen yang ditambahkan aquadest steril.
3. Mengawasi/mengontrol suhu dan waktu proses amplifikasi, terutama pada tahap *annealing* harus tepat.
4. Menghindari kontaminasi DNA dari awal persiapan sampel, ekstraksi dan pemurnian DNA, amplifikasi dan elektroforesis DNA.
5. Menambahkan senyawa yang mengurangi latar belakang (*Back ground*) gel pada saat pembacaan DNA dengan menggunakan sinar UV. Seperti menghilangkan kelebihan *ethidium bromide* pada gel, dengan cara merendam kembali gel pada larutan *buffer running* seperti *Tris Borax EDTA* (TBE) atau *Tris Acid EDTA* (TAE) selama 30 menit.
6. *Primer* yang digunakan harus *conserve*.
7. Jumlah sampel DNA mencukupi.
8. Program amplifikasi harus tepat.
9. Menggunakan *nested* / hibridisasi.
10. Kerja harus steril / aseptik dan penggunaan alat yang *disposable*.

(Prihartini,1996 ; Purwantadkk, 1999; Yuwono,2006)

Kontrol terhadap *amplicon carry – over (carry-over- control)* dengan tujuan untuk menekan kontaminasi oleh amplified DNA, dapat dilakukan dengan cara :

## 1. Enzimatik

Menggunakan *Uracil N-glycosilase* (UNG). Cara ini berdasarkan sifat UNG yang pada temperatur kamar memotong DNA pada residu urasil dan tidak aktif pada temperature tinggi. Penggunaan secara rutin dUTP sebagai ganti TTP pada *master mix*, menghasilkan produk PCR yang terkandung di lingkungan laboratorium. Pemberian UNG sebelum amplifikasi akan menghalangi amplifikasi DNA yang megandung U amplikon / kontaminan ), akan tetapi tidak berpengaruh terhadap amplifikasi DNA yang mngandung T pada DNA target. UNG tidak aktif selama reaksi amplifikasi sehingga molekul yang baru dibentuk tidak terpengaruh.

## 2. Kimiawi

Menggunakan fotokimia isopsoralen. Prosedur inaktivasi secara fotokimiawi untuk DNA yang sudah diamplifikasi di sini menggunakan derivat isopsoralen. Amplifikasi dilakukan dengan adanya isopsoralen. Setelah amplifikasi, tabung reaksi di – irradiasi dengan sinar UV dan isopsoralen akan memodifikasi DNA di dalamnya. Bila DNA modifikasi tersebut dibawa pada amplifikasi berikutnya, ia tidak berfungsi sebagai template untuk amplifikasi (Purwantadkk, 1999)

## 2.6 Elektroforesis

### 2.6.1 Tinjauan umum Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan yang banyak digunakan untuk memisahkan makro molekul (seperti protein dan asam nukleat). Prinsip kerjanya berdasar pada perbedaan kecepatan gerak partikel-partikel bermuatan dalam medan listrik (Supardi, 1991).

### 2.6.2 Elektroforesis Gel Agarose

Molekul DNA, protein dan banyak senyawa biologik lain membawa muatan listrik pada pH tertentu. Pada pH elektroforesis DNA bermuatan negatif. Akibatnya, pada medan listrik molekul DNA akan bermigrasi menuju kutub positif. Kecepatan

migrasi molekul antara lain bergantung pada bentuk molekul DNA dan muatan listriknya. Meskipun demikian ukuran molekul DNA juga ikut menentukan kecepatan migrasi jika elektroforesis dilakukan dalam media gel. Gel dapat terbuat dari agarose, poliakrilamid, atau campuran keduanya, yang membentuk struktur kerangka dengan lubang-lubang kompleks, tempat lewatnya molekul DNA. Makin kecil molekul DNA makin cepat pula perpindahannya melewati gel. Karena itu elektroforesis gel akan memisahkan molekul DNA sesuai dengan ukurannya (Brown, 1991).

Elektroforesis gel agarose adalah salah satu jenis elektroforesis yang menggunakan gel agarose sebagai bahan dalam elektroforesis untuk mendeteksi DNA produk PCR (Supardi, 1991).

Pada elektroforesis molekul DNA bermigrasi dari kutub negatif medan listrik menuju kutub positif dengan jarak perpindahan molekul yang bergantung pada beberapa faktor, antara lain panjang DNA dan besar arus listrik. Pada akhir reaksi gel elektroforesis masing-masing molekul DNA akan terpisah dan dari jarak tempuhnya dapat diketahui ukurannya. Kadar gel yang sering digunakan adalah 0,7% - 2% (Brown, 1991).

Kadar gel agarose untuk pemeriksaan yang efisien dapat dilihat pada tabel 2.1.

**Tabel 2.1 Kadar gel agarose untuk pemeriksaan yang efisien (Supardi, 1991)**

Agarose (% b/v)	Ukuran molekul DNA (kbp)
0,3	5 – 50
0,6	1 – 20
0,8	0,5 – 10
1,0	0,4 – 8
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 4
1,8	0,2 – 3

Keterangan :

b/v : berat/volume

kbp : kilo base pair

Untuk mendeteksi pita DNA pada gel dapat digunakan *ethidium bromide*. Bahan pewarna ini berikatan dengan molekul basa DNA dan menyebabkan DNA berpendar bila disinari dengan sumber cahaya ultraviolet. *Ethidium bromide* juga dapat memantau kemajuan proses elektroforesis, sehingga dapat pula ditambahkan dalam larutan dapar elektroforesis (Supardi, 1991).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Dispepsia merupakan suatu gejala klinis dengan keluhan rasa nyeri yang berpusat pada perut bagian atas yang dapat disebabkan oleh berbagai penyebab, baik karena infeksi *H. pylori* maupun non infeksi *H. pylori* (Yuan *et al*, 2006).

Kebijakan terapi yang berbeda dalam penanganan dispepsia yang disebabkan oleh *H. pylori* (bentuk spiral dan kokoid) dan dispepsia yang bukan disebabkan oleh mikroorganisme ini menyebabkan penting dilakukan pemeriksaan *H. pylori* secara tepat dan cepat. Pemeriksaan infeksi *H. pylori* yang umum dilakukan adalah dengan cara non-invasif dan invasif, yang selama ini masing – masing mempunyai kelemahan. Sebagai contoh, teknik UBT untuk pemeriksaan membutuhkan biaya tinggi dan memerlukan persyaratan yang sulit. Prinsip kerja UBT yang berdasarkan aktifitas enzim urease dapat menunjukkan hasil negatif palsu, misalnya untuk *H. pylori* bentuk kokoid, karena bentuk ini tak menunjukkan aktifitas enzimatik urease. Pemeriksaan serologi ELISA, ICT, *dipstick* dan *latex agglutination* untuk deteksi serologik anti – *H. pylori* memerlukan reagen impor yang menggunakan antigen *H. pylori* dari negara pembuatnya, yang belum tentu sesuai untuk negara lain, sehingga dapat memberikan hasil yang berbeda.

Pemeriksaan invasif untuk deteksi *H. pylori* antara lain menggunakan teknik CLO (*campylobacter like organism*), kultur biopsi lambung dan pemeriksaan histopatologi. Sensitifitas ketiga cara invasif ini, dipengaruhi oleh densitas *H. pylori* dan perubahan morfologi *H. pylori* (Tokunaga *et al*.,2000 ; Logan dan Walker,2001).

Pemeriksaan mikrobiologi (kultur) merupakan pemeriksaan baku emas (*gold standard*) untuk pemeriksaan *H. pylori*. Namun demikian, metoda ini memiliki kelemahan, seperti misalnya waktu inkubasi yang lama, biaya kultur yang mahal, proses kultur bentuk kokoid *H. pylori* yang sulit, dan sensitivitas yang relatif rendah (Wasito *et al*,2001).

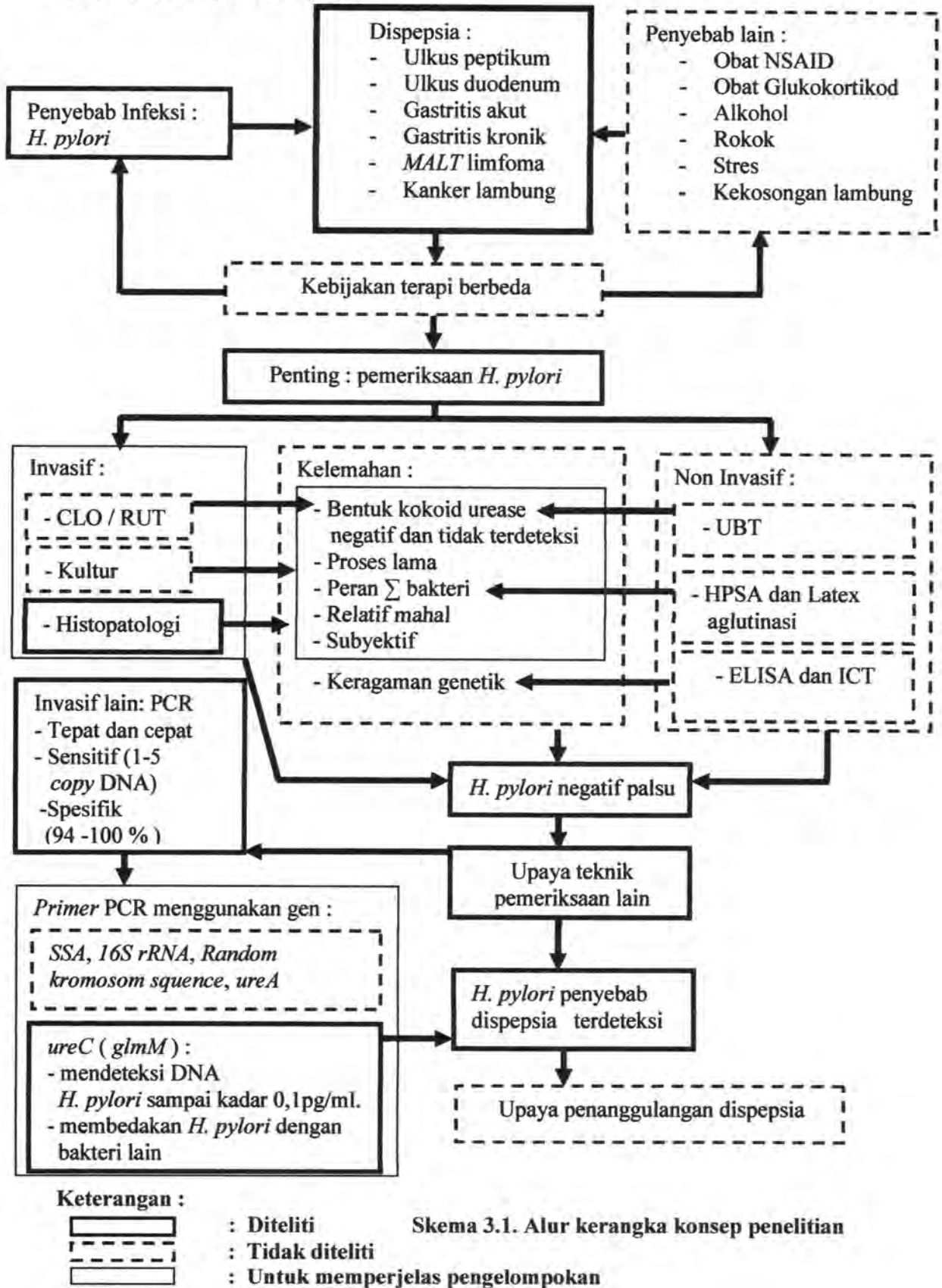
Pemeriksaan histopatologis bersifat subyektif karena hasilnya ditentukan oleh ukuran biopsi, ketepatan dalam lokasi penyayatan jaringan, jenis pewarnaan jaringan, jenis pewarnaan bakteri. Selain itu, bentuk kokoid *H. pylori* lebih sulit dideteksi dengan pemeriksaan histopatologis, sehingga dapat memberikan hasil pemeriksaan negatif. Pemeriksaan invasif lain menggunakan PCR merupakan pemeriksaan alternatif untuk diagnosis *H. pylori* yang lebih tepat dan cepat. Keunggulan teknik ini antara lain terletak pada kemampuannya untuk menggandakan *fragmen* DNA secara *eksponensial* dalam waktu singkat, kemampuannya untuk menegakkan diagnosis kasus penyakit infeksi yang sulit dengan tepat dan cepat, sensitifitasnya yang tinggi, yang mampu mendeteksi 1-5 *copy* DNA ( $\leq 10^3$  CFU/ml atau  $< 2,5 - 3,5$  ug/ml DNA), tahapan kerjanya yang cukup sederhana serta spesifisitasnya yang tinggi. Namun teknik ini masih memiliki kelemahan, yaitu ketidak mampunya untuk membedakan mikroorganisme hidup dengan mikroorganisme mati. Selain itu, teknik ini juga tidak dapat memberikan petunjuk tentang kepekaan *H. pylori* terhadap antibiotika (Cherian *et al.*,1998; Wasito dkk, 2001; Soewondo, 2002).

PCR dengan menggunakan *primer* dari daerah gen *ureC* (*glmM*) memiliki sensitifitas yang tinggi sehingga dapat mendeteksi DNA *H. pylori* sampai kadar 0,1 pg/ml, dan juga spesifitas tinggi sehingga dapat membedakan spesies bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengan *H. pylori*, seperti misalnya *Campylobacter jejuni*

dan spesies bakteri Gram negatif dengan urease positif, seperti misalnya *Proteus vulgaris* dan *Proteus mirabilis* (Lu et al., 1999; Cesar et al., 2005).

Berdasarkan perbedaan kebijakan terapi yang berbeda dalam penanganan dispepsia karena infeksi *H. pylori* dan bukan *H. pylori*, serta kelemahan yang dimiliki oleh teknik non – invasif dan teknik invasif, maka teknik PCR menggunakan primer gen *ureC* (*glmM*) dapat diandalkan sebagai cara pemeriksaan yang akurat untuk membantu deteksi *H. pylori*, sebagai upaya meningkatkan upaya kesehatan dalam mencegah peningkatan penderita dispepsia di Provinsi NTB.

3.2 Alur Kerangka konseptual



Skema 3.1. Alur kerangka konsep penelitian



**BAB 4****METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Berdasarkan sifat masalah yang diteliti maka penelitian ini dapat digolongkan sebagai penelitian observasional analitik, dengan menghitung proporsi sampel *H. pylori* positif dengan metode PCR menggunakan primer gen *ureC* (*glmM*) dari sediaan blok parafin penderita dispepsia dengan hasil histopatologi negatif, yang kemudian dilanjutkan dengan penghitungan perkiraan (estimasi) hasil PCR *H. pylori* positif pada populasi.

