

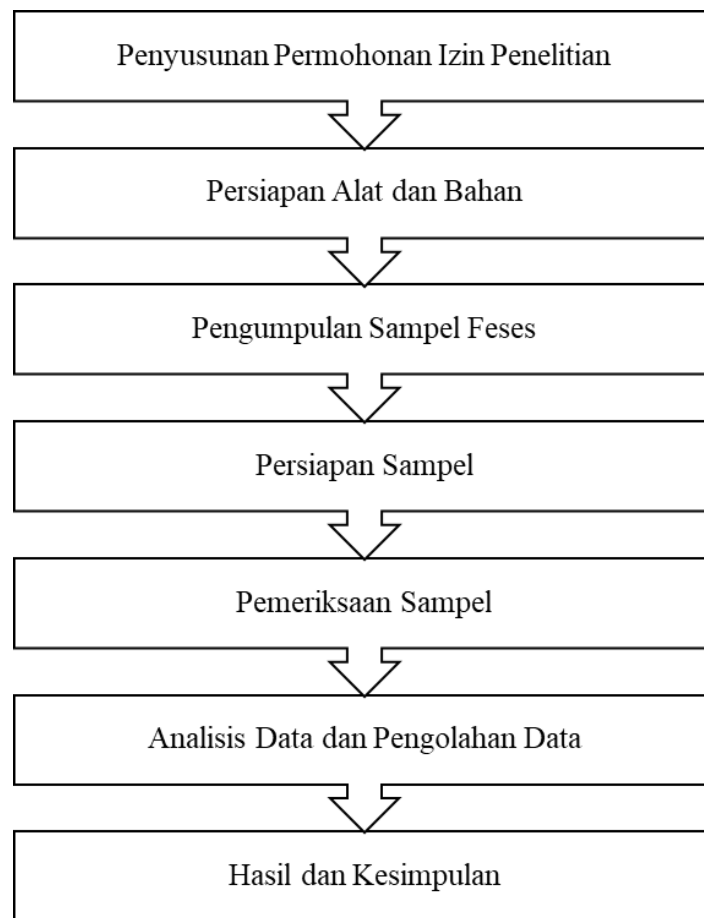
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, yaitu perencanaan dan pelaksanaan sebuah penelitian memerlukan struktur konseptual yang efektif untuk mengumpulkan, mengukur, dan menganalisis data secara efisien.. Penelitian ini digunakan untuk menggambarkan pemeriksaan *Taenia asiatica* dengan menggunakan PCR.

B. Alur Penelitian



Gambar 5 Alur Penelitian.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Pengumpulan sampel dilaksanakan di Puskesmas Sukawati I, Kabupaten Gianyar, dan pemeriksaan sampel dilaksanakan di laboratorium terpadu bagian laboratorium biologi sel dan molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan mulai dari bulan Februari tahun 2024 sampai dengan April tahun 2024.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah masyarakat di kecamatan sukawati yang mengalami *taeniasis* yang telah didata oleh petugas Puskesmas Sukawati I selama periode 2021-2024. Populasi sampel pada penelitian ini yakni sejumlah 15 orang.

2. Sampel

Sampel penelitian dan unit analisis adalah feses pasien yang mengkonsumsi lawar plek yang mengalami *taeniasis* di wilayah Puskesmas Sukawati I selama periode 2021-2024. Feses manusia yang diperoleh kemudian diisolasi untuk mendapatkan DNA template yang akan digunakan dalam proses PCR.

a. Unit analisis

Unit analisis adalah sampel feses.

b. Besar sampel

Jumlah sampel yang digunakan sebesar 15 sampel di wilayah Puskesmas Sukawati I, Kecamatan Sukawati.

c. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang diterapkan adalah menggunakan cara metode *non-probability sampling*, dengan teknik *sampling* jenuh . Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi :

1) Kriteria Inklusi :

- a) Individu peserta yang memberikan persetujuan untuk berpartisipasi dalam penelitian.
- b) Peserta yang memberikan sampel feses untuk pengujian deteksi parasit *Taenia asiatica*.
- c) Adanya hasil mikroskopis yang menunjukkan ditemukannya telur *Taenia sp* dan *proglotid*.

