

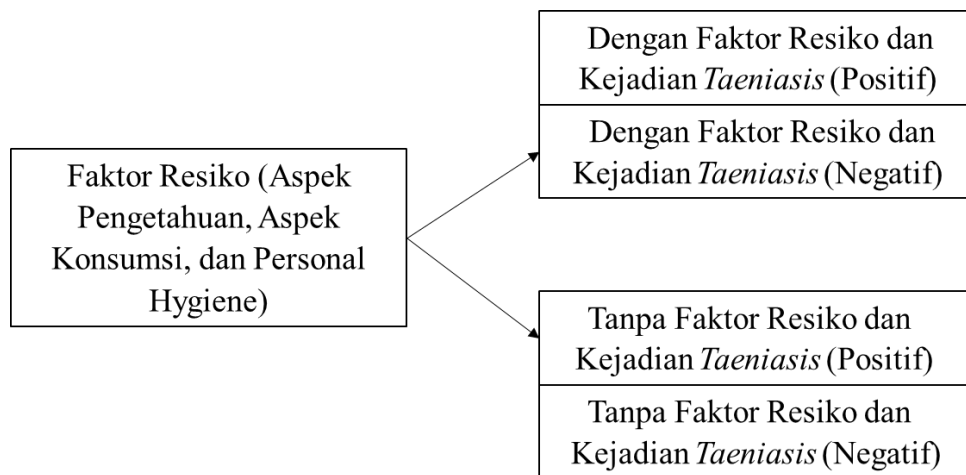
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif, menggunakan metode analitik observasional dengan desain *cross sectional*, dimana penulis mencoba untuk mencari hubungan variabel bebas Faktor Risiko dengan variabel terikat (efek) Kejadian *Taeniasis* Pada Sampel Feses Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* dengan melakukan pengukuran sesaat (Sastroasmoro and Ismael, 2014).

B. Desain Penelitian



Gambar 4. Desain Penelitian.
Sumber : (Sastroasmoro, 2014)

Keterangan:

Dalam penelitian kedokteran dan Kesehatan (Sastroasmoro, 2014), desain *cross sectional* merupakan suatu bentuk studi observasional (non-eksperimental) yang sering dilakukan. Penelitian *cross sectional* peneliti mencari hubungan antara

variabel bebas (faktor risiko) dengan variabel tergantung (efek) dengan melakukan pengukuran sesaat.

C. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat Penelitian

Pengumpulan sampel dilakukan di wilayah Puskesmas Sukawati I, Kabupaten Gianyar, dan pemeriksaan sampel dilakukan di laboratorium molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan mulai dari bulan September tahun 2023 sampai dengan April tahun 2024.

D. Populasi dan sampel penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah masyarakat yang memeriksakan adanya gejala *taeniasis* (kecacingan) didata oleh petugas Puskesmas I Sukawati.

2. Sampel

Sampel adalah Sebagian atau wakil dari populasi yang akan diteliti (Suharsimi Arikunto, 2020). Sampel pada penelitian ini Masyarakat yang melaporkan terkena kecacingan.

3. Unit analisis

Sampel penelitian dan unit analisis dalam penelitian ini adalah feses pasien yang melaporkan terkena gejala *taeniasis* di wilayah Puskesmas Sukawati I. Feses manusia yang diperoleh kemudian diisolasi untuk mendapatkan DNA template

yang akan digunakan dalam proses PCR.

4. Besar sampel

Berdasarkan data pemeriksaan kecacingan di Puskesmas I Sukawati, didapatkan data sampel yang dilaporkan terinfeksi kecacingan pada tahun 2021-2023 sejumlah 25 pasien.

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara memperhatikan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

a. Kriteria inklusi

- 1) Masyarakat yang terdata oleh petugas Kesehatan Puskesmas I Sukawati
- 2) Masyarakat yang memberikan persetujuan untuk berpartisipasi dalam penelitian.
- 3) Masyarakat yang berasal dari wilayah puskesmas I Sukawati
- 4) Sampel feses yang memenuhi kriteria kualitas dan kuantitas yang ditetapkan
- 5) Adanya hasil mikroskopis yang menunjukkan ditemukannya telur cacing *Taenia saginata*

b. Kriteria eksklusi

- 1) Masyarakat yang mendapatkan obat antikecacingan dalam 3 bulan terakhir.

5. Teknik Penentuan Sampel

Teknik penarikan sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan metode *nonprobability sampling*, dengan Teknik *sampling Jenuh* dimana menurut Sugiyono (2022:133) mengatakan sampel yang bila ditambah jumlahnya, tidak akan menambah keterwakilan sehingga tidak akan mempengaruhi nilai informasi yang diperoleh.