**4.2. Populasi dan Sampel Penelitian****4.2.1. Populasi penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia yang telah diperiksa secara histopatologi dengan hasil pemeriksaan *H. pylori* negatif. Blok parafin biopsi lambung ini merupakan koleksi dari laboratorium klinik Biomedika Mataram NTB dan laboratorium klinik diagnostik Sumbawa Surabaya yang dikumpulkan dari bulan Agustus 2004 sampai dengan bulan Agustus 2007, dengan jumlah 139 blok parafin biopsi lambung. Spesimen ini diambil dari penderita dengan diagnosis dispepsia yang datang ke laboratorium klinik Biomedika Mataram. Penderita berasal dari Kabupaten Bima, Sumbawa, Lombok Timur, Lombok Tengah, Lombok Barat, Dompu, Sumbawa Barat dan Kota Mataram. Bahan biopsi lambung tersebut kemudian dikirim ke laboratorium klinik diagnostik Sumbawa Surabaya untuk pemeriksaan secara histopatologi.

#### 4.2.2 Sampel penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif (-).

#### 4.2.3 Besar sampel

Besar sampel dalam penelitian ini dihitung setelah pemeriksaan pendahuluan, dengan menggunakan rumus untuk populasi terbatas (Zainuddin, 2000) sebagai berikut:

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}{d^2 \cdot (N - 1) + Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}$$

keterangan :

n : besar sampel

p : *estimator* (perkiraan) proporsi dari populasi yang didapatkan dari hasil uji pendahuluan  
(3/20 x 100 % = 15 %) = (0,15)

q : 1 - p (1 - 0,15) = 0,85

N : jumlah unit populasi = 139

$Z_{\alpha/2}$  : harga kurva normal yang tergantung dari harga  $\alpha$

Untuk  $\alpha = 0,05$  (5%),  $Z_{\alpha/2} = 1,96$

d : penyimpangan yang ditolerir = 5% (0,05)

sehingga:

$$n = \frac{139 \cdot (1,96)^2 \cdot 0,15 \cdot 0,85}{(0,05)^2 \cdot (139 - 1) + (1,96)^2 \cdot 0,15 \cdot 0,85}$$

$$n = \frac{139 \cdot 0,489804}{0,0025 \cdot 138 + 0,489804}$$

$$n = \frac{68,082756}{0,345 + 0,489804} = \frac{68,082756}{0,834804} = 81,5553$$

Besar sampel dibulatkan menjadi 82.

Dalam penelitian ini dilakukan deteksi *H. pylori* menggunakan metode PCR dengan *primer* gen *ureC* (*glmM*) dari 82 spesimen yang diambil dari 139 blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif (-).

#### 4.2.4 Teknik pengambilan sampel

Dalam penelitian ini dilakukan pengambilan sampel (*sampling*) dengan teknik “*simple random sampling*”, dengan cara diundi. Teknik *sampling* ini dipergunakan karena populasi sampel yang tersedia bersifat homogen.

### 4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 4.3.1 Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah hasil PCR dengan *primer* gen *ureC* (*glmM*) dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif (-).

#### 4.3.2 Definisi operasional.

- a. Spesimen blok parafin biopsi lambung adalah biopsi lambung yang diproses dengan teknik histopatologi menggunakan tahapan fiksasi, *clearing*, infiltrasi dan *embedding* parafin dengan bentuk kotak.

- b. Sampel *H. pylori* negatif adalah berupa spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia yang menunjukkan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif.
- c. Hasil PCR positif dari gen *ureC (glmM)* *H. pylori* adalah munculnya pita DNA *H. pylori* pada elektroforesis gel agarose 2 % dan pewarnaan *ethidium bromide* (10 mg/ml), yang menempati posisi urutan nukleotida 294 bp (berasal dari nukleotida gen *ureC /glmM* no 784 – 1077).

#### 4.4 Bahan Penelitian

- a. Kit Go Taq<sup>®</sup> PCR core system I (Promega) cat.no. M7660, lot.no. 240992
- b. Agarose (Invitrogen) cat.no. 15510-027, lot.no.1137924
- c. American Type Culture Collection ( ATCC ) 53726 *H. pylori* sebagai kontrol positif.
- d. Aquadest/aquabidest
- e. Ethidium bromide (Sigma) lot.no. 55H367615 konsentrasi 10 mg/ml
- f. EDTA (Sigma) cat.no. E-5134, lot.no.91K0133
- g. Asam borat (Sigma) cat.no. B-6768, lot.no 052K0006
- h. Trizma (Gibco BRL) cat.no. 15504-020, lot.no. 1024731
- i. Brom phenol blue (Sigma) cat.no. B-5525, lot.no.111K3684
- j. Tween 20 (1 %) (Sigma) lot. no. 54H0285
- k. Natrium hidroksida (Merk) lot.no. B766798-550 code no. 1.06498.0500
- l. Primer gen *ureC (glmM)* nt 784-1077, dengan hasil produk PCR 294 bp dengan nama primer dengan urutan nukleotida adalah :
- Forward primer*, 5'- AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' (GC 44%), panjang nukleotida 25, primer menempel pada posisi nukleotida 784...808
- Reverse primer*, 5'- AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' (GC 37,5%)

panjang nukleotida 24, *primer* menempel pada posisi nukleotida 1054...1077.

Masing – masing larutan oligonukleotida *primer forward* dan *reverse* dibuat dengan konsentrasi 1,0  $\mu\text{M}$ .

- m. *Xylene p.a (Merk)* lot.no. K17439881
- n. *Proteinase K (Invitrogen)* part.no. 46-6084, Lot.no 1353926
- o. *Marker PCR G316A* atau *Mass ladder kit Invitrogen*  
Cat.no. 15628-09, lot.no.367633.
- p. Etanol absolut GR (*Merk*) lot.no. K34416583
- q. DNA *Taq Polymerase* 1,25 U
- r. *Buffer lisis (L22) Invitrogen* part.no. 46-6625, lot.no. 1359725
- s. Aseton (*Merk*) lot.no. K28120114033
- t. *Ultrapure<sup>™</sup> 10 X TBE Buffer (Invitrogen)* pH 8,4  $\pm$  0,10 cat.no. 15581-044, lot.no. 355127
- u. *Blue Juice<sup>™</sup> 10X (Invitrogen) gel loading buffer* cat.no. 10816-015, lot.no.376698
- v. Natrium klorida (*Merk*) lot.no.K34243404-504 code.no. 1.06404.1000

Semua bahan – bahan tersebut di atas digunakan dalam studi pendahuluan dan pelaksanaan penelitian.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. *Machine Biorad Thermal iCycler*
- b. Alat elektroforesis yang terdiri dari :
  1. *Mini sub cell power supply PAC model 1000/500* untuk elektroforesis DNA (*Biorad laboratories, California USA*)
  2. *Gell apparatus (Biorad)*
  3. *Elektroforesis apparatus horizontal (Biorad)*
- c. *Centrifuge TOMY MC-140 (TOMY Corp, Japan)*
- d. *Centrifuge Sorvall Biofuge.*
- e. Mikro pipet dari Biorad volume :  
0,5  $\mu$ l - 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l- 1000  $\mu$ l, 20  $\mu$ l - 200  $\mu$ l, 10  $\mu$ l - 100 $\mu$ l
- f. *Vortex type 37600 super mixer*
- g. *Hot Plate Cimarec 2 (Thermolyne)*
- h. *Eppendorf / micro tubes* 200  $\mu$ l, 1,5 ml, dan 1,8 ml
- i. Gelas ukur pirex 100 ml, 500 ml, 1000 ml
- j. Parafilm (*Sigma* lot. 95H0419)
- k. Kertas pH indikator
- l. Timbangan elektrik
- m. *Waterbath (Memmert-Germany)*
- n. *Bio-rad Gel DOC XR tipe 170 – 8170* dilengkapi komputer *software* YP dengan *Dell optiplex GX 520.*
- o. Mikrotom *Shibuya Optical Co*
- p. *Autoclave 55-245 (Tommy,Japan)*
- q. *Esco class II tipe A2 lab kultur (Laminary flow)*

- r. Inkubator CO<sub>2</sub> MCO – 175 (*Sanyo-Japan*)
- s. Tusuk gigi steril
- t. Rak eppendorf

#### 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.6.1 Lokasi penelitian.

Penelitian dilakukan di laboratorium instalasi penelitian dan pengembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram.

##### 4.6.2 Jadwal penelitian.

Penelitian ini dilakukan selama 8 bulan, mulai bulan November 2007 sampai dengan Juni 2008, jadwal penelitian seperti terlihat pada table 4.1

Tabel.4.1 Jadwal Penelitian.

Bulan ke – Kegiatan	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Studi pustaka	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Penyusunan proposal		XX	XX	XX				
Penelitian pendahuluan			XX					
Ujian proposal dan perbaikan proposal				XX				
Pelaksanaan penelitian					XX	XX		
Pengumpulan data						XX	XX	
Analisis data							XX	
Pembuatan laporan							XX	
Seminar hasil / Pra Tesis								XX
Ujian Tesis								XX

Keterangan :

I : November 2007      II : Desember 2007      III : Januari 2008  
 IV : Pebruari 2008      V : Maret 2008      VI : April 2008  
 VII : Mei 2008      VIII : Juni 2008

## 4.7 Prosedur Pengambilan Data

### 4.7.1 Tahapan kegiatan untuk memperoleh data

#### a. Persiapan dan seleksi sampel

Persiapan dan seleksi sampel dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil diagnosis histopatologi *H. pylori* negatif (-).

#### b. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *H. pylori* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi negatif dilakukan dengan menggunakan metode gabungan Koehler *et al* (2002) dan Yuwono (2006), dengan tahap-tahap ekstraksi sebagai berikut :

Spesimen blok parafin diminimalkan parafinnya dengan membuat bentuk potongan jaringan kotak kecil. Blok parafin tersebut dipotong dengan mikrotom buatan pabrik *Shibuya Optical Co* dengan ketebalan irisan 5  $\mu\text{m}$ . Hasil irisan diambil dengan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke dalam *eppendorf* 1,8 ml steril. Untuk mencegah kontaminasi silang, pisau mikrotom dan semua alat yang digunakan pada saat pemotongan dibersihkan dengan kapas steril yang dibasahi *xylene*. Parafin dapat dihilangkan dari jaringan dengan jalan dilarutkan dalam *xylene* 500  $\mu\text{l}$ . Spesimen kemudian diinkubasi pada suhu 65  $^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, dan selanjutnya di putar 8000 rpm selama 5 menit, supernatant dibuang. Ditambahkan 500  $\mu\text{l}$  etanol absolut, diputar 8000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan pelarutnya. Supernatan dibuang, sisa etanol dihilangkan dengan mengeringkan sampel dalam keadaan vakum atau dengan membilasnya menggunakan aseton dengan membuka tutup *eppendorf* dan meletakkannya di dalam *waterbath* pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$  - 50 $^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, sampai asetonnya habis menguap. Berikutnya ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  *buffer* lisis



dan 25  $\mu$ l *proteinase K* (5  $\mu$ g/25  $\mu$ l), disusul dengan inkubasi selama 3 jam pada suhu 55  $^{\circ}$ C. Setelah itu dilakukan *spin down* untuk menurunkan cairan yang ada pada tutup *ependorf*, diikuti inkubasi pada suhu 95  $^{\circ}$ C selama 8 – 10 menit untuk me-nonaktifkan *Protease K*. Terakhir dilakukan sentrifugasi selama 30 detik 8000 rpm untuk mengendapkan sisa parafin atau jaringan. Supernatan yang didapatkan digunakan sebagai *template* PCR.

### c. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan pada PCR *Machine BIO-RAD iCycler*. Bahan – bahan yang digunakan adalah kit Go Taq<sup>®</sup> *PCR core system I (Promega)* cat.no. M7660, lot.no. 240992, yang terdiri dari *buffer* PCR tanpa Mg 10 X, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10 mM, Taq *polymerase* 5 u/ul, oligonukleotida pasangan *primer* untuk amplifikasi DNA yaitu *primer gen ureC (glmM)* yang mengamplifikasi posisi nukleotida 784-1077, hasil produk PCR 294 bp dengan nama *primer* dan urutan nukleotida adalah :

*Forward primer*, 5'- AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' (GC 44%),

panjang nukleotida 25, *primer* menempel pada posisi nukleotida 784...808

*Reverse primer*, 5'- AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' (GC 37,5%)

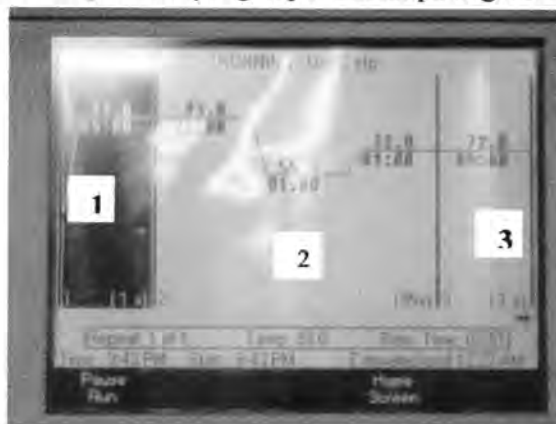
panjang nukleotida 24, *primer* menempel pada posisi nukleotida 1054...1077.

Masing – masing larutan oligonukleotida *primer forward* dan *reverse* dibuat dengan konsentrasi 50 pmol.

