

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Gambaran Umum Lokasi Penelitian

Badan Layanan Umum Daerah Unit Pelaksana Teknis Kesehatan Masyarakat (UPTD Puskesmas Sukawati I), yang berdiri sejak tahun 1975, berlokasi di pusat Kota Sukawati. Sejak Januari 2011, UPTD ini telah mengalami transformasi menjadi Badan Layanan Umum Daerah berdasarkan SK Bupati 1060/05-B/HK/2010, dengan penerapan PPK-BLUD penuh dan meraih penilaian sebesar 86,77. Kemudian, berdasarkan Keputusan Bupati Gianyar Nomor 1923/05-B/HK/2015, UPTD Puskesmas Sukawati I ditetapkan sebagai Badan Layanan Umum Daerah Unit Pelaksana Teknis Kesehatan Masyarakat (Suryana, 2023).

UPTD Puskesmas Sukawati I memiliki wilayah seluas sekitar 32.05 km² dan berada pada ketinggian sekitar ± 200 m di atas permukaan laut. Wilayah pelayanan Puskesmas Sukawati I mencakup enam desa, yaitu Kemenuh, Batuan Kaler, Batuan, Sukawati, Guwang, dan Ketewel, yang terdiri dari 67 dusun. Setiap dusun dilengkapi dengan satu Posyandu. Aksesibilitas ke semua desa dapat dicapai dalam waktu sekitar ± 15 menit, dengan jalan-jalan umum yang mudah diakses (Suryana, 2023).

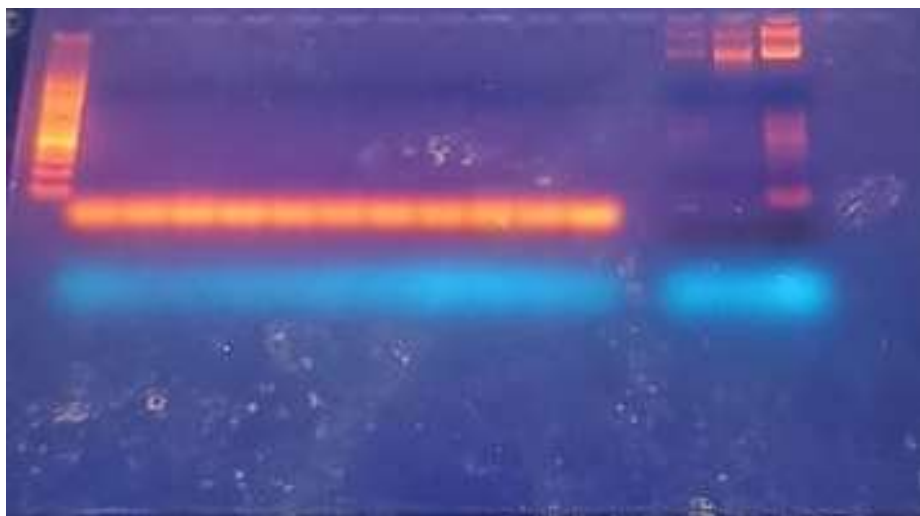
Puskesmas Sukawati I memiliki rangkaian program pelayanan kesehatan yang meliputi: Program promosi kesehatan; Program kesehatan lingkungan; Program kesehatan keluarga; Program gizi; Program pencegahan dan pengendalian penyakit tidak menular (termasuk kesehatan jiwa dan kesehatan

indera); Program pencegahan dan pengendalian penyakit menular (seperti *Taeniasis*, DBD, kusta, TB, malaria, HIV/AIDS, rabies, diare, hepatitis, ISPA); Program surveilans; Program imunisasi; Program perawatan kesehatan masyarakat; Program pengembangan UKM; Program UKP, kefarmasian, dan laboratorium; serta Program jejaring pelayanan puskesmas dengan fasilitas pelayanan kesehatan lainnya (Suryana, 2023).

2. Karakteristik objek penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah sampel feses. Sampel feses yang digunakan berasal dari responden yang telah mengalami kasus kecacingan dan belum mendapatkan pengobatan atau perawatan di wilayah kerja Puskesmas Sukawati I. Sampel feses yang diuji merupakan sampel segar yang langsung diekstraksi dan disimpan pada suhu -30°C untuk menjaga kualitasnya. Pengambilan sampel dilakukan setelah konfirmasi kecacingan melalui pemeriksaan diagnostik yang dilakukan oleh petugas kesehatan di Puskesmas Sukawati I.