2) Kriteria Eksklusi :

- a) Sampel feses yang tidak memenuhi kriteria kualitas dan kuantitas yang ditetapkan untuk pemeriksaan deteksi parasit.
- b) Responden yang memiliki kondisi kesehatan tertentu yang dapat mempengaruhi hasil deteksi parasit.

d. Alat dan bahan :

Alat yang dipergunakan untuk pemeriksaan molekuler, yaitu: Mikroskop; Objek glass; Cover glass; Tabung PCR; Tabung centrifuge; Tabung eppendorf; Mikropipet; Tip kuning, biru, dan putih; Mikrosentrifugasi; Vortex; Spin down; Transluminator; dan Thermal cycler; BSC Level 2; *Laminator Flow*; centrifuge,

Waterbath; Neraca analitik. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu: Bahan yang dipergunakan pada pemeriksaan molekuler, antara lain: Feses; Potasium dikromat 2.5%; Eosin 2%; Aquadest; Primer Forward 1, Primer Reverse 1, Buffer PCR 1x; MgCl₂; deoksinukleosida trifosfat; BSA; Taq polymerase; agaros; etidium bromida; Etanol 96-100%, Proteinase K; Loading dye; Gel-red.

e. Prosedur Kerja :

1) Pada tahap Pra-Analitik

- a) Pemberian *informed consent* dan kuesioner kepada responden, setelah menyetujui untuk menjadi responden maka akan diberikan pot feses untuk pengumpulan sampel.
- b) Pengumpulan Sampel : Cuci tangan 6 langkah ; Kemudian keluarkan wadah feces dari plastik pembungkusnya; Ambil wadah feces yang berisi *Potasium dikromat* 2,5% dan buka wadahnya (*Note* : Jangan buang cairan yang terdapat di wadah feces); Gunakan sendok yang menempel pada tutup wadah untuk mengambil feses; Kemudian ambil 2-3 sendok feses; Berhati-hati saat mengambil feses agar tidak bercampur dengan darah, air kencing, tissue toilet dan air; Tutup kantong wadah dengan rapat setelah pengambilan feses; Masukkan ke dalam plastik bening dan beri identitas pada wadah feses: nama lengkap; umur; jenis kelamin; Masukkan kedalam wadah plastik bening dan masukan kembali ke dalam kresek hitam; Cuci tangan sampai bersih; Bawa sampel feses ke petugas (Bekti, dkk., 2021).
- c) Persiapan Sampel : Siapkan sampel feses; Masukkan kedalam tabung centrifuge, centrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 14.000rpm, buang supernatan; Kemudian tambahkan aquades dengan perbandingan 1:1;

Kemudian lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit; Kemudian buang supernatan; Lakukan langkah tersebut sebanyak 3 kali; Sampel siap untuk digunakan (Habibah, dkk., 2021).

2) Pada tahap Analitik

- a) Pemeriksaan mikroskopis feses metode *direct slide* : Dalam pemeriksaan feses diawali dengan mempersiapkan alat dan bahan; Selanjutnya, teteskan eosin 2% ke objek kaca, ambil sampel feses secukupnya, kemudian campurkan feses dengan eosin, buang bagian kasar dari sediaan tersebut. Letakkan tutup kaca perlahan-lahan di atas sediaan sehingga merata dan pastikan tidak ada gelembung udara. Periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x (Makkadafi,2022)
- b) Desain primer dengan analisis *in silico* diawali dengan pencarian full genome parasit *Taenia asiatica* dari *genbank* pada website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). FASTA dari *full genome* yang didapat kemudian disejajarkan dengan FASTA full genome parasit lain yang memiliki kemiripan tinggi dengan *Taenia asiatica*. Desain primer dibuat dengan sekuen yang memiliki perbedaan. Primer didesain dan dianalisis menggunakan program Primer-BLAST. Spesifisitas primer diperiksa secara *in silico* menggunakan BLAST di laman NCBI. Pengecekan spesifisitas dilakukan dengan mengunjungi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), menyalin primer ke kolom 'use my own forward/reverse primer', dan mengklik 'Get primer'. Setelah mendapatkan sekuens yang diinginkan kemudian dilakukan analisis pada website Benchling

(<https://www.benchling.com/>) pada perangkat lunak ini berfungsi untuk merancang primer (Melati dkk., 2022).

- c) Ekstraksi Sampel : Ditimbang sebanyak 180 - 220 mg feses dan dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml; Ditambahkan 1 ml inhibitex buffer ke dalam sampel feses; Divorteks selama 1 menit, sampai sampel homogen; Disentrifugasi selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Disiapkan tabung mikrosentrifus 2 ml yang baru dan ditambahkan 25µL proteinase K; Ditambahkan 600µL dari langkah no. 4, kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml yang telah terdapat proteinase K; Ditambahkan 600µL buffer AL; Divorteks selama 15 detik; Dilakukan inkubasi pada suhu 70°C, selama 10 menit; Ditambahkan 600µL etanol 96-100 %;
- d)
- e) Vorteks selama 15 detik; Dipindahkan 600µL, ke tabung spin column; Disentrifugasi selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Dibuang cairan/filtrat pada tabung; Diulangi sampai lisatnya habis; Dipastikan pada tabung spin column, pada tahap terakhir tidak ada cairan (jika ada, maka dilakukan sentrifugasi ulang); Dipindahka dari tabung spin column, kedalam collecting tube yang baru; Ditambahkan 500µL buffer AW1; Disentrifugasi selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm ; Dibuang cairan/filtrate pada collecting tube; Ditambahkan 500µL buffer AW2; Disentrifugasi selama 3 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Dibuang cairan/filtrate pada collecting tube; Disentrifugasi selama 3 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Dipindahkan top dari tabung spin column, kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml yang baru; Ditambahkan 100µL buffer ATE (yang telah

diinkubasi 70°C selama 3 menit); Diinkubasi selama 1 menit, pada suhu kamar; Disentrifugasi selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Disimpan supernatant/filtrate yang terdapat pada tabung mikrosentrifus 2 ml (*Sample to Insight__ QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook*, 2020).