Adapun komposisi campuran reagen dan bahan pemeriksaan yang digunakan dalam PCR DNA *H. pylori* menggunakan *primer gen ureC (glmM)* adalah sebagai berikut :

<u>Komponen</u>	<u>Volume Komponen</u>	<u>Konsentrasi final</u>
ddH <sub>2</sub> O	30,75 µl	
Buffer (-) Mg 10 X	5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP @ 10 mM	1 µl	@ 200 µM
<i>Forward Primer</i> 50 pmol	2,5 µl	1,0 µM
<i>Reverse Primer</i> 50 pmol	2,5 µl	1,0 µM
Taq <i>Polymerase</i> 5 U / µl	0,25 µl	1,25 U / 50 µl
<i>Templete</i>	5 µl	< 0,5 µg / 50 µl
Total	50 µl	

Untuk kontrol positif (+), *DNA template* sampel diganti dengan DNA isolat *H. pylori* ATCC 53726 dan sebagai kontrol negatif (-) digunakan *aquabidest* steril, keduanya di amplifikasi sama seperti sampel. Pencampuran bahan – bahan tersebut dilakukan pada *eppendrof* 200 ul dalam *box* pendingin supaya DNA dan enzim yang digunakan tidak rusak. Campuran ini kemudian di *spin down* dan selanjutnya di masukkan ke dalam mesin PCR dengan kondisi amplifikasi yang dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Kondisi amplifikasi PCR menggunakan *primer* gen *ureC (glmM)*

Keterangan gambar 4.1 :

1. <i>Hot start</i>	93 °C selama 4 Menit	
2. <i>Denaturasi</i> (pemisahan DNA)	93 °C selama 1 menit	} 35 siklus
<i>Annealing</i> (penempelan primer)	55 °C selama 1 menit	
<i>Elongasi / Ekstensi</i> (pemanjangan DNA)	72 °C selama 1 menit	
3. <i>Elongasi post PCR</i>	72 °C selama 4 menit	

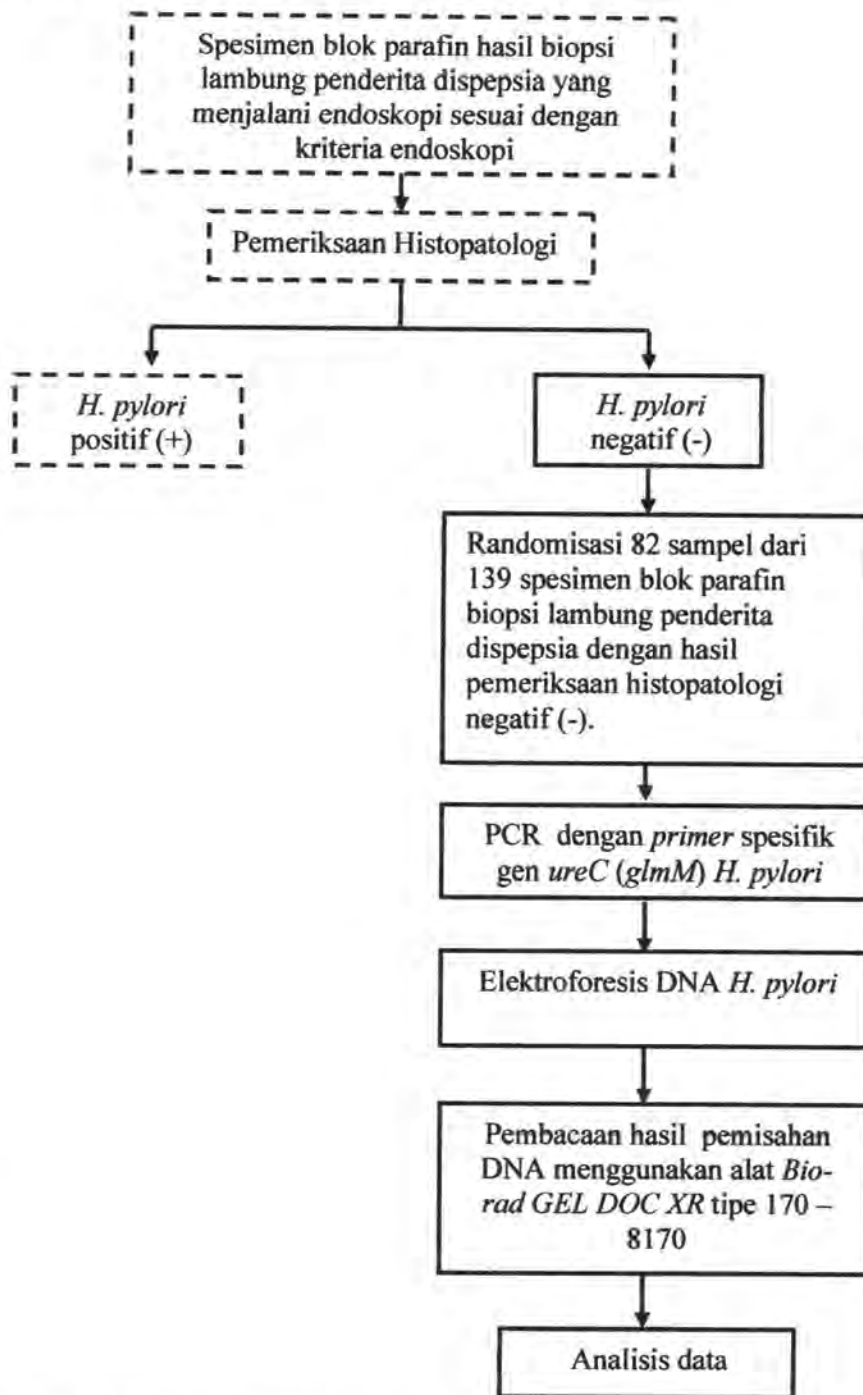
(Lu *et al.*, 1999; Ausubel *et al.*,1992)

#### d. Elektroforesis gel agarose

Gel agarose diletakkan pada alat elektroforesis dan digenangi dengan larutan dapar elektroforesis TBE (Tris Borat EDTA). Kemudian dipipet 3 µl larutan pemberat sampel (*loading buffer*) untuk masing-masing spesimen dan diletakkan di atas kertas parafilm. Setelah itu ditambahkan masing-masing 5 µl *marker* G316A atau *mass ladder kit invitrogen* cat.no. 15628-09, lot.no.367633, 10 µl hasil penggandaan (produk PCR) baik dari kontrol positif, kontrol negatif dan sampel ke masing-masing larutan pemberat sampel (*loading buffer*) yang telah diletakkan di atas kertas parafilm, dengan menghindari kemungkinan terjadinya kontaminasi. Setelah tercampur rata, larutan kemudian dipipet dan dengan hati-hati dimasukkan ke dalam lubang-lubang pada gel agarose. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 v sedlama 40 menit. Hasil pemisahan DNA dibaca dengan alat visualisasi *Biorad Gel Doc<sup>TM</sup> X-Ray* tipe 170 – 8170 dari *Biorad* dengan program *Icon quantity one system* (Ausubel *et al.*, 1992).

#### 4.7.2 Kerangka operasional penelitian.

Kerangka operasional penelitian digambarkan sebagai berikut :



Keterangan :  : Dikerjakan  
 : Tidak dikerjakan

**Skema 4.1 Kerangka operasional penelitian**

#### 4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menghitung proporsi sampel *H. pylori* positif dengan metode PCR menggunakan *primer gen ureC (glmM)* dari sediaan blok parafin penderita dispepsia dengan hasil histopatologi *H. pylori* negatif. Kemudian dilanjutkan dengan penghitungan perkiraan (*estimate*) atau taksiran interval proporsi hasil positif *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan *primer gen ureC (glmM)* pada populasi pada interval kepercayaan 95%.

## BAB 5

### HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *H. pylori*, mendapatkan data proporsi hasil PCR positif *H. pylori* dan mengetahui taksiran interval proporsi hasil *H. pylori* positif dengan metode PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)* pada populasi dengan interval kepercayaan 95% dari sediaan blok parafin penderita dispepsia dengan hasil histopatologi negatif di provinsi NTB.

#### 5.1. Data Penelitian.

Penelitian ini menggunakan 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif yang diambil secara acak dari populasi berjumlah 139 populasi. Sampel ini merupakan koleksi dari laboratorium klinik Biomedika Mataram NTB dan laboratorium klinik diagnostik Sumbawa Surabaya yang dikumpulkan dari bulan Agustus 2004 sampai dengan bulan Agustus 2007.

Deteksi *H.pylori* dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi negatif ini dilakukan menggunakan metode PCR dengan primer gen *ureC (glmM)*. Hasil PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarose 2 %, memakai pewarnaan ethidium bromida (10 mg/ml) dan dibaca pada alat *Gel Doc<sup>™</sup> X-Ray* tipe 170 – 8170 dari Biorad dengan program *Icon quantity one system*.

Pada tabel 5.1. dapat dilihat frekuensi sampel dengan diagnosis klinik dispepsia berdasarkan umur. Angka-angka ini berasal dari data sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia yang tercantum pada lampiran 2 halaman 90.

**Tabel 5.1. Frekuensi sampel dengan diagnosis klinis dispepsia berdasarkan kelompok umur.**

No	Umur (Tahun)	f	%
1	17 – 25	5	6,1
2	26 – 34	19	23,2
3	35 – 43	19	23,2
4	44 – 52	15	18,3
5	53 – 61	15	18,3
6	62 – 70	9	11,0
Total		82	100

Keterangan :

f : jumlah (frekuensi) sampel dengan diagnosis klinis dispepsia berdasarkan kelompok umur.

% : persentase

Dari tabel 5.1. tampak bahwa sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia terbanyak berasal dari kelompok umur 26 – 34 tahun, dengan angka 23,2 % (19/82) dan kelompok umur 35 – 43 tahun (23,2 %, 19/82), disusul berturut-turut oleh kelompok-kelompok umur 44 – 52 tahun (18,3 %, 15/82), 53 – 61 tahun (18,3 %, 15/82), 62 – 70 tahun (11,0 %, 9/82), dan 17 – 25 tahun (6,1 %, 5/82).

Pada tabel 5.2. dapat dilihat frekuensi sampel dengan diagnosis klinik dispepsia berdasarkan jenis kelamin. Angka-angka ini diperoleh dari data sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia yang tertera pada lampiran 2 halaman 90.

**Tabel 5.2. Frekuensi sampel dengan diagnosis klinis dispepsia berdasarkan Jenis kelamin.**

No	Jenis kelamin	f	%
1	Laki - laki	54	65,9
2	Perempuan	28	34,1
Total		82	100

Keterangan :

f : jumlah (frekuensi) sampel dengan diagnosis klinis dispepsia berdasarkan jenis kelamin.

% : persentase

Tampak pada tabel 5.2. tersebut bahwa sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia terbanyak berasal penderita laki-laki 65,9 % (54/82). Sampel dari penderita perempuan dijumpai lebih sedikit, dengan angka 34,1 % (28/82).

Tabel 5.3 menunjukkan frekuensi hasil pemeriksaan histopatologi sampel penderita dengan diagnosis klinik dispepsia. Data yang merupakan sumber tabel ini dapat dilihat pada lampiran 2 halaman 90.

**Tabel 5.3 Frekuensi sampel dengan diagnosis klinis dispepsia berdasarkan jenis kelainan pemeriksaan histopatologi.**

No	Jenis kelainan berdasarkan pemeriksaan histopatologi	f	%
1	Normal	13	15,9
2	Gastritis akut	12	14,6
3	Gastritis akut erosiva	17	20,7
4	Gastritis akut Haemorrhagik	6	7,3
5	Gastritis aktif	1	1,2
6	Gastritis kronik superfisial	20	24,4
7	Gastritis kronik	5	6,1
8	Gastritis atropik	2	2,4
9	Gastritis kronik atrofi	3	3,7
10	Gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal	1	1,2
11	<i>Mild</i> displasia dengan peradangan menahun	1	1,2
12	Tepi ulkus benigna	1	1,2
	Total	82	100

Keterangan :

f : jumlah (frekuensi) sampel dengan diagnosis klinis dispepsia berdasarkan jenis kelainan pemeriksaan histopatologi.

% : persentase

Tampak bahwa hasil pemeriksaan histopatologi yang terbanyak adalah gastritis kronik superfisial (20 spesimen, 24,4%), disusul berturut-turut oleh gastritis akut erosiva (17 spesimen 20,7 %), mukosa normal (13 spesimen, 15,9%), gastritis akut (12 spesimen, 14,6%), gastritis akut haemorrhagik (6 spesimen, 7,3%), gastritis kronik (5 spesimen, 6,1%), gastritis kronik atrofi (3 spesimen, 3,7%), gastritis atropik (2 spesimen, 2,4%), tepi ulkus benigna (1 spesimen, 1,2%), gastritis aktif (1 spesimen, 1,2%), gastritis



kronik atrofi dengan metaplasia intestinal (1 spesimen, 1,2%) dan *mild* displasia dengan peradangan menahun (1 spesimen, 1,2%).

## 5.2. Analisis dan Hasil Penelitian

Pada seluruh sampel blok parafin biopsi lambung dari penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif yang berjumlah buah, dilakukan pemurnian (*ekstraksi*) DNA dengan metode gabungan Koehler *et al* (2002) dan Yuwono (2006). PCR dilakukan menggunakan kit Go Taq<sup>®</sup> PCR core system I (*Promega*), mesin PCR BIO – RAD *iCycler*, primer gen *ureC* (*glmM*). DNA hasil PCR dipisahkan dengan *Elektrophoresis apparatus horizontal* (*Biorad*) dan hasilnya dibaca dengan alat *Gel Doc<sup>™</sup> X-Ray* tipe 170–8170 dari *Biorad*, dengan program *Icon quantity one system*.

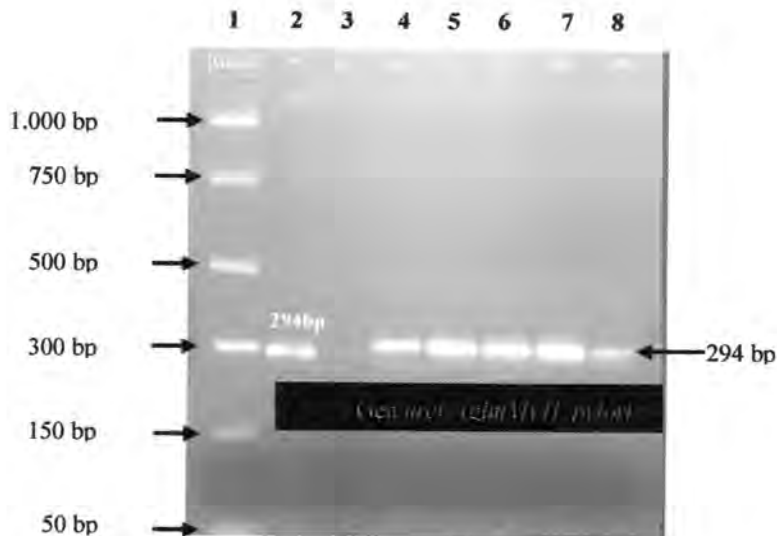
### 5.2.1 Hasil PCR dengan primer gen *ureC* (*glmM*) DNA *H. pylori*.

Deteksi DNA *H. pylori* dilakukan menggunakan pemeriksaan PCR dengan primer gen *ureC* (*glmM*). Primer gen *ureC* yang digunakan adalah primer gen *ureC* (*glmM*) yang mengamplifikasi posisi nukleotida 784-1077, hasil produk PCR 294 bp, dengan ciri-ciri sebagai berikut:

*Forward primer*, 5'- AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' (GC 44%), panjang nukleotida 25, primer menempel pada posisi nukleotida 784...808.

*Reverse primer*, 5'- AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' (GC 37,5%), panjang nukleotida 24, primer menempel pada posisi nukleotida 1054...1077.