E. Jenis dan Teknik Sampling

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. saginata* dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* dan melalui wawancara (kuisisioner) kejadian taeniasis.

b. Data sekunder

Data sekunder adalah informasi yang diperoleh oleh seorang peneliti tidak secara langsung dari subjeknya, melainkan melalui sumber lain, baik secara lisan maupun tertulis. Data sekunder dalam penelitian ini wilayah geografi penelitian serta data pasien yang melaporkan kecacingan.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi, wawancara (kuisisioner).

a. Observasi merupakan metode pengumpulan data dengan cara mengamati atau meninjau secara cermat dan langsung di lokasi penelitian untuk mengetahui kondisi yang terjadi atau membuktikan kebenaran dari sebuah desain penelitian yang sedang dilakukan.

b. Pada observasi laboratorium terhadap hasil pemeriksaan laboratorium berupa pendaran pita DNA pada hasil PCR yang diperiksa dengan *UV-transluminator*.

c. Wawancara (kuisisioner) dilakukan untuk mendapatkan informasi mengenai kejadian taeniasis.

3. Instrument pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data meliputi:

- a. Lembar persetujuan subjek yang digunakan untuk pernyataan kesediaan pasien menjadi subjek penelitian
- b. Lembar kuisioner subjek yang digunakan mendapatkan data kejadian taeniasis.
- c. Alat yang digunakan untuk pemeriksaan DNA yaitu *UV-transluminator*.
- d. *Handphone*, merupakan alat dokumentasi untuk mendokumentasikan kegiatan penelitian
- e. Alat dan bahan

Alat yang dipergunakan pada pemeriksaan molekuler, antara lain: Tabung PCR; tabung ependorf; mikropipet; tip kuning dan putih; mikrosentrifugas; vortex, spindown; transluminator; dan thermal cycler; BSC Level 2; *Laminatory Flow*; centrifuge. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu: Bahan yang dipergunakan pada pemeriksaan molekuler, antara lain: Pottasium dikromat 2.5%; Primer Forward 1, Primer Reverse 1, Buffer PCR 1x; MgCl₂; deoksinukleosida trifosfat; BSA; Taq polymerase; agaros; dan etidium bromi. Etanol 96-100%, Proteinase K.

- f. Prosedur kerja
 - 1) Pada tahap Pra-Analitik
 - a) Pembagian *informed consent* dan kuisioner kepada subjek penelitian, setelah menyetujui untuk menjadi subjek penelitian 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 feces; Kemudian ambil 2-3 sendok feces; Berhati-hati saat mengambil feces agar tidak bercampur dengan darah, air kencing, tissue toilet dan air; Tutup kantong wadah dengan rapat setelah pengambilan feces; Masukkan ke dalam plastik bening dan beri identitas pada wadah feces: nama lengkap; umur; jenis kelamin; Masukkan kedalam wadah plastik bening dan masukan kembali ke dalam kresek hitam; Cuci tangan sampai bersih; Bawa sampel feces ke petugas (Setiyo Bakti, dkk., 2021).

- c) Persiapan Sampel : Siapkan sampel feces; Masukkan kedalam tabung centrifuge, centrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 14.000rpm, buang supernatan; Kemudian tambahkan aquadest dengan perbandingan 1:1; Kemudian lakukan centrifugasi 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 feces : Dalam pemeriksaan feces diawali dengan mempersiapkan alat dan bahan; Kemudian larutan eosin 2% diteteskan di atas objek glass, diambil sampel feces secukupnya, kemudian campurkan feces dengan eosin, dibuang bagian kasar dari sediaan tersebut. Letakkan cover glass diatas sediaan secara perlahan-lahan sehingga merata dan pastikan agar tidak terdapat gelembung udara pada sediaan. Periksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 10X dan 40x (Ridwan, dkk., 2021).
- b) Ekstraksi Sampel : Ditimbang sebanyak 180 - 220 mg feces dan dimasukan kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml; Ditambahkan 1 ml inhibitex buffer

ke dalam sampel feses; Divorteks selama 1 menit, sampai sampel homogen; Disentrifus 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 %; Divorteks selama 15detik; Dipindahkan 600µL, ketabung spin column; Disentrifus 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 sentrigase ulang); Dipindahkan top dari tabung spin column, kedalam collecting tube yang baru; Ditambahkan 500µL buffer AW1; Disentrifus selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm ; Dibuang cairan/filtrate pada collecting tube; Ditambahkan 500µL buffer AW2; Disentrifus selama 3 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Dibuang cairan/filtrate pada collecting tube; Disentrifus 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 (yangtelah diinkubasi 70°C selama 3menit); Diinkubasi selama 1 menit, pada suhu kamar; Disentrifus selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm; Disimpansupernatant/filtrate yang terdapat pada tabung mikrosentrifus 2 ml (*Sample to Insight_QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook*, 2020).

c) Mix PCR :

Menurut (Irianto, 2017) 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 2.
Mix PCR

