

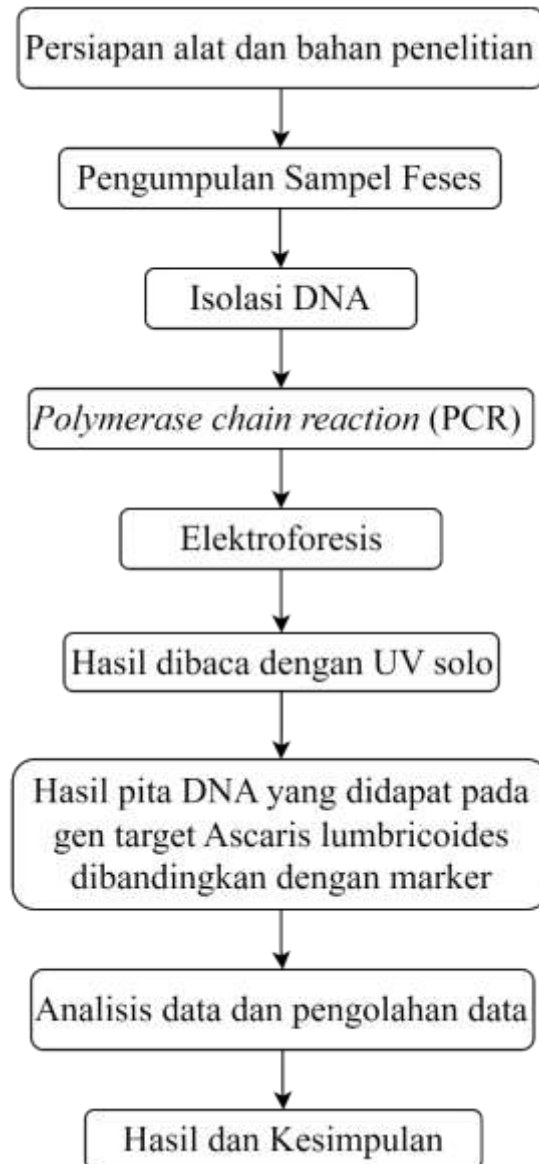
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif analitik, dengan *design* observasional. Dimana metode *polymerase chain reaction* (PCR) diaplikasikan sebagai alat utama untuk melakukan pemeriksaan terhadap infeksi *Ascaris lumbricoides*. Dengan fokus utama penelitian adalah mendeteksi gen target *first internal transcribed spacer* (ITS-1) spesifik parasit *Ascaris lumbricoides* pada kasus kecacingan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

B. Alur Penelitian



Gambar 7. Skema Kerja Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel feses dilakukan di Puskesmas Sukawati I, Kecamatan Sukawati. Pemeriksaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan November sampai April 2024.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah masyarakat yang didata mengalami kasus kecacingan pada periode tahun 2021 – 2024 yang berjumlah 15 orang di wilayah kerja Puskesmas Sukawati I, Kecamatan Sukawati, Gianyar.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah feses pada kasus kecacingan di wilayah kerja Puskesmas Sukawati I. Feses yang diperoleh kemudian diisolasi DNA-nya untuk mendapatkan DNA template yang akan digunakan dalam proses *polymerase chain reaction* (PCR).

a. Unit analisis

Unit yang menjadi fokus analisis adalah gen target *first Internal Transcribed Spacer* (ITS-1) pada parasit *Ascaris lumbricoides*.

b. Besar sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 15 sampel pada kasus kecacingan di Puskesmas Sukawati I, Kecamatan Sukawati.

c. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang diterapkan dalam penelitian ini adalah *Sampling Jenuh*.

1) Kriteria inklusi:

- a) Individu berada di wilayah kerja Puskesmas Sukawati I, dengan memiliki gejala kecacingan ;
- b) Individu responden yang memberikan persetujuan untuk berpartisipasi dalam penelitian ;
- c) Individu gejala atau tanda klinis yang mencurigakan terinfeksi cacing, seperti mengalami diare dengan ciri feses dengan tekstur encer;
- d) Sampel feses yang memenuhi kriteria kualitas dan kuantitas yang ditetapkan, diantaranya komposisi minimal 1/3 dari pot feses dan maksimal 1/2 serta tidak sampai memenuhi wadah feses, tidak terkontaminasi air kencing, label identitas lengkap.