Produk PCR dipisahkan pada dengan 2 % gel agarose dengan pewarnaan *ethidium bromide* (10 mg/ml) dan dideteksi dengan alat *Gel Doc<sup>™</sup> X-Ray* tipe 170 – 8170 dari *Biorad* dengan program *Icon quantity one system*. Contoh hasil visualisasi PCR dari DNA *H. pylori* menggunakan primer gen *ureC* (*glmM*) dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1. Hasil visualisasi PCR DNA *H. pylori* dengan primer gen *ureC* (*glmM*).

Keterangan :

- 1: Marker G316A
- 2: Kontrol positif ATCC 53726 *H. pylori* 294 bp
- 3: Kontrol negatif (aquadest)
- 4: Sampel B88 → Positif *H. pylori* (294 bp)
- 5: Sampel B99 → Positif *H. pylori* (294 bp)
- 6: Sampel B104 → Positif *H. pylori* (294 bp)
- 7: Sampel B112 → Positif *H. pylori* (294 bp)
- 8: Sampel B118 → Positif *H. pylori* (294 bp)

Data hasil pemeriksaan *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC* (*glmM*) dari 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif, yang digunakan untuk menghitung proporsi hasil positif *H. pylori* dapat dilihat pada lampiran 3 halaman 88 dalam tesis ini. Proporsi hasil deteksi DNA *H. pylori* positif menggunakan PCR dengan primer gen *ureC* (*glmM*) sebesar 47,6% (39/82) dan proporsi hasil negatif PCR adalah 52,4% (43/82).

Data hasil pemeriksaan *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC* (*glmM*) dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif berdasarkan kelompok umur yang digunakan untuk menghitung proporsi hasil positif *H. pylori* di dapatkan dari data

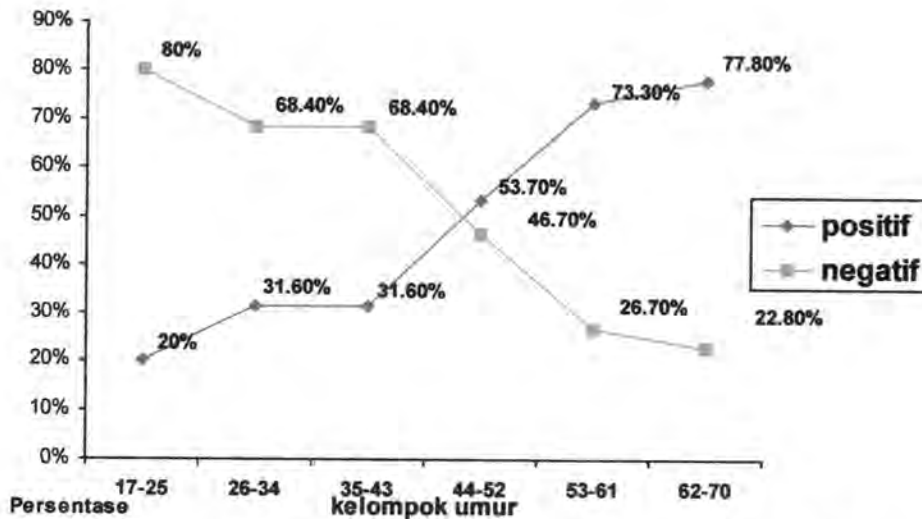
hasil yang terdapat pada lampiran 3 halaman 92. Proporsi hasil positif *H. pylori* pada sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia berdasarkan kelompok umur dapat terlihat pada tabel 5.4 dan diagram 5.1.

**Tabel 5.4. Proporsi hasil positif *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel berdasarkan kelompok umur**

N0	Umur (Tahun)	PCR positif		PCR negatif		Total	
		f	%	f	%	f	%
1	17 – 25	1	20	4	80	5	100
2	26 – 34	6	31,6	13	68,4	19	100
3	35 – 43	6	31,6	13	68,4	19	100
4	44 – 52	8	53,3	7	46,7	15	100
5	53 – 61	11	73,3	4	26,7	15	100
6	62 – 70	7	77,8	2	22,2	9	100
Total		39	47,6	43	52,4	82	100

Keterangan :

f : jumlah (frekuensi) sampel positif *H. pylori* dengan pemeriksaan PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)* berdasarkan umur.  
% : persentase



**Diagram 5.1. Proporsi hasil positif *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel berdasarkan kelompok umur**

Tabel 5.4 dan diagram 5.1 menunjukkan proporsi hasil positif PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif, berdasarkan kelompok umur. Tampak bahwa hasil PCR positif terbanyak dijumpai pada spesimen histopatologi negatif yang berasal dari kelompok umur 62 – 70 tahun (77,8 %, 7/9), disusul berturut-turut oleh spesimen kelompok umur 53 – 61 tahun (73,3 %, 11/15), 44 – 52 tahun (53,3 %, 8/15), 35 – 43 tahun (31,6 %, 6/19), 26 – 34 tahun (31,6%, 6/19) dan 17 – 25 tahun (20 %, 1/5).

Angka-angka hasil pemeriksaan *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif berdasarkan jenis kelamin yang digunakan untuk menghitung proporsi hasil positif *H. pylori* didapatkan dari data yang dapat dilihat pada lampiran 3 halaman 92.

Proporsi hasil positif *H. pylori* pada sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia berdasarkan jenis kelamin dapat terlihat pada tabel 5.5 dan diagram 5.2.

**Tabel 5.5. Proporsi hasil positif *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel berdasarkan jenis kelamin**

N0	Jenis kelamin	PCR positif		PCR negatif		Total	
		f	%	f	%	f	%
1	Laki - laki	27	50	27	50	54	100
2	Perempuan	12	42,90	16	57,10	28	100
	Total	39	47,60	43	52,40	82	100

Keterangan :

f : jumlah (frekuensi) sampel positif *H. pylori* dengan pemeriksaan PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)* berdasarkan jenis kelamin.

% : persentase

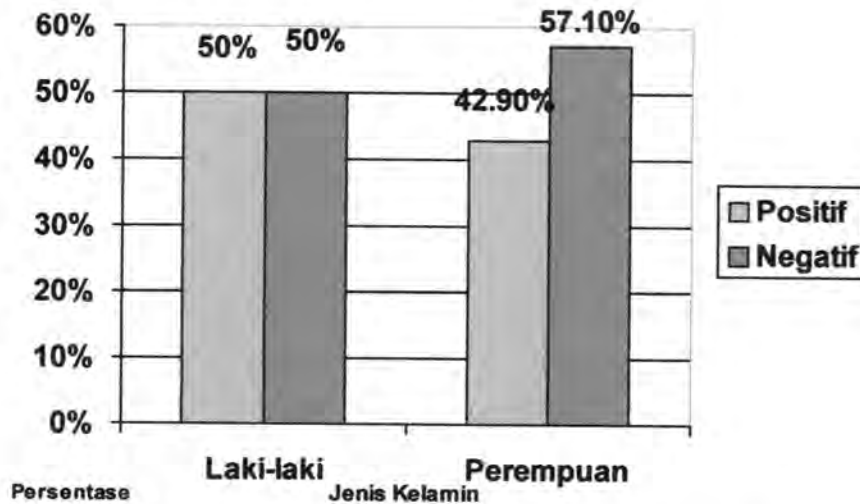


Diagram 5.2. Proporsi hasil positif *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel berdasarkan jenis kelamin

Tabel 5.5 dan diagram 5.2 menunjukkan proporsi hasil PCR positif dari 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif berdasarkan jenis kelamin. Tampak bahwa hasil PCR positif lebih banyak dijumpai pada spesimen histopatologi negatif yang berasal dari penderita laki-laki (50%, 27/54) daripada spesimen histopatologi negatif penderita perempuan (42,90 %, 12/28).

Angka-angka hasil pemeriksaan *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif berdasarkan kelompok pemeriksaan histopatologi yang digunakan untuk menghitung proporsi hasil positif *H. pylori*, di dapatkan dari data hasil yang dapat dilihat pada lampiran 3 halaman 92.

Proporsi hasil positif *H. pylori* pada sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia berdasarkan jenis kelainan hasil pemeriksaan histopatologi dapat terlihat pada tabel 5.6.

**Tabel 5.6 Proporsi hasil positif *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel berdasarkan jenis kelainan hasil pemeriksaan histopatologi.**

N0	Jenis kelainan berdasarkan pemeriksaan histopatologi	PCR positif		PCR negatif		Total	
		f	%	f	%	f	%
1	Normal	0	0	13	100	13	100
2	Gastritis akut	5	41,7	7	58,3	12	100
3	Gastritis akut erosiva	3	17,6	14	82,4	17	100
4	Gastritis akut Haemorrhagik	2	33,3	4	66,7	6	100
5	Gastritis aktif	1	100	0	0	1	100
6	Gastritis kronik superfisial	19	95	1	5	20	100
7	Gastritis kronik	3	60	2	40	5	100
8	Gastritis atropik	0	0	2	100	2	100
9	Gastritis kronik atrofi	3	100	0	0	3	100
10	Gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal	1	100	0	0	1	100
11	Mild displasia dengan peradangan menahun	1	100	0	0	1	100
12	Tepi ulkus Benigna	1	100	0	0	1	100
	Total	39	47,6	43	52,4	82	100

Keterangan :

f : jumlah (frekuensi sampel positif *H. pylori* dengan pemeriksaan PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel-sampel dengan berbagai jenis kelainan berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi.

% : persentase

Tabel 5.7 dan diagram 5.3, menunjukkan proporsi hasil PCR positif pada berbagai jenis kelainan histopatologis dari 82 sampel blok parafin penderita dispepsia yang tak menunjukkan *H. pylori* pada pemeriksaan histopatologi. Pada *mild* displasia dengan peradangan menahun didapati angka PCR positif sebesar 100% (1/1). Angka yang sama dijumpai pada gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal 100%, 1/1), gastritis aktif (100%, 1/1), dan tepi ulkus benigna (100%, 1/1), dan gastritis kronik atrofi (100%, 3/3). Pada berbagai kelainan histopatologis lain, proporsi tersebut berturut-turut adalah sebagai berikut: Gastritis kronik superfisial 95% (19/20), gastritis kronik 60% (3/5), gastritis akut 41,7% (5/12), gastritis akut haemorrhagik 33,3% (2/6), gastritis akut erosiva 17,6% (3/17). Tidak didapati hasil positif pada pasien dengan kelompok gastritis atropik.

Kelainan histopatologis terbanyak adalah gastritis kronik superfisial (20 sampel), dengan proporsi PCR positif sebesar 95% (19/20).

Taksiran interval proporsi hasil PCR positif *H. pylori* pada populasi dengan interval kepercayaan 95% dapat dilihat pada tabel 5.7. Angka - angka dan rumus untuk menghitung taksiran interval proporsi hasil PCR positif *H. pylori* pada populasi dengan interval kepercayaan 95 % terdapat pada lampiran 4 halaman 95 dan lampiran 5 halaman 93.

**Tabel 5.7. Taksiran interval proporsi hasil positif DNA *H. pylori* menggunakan PCR dengan primer gen *ureC (glmM)***

No	Sampel	Jumlah sampel	PCR positif		
			f	$\hat{p}$	IK 95 %
1	Blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi <i>H. pylori</i> negatif	82	39	47,6	36,75 – 58,37

Keterangan :

f : frekuensi hasil PCR positif

$\hat{p}$

P : proporsi PCR positif pada sampel (dalam %)

IK 95 % : taksiran interval proporsi PCR positif pada populasi dengan interval kepercayaan 95 % (dalam %)

Dari tabel 5.7 tampak bahwa taksiran interval proporsi hasil PCR *H. pylori* positif pada populasi adalah antara 36,75% – 58,37%, yang dihitung dengan rumus interval kepercayaan untuk proporsi tunggal (Sastroasmoro dan Ismael, 2002).

Taksiran interval proporsi hasil PCR *H. pylori* positif pada populasi antara 36,75% – 58,37% menyiratkan kita percaya 95% bahwa proporsi hasil positif pada deteksi *H. pylori* dari sampel spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di provinsi NTB dengan hasil histopatologi negatif menggunakan metode PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada populasi terjangkau terletak antara 0,3675 sampai 0,5837 atau antara 36,75 % – 58,37 %. Hal ini terbukti dengan hasil

penelitian dimana proporsi hasil positif PCR menggunakan *primer gen ureC (glmM)* dari 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif adalah 47,6 % yang terletak antara nilai taksiran interval proporsi 36,75 % – 58,37 %.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik yang bertujuan untuk mendeteksi *H. pylori*, mendapatkan data proporsi hasil PCR positif *H. pylori* dan mengetahui perkiraan (*estimate*) hasil PCR *H. pylori* positif dari spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia di Provinsi NTB, dengan hasil histopatologi negatif. Sampel dari penelitian ini adalah 82 spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif yang diambil menggunakan “*simple random sampling*”, dengan cara diundi dari 139 populasi. Teknik sampling ini dipergunakan karena populasi sampel yang tersedia bersifat homogen.

#### **6.1 Deteksi *H. pylori* menggunakan metode PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* pada sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif.**

Dari hasil penelitian ini tampak bahwa proporsi hasil positif PCR dari 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif adalah 47,6 %, sedangkan proporsi hasil negatif PCR adalah 52,4 %, dengan taksiran interval proporsi hasil PCR *H. pylori* positif pada populasi dengan interval kepercayaan 95% antara 36,75 % – 58,37 %. Berarti pemeriksaan PCR dengan menggunakan primer gen *ureC (glmM)* dapat menaikkan proporsi hasil positif *H. pylori* sebesar 47,6% pada sampel blok parafin biopsi lambung yang sebelumnya menunjukkan hasil *H. pylori* negatif pada pemeriksaan histopatologi. Hasil ini sejalan dengan penelitian Cesar *et al.*, 2005 yang membandingkan pemeriksaan histopatologi dan PCR dalam mendeteksi *H. pylori* pada 80 sampel biopsi lambung dengan diagnosis klinis gastritis ulkus benigna

dan 18 sampel dengan diagnosis klinis gastritis *adenocarcinoma* yang tidak menunjukkan adanya *H. pylori* pada pemeriksaan histologi, dengan hasil PCR positif masing-masing sebesar 27,5% (22/80) pada gastritis ulkus benigna dan 50% (9/18) pada gastritis *adenocarcinoma*.