Reagen	Quantity (µl)	Total Konsentrasi
<i>Water, nuclease-free</i>	38.1	-
10 xVi Buffer A	5.0	1x
2 mM Dntp mix	2.0	0.08 mM
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 µM Forward Primer	1.0	0.2 µM
10 µM Reverse Primer	1.0	0.2 µM
Control DNA (5ng/µl)	1.0	5 ng
Taq DNA <i>Polymerase</i> (5ng/µl)	0.4	2 unit
Total Volume	50.0	-

Sumber : Irianto, 2017

- (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 55°C selama 30 detik untuk annealing; Atur suhu 32°C selama 1 menit untuk extension; Atur suhu 72°C selama 10 detik untuk final extension; Atur suhu 4°C selama waktu tak terhingga untuk elemetion; Kemudian tunggu sampel runing.

d) *Elektroforesis:*

- (1) Pembuatan gel agarose : Tentukan konsentrasi atau persentase agarose yang dibutuhkan, dan hal ini tergantung dari ukuran fragmen DNA yang dianalisis. Persentase gel agarose yang direkomendasikan, adalah sebagai berikut: 0.5% agarose untuk fragmen DNA berukuran 1.000-30.000 pb, 0.7% agarose untuk fragmen DNA berukuran 800-12.000 pb, 1.5% agarose untuk fragmen DNA berukuran 200-3.000 pb, 2.0% agarose untuk fragmen DNA berukuran 50-2.000 pb; Pilih tipe agarose yang digunakan. Kebanyakan tipe yang digunakan adalah standard agarose. Misalnya telah ditentukan akan dibuat 2% gel agarose dalam volume 200 ml 1 x buffer TAE, maka jumlah agarose yang akan ditimbang yaitu $2 \text{ g}/100 \text{ ml} \times 200 \text{ ml} = 4 \text{ g}$; Tempatkan 4 g agarose ke dalam erlenmeyer dan isi dengan larutan 1 x buffer TAE sampai volume 200 ml, kemudian kocok sampai merata; Panaskan dalam *microwave* sampai mendidih sampai larutan menjadi jernih; Dinginkan agarose kira-kira sampai 60°C dan tambahkan 5ul ethidium bromide (10 mg/ml) dan campur 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 μ l.. Letakkan sampel di atas para film atau plastic cling wrap dan tambahkan loading dye buffer sebanyak 1/10 volume sampel kemudian aduk hingga merata. Ambil larutan tersebut dengan Mikropipet dan masukkan ke dalam sumur (*well*) pada gel agarose; Setelah sampel dimasukkan dalam sumur (*well*), tutup tank elektroforesis dan hubungkan arus listrik (hati-hati tegangan listrik cukup tinggi). Setelah itu proses *elektroforesis* siap dijalankan; Lamanya *elektroforesis* tergantung persentase gel agarose, tegangan arus listrik, dan ukuran molekul DNA. Sebagai gambaran proses *elektroforesis* untuk: tegangan listrik yang digunakan 100 volt. Ukuran fragmen DNA yang dianalisis 50-2000pasang basa maka proses *elektroforesis* memerlukan waktu sekitar 30 menit; Setelah proses *elektroforesis* selesai, matikan arus listrik dan ambil tray dengan menggunakan sarung tangan. Taruh gel pada UV-*transiluminator* dan amati pita/band molekul DNA (Irianto, 2017).

(3) Post-Analitik

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

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik Pengolahan data

Pengolahan data dalam konteks penelitian melibatkan tahapan

mengumpulkan data penelitian dan mengubahnya menjadi informasi yang dapat dimanfaatkan oleh berbagai pihak yang berkepentingan. Pengolahan data meliputi tahap-tahap seperti *editing* (penyuntingan), *coding* (pemberian kode), *entry* (pemasukan data), dan tabulasi (penyajian data dalam tabel).

- 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.
- c. *Entry* (pemasukkan 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

Penelitian ini menggunakan uji normalitas Shapiro-wilk lalu dilanjutkan dengan uji *chi square*. Uji *Chi Square* adalah untuk menemukan hubungan antar variabel yang terdapat dalam baris dan kolom, jenis data yang digunakan dalam uji *chi-square* harus berupa data frekuensi (data kualitatif) dengan skala nominal atau ordinal, alternatifnya, bisa berupa skala nominal atau ordinal.

G. Etika Penelitian

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

1. *Respect for persons*

Peneliti menghormati harkat dan martabat manusia, otonomi, perbedaan nilai budaya dan menjamin kerahasiaan sebagai subyek peneliti. Untuk itu peneliti melakukan persetujuan setelah penjelasan (PSP).

2. *Benificence*

Benificence yaitu tidak berbuat merugikan subyek. Peneliti telah mempertimbangkan bahwa penelitian ini lebih banyak manfaat daripada kerugian dari penelitian ini. Peneliti juga memaksimalkan manfaat dan meminimalkan risiko dengan penelaahan hasil penelitian terdahulu.

3. *Justice* atau Berlaku adil

Peneliti berlaku adil tanpa membedakan antar subyek penelitian. Semua subyek akan mendapatkan perlakuan yang sama.