f) Mix PCR :

Menurut *Taq PCR handbook* Qiagen (2010) terdapat beberapa langkah untuk mix PCR yaitu sebagai berikut :

- (1) Langkah awal sebelum dilakukan mix PCR yaitu menyiapkan alat dan bahan; kemudian campurkan semua reagen dengan menggunakan ketentuan sebagai berikut :

Tabel 3
Prosedur 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
RNase-free	9.5	-
Template DNA	2.0	≤ 1 µg/reaction
Total Volume	25	-

Sumber : Qiagen, 2010.

- (2) Lakukan *homogenisasi* reagen, dan centrifuge beberapa detik agar larutan yang menempel pada tutup dan dinding eppendorf turun ke bawah.
- (3) Masukkan ke dalam alat PCR untuk dilakukan tahap amplifikasi. Memasukan sampel ke dalam alat PCR; Pada alat kemudian tekan login, lalu tekan taeniasis, kemudian tekan program overview; Tekan three step, kemudian

tekan open template; Atur suhu 95°C selama; 3 menit untuk pre denaturasi; Atur suhu 95°C selama 30 detik untuk denaturasi; Atur suhu 60°C selama 30 detik untuk annealing; Pilih 39 cycles; Atur suhu 72°C selama 1 menit untuk extension; Atur suhu 72°C selama 5 menit untuk final extension; Atur suhu 4°C selama waktu tak terhingga untuk elemetion; Kemudian tunggu sampel runing.

g) *Elektroforesis:*

(1) Pembuatan gel agarose : Tentukan konsentrasi atau persentase agarose yang dibutuhkan, dan hal ini tergantung dari ukuran fragmen DNA yang dianalisis. Konsentrasi gel yang digunakan yaitu 2% dalam volume 200 ml 1 x buffer TAE, maka jumlah agarose yang akan ditimbang yaitu 4 gram; Masukkan 4 gram agarose ke dalam erlenmeyer dan tambahkan larutan 1 x buffer TAE sampai volume 200 ml, homogenkan sampai rata; Panaskan diatas hotplate sampai larutan menjadi jernih; Dinginkan agarose kira-kira sampai 60°C dan tambahkan 5ul ethidium bromide dan homogenkan hingga merata; Setelah itu larutan dituang ke dalam tray dan pasang *well-forming combs*, tunggu 30 menit atau sampai gel mengeras. Lepas *well-forming combs* secara perlahan-lahan dan gel agarose siap digunakan untuk elektroforesis (Irianto, 2017).

(2) Proses *Elektroforesis* : Letakkan tray yang berisi agarose di dalam tank elektroforesis dan tuang larutan 1 x buffer TAE ke dalam tank tersebut hingga sekitar 1 mm di atas permukaan gel; Ambil sampel dengan mikropipet sebanyak kapasitas sumur (*well*) yang biasanya sekitar 4-8 µl.. Letakkan sampel di atas para film atau plastic cling wrap sebanyak 8µ dan tambahkan loading dye 2, homogenkan dengan cara *up and down* sebanyak 8 kali,

kemudian ambil larutan tersebut dengan mikropipet dan masukkan ke dalam sumur (*well*) pada gel agarose dengan 15 sumur berisi sampel dan 1 sumur berisi marker sebanyak 5 μ ; Setelah sampel dan marker dimasukkan dalam sumur (*well*), tutup tangki elektroforesis dan hubungkan arus listrik. Setelah itu proses *elektroforesis* siap dijalankan; volt yang digunakan yaitu sebesar 77 volt selama 90 menit. Setelah selesai, matikan arus listrik kemudian ambil tray dengan menggunakan sarung tangan. Letakan gel pada UV-*transiluminator* kemudian amati pita/band 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 langsung dari subjek penelitian melalui pengamatan langsung data hasil pemeriksaan *T. asiatica* dengan metode PCR.

b. Data sekunder

Data sekunder dalam penelitian ini terdiri dari berbagai jenis informasi yang telah dicatat dan dipublikasikan dalam studi literatur dari beberapa sumber, termasuk artikel dan buku terkait.

2. Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian yaitu :

a. Kuesioner

Pada penelitian ini kuesioner digunakan untuk mengumpulkan data nama, umur, jenis kelamin, riwayat kesehatan, konsumsi lawar plek, *personal hygiene*, pengetahuan terhadap infeksi parasit, dan konsumsi obat cacing dari responden.

b. Observasi

Pada penelitian ini dilakukan observasi terhadap hasil pemeriksaan laboratorium berupa muncul pita DNA pada hasil PCR yang telah dilakukan *elektroforesis* dan diperiksa dengan *UV-transluminator*.

c. Studi literatur

Pada penelitian ini studi literatur digunakan untuk mengumpulkan data berupa sekuen parasit dan pembuatan desain primer.

d. Dokumentasi

Pada penelitian ini dokumentasi digunakan untuk mendokumentasikan hasil pemeriksaan laboratorium berupa foto.

3. Instrumen Pengumpulan Data

Dalam pengumpulan data instrumen yang digunakan meliputi:

- a. Lembar *informed consent* yang digunakan untuk pernyataan kesediaan pasien menjadi responden.
- b. Lembar kuesioner yang digunakan untuk mengumpulkan data yang sesuai dengan kriteria yang diinginkan.
- c. Alat tulis untuk mencatat hasil pengumpulan data yang diperoleh.
- d. *Handphone* untuk mendokumentasikan kegiatan penelitian.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik Pengolahan Data

Pengolahan data merupakan proses mengatur dan menyusun data agar siap untuk dianalisis. Pengolahan data meliputi tahap-tahap seperti *editing*, *coding*, *entry*, dan tabulasi.

- a. *Editing* (penyuntingan) dilakukan untuk memastikan kebenaran data yang dikumpulkan dan kelengkapan data yang sesuai dengan tujuan penelitian.
- b. *Coding* (pemberian kode) dilakukan untuk memberi tanda dalam bentuk angka/bilangan pada masing-masing hasil penelitian. Tahapan selanjutnya mengubah data yang berbentuk huruf dalam kuesioner menjadi data berbentuk angka. Skoring dalam skala Guttman diubah sebagai berikut: angka 1 untuk “Tidak” dan angka 2 untuk “Ya”. Kemudian total hasil dimasukan ke dalam rumus. Rumus yang digunakan untuk mengukur dari jawaban yang didapat dari kuesioner menurut Arikunto (2013), yaitu :

$$\text{Persentase} = \frac{\text{Jumlah Nilai Benar}}{\text{Jumlah Total Nilai}} \times 100\%$$

Menurut Arikunto (2013) terdapat tiga kategori tingkatan yang didasarkan pada nilai persentase yaitu sebagai berikut:

- 1) Tingkat pengetahuan kategori Baik jika nilainya $\geq 76-100\%$.
 - 2) Tingkat pengetahuan kategori Cukup jika nilainya $60-75\%$.
 - 3) Tingkat pengetahuan kategori Kurang jika nilainya $\leq 60\%$.
- c. *Entry* (pemasukan data) dilakukan dengan mengumpulkan lembar observasi dan pengumpulan dokumentasi penelitian.

- d. Tabulasi (penyajian data) memasukkan data ke dalam tabel data yang telah tersedia untuk menghitung data secara spesifik.

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah statistik deskriptif analisis ini digunakan untuk memberikan gambaran sehingga memungkinkan informasi dapat diambil secara sistematis dan jelas dari data tersebut. Statistik deskriptif, juga dikenal sebagai analisis *univariat*, dilakukan tergantung pada jenis data yang berupa kategorik dan numerik. Pada penelitian ini hasil yang didapatkan berupa gambaran adanya DNA parasit *Taenia asiatica* pada sampel feses. Hasil yang diperoleh disajikan berupa tabel. Dalam Nurmala (2021) menurut sugiyono 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

G. Etika Penelitian

Penelitian ini menghormati hak-hak subyek, untuk itu prinsip etika diterapkan pada penelitian ini yaitu:

1. *Respect for persons*

Peneliti menghargai martabat manusia, otonomi, serta perbedaan nilai budaya, dan menjamin kerahasiaan sebagai subjek penelitian. Oleh karena itu,

peneliti melakukan penjelasan dan persetujuan (PSP) sebelum proses penelitian dimulai.

2. Beneficence

Adalah prinsip yang menuntut untuk tidak menyebabkan kerugian pada subjek. Peneliti memastikan manfaat dari penelitian ini lebih besar daripada potensi kerugiannya. Selain itu, peneliti juga telah memaksimalkan manfaat dan meminimalkan risiko dengan mempelajari hasil penelitian sebelumnya.

3. *Justice*

Peneliti bertindak adil tanpa membedakan antara subjek penelitian. Semua subjek akan diperlakukan dengan cara yang sama.