Lebih rendahnya hasil positif *H. pylori* pada pemeriksaan histopatologi disebabkan oleh kelemahan-kelemahan yang terdapat pada teknik pemeriksaan histopatologi. Pemeriksaan histopatologi yang dilakukan menggunakan pewarnaan *Giemsa* yang hanya dapat mendeteksi *H. pylori* dalam bentuk sel vegetatif utuh berbentuk "S" atau batang bengkok. Sel vegetatif yang telah mengalami perubahan bentuk menjadi bentuk kokoid atau yang terpecah-pecah akan sulit terdeteksi dengan pewarnaan ini, dan hanya dapat dideteksi menggunakan pewarnaan yang lebih spesifik seperti misalnya pewarnaan perak *Warthin-Stary* atau dengan teknik imunohistokimia. Selain itu, ketepatan pemeriksaan histopatologi sangat bergantung pada tempat, jumlah, dan ukuran dalam penyayatan biopsi. Hal ini berkaitan dengan sifat habitat kolonisasi *H. pylori* bersifat fokal (infeksi insitu) tidak bersifat *diffuse* (menyebar) (Kumar *et al.*, 2005).

Perkembangan bioteknologi telah membuka cakrawala baru dalam ilmu pengetahuan dan teknologi. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR telah menjadi prosedur handal dalam biologi molekuler, yang dapat membantu menegakkan serta mempercepat pemeriksaan suatu penyakit. Metode PCR sangat sensitif karena mampu melipatgandakan satu molekul DNA menjadi jutaan *copy* DNA. PCR mampu mendeteksi 1-5 *copy* DNA ( $\leq 10^3$  CFU/ml atau  $< 2,5 - 3,5$  ug/ml DNA). Selain itu, PCR dapat mendeteksi mikroorganisme penyebab penyakit secara cepat dan tepat, dengan spesifisitas yang tinggi, karena menggunakan *primer* yang spesifik untuk potongan gen dari mikroorganisme yang dikehendaki. Namun teknik ini memiliki

kelemahan karena tidak dapat membedakan mikroorganisme yang masih hidup atau telah mati, serta tidak dapat memberi informasi tentang kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotika (Cherian *et al.*, 1998; Wasito dkk, 2001; Soewondo, 2002).

Pada penelitian ini tampak bahwa hasil positif *H. pylori* pada spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)* adalah lebih tinggi daripada yang diperoleh dengan pemeriksaan histopatologi. Ini mencerminkan keunggulan PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)*. PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* ini memiliki sensitifitas tinggi, yang dapat mendeteksi DNA *H. pylori* sampai kadar 0,1 pg/ml, dan memiliki spesifitas tinggi, yang dapat membedakan spesies bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengan *H. pylori*, seperti misalnya *Campylobacter jejuni* dan bakteri Gram negatif dengan urease positif, seperti misalnya *Proteus vulgaris* dan *Proteus mirabilis* ( Lu *et al.*, 1999; Cesar *et al.*, 2005).

Ini sejalan dengan pendapat Mishra *et al* (2002) yang menyatakan bahwa pemeriksaan PCR dengan menggunakan pasangan sekuen nukleotida dari gen *ureC H. pylori*, mampu menggandakan fragmen *H. pylori* dengan panjang 1.132 bp. PCR menggunakan pasangan sekuen nukleotida dari gen *ureC H. pylori* ini memberi hasil negatif pada 42 isolat klinik spesimen biopsi lambung penderita dengan *Campylobacter jejuni* yang sifat morfologi dan biokimianya menyerupai *H. pylori*, dan juga memberi hasil negatif pada 4 spesies bakteri lain dengan urease positif. Ini menunjukkan spesifitas tinggi primer gen *ureC H. pylori* yang dapat membedakan genom *H. pylori* dari bakteri lainnya dan menunjukkan bahwa primer gen *ureC H. pylori* adalah merupakan target deteksi *H. pylori* (Mishra *et al.*, 2002).

Moore *et al* (1993) dalam penelitiannya juga menguji spesifitas dari primer yang berasal dari sekuen gen *ureC H. pylori* terhadap berbagai spesies bakteri urease

positif dan beberapa *strain* bakteri yang karakteristiknya mirip *H. pylori*, dan menemukan bahwa *primer* yang berasal dari sekuen gen *ureC* *H. pylori* ternyata sangat spesifik untuk deteksi *H. pylori*. Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Lage *et al* (1995) yang menyatakan bahwa spesifitas PCR dengan *primer* yang berasal dari sekuen gen *ureC* telah di verifikasi lebih dari satu kali dan amplifikasi gen *ureC* hanya di dapatkan pada pemeriksaan *H. pylori* dan tidak pada bakteri urease positif lain. Pemeriksaan PCR spesimen biopsi lambung untuk deteksi *H. pylori* dengan menggunakan *primer* dari gen *ureC* juga tidak menunjukkan hasil positif palsu dan negatif palsu (Moore *et al.*, 1993 ; Lage *et al.*, 1995).

Spesifitas PCR dengan *primer* yang berasal dari sekuen gen *ureC* juga ditunjukkan dengan keberadaan gen *ureC* pada semua *H. pylori*, baik galur *H. pylori* yang bersifat sitotoksik maupun dari galur yang non sitotoksik, sedangkan gen *VacA* dan *CagA* hanya di dapatkan pada *H. pylori* sitotoksik. Ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa, berdasarkan toksin yang dihasilkan, terdapat 2 kelompok galur *H. pylori*. Kelompok pertama adalah galur *H. pylori* yang bersifat sitotoksik dengan gen *VacA* dan gen *CagA*, dan kelompok kedua adalah *H. pylori* non sitotoksik dengan *VacA* positif dan *CagA* negatif, ( Dunn *et al.*, 1997 ; Bodger dan Crabtree, 1998 ; Arherton *et al*, 2001 ).

Lu *et al* (1999), yang membandingkan 5 metode PCR yang menggunakan *primer* dari daerah gen *16S rRNA*, *primer* gen *random kromosom sequence*, *primer* gen *species-specific antigen 26-kDa (SSA)*, *primer* gen *ureC (glmM)* dan *primer* gen *ureA* untuk mendeteksi *H. pylori* pada jaringan lambung, memperoleh hasil yang menunjukkan *primer* dari daerah gen *ureC (glmM)* memiliki sensitifitas yang tinggi, karena PCR yang dilakukan dengan *primer* dari daerah gen *ureC (glmM)*, walaupun merupakan metode PCR *single-step*, mampu mendeteksi DNA *H. pylori* sampai kadar

0,1 pg/ml. Peneliti ini menyatakan bahwa penggunaan PCR dengan *primer* dari daerah gen *ureC* (*glmM*) sangat sensitif dan spesifik untuk penerapan deteksi *H. pylori* dalam spesimen klinik (Lu *et al*, 1999).

Berdasarkan hasil penelitian ini, bila *diagnosis etiologis* hanya ditujukan untuk mengetahui apakah penyebab infeksi adalah *H. pylori*, tanpa melihat kelainan yang ada pada lambung, maka dimungkinkan untuk mendeteksi mikroorganisme dengan PCR tanpa harus melakukan pemeriksaan histopatologi atau melakukan kultur. Ini akan sangat menguntungkan, lebih-lebih bila metode deteksi konvensional yang tersedia kurang sensitif, misalnya karena bergantung pada jumlah mikroorganisme yang ada pada sampel pemeriksaan, atau bila mikroorganisme yang akan dideteksi tumbuh lambat, seperti misalnya *H. pylori*.

Berdasarkan hasil penelitian ini, proporsi hasil PCR negatif *H. pylori* adalah 52,4% (43/82). Hasil PCR negatif *H. pylori* antara lain menunjukkan tidak terdapatnya *H. pylori* pada spesimen blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia, atau kemungkinan karena DNA *H. pylori* mengalami mutasi dan terdapat keragaman genetik *H. pylori* pada tempat melekatnya *primer*, sehingga ada kemungkinan *primer* yang digunakan tidak dapat melekat (Purwanta *et al*, 1999; Handajani, 2006 ; Yuwono, 2006).

## **6.2 Keterkaitan umur dan jenis kelamin dengan dispepsia karena infeksi *H. pylori* dengan hasil PCR positif**

Data penelitian ini menunjukkan bahwa sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia terbanyak berasal dari kelompok umur 26 – 34 tahun (23,2%) dan 35 – 43 tahun (23,2%), disusul berturut-turut oleh kelompok umur 44 – 52 tahun (18,3%) dan 53 – 61 tahun (18,3%), kelompok umur 62 – 70 tahun (11,0%), dan kelompok umur 17 – 25 tahun (6,1%). Berdasarkan jenis kelamin, sampel

blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia lebih banyak berasal dari laki-laki 54 orang (65,9 %) daripada perempuan 28 orang (34,1%).

Proporsi terbesar hasil *H. pylori* positif pemeriksaan PCR 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif dimiliki oleh kelompok umur 62 – 70 tahun 77,8% (7/9), disusul kelompok umur 53 – 61 tahun 73,3% (11/15), 44 – 52 tahun (8/15), 35 – 43 tahun 31,6% (6/19), 26 – 34 tahun 31,6% (6/19) dan 17 – 25 tahun 20% (1/5). Tampak bahwa ada hubungan antara umur dengan proporsi positif *H. pylori*, prevalensi infeksi *H. pylori* makin meningkat seiring dengan makin bertambahnya umur. Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan Indrawan, 1995, bahwa infeksi *H. pylori* meningkat seiring dengan bertambahnya umur, yang bertambah 1% tiap 1 tahun pertambahan umur. Di negara berkembang prevalensi infeksi meningkat dengan tajam segera setelah lahir dan dapat mencapai 80% - 90% pada masa umur 20 tahun. Sebaliknya, di negara maju kejadian infeksi dibawah umur 25 – 30 tahun boleh dikatakan tidak banyak, yaitu sekitar 5% - 10%. Prevalensi ini berangsur-angsur meningkat sehingga pada umur 60 tahun yang terkena infeksi adalah 60 %. Pada umur 70 tahun angka prevalensi tersebut bertambah menjadi 60% - 70 %. Hubungan antara meningkatnya umur dengan proporsi positif *H. pylori* juga di perkuat dengan pernyataan Wibawa pada tahun 2006 yang menyatakan bahwa prevalensi infeksi *H. pylori* meningkat sesuai pertambahan usia di seluruh dunia, yaitu 40 – 60% pada orang tua asimtomatik dan lebih dari 70% pada orang tua dengan penyakit gastrointestinal (Wibawa, 2006).

Keterkaitan infeksi *H. pylori* dengan umur dapat mempengaruhi epidemiologi infeksi *H. pylori*. Hal ini di perkuat oleh pernyataan Soewignjo, 2002, yang mengemukakan bahwa ada pengaruh umur saat awal terkena infeksi dengan epidemiologi infeksi *H. pylori*. Penelitian menunjukkan bahwa di negara-negara

berkembang infeksi *H. pylori* telah terjadi pada masa anak-anak dan bahkan pada masa bayi. Ini berhubungan dengan tingkat sosioekonomi yang secara tidak langsung berhubungan dengan tingkat higiene dan sanitasi. Di negara-negara maju infeksi dimulai pada usia yang lebih tua, tetapi sebagian besar infeksi terjadi tetap dimulai pada umur kurang dari 15 tahun. Disamping itu, didapati bukti bahwa makin meningkatnya status sosio-ekonomi akan diiringi makin bertambahnya usia awal terkena infeksi *H. pylori* (Soewignjo, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan kelompok umur muda yang terinfeksi *H. pylori*, yaitu kelompok umur 17 – 25 tahun 20 % (1/5). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Chang, 1992, menggunakan metode seroepidemiologik yang menunjukkan bahwa 41% penderita ulkus duodenum karena infeksi *H. pylori* berumur 18 tahun.

Kaitan umur dengan perbedaan prevalensi infeksi *H. pylori* dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah rute penularan. Sumber penularan infeksi *H. pylori* bervariasi, berasal dari dalam keluarga, dari luar keluarga, dari tetangga dan dari lingkungan. Semua anggota keluarga yang terinfeksi *H. pylori* dan lingkungan berpotensi menjadi sumber infeksi *H. pylori* (Soebagyo, 2004). Rute penularan dan transmisi *H. pylori* dapat terjadi melalui air. *H. pylori* dapat bertahan hidup di dalam air kran dan limbah domestik selama enam hari. Di dalam air sumur, memasuki hari ke sembilan *H. pylori* masih mampu hidup walaupun jumlahnya sedikit dan bentuknya berubah menjadi kokoid, (Roekiandari dkk, 1999).

Berdasarkan hasil penelitian ini, dan dengan mengingat rute penularan infeksi oleh *H. pylori* yang bisa terjadi melalui air dan lingkungan, pemeriksaan PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sampel bahan muntahan lambung dan faeses (non invasif).

Proporsi hasil positif PCR dengan menggunakan primer gen *ureC (glmM)* dari 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif pada laki-laki adalah 50% (27/54), dan pada perempuan 42,9% (12/28). Berarti perbandingan hasil *H. pylori* positif pada laki-laki dan perempuan adalah 50% : 42,9% atau 1,17 : 1. Hasil ini menunjukkan proporsi PCR *H. pylori* positif pada laki-laki lebih tinggi 7,1% dibandingkan dengan proporsi PCR *H. pylori* positif pada perempuan.

Ini sesuai dengan hasil beberapa penelitian menggunakan teknik PCR dengan primer gen *ureC (glmM)* untuk deteksi *H. pylori*, yang melaporkan prevalensi *H. pylori* antara 33% - 70,1%, dengan prevalensi pada laki-laki yang lebih tinggi daripada perempuan. Namun tidak dikemukakan alasan mengapa terjadi hal tersebut (Monteiro *et al*, 2001 ; Fernando *et al*, 2002)

### **6.3 Keterkaitan jenis kelainan hasil pemeriksaan histopatologi dengan infeksi *H. pylori*.**

Proporsi hasil positif PCR dari 82 sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif berdasarkan kesimpulan pemeriksaan histopatologi, yang adalah *mild* displasia dengan peradangan menahun 100% (1/1), gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal 100% (1/1), gastritis aktif 100% (1/1), tepi ulkus benigna 100% (1/1), gastritis kronik atrofi 100% (3/3), gastritis kronik superfisial 95% (19/20), gastritis kronik 60% (3/5), gastritis akut 41,7% (5/12), gastritis akut haemorrhagik 33,3% (2/6), gastritis akut erosiva 17,6% (3/17), dan tidak di dapatkan hasil positif pada pasien dengan kesimpulan pemeriksaan histopatologi kelompok gastritis atropik.

Tampak bahwa kelainan yang terbanyak pada penderita dispepsia berdasarkan pemeriksaan histopatologi adalah gastritis kronik superfisial 95 % (19/20), disusul



oleh gastritis kronik atrofi 100% (3/3) dan gastritis kronik 60% (3/5). Terdapat beberapa kasus dengan kelainan yang mengarah ke keganasan lambung, yaitu *mild* displasia dengan peradangan menahun 100% (1/1), kasus gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal 100% (1/1), kasus gastritis aktif 100% (1/1), dan hasil histopatologi berupa tepi ulkus benigna 100% (1/1). Ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa infeksi *H. pylori* didapatkan pada 90% – 100% kasus dengan ulkus duodeni, pada lebih dari 75% kasus dengan ulkus lambung, pada 50% – 60% kasus dengan dispepsia non ulkus. Frekuensi infeksi *H. pylori* pada gastritis kronik adalah sekitar 50% - 96% (Tytgat *et. al.*, 1990).