3. Hasil elektroforesis pada isolasi DNA



Gambar 8. Hasil elektroforesis isolasi DNA

Sumber : Data Primer, 2024

4. Hasil uji PCR pada isolasi DNA menggunakan primer gen target *First Internal Transcribed Spacer*

Berdasarkan hasil pemeriksaan molekuler terhadap 15 responden diperoleh sebagai berikut :

Tabel 3

Hasil pemeriksaan molekuler

No	Pemeriksaan Molekuler (PCR)	Frekuensi (f) (orang)	Presentase (%)
1	Negatif (-)	15	100
2	Positif (+)	0	0
Total		15	100

Berdasarkan tabel 3 tersebut, hasil pemeriksaan molekuler untuk mendeteksi adanya gen *First Internal Transcribed Spacer* (ITS-1) pada parasit *Ascaris lumbricoides* pada responden, menunjukkan semua sampel negatif 15 responden (100%). Karena tidak ditemukan benaran pita DNA pada 594 bp. Hasil dari pemeriksaan tersebut dapat dilihat pada gambar 8 dibawah ini.



Gambar 9. Hasil pengamatan pemeriksaan PCR konvensional

Sumber : Data Primer, 2024

B. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional untuk mendeteksi infeksi nematoda (cacing), dengan tujuan mengidentifikasi gen *first Internal Transcribed Spacer* (ITS-1) yang dimiliki oleh nematoda *Ascaris lumbricoides* pada sampel feses responden yang mengalami kasus kecacingan berjumlah 15 responden.

Data responden kecacingan didapatkan dari laporan hasil pemeriksaan pihak puskesmas, dimana responden yang dituju adalah responden dengan kasus kecacingan yang belum dinyatakan sembuh, dimana belum ditandai dengan keluarnya kepala cacing dari tubuh responden melalui feses. Pengambilan sampel feses dilakukan secara langsung ke responden yang mengalami kecacingan berdasarkan data dari puskesmas.

Pemilihan sampel feses untuk pemeriksaan, diambil berdasarkan kriteria inklusi yaitu individu yang berada di wilayah kerja Puskesmas Sukawati I

dengan gejala kecacingan dan memberikan persetujuan untuk berpartisipasi dalam penelitian, serta menunjukkan tanda klinis mencurigakan seperti diare dengan feses bertekstur encer, akan diikutsertakan dalam penelitian. Sampel feses yang diambil harus memenuhi kriteria kualitas dan kuantitas yang ditetapkan, yaitu minimal 1/3 dan maksimal 1/2 dari pot feses, tidak terkontaminasi air kencing, dan memiliki label identitas yang lengkap.

Penelitian ini dimulai dengan proses pengambilan sampel feses dan kemudian dilakukan pemisahan sampel menggunakan pengawet potassium dikromat 2% melalui sentrifugasi. Langkah berikutnya adalah melakukan ekstraksi untuk mendapatkan template DNA. Dalam kegiatan analisis molekuler, ekstraksi DNA adalah langkah awal yang sangat penting untuk menentukan tahap-tahap berikutnya (Nugroho dkk., 2022).

Ekstraksi DNA melibatkan lisis sel dan pelarutan DNA, yang diikuti dengan metode kimia atau enzimatis, bertujuan untuk memisahkan DNA murni dan menghilangkan makromolekul, lipid, RNA, atau protein. Teknik ekstraksi DNA, meliputi ekstraksi organik (*phenol–chloroform method*), metode non-organik (*salting out and proteinase K treatment*), dan metode adsorpsi (*silica–gel membrane*) (Gupta, 2019). Pada penelitian ini teknik ekstraksi DNA yang digunakan adalah kit Qiagen dengan metode adsorpsi (*silica–gel membrane*).

Kit QIAamp Stool Mini (Qiagen, Hilden, Jerman), merupakan salah satu kit komersial yang awalnya dirancang untuk isolasi DNA dari sel-sel metabolik aktif yang ditemukan dalam tinja. Sistem buffernya memungkinkan lisis sel secara langsung dan mengoptimalkan pengikatan asam nukleat pada membran gel silika. Kit ini mencakup langkah pemanasan awal, penggunaan tablet