2) Kriteria eksklusi:

- a) Responden dengan kondisi medis atau riwayat yang dapat mempengaruhi hasil deteksi parasit atau analisis *polymerase chain reaction* (PCR) seperti sudah mendapatkan penanganan kecacingan dengan pemberian obat antiparasit.

d. Alat dan bahan

1) Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini, diantaranya mesin PCR, alat *elektroforesis*, *transliminator*, *thermal cycler*, *UV transluminator*, *centrifuge*, *mikrocentrifugasi*, mikropipet (2-20 µl dan 100-1000 µl), BSC Level 2, *Laminatory Airflow* (LAF), *vortex*, *waterbath*, rak tabung, neraca analitik, tabung *eppendorf* 15

ml centrifugasi, gelas kimia 500 ml, gelas ukur 500 ml, Erlenmeyer 250 ml, pipet ukur steril 10 ml, *hot plate*, *ball* pipet, pinset, kamera, dan alat tulis.

2) Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini, diantaranya sampel feses positif *Taeniasis* (15), pot feses (15), plastik hitam (15), aquades, NaCl 0,9 %, kertas parafilm, Potasion dikromat 2.5%, *blue tip* dan *yellow tip*, Mix PCR (*buffer* PCR 1x, $MgCl_2$, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), *Taq polymerase*, primer *foward*, primer *reverse*, kit ekstraksi DNA (*inhibitex buffer*, *buffer* AL, *buffer* AW 1, *buffer* AW 2, *buffer* ATE), Proteinase K, media agaros, etanol 96-100%, *loading dye*, dan *Staining gel* (etidium bromi).

e. Prosedur kerja

1) Pra analitik

a) Pengumpulan sampel feses

- (1) Pembagian *informed consent* dan kuisioner kepada responden, setelah menyetujui untuk menjadi responden maka akan diberikan pot feses untuk pengumpulan sampel.
- (2) Cuci tangan dengan sabun dan air hingga bersih sebelum memulai proses pengambilan sampel.
- (3) Keluarkan wadah feses dari plastik pembungkusnya dengan hati-hati untuk mencegah kontaminasi.
- (4) Buka wadah feses secara hati-hati, pastikan tidak ada kerusakan atau kebocoran pada wadah.

- (5) Jangan membuang cairan (2,5% potassium dikromat dengan perbandingan 1:2) yang terdapat di dalam wadah feses; semua komponen harus dipertahankan untuk analisis yang akurat.
- (6) Gunakan sendok yang terhubung dengan tutup wadah untuk mengambil 2-3 sendok feses secara representatif.
- (7) Ambil feses dengan hati-hati untuk menghindari kontaminasi dengan bahan lain seperti darah, air kencing, tissue toilet, atau air.
- (8) Rapatkan tutup wadah dengan baik setelah pengambilan feses untuk menjaga integritas sampel.
- (9) Tempatkan wadah feses dalam kantong plastik bening dan beri identitas dengan jelas, diantaranya: nama lengkap, umur, dan jenis kelamin.
- (10) Masukkan kantong plastik bening ke dalam kantong kresek hitam sebagai lapisan tambahan perlindungan.
- (11) Cuci tangan dengan sabun dan air hingga bersih setelah menyelesaikan proses pengambilan sampel.
- (12) Bawa sampel feses ke petugas laboratorium sesegera mungkin untuk pemeriksaan lebih lanjut.
(Bekti dkk., 2021).

b) Persiapan sampel feses

- (1) Siapkan suspensi feses.
- (2) Masukkan ke dalam tabung *centrifuge*, lalu tambahkan aquadest dengan perbandingan 1:1.
- (3) Lakukan *centrifugasi* dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit.
- (4) Buang supernatan.