Soewignjo (2002), mengemukakan adanya hubungan infeksi *H. pylori* dengan keganasan lambung. Banyak penelitian epidemiologik menunjukkan hubungan yang kuat antara adenokarsinoma lambung dengan infeksi *H. pylori*. Salah satu diantaranya adalah suatu studi multisenter yang melibatkan 3000 kasus adenokarsinoma lambung dari 13 negara di Eropa ( *Eurogast Study group*,1993). Hubungan dapat diterangkan karena didapatkan bahwa adenokarsinoma lambung erat hubungannya dengan gastritis atrofik, sedangkan telah terbukti infeksi *H. pylori* merupakan penyebab utama gastritis kronik aktif yang merupakan penyebab utama gastritis atrofik. Hubungan yang sangat kuat juga didapatkan antara infeksi *H. pylori* dengan limfoma pada jaringan limfoid mukosa lambung (MALT limfoma). Hubungan ini lebih diperkuat lagi bahwa pada fase awal dari eradikasi MALT limfoma, *H. pylori* dapat menimbulkan *regressi* spontan dari keganasan tersebut (Soewignjo,2002).

Patogenesis terjadinya gastritis kronik karena infeksi *H. pylori* dimulai dengan berhasilnya *H. pylori* menembus asam lambung dan masuk ke dalam habitatnya, tempat *H. pylori* dapat bertahan hidup dan mengadakan kolonisasi. Bakteri ini mengadakan kontak dengan epitel mukosa lambung melalui bagian bakteri yang

disebut adesin dan berikatan dengan gliserolipid yang terdapat pada epitel lambung. *H. pylori* menghasilkan berbagai enzim seperti misalnya urease, katalase, protease dan fosfolipase. Protease dan fosfolipase dapat merusak mukus lambung. Disamping itu bakteri ini juga memiliki gen pengkode produksi toksin yang menyebabkan reaksi peradangan, kerusakan jaringan dan menyebabkan gastritis kronik. Contohnya adalah *cytotoxin-associated gene (CagA)*, *vacuolating cytotoxin gene (VacA)* dan *induced by contact with epithelium gene (iceA)* yang merupakan marker dari strain *H. pylori* yang banyak menimbulkan ulkus peptikum, ulkus duodenum, gastritis atrofik, adenokarsinoma dan *mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)* limfoma lambung (Testerman *et al.*, 2001; Soewignjo, 2002).

Ljungh, 2000, mengemukakan adanya sejumlah faktor virulensi *H. pylori* penyebab gastritis kronis, *ulkus peptikum* dan kanker lambung. Contohnya adalah adesin, sitotoksin, protein aktivasi neutrofil, dan protein pengikat *matriks ekstraselular* seperti kolagen tipe IV dan laminin.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1. Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil analisis dan pembahasan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. *Polymerase Chain Reaction* menggunakan primer *ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif, dapat mendeteksi dan meningkatkan hasil positif *H. pylori*.
2. Proporsi hasil PCR positif *H. pylori* menggunakan primer gen *ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif adalah 47,6 % (39/82). Proporsi hasil PCR positif *H. pylori* berdasarkan jenis kelamin adalah laki – laki 50% (27/54), perempuan 42,90 % (12/28) dan proporsi hasil PCR positif *H. pylori* berdasarkan jenis kelainan pemeriksaan histopatologi yang terbanyak adalah gastritis kronik superfisial 95% (19/20).
3. Taksiran interval proporsi hasil positif *H. pylori* dengan metode PCR menggunakan primer gen *ureC (glmM)* pada populasi dengan interval kepercayaan 95 % adalah antara 36,75 % – 58,37 %.

#### 7.2. Saran

1. Perlu sosialisasi dari hasil penelitian ini dalam kaitannya dengan deteksi *H. pylori* pada penderita dispepsia, sehingga dapat memberikan gambaran yang lebih tepat mengenai proporsi infeksi *H. pylori* di provinsi NTB.

2. Kepada Institusi yang berwenang, hasil penelitian ini dapat dipertimbangkan di kemudian hari, untuk digunakan dalam membantu deteksi *H. pylori* dari penderita dispepsia dengan metode PCR menggunakan primer gen *ureC* (*glmM*) dari sampel biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif, dan dapat digunakan untuk mendeteksi *H. pylori* dari sampel muntahan lambung dan tinja (non invasif).
3. Dari hasil penelitian ini, disarankan bila *diagnosis etiologis* yang diinginkan hanya untuk melihat penyebab infeksi oleh *H. pylori* tanpa melihat kelainan pada lambung, maka dimungkinkan untuk mendeteksi *H. pylori* dengan hanya menggunakan PCR, tanpa harus melakukan pemeriksaan histopatologi atau melakukan kultur. Bila *diagnosis etiologis* bertujuan untuk melihat adanya kelainan pada lambung yang mengarah keganasan tanpa mendeteksi ada tidaknya *H. pylori* maka pemeriksaan Histopatologi harus dilakukan. Bila *diagnosis etiologis* bertujuan untuk melihat adanya kelainan pada lambung yang mengarah keganasan disertai dengan pemeriksaan ada tidaknya *H. pylori* maka dilakukan pemeriksaan Histopatologi dan PCR.
4. Perlu penelitian lebih lanjut dengan mendeteksi *cytotoxine – associated gene* (*CagA*), *vacuolating cytotoxine gene* (*VacA*) dan *induced by contact with epithelium gene* (*iceA*) *H. pylori* dari sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil *H. pylori* positif untuk mengetahui apakah *H. pylori* positif dari hasil penelitian ini bersifat patogen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Atherton JC, TL Cover, E Papini, JL Telford, 2001. Vacuolating cytotoxin in Moble HLT, Mendz GL and Hazell S (Eds) *Helicobacter pylori* physiology and genetics. ASM press.
- Ausubel FM, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, K Struhl, 1992. Short Protocols in molekuler biology. second edition. John Wiley & Sons. New York. pp. 15-3 – 15-10.
- Blaser MJ, 2005. An Endangered Species in the Stomach. Scientific American, halaman 24-31
- Bodger K, J Crabtree, 1998. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. British Medical Bulletin. 54(1): 139- 147.
- Brown TA, 1991. Pengantar kloning gena. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica, halaman 65 – 67.
- Cesar ACG, Patricia MC, Spencer LMP, Paula RL, and Ana ES, 2005. Comparison of histological and molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in Benign lesions and gastric Adenocarcinoma. Brazillian Journal of Microbiology. 36: 12-16.
- Chang MHC, 1992. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer in children. Cermin Dunia Kedokteran no. 81, hlm 112.
- Cherian T, MK Lalitha, M Anand, 1998. Polymerase chain reaction and enzyme immuno assay (EIA) for the detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid sample from pasien with cultur negative meningitis. Journal Clin Microbiology: 36 (12):3605-3608.
- Coussens LM, and Z Werb, 2002. Inflammation and cancer. Nature, 420:860-867.
- De Reuse H, A Labigne, DM Lecreulx, 1997. The *Helicobacter pylori ureC* codes for a Phosphoglucosamine Mutase. Journal of Bacteriology. 179(11):3488-3493.
- Doorn LJV, Y Henskens, N Nouhan *et al*, 2000. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and vacA, cagA, and iceA genotypes. Journal of Clinical Microbiology. 38(1): 13-17.
- Dunn BE, H Cohen, MJ Blaser, 1997. *Helicobacter pylori*. American Society for Microbiology. 10(4): 720 – 734.
- Feldman RA, 2001. Epidemiologic observation and open question about disease and infection caused by *H. pylori*. In: Achtman M, Suerbaum S, eds. *H. pylori*: molekuler and cellular biology. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press: 29-51.

- Fernando N, Holton J, Vaira D, DeSilva M, Fernando D, 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Sri Langka as determined by PCR. *J Clin Microbiol.* 40:2675-6.
- Fiche de diagnostic, 2007. *Helicobacter pylori*. Result for [http—www\\_microbes-edu-org-professionel-diag-img-hel-macrol\\_jpg.htm](http://www.microbes-edu-org-professionel-diag-img-hel-macrol_jpg.htm).( Accessed:2007,November 29).
- Forman D, DGNewel, F Fullerton, JWG Yarnell, 1991. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer (evidence from a prospective investigation). *Br.Med.J*,302:1302-1305.
- Gelfand,DH,and TJ White, 1990. Thermostable DNA polymerases.dalam: Triwibowo Yuwono, 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Yogyakarta: C.V.Andi Offset, halaman18-23.
- Giovannoni S, 1991. *Nucleic acid tehniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons (Stackebrant E and Goodfellow M edit). New York, pp. 177-201.
- GLMM- HELPY, 2007. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P25177. Last modified November 13,Version 56.
- Handajani R, 2006. Prinsip PCR. Materi kuliah mahasiswa program Pascasarjana Unair Surabaya.
- He Q, JP Wang, M Osato, LB Lachman, 2002. Real – time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal Clinical Microbiol*.40: 3720 – 3728.
- Holt JG, NR Krieg, PH Sneath, JT Staley, ST Williams, 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth edition, Baltimore-Maryland USA: Williams & Wilkins, pp. 194-195.
- Hua J, B Ho, P Zheng, KG Yeoh, SG Lim, 1998.Coexistence of *Helicobacter pylori* spiral and cocoid forms in experimental mice. *WJG*.4(6):485-488.
- Indrawan D, 1995. Peran kuman *Helicobacter pylori* dalam penyakit saluran cerna dalam makalah simposium *Helicobacter pylori* : Tantangan baru dalam tatalaksana penyakit saluran cerna. *Ujung Pandang*. Hlm 1-15.
- Iswidhani, dan Jiwintarum J, 2007. Eksplorasi uji aktivias antimikroba bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu kuda liar Sumbawa terfermentasi terhadap pertumbuhan dan profil integritas DNA *Helicobacter pylori*. Laporan penelitian Risbinakes Politeknik Kesehatan Mataram –NTB.Hlm 55.
- Jawet E, Melnick J, Adelberg E, (Editor Gerard Bonang)1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi.20. Jakarta, EGC Kedokteran . Halaman 2,262-263.
- Jekti DSD, 2003. Pengaruh Aerobiosis dan antibiotik terhadap karakteristik; daya tahan,virulensi dan ultrastruktur bentuk kokoid *Helicobacter pylori*. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Jiwintarum Y, 2006. Diktat Praktikum Cytohistoteknologi. Program Studi Analisis Kesehatan Mataram Politeknik Kesehatan Mataram-NTB.Halaman 5-10.

- Kist M, 1991. Immunology of *Helicobacter pylori*. In: Marshall BJ, McCallum RW, Guerrant RL.(Eds). *Helicobacter pylori*. Blackweel Scientific Publications. Boston.pp 92-110.
- Koehler CI, MB Mues, HP Dienes, J Kriegsmann, P Schirmacher, M Odenthal, 2003.*Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. J Clin Pathol:Mol Pathol. 56: 36-42.
- Konturek JW, 2003. Discovery By Jaworski Of *Helicobacter Pylori* And Its Pathogenetic Role In Peptic Ulcer, Gastritis And Gastric Cancer. J Physiol Pharmacol. 54 (Supll 3) : 23-41.
- Kumar V, AK Abbas, N Fausto, 2005. Robbins and Cotran, Pathologic basis Of Disease. Edisi 7,vol II Elsevier Saunders Philadelphia
- Kuster JG, MM Gerrits, JA Van Strijp,1997. Coccoid Form of *Helicobacter pylori* Are The Morphologic Manifestation of Cell Death. Infec Immun.65(9): 3672-3679.
- Lage AP, E Godfroid, A Fauconnier, *et al*,1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin microbial.33: 2752-2756.
- LaimoreTC,1990. *Polymerase Chain Reaction*. Availablefrom:[http://hg.wustl.edu/hdk\\_lab\\_manual/pcr/pcr.1.html](http://hg.wustl.edu/hdk_lab_manual/pcr/pcr.1.html) .(Accesed:2007,Oktober 28 ).
- Leite KMR, E Darini, FC Canavez, CM Carvalho, CATS Miteldorf , LHC Lopes, 2005. *Helicobacter pylori* and cagA gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsi:correlation with histological findings,proliferation and apoptosis. Sao Paulo Med J. 123 (3) : 113-8.
- Ljungh A, 2000. *Helicobacter pylori* interaction with plasminogen. Methods, 21(12): 151-157.
- Logan RPH ,and MM Walker, 2002. A B C of the upper gastrointestinal tract:Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. BMJ,323 : 920-922.
- Lu JJ, CL Perng , RY Shyu , CH Chen. Q Lou, SKF Chong ,and CH Lee ,1999. Comparison of five PCR Methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissue. J Clin Microbiol. 37 (3) : 772-774.
- Lyana K,2008. Fucoidan nature's way for faster peptic ulcer healing dalam makalah symposium Fucoidan 100.Sheraton Hotel Surabaya.
- Makristathis A, AM Hirschl, P Lehours, F Megraud , 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Blackwell publishing Ltd, *Helicobacter*.9(1):7-14.
- Malaty HM, DY Graham,1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *H.pylori* infection. Gut.35:742-745.

- Manual *Dyna Quant-200 Apparatus* Hoefer – USA fluorometer, Amersham Pharmacia Biotech, 1999.
- Marchetti M, B Arico, D Burrone, N Figura, R Rappuoli, P Chiara, 1995. Development of Mouse Model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*. 267 : 1655-1658
- Marshall BJ, and JR Warren, 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 323( 8390 ) : 1311-1315.
- Mishra KK, S Srivastava, PP Dwivedi, KN Prasad, A Ayyagari, 2002. PCR- Based RFLP Analysis of ureC for Typing of Indian *Helicobacter pylori* Strains from Gastric Biopsy Specimens and Culture. *The Journal of Microbiology*. 40(4):282-288.
- Mobley HLT, MD Island , RP Hausinger , 1995. Molecular Biology of Microbial Urease. *American Society for Microbiology*. 59 (3):452 .
- Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM *et al.* 2001. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* . 96 :353-8.
- Moore RA, W. Amar Kureishi, Sallene, E.B. Lawrence, 1993. Categorization of clinical isolate of *Helicobacter pylori* on the basis of restriction digest analysis of polymerase chain reaction-amplified ureC genes. *The Journal Clinical Microbiology*. 31: 1334-1335.
- Morgan DR, and RD Leunk , 1989. Pathogenesis of infection by *Campylobacter pylori*. In Blaser MJ( Ed.): *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. Igaku-Shoin, New York. pp: 115-134.
- Mori M, H Suzuki, M Suzuki, A Kai, S Miura, and H Ishii, 1997. Catalase and Superoxide Dismutase secreted from *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2(2):100-104.
- Perez-Perez GI, 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin Nort Am*. 29:879-884.
- Persing DH, 1993. In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White TJ. *Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications*. Washington DC: America Society for Microbiology, 51-87.
- Prihatini, 1996. Penilaian kegunaan polymerase chain reaction dalam diagnostik. Disertasi. Universitas Airlangga Surabaya. Indonesia, halaman.52-53.
- Price AB, 1996. The histological recognition of *Helicobacter pylori* in Lee A. and Megraud F. (Eds) *Helicobacter pylori* Techniques for Clinical Diagnosis and Basic Research. W.B.Saunders Company LTD.London.
- Promega, 2000. *Polymerase Chain Reaction (PCR) Core System Manual*. Technical Bulletin. Madison USA: Promega Corporation, pp. 1-11.