InhibitEX, dan dua langkah pencucian berturut-turut sesuai dengan petunjuk pabrik untuk menghilangkan kontaminan yang umumnya ditemukan dalam tinja (Gupta, 2019). Reagen yang digunakan dalam proses ekstraksi dengan Kit QIAamp Stool Mini diantaranya *inhibitex buffer*, mengandung deterjen untuk melisiskan sel dan melepaskan DNA, *buffer* ini sering mengandung komponen seperti SDS (*sodium dodecyl sulfate*) atau Triton X-100; proteinase K, Enzim yang digunakan untuk mendegradasi protein dan memfasilitasi pelepasan DNA; *buffer* AW1 dan *buffer* AW2, mengandung etanol untuk membersihkan pengotor dari DNA yang terikat pada membran silika; dan *buffer* ATE, biasanya larutan TE (*Tris-EDTA*) atau air bebas nuklease, digunakan untuk melepaskan DNA dari membran silika.

Setelah dilakukannya proses ekstraksi, untuk memastikan keberhasilan ekstraksi, dilakukan *elektroforesis* terlebih dahulu; jika terlihat pita DNA yang benar, itu menandakan keberhasilan ekstraksi. Dari hasil *elektroforesis* pada isolasi DNA yang dibaca pada UV Solo pada gambar 8 diatas, terdapat beberapa pita berwarna oranye yang menunjukkan keberadaan DNA (pada sampel 1 sampai 15). Hasil ekstraksi yang didapatkan tampak jelas, tetapi terdapat beberapa sampel yang *smear* (nampak kurang jelas). Meskipun masih terdapat *smear* (nampak kurang jelas), hasil ekstraksi ini menunjukkan bahwa isolasi DNA genom berlangsung dengan baik. Sehingga, DNA tersebut dapat digunakan untuk analisis selanjutnya, yaitu amplifikasi PCR (Fahlevi, dkk, 2017).

Setelah tahap ekstraksi, dilanjutkan dengan langkah pembuatan mix PCR dan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dalam proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR), digunakan program siklus termal sebagai berikut: pra-*denaturasi* pada suhu 95°C selama 15 menit untuk mengaktifkan enzim DNA polimerase. Kemudian dilakukan 35 siklus dengan *denaturasi* pada suhu 95°C selama 30 detik untuk memisahkan untai DNA (*annealing*), suhu 55°C selama 1 menit untuk primer berikatan dengan target DNA, dan suhu 72°C selama 1 menit untuk memperpanjang DNA (*extension*). Setelah semua siklus selesai, dilakukan ekstensi terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit untuk menyelesaikan proses reaksi (*final extension*). Proses PCR pada penelitian ini, dilakukan secara duplo, dengan menggunakan dua suhu *annealing* yang berbeda yaitu 55°C dan 53°C. *Annealing* adalah tahap penempelan primer yang sangat mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi menggunakan PCR (Rahmadhan, dkk, 2019). Pada tahapan *annealing*, terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi, salah satunya adalah suhu. Proses penempelan primer pada DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu yang optimal. Jika suhu *annealing* terlalu rendah, primer akan menempel pada sisi lain dari DNA, sehingga DNA yang terbentuk memiliki spesifisitas rendah. Sebaliknya, jika suhu terlalu tinggi, amplifikasi bisa gagal karena penempelan primer tidak terjadi (Rahmadhan, dkk, 2019).

Selanjutnya, setelah tahapan amplifikasi DNA menggunakan metode PCR selesai dilakukan, dilanjutkan dengan analisis fragmen DNA melalui *elektroforesis* dan dibaca dengan menggunakan gel agarose 1,5 %. Gel agarose dengan konsentrasi 1,5 %, digunakan untuk fragmen DNA dengan ukuran 200

– 3.000 bp, sehingga dapat memberikan pemisahan yang baik untuk fragmen DNA dengan ukuran produk primer sepanjang 594 bp (Irianto, 2013 : 551).

Dalam proses ini, tegangan listrik sebesar 77 volt diterapkan pada gel agarosa yang mengandung fragmen DNA yang diamati. Fragmen DNA dengan panjang 50-2000 pasang basa dipisahkan berdasarkan ukurannya selama sekitar 80 menit dengan menggunakan *elektroforesis*. Setelah itu, gel *elektroforesis* ditempatkan di bawah UV solo untuk memungkinkan visualisasi dan analisis lebih lanjut terhadap pola migrasi dan distribusi fragmen DNA.