- (5) Ulangi langkah-langkah tersebut sebanyak 3 kali.
- (6) Setelah itu, sampel siap untuk dilakukan ekstraksi.

(Habibah dkk., 2021).

2) Analitik

a) Ekstraksi sampel

- (1) Timbang 180-220 mg feses dan masukkan ke dalam tabung *mikrocentrifus* 2 ml.
- (2) Tambahkan 1 ml *inhibitex buffer* ke dalam sampel feses.
- (3) *Vortex* selama 1 menit hingga homogen.
- (4) *Centrifuge* selama 1 menit pada kecepatan 20.000 g/14.000 rpm.
- (5) Siapkan tabung *mikrocentrifuge* 2 ml baru, tambahkan 25µL proteinase K.
- (6) Tambahkan 600µL suspensi feses dari langkah 4 ke tabung *mikrocentrifuge* 2 ml yang berisi proteinase K.
- (7) Tambahkan 600µL *buffer* AL.
- (8) *Vortex* selama 15 detik.
- (9) Inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit.
- (10) Tambahkan 600µL etanol 96-100%.
- (11) *Vortex* selama 15 detik.
- (12) Pindahkan 600µL ke tabung *spin column*.
- (13) *Centrifuge* selama 1 menit pada kecepatan 20.000 g/14.000 rpm.
- (14) Buang cairan/filtrat pada tabung.
- (15) Ulangi sampai lisat habis.
- (16) Pastikan pada tabung *spin column*, pada tahap terakhir tidak ada cairan (jika ada, *centrifuge* ulang).
- (17) Pindahkan *top* dari tabung *spin column* ke *collecting tube* baru.

- (18) Tambahkan 500µL *buffer* AW1.
- (19) *Centrifus* selama 1 menit pada kecepatan 20.000 g/14.000 rpm.
- (20) Buang cairan/*filtrat* pada *collecting tube*.
- (21) Tambahkan 500µL *buffer* AW2.
- (22) *Centrifus* selama 3 menit pada kecepatan 20.000 g/14.000 rpm.
- (23) Buang cairan/*filtrat* pada *collecting tube*.
- (24) *Centrifus* selama 3 menit pada kecepatan 20.000 g/14.000 rpm.
- (25) Pindahkan *top* dari tabung *spin column* ke tabung *mikrocentrifus* 2 ml baru.
- (26) Tambahkan 100µL *buffer* ATE (diinkubasi pada 70°C selama 3 menit).
- (27) Inkubasi selama 1 menit pada suhu kamar.
- (28) *Centrifus* selama 1 menit pada kecepatan 20.000 g/14.000 rpm.
- (29) Simpan supernatant/*filtrat* di dalam tabung *mikrocentrifus* 2 ml.
- b) Proses PCR
- (1) Siapkan microtube untuk PCR mix.

Tabel 2
Mix PCR

Reagen	Quantity (µl)	Total Konsentrasi
<i>Taq PCR Master mix</i>	12.5	-
Primer <i>forward</i>	0.5	0,4 µM
Primer <i>reverse</i>	0.5	0.4 µM
<i>RNase-free</i>	9.5	-
Template DNA	2.0	≤ 1 µg/ <i>reaction</i>
Total Volume	25	-

Sumber : Qiagen, 2010.

- (2) Masukkan sampel ke dalam alat PCR.
- (3) Pilih *three-step*, kemudian tekan *open template*.
- (4) Atur suhu menjadi 95°C selama 15 menit untuk *pre-denaturasi*.
- (5) Atur suhu menjadi 95°C selama 30 detik untuk *denaturasi*.
- (6) Atur suhu menjadi 55°C selama 1 menit untuk *annealing*.
- (7) Atur suhu menjadi 72°C selama 1 menit untuk *extension*.
- (8) Atur suhu menjadi 72°C selama 10 menit untuk *final extension*.
- (9) Atur suhu menjadi 4°C untuk waktu tak terbatas untuk *elemetion*.
- (10) Selanjutnya, tunggu hingga sampel selesai dijalankan (*running*).