- Purwanta M, MI Lusida, R Handajani, 1999. Polymerase Chain Reaction. dalam: Suhartono TP. Biologi molekuler kedokteran. Surabaya: Airlangga University Press, halaman. 150-166.
- Rani AA, 2002. Inflamasi pada dispepsia dalam Rani AA, Manan C, Djojoningrat D, Simadibrata M, Makmun D, Abdullah M, dan Syam AF ( Eds ) Dispepsia : Sains dan aplikasi klinik. Pusat informasi dan penerbitan bagian penyakit dalam FKUI, Jakarta, halaman.1-7.
- Rathbone B.J, RV Heatley, 1989. Immunology of *C.pylori* infection in blaser MJ(Ed). *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer. New york: I gaku zhoin, pp 135-146.
- Retnoningrum DS, 1997. Penerapan PCR untuk deteksi patogen. Kursus Penyegaran dan Pemantapan Uji Laboratorium ITB: Bandung, halaman 9.
- Ricci C, J Holton, D Vaira, 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non invasive test. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 21: 299-313.
- Roekindari M, A Idajati, EB Wasito, 1999. Daya hidup *Helicobacter pylori* pada air kran ( PDAM ) yang ditambah urea, air limbah doestik, dan air sumur. JBP.1 ( 2 ) : 48-55.
- Rotimi O, A Cairns, S Gray, P Moayyedi , MF Dixon, 2000. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. J Clin Pathol.53:756-759.
- Sastroasmoro S, Ismael S, 2002. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Edisi kedua. Jakarta: Sagung Seto, halaman. 13-22.
- Soebagyo B, 2004. Peran ibu dan keluarga sebagai sumber infeksi *Helicobacter pylori* pada anak umur 0 – 5 tahun di Surakarta. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Soewignjo S, A Wenny, Z Muttaqin *et al*, 1993. Penelitian epidemiologi infeksi *Helicobacter pylori* di Mataram. DEXA Media.3(6): 9-12.
- Soewignjo S,2002. Mengenal lebih dekat *Helicobacter pylori* dan penyakit Gastroduodenal. Edisi 3, Jakarta: PT. Tempo Scan Pacific, halaman 1-2.
- Soewignjo S, IG Palgunadi, S Gunawan, Z Muttaqin , H Widita, dan A Wenny, 2007. Deteksi *Helicobacter pylori* pada specimen biopsi mukosa lambung menggunakan PCR dengan primer berasal dari gen *ureC* pada penderita dengan dispepsia. Laporan penelitian yang disampaikan pada kongres PPHI-PGI-PEGI di Surabaya.
- Soewondo ES, 2002. Seri penyakit tropik infeksi. Perkembangan terkini dalam pengelolaan beberapa penyakit tropik infeksi. Surabaya: Airlangga University Press , 142-150.
- Supardi W, 1991. Elektrophoresis gel protein. Yogyakarta: Pusat antar universitas, Bioteknologi universitas Gadjah Mada, halaman. 1-3, 10-14.

- Supargiyono, 1997. *Reaksi berantai polymerase (polymerase chain reaction)*. Yogyakarta: Pusat kedokteran tropis Universitas Gadjah Mada.
- Testerman T, DJ McGee, HLT Mobley, 2001. Adherence and colonization in Mobley HLT, Mendz GL and Hazell S (Eds) *Helicobacter pylori* physiology and genetics. ASM press.
- Thomas, JE, GR Gibson, MK Darboe, A Dale, LT Weaver, 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from Human Faeces. *The Lancet*. 340;1194-1195.
- Tokunaga Y, H Shirahase, E Yamamoto, R Inao, S Hamaguchi *et al*, 2000. *Helicobacter pylori* and modified Urease Test; Modified rapid urease test for *Helicobacter pylori* detection in relation to an immunohistochemical stain. *J Gastroenterol hepatol*.15(6):617-621.
- Tomb JF, Owen W, Anthony RK, Rebecca AC, Granger GS *et al*, 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388:539-547.
- Tytgat, G.N.J., *et.al*, 1990. *Helicobacter pylori*, In : Causal Agent in Peptic Ulcer Disease, In World Congress Gastroenterology.
- Wasito EB, T Soemarno, Asnawati, 2001. Pewarnaan *Modified Giemsa* dan *Warthin-Starry* untuk Mendiagnosis Gastritis *Helicobacter pylori* penderita dispepsia. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta*. 2(2):82-90.
- Wenny A, S Soewignjo, Z Muttaqin *et al*, 1994. Karyawan Rumah Sakit sebagai kelompok resiko tinggi infeksi *Helicobacter pylori*, *Jurnal RSU Mataram*. 6:13-21.
- White TJ, R Madej, DH Persing, 1993. The Polymerase Chain Reaction: Clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry* 29: 161-196.
- Wibawa IDN, 2006. Penanganan dispepsia pada lanjut usia. *Jurnal penyakit dalam* 7 (3) : 214 – 220.
- Yuan Y, IT Padol, RH Hunt, 2006. Peptic ulcer disease today. *Nature clinical practice gastroenterology and hepatology*. 3(2):80-87.
- Yuwono T, 2006. Teori dan Aplikasi Polimerase Chain Reaction: Panduan eksperimen PCR untuk memecahkan masalah biologi terkini. Yogyakarta:C.V Andi Offset, Halaman. 2-43.
- Zainuddin M, 2000. Metodologi penelitian. Surabaya, halaman 32-36, 79-81.

## Lampiran 1 : Pembuatan reagen penelitian

### 1.1 Pembuatan larutan dapar TBE / *tris borate EDTA* 10X (larutan stok)

Ditimbang: trizma 108 gr, asam borat 55 gr, EDTA 9,3 gr. Kemudian dilarutkan dengan *aquadest/aquabidest* sebanyak 1000 ml. Dibuat pH-nya menjadi 7,0 – 7,4 dengan natrium hidroksida (NaOH).

### 1.2. Pembuatan larutan dapar elektroforesis (*running buffer*)

Larutan dapar untuk elektroforesis (*running buffer*) dibuat dengan mengencerkan 100 ml larutan dapar stok (TBE 10X) menjadi 1 liter dengan *aquadest/aquabidest*

### 1.3 Pembuatan buffer lisis

50 mM Tris-HCl ( pH 8,5 ), 1 mM EDTA, 0,5 % Tween 20 atau 1 % Laureth 12.

### 1.4 Pembuatan ethidium bromida konsentrasi 10 mg/ml

Ditimbang ethidium bromida (*Sigma* Lot. 55H367615) sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam 10 ml *aquadest*.

### 1.5 Pembuatan larutan pemberat sampel (*loading buffer*)

Campurkan dengan merata: 1,25 ml EDTA 1M pH 8; 1 ml *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10%; 3 ml glycerol; dan 10 mg *bromphenol blue*.

### 1.6 Pembuatan gel agarose

Pembuatan gel agarose kecil (konsentrasi 2%): ditimbang agarose (*Invitrogen*) sebanyak 0,8 gr, ditambahkan TBE 10X sebanyak 4 ml, dan selanjutnya ditambahkan *aquadest/aquabidest* sebanyak 36 ml. Dicampur dan diaduk hingga merata. Selanjutnya dipanaskan hingga mendidih (terlihat transparan/tidak keruh). Setelah larut merata, didinginkan hingga agak hangat (suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ ), kemudian tambahkan *ethidium bromide* (10 mg/ml) sebanyak 4  $\mu\text{l}$ . Gel kemudian dituang pada cetakan gel, dibiarkan memadat dan siap dipakai.

Pembuatan gel agarose besar (konsentrasi 2%): ditimbang agarose (*Invitrogen*) sebanyak 1,2 gr, ditambahkan TBE 10X sebanyak 6 ml, dan selanjutnya ditambahkan *aquadest/aquabidest* sebanyak 54 ml. Dicampur dan diaduk hingga merata. Selanjutnya dipanaskan hingga mendidih (terlihat transparan/tidak keruh). Setelah larut merata, didinginkan hingga agak hangat (suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ ), kemudian tambahkan *ethidium bromide* (10 mg/ml) sebanyak 6  $\mu\text{l}$ . Gel kemudian dituang pada cetakan gel, dibiarkan memadat dan siap dipakai.

**Lampiran 2 : Data sampel blok parafin biopsi lambung dari penderita dispepsia.**

No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur (Tahun)	Kode	Diagnosa	
					Klinik	PA
1	2	3	4	5	6	7
1	NyS	P	30	B5	Dispepsia	Normal
2	TnTa	L	27	B73	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
3	HMP	L	63	B1	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis akut
4	TnSM	L	55	B10	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
5	TnG	L	50	B26	Dispepsia	Gastritis akut
6	TnINKP	L	37	B15	Dispepsia	Gastritis kronis Superficial
7	TnH	L	35	B13	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
8	NYBDV	P	24	B18	Dispepsia	Normal
9	TnHM	L	46	B17	Dispepsia	Gastritis kronis Superficial
10	TnBR	L	68	B19	Dispepsia	Gastritis kronis Superficial
11	NyP	P	46	B20	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
12	TnUA	L	66	B23	Dispepsia	Gastritis akut
13	HS	L	65	B21	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis kronis
14	TnN	L	58	B25	Dispepsia	Gastritis Kronis Superficial
15	TnSy	L	34	B61	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik
16	NNEM	P	28	B63	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik
17	HMY	L	60	B66	Dispepsia	Gastritis atropican
18	BS	L	50	B27	Dispepsia	Gastritis Kronis Atropi
19	TnR	L	35	B65	Dispepsia	Gastritis kronik atropi
20	TnIS	L	45	B67	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik
21	TnS	L	57	B68	Masa Gaster	Tepi ulkus Benigna
22	TnSA	L	58	B69	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
23	TnHa	L	34	B72	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
24	NyLE	P	30	B71	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik
25	TnYR	L	42	B78	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial
26	NyH	P	35	B84	Dispepsia	Gastritis aktif
27	TnNM	L	35	B74	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
28	NyR	P	35	B77	Dispepsia	Normal
29	NyR	P	44	B88	Dispepsia	Gastritis kronik
30	NA	P	50	B99	Dispepsia	Gastritis akut
31	TnZe	L	31	B104	Displasia	Gastritis akut
32	NyF	P	52	B112	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial
33	S	L	55	B118	Dispepsia	Gastritis akut Hemorrhagik
34	MI	L	33	B137	Dispepsia	Normal
35	NySG	P	30	B135	Dispepsia	Normal
36	Nya	P	55	B160	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial
37	WSW	P	28	B133	Dispepsia	Normal
38	AQI	L	65	B131	Dispepsia	Normal
39	TnIA	L	35	B129	Dispepsia	Normal
40	NyA	P	34	B121	Dispepsia	Normal
41	TnYH	L	47	B116	Radang/ Dispepsia	Gastritis akut
42	TnMU	L	47	B110	Dispepsia	Normal
43	NyN	P	64	B166	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis kronik superfisial
44	BI	L	35	B98	Dispepsia	Gastritis akut
45	EF	P	18	B96	Dispepsia	Gastritis kronik karena jamur
46	NyKS	P	43	B85	Dispepsia	Normal
47	MDAKP	P	35	B16	Dispepsia	Gastritis kronis Superfisial
48	TnSa	L	40	B145	Dispepsia	Normal
49	TnMa	L	55	B123	Dispepsia kronik	Gastritis kronis superfisial
50	Su	L	45	B156	Dispepsia	Gastritis kronik
51	TnSab	L	54	B122	Susp Massa gaster	Gastritis kronis superfisial
52	HMAA	L	68	B157	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial

No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur (Tahun)	Kode	Diagnosa	
					Klinik	PA
1	2	3	4	5	6	7
53	TnES	L	28	B89	Dispepsia	Gastritis akut
54	TnT	L	58	B159	Dyspepsia tipe ulkus	Gastritis akut haemorrhagik
55	TnND	L	35	B92	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
56	HjA	P	50	B94	Dispepsia	Normal
57	NyM	P	47	B147	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
58	RYA	L	17	B153	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis akut erosiva
59	TnSa	L	53	B171	Dispepsia	Gastritis kronik
60	NNF	L	40	B172	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis akut
61	TnAbH	L	34	B6	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
62	NHN	P	26	B24	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
63	NDY	P	18	B144	Dispepsia	Gastritis akut
64	TnHFa	L	40	B111	Dispepsia	Gastritis akut erosive
65	NyV	P	29	B9	Dispepsia	Gastritis akut
66	NDA	P	18	B170	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial
67	R	P	36	B175	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial
68	TnYK	L	34	B177	Dispepsia	Gastritis akut
69	TnWi	L	29	B126	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
70	TnHLW	L	67	B34	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis Kronik Superfisial
71	NyRH	P	29	B36	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis Kronik Superfisial
72	TnSu	L	43	B132	Massa curvatura	Gastritis atropi
73	TnH	L	35	B13	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
74	TnMW	L	63	B43	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial
75	TnN	L	58	B25	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial
76	RA	L	46	B139	Dispepsia	Gastritis akut erosive
77	TnN	L	58	B25	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial
78	TnNT	L	51	B54	Dispepsia	Gastritis akut erosiva
79	NyI	P	60	B49	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis Kronik atrofi dengan Metaplasia intestinal
80	NyN	P	36	B109	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis kronik atropi
81	TnAbB	L	32	B124	Dispepsia kronik	Gastritis kronik superfisial
82	TnSo	L	58	B114	Susp CA.Gaster	Mild displasia dengan keradangan menahun

Keterangan :

Jumlah :