Dalam penelitian ini, menggunakan 2 pasang primer dan setiap primer dianalisis menggunakan website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) untuk memastikan kecocokan 100% dengan urutan sekuens primer yang dianalisis. Sekuens nukleotida *Ascaris lumbricoides* dari gen target *first Internal Transcribed Spacer* (ITS-1), menggunakan primer primer AsITS1F (*Ascaris* ITS1 *Forward*) dengan urutan : Citosin; Timin; Timin; Guanin; Adenin; Adenin; Citosin; Citosin; Guanin; Guanin; Guanin; Timin; Adenin; Adenin; Adenin; Adenin; Guanin; Timin; Citosin; Guanin (CTTGAACCGGGTAAAAGTCG) dan AsITS1R (*Ascaris* ITS1 *Reverse*) dengan urutan: Adenin; Timin; Guanin; Timin; Guanin; Timin; Citosin; Timin; Guanin; Citosin; Adenin; Adenin; Timin; Timin; Citosin; Guanin; Citosin; Adenin; Citosin; Timin (ATGTGTCTGCAATTCGCACT). Sekuens nukleotida tersebut kemudian diidentifikasi, disalin, dan dimasukkan ke dalam program kemudian membandingkan sekuens tersebut dengan nematoda lain yang dapat dideteksi melalui gen target ITS-1.

Menurut penelitian Carlsgart et al. (2009) sebagai litelatur penelitian ini, menggunakan primer primer AsITS1F (*Ascaris* ITS1 *Forward*) dengan urutan : Cytosin; Timin; Timin; Guanin; Adenin; Adenin; Cytosin; Cytosin; Guanin; Guanin; Guanin; Timin; Adenin; Adenin; Adenin; Adenin; Guanin; Timin; Cytosin; Guanin (CTTGAACCGGGTAAAAGTCG) dan AsITS1R (*Ascaris* ITS1 *Reverse*) dengan urutan: Adenin; Timin; Guanin; Timin; Guanin; Timin; Cytosin; Timin; Guanin; Cytosin; Adenin; Adenin; Timin; Timin; Cytosin; Guanin; Cytosin; Adenin; Cytosin; Timin (ATGTGTCTGCAATTCGCACT). Primer ini ditargetkan pada bagian-bagian spesifik dari genom mitokondria atau wilayah inti ITS-1. Wilayah inti ITS-1, yang merupakan bagian dari DNA yang terletak di dalam inti sel, memiliki situs pembatas *HaeIII* yang hampir spesifik untuk membedakan antara *Ascaris lumbricoides* pada manusia dan *Ascaris suum* pada babi. Wilayah ITS1 dari rDNA dan tiga wilayah mtDNA berhasil diperbanyak dengan baik, memungkinkan amplifikasi DNA ribosom dan mitokondria secara simultan dalam satu reaksi tunggal menggunakan dua set primer. Dengan hasil yang didapatkan, Dari total 25 sampel, amplifikasi berhasil pada 23–25 (92–100%) sampel menggunakan berbagai set primer yang berbeda, termasuk primer AsITS1F/AsITS1R.

Menurut Al-Mozan dan Alyousif (2019), yang dimana juga menggunakan primer yang sama dengan penelitian ini, dimana primer AsITS1F/AsITS1R dilakukan pencocokan sekuens wilayah ITS1 ribosomal dengan sekuens yang tersedia dalam database NCBI menggunakan *website* BLAST. Hasilnya menunjukkan bahwa semua isolat diidentifikasi sebagai *Ascaris lumbricoides* dengan tingkat kesamaan sekuens mencapai 100%. Sehingga dari penjelasan

diatas, diperlukan pemilihan jenis primer yang spesifik dan sensitive terhadap gen target nematoda yang dituju.

Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan, dengan pemeriksaan molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional secara duplo dari 15 responden pada kasus kecacingan, didapatkan hasil positif sebanyak 0 sampel dengan persentase 0 persen, dan hasil negatif sebanyak 15 sampel dengan persentase 100 persen. Hasil berikut didapatkan dari tidak adanya untai pita DNA yang muncul pada 594 bp, yang mengindikasikan ketiadaan gen *first Internal Transcribed Spacer* (ITS-1) pada sampel feses responden tersebut.

Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian Carlsgart et al. (2009). Primer yang digunakan dalam penelitian ini ditargetkan pada bagian-bagian spesifik dari genom mitokondria atau wilayah inti ITS1. Dengan menggunakan dua set primer, DNA ribosom dan DNA mitokondria dapat diperbanyak secara bersamaan dalam satu reaksi tunggal. Wilayah inti ITS1 merupakan sebagian dari DNA yang terletak di dalam inti sel dan memiliki situs pembatas *HaeIII*, yang memiliki karakteristik yang hampir spesifik untuk membedakan antara *Ascaris lumbricoides* pada manusia dan *Ascaris suum* pada babi. Wilayah ITS1 dari rDNA dan tiga wilayah mtDNA berhasil diperbanyak dengan baik.