c) *Elektroforesis*

(1) Pembuatan gel agarose

- (a) Konsentrasi atau persentase agarose yang diperlukan harus ditentukan, dan ini bergantung pada ukuran fragmen DNA yang akan dianalisis. Persentase gel agarose yang direkomendasikan adalah sebagai berikut: 0.5% agarose untuk fragmen DNA dengan ukuran 1.000-30.000 pb, 0.7% agarose untuk fragmen DNA dengan ukuran 800-12.000 pb, 1.5% agarose untuk fragmen DNA dengan ukuran 200-3.000 pb, dan 2.0% agarose untuk fragmen DNA dengan ukuran 50-2.000 pb.
- (b) Pilih tipe agarose yang digunakan. Kebanyakan tipe yang digunakan adalah *standard agarose*. Misalnya telah ditentukan akan dibuat 1.5 % gel agarose dalam volume 150 ml 1 x *buffer* TAE, maka jumlah agarose yang akan ditimbang yaitu $1,5 \text{ g/100 ml} \times 150 \text{ ml} = 2,25 \text{ g}$.

- (c) Tempatkan 2,25 g agarose ke dalam erlenmeyer dan isi dengan larutan 1 x *buffer* TAE sampai volume 150 ml, kemudian kocok sampai merata; Panaskan dalam *microwave* sampai mendidih sampai larutan menjadi jernih.
- (d) Dinginkan agarose kira-kira sampai 60°C dan tambahkan 5ul *ethidium bromide* (10 mg/ml) dan campur hingga merata.
- (e) Setelah itu, larutan dituang ke dalam *tray* dan *well-forming combs* dipasang, kemudian tunggu selama 30 menit atau sampai gel agarose mengeras. Setelah gel mengeras, *well-forming combs* dilepas secara perlahan-lahan, dan gel agarose siap digunakan untuk proses *elektroforesis*.
(Irianto, 2017).

(2) Proses *Elektroforesis*

- (a) Letakkan gel agarose dalam *tray elektroforesis* dan isi tank *elektroforesis* dengan larutan 1 x *buffer* TAE dengan ketebalan sekitar 1 mm di atas permukaan gel.
- (b) Ambil sampel menggunakan mikropipet dengan volume yang sesuai dengan kapasitas sumur (*well*), biasanya sekitar 4-8 µl. Tempatkan sampel di atas parafilm atau *plastic cling wrap* dan tambahkan *loading dye buffer* dengan volume 1/10 dari sampel, lalu homogenkan. Ambil larutan tersebut dengan mikropipet dan masukkan ke dalam sumur (*well*) pada gel agarose.
- (c) Setelah sampel dimasukkan ke dalam sumur *elektroforesis*, tutuplah tangki *elektroforesis* dengan hati-hati dan sambungkan aliran listrik (perhatikan tegangan listrik yang cukup tinggi). Setelah itu proses *elektroforesis* siap dijalankan.
- (d) Lamanya proses *elektroforesis* dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk persentase gel agarose, tegangan arus listrik, dan ukuran molekul DNA. Sebagai

contoh, dengan menggunakan tegangan listrik sebesar 77 volt dan menganalisis fragmen DNA dengan rentang ukuran 50-2000 pasang basa, proses *elektroforesis* memerlukan waktu sekitar 80 menit.

- (e) Setelah penyelesaian proses *elektroforesis*, hentikan aliran listrik dan gunakan sarung tangan saat mengambil *tray*. Letakkan gel pada *UV-transiluminator* dan perhatikan pita atau band molekul DNA.

(Irianto, 2017).

3) Post analitik

- a) Amati hasil yang didapat kemudian catat hasilnya.
- b) Dokumentasikan hasil tersebut.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer dalam penelitian ini diperoleh melalui pengamatan langsung adalah hasil pemeriksaan PCR dengan pembacaan hasil pada *gel doc*.

b. Data sekunder

Data sekunder diperoleh dari beberapa sumber, termasuk jurnal, buku terkait, data Dinas Kesehatan Denpasar dan data kasus kecacingan di Puskesmas Sukawati I.

F. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang diterapkan dalam penelitian ini adalah Observasi terus terang atau tersamar dan pemeriksaan gen target *first Internal Transcribed Spacer* (ITS-1) pada cacing *Ascaris lumbricoides* pada kasus kecacingan melalui metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Puskesmas Sukawati I, Kecamatan Sukawati.

G. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data meliputi:

- a. Formulir kuisioner yang digunakan untuk mengumpulkan data mengenai subjek penelitian mencakup identitas responden dan data karakteristik responden, seperti nama, usia, jenis kelamin, serta keadaan klinis responden.
- b. *Form informed consent* yang digunakan sebagai lembar persetujuan responden menjadi subjek penelitian.
- c. Kamera ponsel untuk dokumentasi kegiatan penelitian dan dokumentasi hasil.
- d. Peralatan laboratorium untuk pemeriksaan.
- e. Alat tulis seperti buku, bolpoin, dan pensil.
- f. Tabel hasil pendataan responden yang berisis nama, usia, jenis kelamin, dan hasil pemeriksaan PCR.

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Teknik pengolahan data yang digunakan adalah metode analisis statistik deskriptif bertujuan untuk memberikan gambaran umum tentang karakteristik sampel dan hasil deteksi. Data berupa gambaran hasil pita DNA yang diperoleh melalui metode *polymerase chain reaction* (PCR) akan diproses dan disajikan dalam bentuk visual dengan narasi yang sesuai.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis univariat. Setelah itu data yang diperoleh diolah dengan menggunakan SPSS pada *frequencies* untuk mengetahui *persentase* (%) kejadian positif parasit *Ascaris lumbricoides* pada kasus kecacingan di Puskesmas Sukawati I, Gianyar.

Pada penelitian ini hasil yang didapatkan berupa gambaran adanya DNA cacing *Ascaris lumbricoides* pada sampel feses. Hasil yang diperoleh disajikan berupa tabel. Persentase sampel dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$P = F/N \times 100\%$$

Keterangan :

P : Persentase

F : Frekuensi jumlah sampel positif

N : Jumlah data/sampel

3. Etika penelitian

Penelitian kesehatan yang melibatkan partisipasi manusia harus bertumpu pada prinsip-prinsip etika yang mendasar. Tiga prinsip ini diakui sebagai pijakan moral dalam penelitian kesehatan dan dianggap memiliki kekuatan moral yang kuat. Oleh karena itu, suatu penelitian haruslah dapat dipertanggungjawabkan secara etis dan legal sesuai dengan panduan dari Komisi Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Prinsip-prinsip tersebut adalah:

a. Prinsip menghormati harkat martabat manusia (*respect for persons*)

Penghormatan terhadap martabat manusia tercermin dalam prinsip ini, di mana manusia dianggap sebagai individu yang memiliki kebebasan untuk membuat pilihan, namun sekaligus bertanggung jawab secara pribadi terhadap keputusan yang diambil.

b. Prinsip berbuat baik (*beneficence*) dan tidak merugikan (*non-maleficence*)

Prinsip etika tentang tindakan baik berkaitan dengan tanggung jawab untuk membantu orang lain dengan upaya yang menghasilkan manfaat maksimal dengan risiko minimal. Mengikutsertakan partisipan manusia dalam penelitian kesehatan

bertujuan untuk membantu mencapai tujuan penelitian yang bermanfaat dan sesuai untuk diterapkan kepada manusia.

c. Prinsip keadilan (*justice*)

Prinsip etik keadilan menekankan pentingnya memperlakukan setiap individu secara adil dan setara dalam pemberian hak-haknya. Secara khusus, prinsip keadilan menyoroti konsep keadilan distributif, yang memastikan distribusi yang adil dalam hal beban dan manfaat bagi subjek penelitian. Distribusi ini mempertimbangkan berbagai faktor seperti usia, jenis kelamin, status ekonomi, budaya, dan pertimbangan etnis.