1. Laki – laki (L) = 54 orang
- Perempuan (P) = 28 orang
2. Umur 17 – 25 tahun = 5 orang
- Umur 26 – 34 tahun = 19 orang
- Umur 35 – 43 tahun = 19 orang
- Umur 44 – 52 tahun = 15 orang
- Umur 53 – 61 tahun = 15 orang
- Umur 62 – 70 tahun = 9 orang
3. Normal = 13 orang
- Gastritis akut = 12 orang
- Gastritis akut erosiva = 17 orang
- Gastritis akut haemorrhagik = 6 orang
- Gastritis aktif = 1 orang
- Gastritis kronik superfisial = 20 orang
- Gastritis kronik = 5 orang
- Gastritis atropik = 2 orang
- Gastritis kronik atrofi = 3 orang
- Gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal = 1 orang
- Mild displasia dengan keradangan menahun = 1 orang
- Tepi ulkus benigna = 1 orang

**Lampiran 3 : Hasil PCR *H. Pylori* positif dengan primer *ureC (glmM)* dari sampel blok parafin biopsi lambung dari penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi negatif.**

No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur ( Thn)	Kode	Diagnosa		Hasil diagnosis <i>H. pylori</i>	
					Klinik	PA	PA	PCR
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	NyS	P	30	B5	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
2	TnTa	L	27	B73	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
3	HMP	L	63	B1	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis akut	Neg(-)	Pos(+)
4	TnSM	L	55	B10	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
5	TnG	L	50	B26	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
6	TnINKP	L	37	B15	Dispepsia	Gastritis khronis Superficial	Neg(-)	Pos(+)
7	TnH	L	35	B13	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
8	NYBDV	P	24	B18	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
9	TnHM	L	46	B17	Dispepsia	Gastritis khronis Superficial	Neg(-)	Pos(+)
10	TnBR	L	68	B19	Dispepsia	Gastritis khronis Superficial	Neg(-)	Pos(+)
11	NyP	P	46	B20	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
12	TnUA	L	66	B23	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
13	HS	L	65	B21	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis khronis	Neg(-)	Pos(+)
14	TnN	L	58	B25	Dispepsia	Gastritis Khronis Superficial	Neg(-)	Pos(+)
15	TnSy	L	34	B61	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik	Neg(-)	Neg(-)
16	NNEM	P	28	B63	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik	Neg(-)	Neg(-)
17	HMY	L	60	B66	Dispepsia	Gastritis atropican	Neg(-)	Neg(-)
18	BS	L	50	B27	Dispepsia	Gastritis Khronis Atropi	Neg(-)	Pos(+)
19	TnR	L	35	B65	Dispepsia	Gastritis khronik atropi	Neg(-)	Pos(+)
20	TnIS	L	45	B67	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik	Neg(-)	Neg(-)
21	TnS	L	57	B68	Masa Gaster	Tepi ulkus Benigna	Neg(-)	Pos(+)
22	TnSA	L	58	B69	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
23	TnHa	L	34	B72	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Pos(+)
24	NyLE	P	30	B71	Dispepsia	Gastritis akut Haemorrhagik	Neg(-)	Neg(-)
25	TnYR	L	42	B78	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial	Neg(-)	Pos(+)
26	NyH	P	35	B84	Dispepsia	Gastritis aktif	Neg(-)	Pos(+)
27	TnNM	L	35	B74	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
28	NyR	P	35	B77	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
29	NyR	P	44	B88	Dispepsia	Gastritis kronik	Neg(-)	Pos(+)
30	NA	P	50	B99	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Pos(+)
31	TnZe	L	31	B104	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Pos(+)
32	NyF	P	52	B112	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
33	S	L	55	B118	Dispepsia	Gastritis akut Hemorrhagik	Neg(-)	Pos(+)
34	MI	L	33	B137	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
35	NySG	P	30	B135	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)

No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur (Thn)	Kode	Diagnosa		Hasil diagnosis <i>H. pylori</i>	
					Klinik	PA	PA	PCR
1	2	3	4	5	6	7	8	9
36	Nya	P	55	B160	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
37	WSW	P	28	B133	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
38	AQI	L	65	B131	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
39	TnIA	L	35	B129	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
40	NyA	P	34	B121	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
41	TnYH	L	47	B116	Radang/ Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
42	TnMU	L	47	B110	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
43	NyN	P	64	B166	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
44	BI	L	35	B98	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
45	EF	P	18	B96	Dispepsia	Gastritis kronik karena jamur	Neg(-)	Neg(-)
46	NyKS	P	43	B85	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
47	MDAKP	P	35	B16	Dispepsia	Gastritis kronis Superfisial	Neg(-)	Neg(-)
48	TnSa	L	40	B145	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
49	TnMa	L	55	B123	Dispepsia khronik	Gastritis kronis superfisial	Neg(-)	Pos(+)
50	Su	L	45	B156	Dispepsia	Gastritis kronik	Neg(-)	Pos(+)
51	TnSab	L	54	B122	Susp Massa gaster	Gastritis kronis superfisial	Neg(-)	Pos(+)
52	HMAA	L	68	B157	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
53	TnES	L	28	B89	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
54	TnT	L	58	B159	Dyspepsia tipe ulkus	Gastritis akut haemorragik	Neg(-)	Neg(+)
55	TnND	L	35	B92	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
56	HjA	P	50	B94	Dispepsia	Normal	Neg(-)	Neg(-)
57	NyM	P	47	B147	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
58	RYA	L	17	B153	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
59	TnSa	L	53	B171	Dispepsia	Gastritis kronik	Neg(-)	Neg(-)
60	NNF	L	40	B172	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
61	TnAbH	L	34	B6	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
62	NHN	P	26	B24	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
63	NDY	P	18	B144	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Neg(-)
64	TnHFa	L	40	B111	Dispepsia	Gastritis akut erosive	Neg(-)	Neg(-)
65	NyV	P	29	B9	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Pos(+)
66	NDA	P	18	B170	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
67	R	P	36	B175	Dispepsia	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
68	TnYK	L	34	B177	Dispepsia	Gastritis akut	Neg(-)	Pos(+)
69	TnWi	L	29	B126	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
70	TnHLW	L	67	B34	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis Kronik Superfisial	Neg(-)	Pos(+)
71	NyRH	P	29	B36	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis Kronik Superfisial	Neg(-)	Pos(+)
72	TnSu	L	43	B132	Massa curvatura	Gastritis atropi	Neg(-)	Neg(-)

No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur (Thn)	Kode	Diagnosa		Hasil diagnosis <i>H. pylori</i>	
					Klinik	PA	PA	PCR
1	2	3	4	5	6	7	8	9
73	TnH	L	35	B13	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Neg(-)
74	TnMW	L	63	B43	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial	Neg(-)	Pos(+)
75	TnN	L	58	B25	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial	Neg(-)	Pos(+)
76	RA	L	46	B139	Dispepsia	Gastritis akut erosive	Neg(-)	Pos(+)
77	TnN	L	58	B25	Dispepsia	Gastritis Kronik Superfisial	Neg(-)	Pos(+)
78	TnNT	L	51	B54	Dispepsia	Gastritis akut erosiva	Neg(-)	Pos(+)
79	NyI	P	60	B49	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis Kronik atrofi dengan Metaplasia intestinal	Neg(-)	Pos(+)
80	NyN	P	36	B109	Dispepsia tipe ulkus	Gastritis kronik atrofi	Neg(-)	Pos(+)
81	TnAbB	L	32	B124	Dispepsia khronik	Gastritis kronik superfisial	Neg(-)	Pos(+)
82	TnSo	L	58	B114	Susp CA.Gaster	Mild displasia dengan keradangan menahun	Neg(-)	Pos(+)

Keterangan :

Jumlah :

1. Laki – laki (L)	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 27 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 27 orang
Perempuan (P)	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 12 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 16 orang
2. Umur 17 – 25 tahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 1 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 4 orang
Umur 26 – 34 tahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 6 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 13 orang
Umur 35 – 43 tahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 6 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 13 orang
Umur 44 – 52 tahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 8 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 7 orang
Umur 53 – 61 tahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 11 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 4 orang
Umur 62 – 70 tahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 7 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 2 orang
3. Normal	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 0 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 13 orang
Gastritis akut	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 5 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 7 orang
Gastritis akut erosiva	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 3 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 14 orang
Gastritis akut haemorrhagik	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 2 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 4 orang
Gastritis aktif	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 1 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 1 orang
Gastritis kronik superfisial	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 19 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 1 orang
Gastritis kronik	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 3 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 2 orang
Gastritis atropik	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 0 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 2 orang
Gastritis kronik atrofi	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 3 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 0 orang
Gastritis kronik atrofi dengan metaplasia intestinal	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 1 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 0 orang
Mild displasia dengan keradangan menahun	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 1 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 0 orang
Tepi ulkus benigna	PCR <i>H. pylori</i> positif (+) = 1 orang, PCR <i>H. pylori</i> negatif (-) = 0 orang



**Lampiran 4 : Proporsi hasil deteksi DNA *H. pylori* positif menggunakan PCR dengan primer gen *ureC* (*glmM*)**

- Besar sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia dengan hasil pemeriksaan histopatologi *H. pylori* negatif = 82 sampel.
- Jumlah sampel PCR positif = 39 sampel

Persentase hasil PCR positif *H. pylori* :

$$\frac{39}{82} \times 100 \% = 47,6\%$$

**Lampiran 5 : Perkiraan (estimate) hasil PCR positif pada populasi.**

- Besar populasi = 139 blok parafin
- Besar sampel = 82 blok parafin
- Rumus menghitung interval kepercayaan (Sastroasmoro dan Ismael, 2002):

$$IK\ 95\% = \hat{p} \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{p}q}{n}}$$

IK 95% = interval kepercayaan 95%, yakni rentang nilai pada populasi yang dihitung dengan dasar statistik yang diperoleh pada sampel dengan interval kepercayaan 95%.

- $\hat{p}$  = *point estimate*, yakni proporsi yang diperoleh dari sampel.
- $Z_{\alpha/2}$  = deviat baku normal untuk  $\alpha$ , karena  $\alpha = 0,05$ , maka  $Z_{\alpha/2} = 1,96$
- $q = (1-p)$
- $n$  = jumlah sampel

$$\begin{aligned} \hat{p}\ H.\ pylori\ dengan\ PCR\ positif &= 0,4756 \\ q &= 1 - p = 1 - 0,4756 = 0,5244 \end{aligned}$$

a) Rentang hasil PCR positif *H. pylori* pada populasi:

$$IK\ 95\% = 0,4756 \pm 1,96 \sqrt{\frac{0,4766 (1 - 0,205)}{39}}$$

$$\begin{aligned} &= 0,4756 \pm 1,96 \times 0,05514997733 \\ &= 0,4756 \pm 0,1081 \rightarrow 0,4756 + 0,1081 = 0,5837 (58,37) \\ &\quad \rightarrow 0,4756 - 0,1081 = 0,3675 (36,75) \end{aligned}$$

$$\text{Rentang} = 36,75\% - 58,37\%$$

**Lampiran 6 : Foto penelitian**



**Sampel blok parafin biopsi lambung penderita dispepsia**



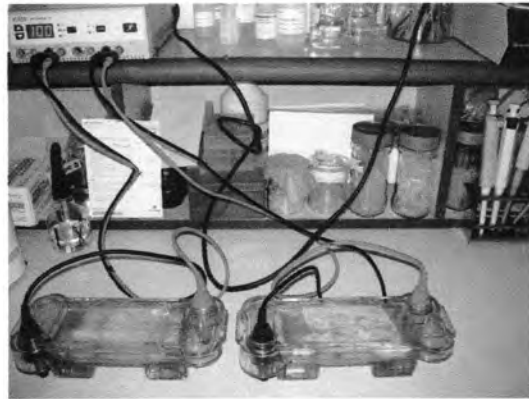
**Pemotongan sample blok parafin biopsi lambung dengan mikrotom**



**Proses ekstraksi DNA sampel**



**Proses Amplifikasi**



**Proses elektroforesis DNA pada gel agarose 2 %  
dengan pewarnaan *ethidium bromide* (10 mg/ml)**



**Pembacaan hasil dengan alat  
*Bio-rad GEL DOC XR* tipe 170 – 8170**

**INSTALASI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TEKNOLOGI  
KESEHATAN RSUD MATARAM**

Jl. Pejangik no.6 Mataram

Telp.0370-638329 Fax.0370-638329,e-mail: [urbrsudm@yahoo.com](mailto:urbrsudm@yahoo.com)

Mataram, 20 Februari 2008

No : 04/ Litbangtekkes / II / 2008  
Lamp : -  
Perihal: Ijin melaksanakan penelitian

Kepada Yth.  
Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Airlangga  
Di-  
Tempat

Dengan hormat,  
Bersama ini kami sampaikan bahwa sehubungan dengan surat dari Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga No: 508/J03.1.17/PP.17/2008 perihal permohonan ijin penelitian mahasiswa Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Unair Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Minat Biokimia an. Maruni Wiwin Diarti,S.Si pada prinsipnya kami menyetujui dan memberikan ijin selama mematuhi peraturan yang berlaku.

Demikian atas perhatiannya kami sampaikan terima kasih.

Ka. Instalasi Litbang Tekkes  
RSUD Mataram



Dr. I Gede Palgunadi, Sp.PD  
Nip. 140 122 538

**INSTALASI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TEKNOLOGI  
KESEHATAN RSUD MATARAM**

Jl. Pejangik no.6 Mataram  
Telp.0370-638329 Fax.0370-638329,e-mail: urbrsudm@yahoo.com

---

**SURAT KETERANGAN MELAKSANAKAN PENELITIAN**  
**NO: 01/ Litbangtekkes /RSUDM / V / 2008**

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dr. I Gede Palgunadi,Sp.PD  
NIP : 140 122 538  
Jabatan : Kepala Instalasi Penelitian Dan Pengembangan Teknologi  
Kesehatan RSUD Mataram.


Dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Maruni Wiwin Diarti,S.Si  
NIM : 090610365/M

Mahasiswa Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Unair Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Minat Biokimia, telah melaksanakan penelitian dengan judul : " DETEKSI HELICOBACTER PYLORI DARI SPESIMEN BLOK PARAFIN BIOPSI LAMBUNG PENDERITA DISPEPSIA DENGAN HASIL HISTOPATOLOGI NEGATIF MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION DENGAN PRIMER GEN *ureC* ( *glmM* ) DI PROVINSI NTB " di laboratorium Instalasi penelitian dan engembangan teknologi kesehatan RSUD Mataram mulai tanggal 26 Februari 2008 s/d 26 April 2008.

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mataram, 2 Mei 2008  
Ka. Instalasi Litbang Tekkes  
RSUD Mataram

  
Dr. I Gede Palgunadi,Sp.PD  
Nip. 140 122 538