Penelitian dari Al-Mozan dan Alyousif (2019) juga menunjukkan hasil yang berbeda. Penggunaan primer AsITS1F (*Ascaris* ITS1 Forward) dengan urutan : Cytosin; Timin; Timin; Guanin; Adenin; Adenin; Cytosin; Cytosin; Guanin; Guanin; Guanin; Timin; Adenin; Adenin; Adenin; Adenin; Guanin; Timin; Cytosin; Guanin (CTTGAACCGGGTAAAAGTCG) dan AsITS1R (*Ascaris* ITS1 Reverse) dengan urutan: Adenin; Timin; Guanin; Timin; Guanin; Timin;

Citosin; Timin; Guanin; Cytosin; Adenin; Adenin; Timin; Timin; Cytosin; Guanin; Cytosin; Adenin; Cytosin; Timin (ATGTGTCTGCAATTGCGCACT) digunakan dalam penelitian ini. Telur *Ascaris lumbricoides* berhasil dideteksi dalam 21 dari 100 sampel tanah yang dikumpulkan dari area pertanian di lima distrik Provinsi Thi-qar, dengan persentase positif sebesar 21%.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional. PCR dapat berfungsi sebagai alternatif dari metode konvensional dalam mendeteksi genom dari berbagai spesimen. PCR memiliki kelebihan, dimana waktu pemeriksaan yang lebih singkat dengan hasil yang lebih sensitif dan spesifik. Pada pemeriksaan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Menurut penelitian Manuel *et al*, (2021), melaporkan bahwa sensitivitas untuk mendeteksi *A. lumbricoides*, *N. americanus*, dan *T. trichiura* adalah 87%, dengan spesifisitas sebesar 83% ketika menggunakan metode PCR konvensional. Namun, walaupun begitu, proses elektroforesis gel agarosa diperlukan untuk memvisualisasikan hasil PCR, dengan memiliki potensi untuk terjadi kontaminasi. Sehingga dari ulasan berikut, penggunaan metode PCR lainnya yang lebih sensitif dan spesifik, dengan tingkat kontaminasi yang lebih rendah dapat digunakan untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan spesifik.

Adanya hasil PCR yang negatif dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pemilihan gen target yang kurang spesifik terhadap jenis genom yang diinginkan, juga dapat mempengaruhi hasil PCR. Gen target ITS-1 adalah bagian spesifik dari genom mitokondria. Namun, penggunaannya untuk pemeriksaan telur cacing kurang tepat dibandingkan dengan gen target dari

genom ribosom. Hal ini karena genom mitokondria lebih bervariasi dan sering mengalami mutasi, sehingga bisa menghasilkan hasil yang kurang akurat. Sebaliknya, gen target dari genom ribosom lebih stabil dan spesifik, sehingga lebih dapat diandalkan untuk mengidentifikasi telur cacing dengan lebih akurat.

Kelemahan dari penelitian ini terletak pada tidak diketahui mengenai konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh setelah proses ekstraksi. Dalam konteks studi molekuler, pentingnya aspek kuantitas (konsentrasi) dan kualitas (kemurnian) DNA. Kedua faktor ini memiliki dampak signifikan terhadap hasil amplifikasi DNA melalui teknik PCR (Priyastomo, dkk., 2023). Untuk mencapai hasil yang optimal, penting untuk mengikuti prosedur yang disarankan dalam hal jumlah template DNA yang digunakan, yaitu ; DNA genom manusia optimal pada 1 ng hingga 200 ng; cDNA optimal pada 10 ng hingga 100 ng; DNA bakteri optimal pada 10 pg hingga 10 ng; PCR fragment (1 kb DNA) optimal pada 10 fg hingga 1 ng; dan Plasmid DNA optimal pada 0.1 ng hingga 50 ng (Qiagen, 2010). Serta tidak adanya penggunaan kontrol positif yang digunakan untuk memastikan bahwa reaksi PCR berjalan dengan baik, juga menjadi salah satu faktor pendukung hasil pemeriksaan PCR negatif dan juga menjadi kelemahan dari penelitian ini yang perlu diperhatikan.