

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah studi kasus kontrol yang merupakan penelitian epidemiologi observasional analitik yang dilakukan di daerah endemis kusta yaitu kabupaten Lamongan, Jawa Timur.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi kasus adalah penderita kusta, air dan tanah disekitar rumah penderita kusta, sedangkan populasi kontrol adalah tetangga penderita kusta yang tidak menderita penyakit kusta (non-penderita), air dan tanah disekitar rumah non-penderita kusta.

4.2.2 Sampel

Sampel kasus adalah penderita kusta, air dan tanah di sekitar rumah penderita yang terpilih menjadi sampel, sedangkan sampel kontrol adalah tetangga penderita kusta yang tidak menderita penyakit kusta (non-penderita), air dan tanah di sekitar rumah non-penderita yang terpilih menjadi sampel.

Sampel dipilih secara *consecutive sampling* dengan pertimbangan jumlah penderita kusta yang relatif sedikit (total penderita yang terdaftar di wilayah puskesmas Brondong kecamatan Brondong pada akhir tahun 2008 adalah 52 orang).

Sampel kasus berdasarkan rumah penderita kusta, yaitu penduduk yang didiagnosa menderita penyakit kusta berdasarkan data yang didapatkan dari puskesmas Brondong. Sedangkan sampel kontrol berdasarkan rumah non-penderita kusta dengan jarak minimal

12 meter dari rumah penderita kusta, yaitu penduduk yang berdasarkan pemeriksaan oleh pihak puskesmas tidak ditemukan adanya tanda-tanda *cardinal sign* kusta.

4.2.3 Besar sampel

Besar sampel dihitung dengan menggunakan program *epimap*, dengan diketahui :

$$P1 = 76\%$$

$$P2 = 24\%$$

$$\alpha = 10\%$$

$$\beta = 20\%$$

Setelah dihitung, maka besar sampel adalah 42 sampel kasus dan 42 sampel kontrol dengan perbandingan kasus kontrol adalah 1:1, angka kepercayaan (*Confidence Interval*) 90% dan kekuatan uji (*test power*) 80%.

4.2.4 Kriteria penerimaan sampel

1. Sampel yang bersedia ikut serta dalam penelitian.
2. Sumber air yang masih digunakan oleh sampel untuk kegiatan sehari-hari yakni mandi dan mencuci pada saat dilakukan pengamatan.
3. Sumber air belum mengalami proses penjernihan air misalnya diberi kaporit atau disinfektan.
4. Tanah berasal dari daerah di sekitar rumah sampel yang mempunyai sumber air.
5. Tanah berasal dari daerah di sekitar rumah sampel dalam radius 5 meter dari rumah.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

1. Eksistensi *M.leprae* pada sampel air dan tanah dari daerah prevalensi kusta tinggi sebagai variabel bebas.
2. Keberadaan penderita kusta dari daerah prevalensi kusta tinggi sebagai variabel tergantung.

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Eksistensi *M.leprae* pada sampel air dan tanah dari daerah prevalensi kusta tinggi :
DNA *M.leprae* yang di deteksi dengan menggunakan tehnik *nested* PCR. Tehnik *nested* PCR merupakan tehnik molekuler untuk mendeteksi DNA *M.leprae* menggunakan primer LPF, LPR dan LP3, LP4. Primer oligonukleotida LPF dan LPR akan mengamplifikasi sekuens 280bp dari *repetitive element* (RLEP) yang spesifik *M.leprae*, sedangkan LP3 dan LP4 akan mengamplifikasi 99 bp dari RLEP hasil amplifikasi LPF-LPR. Hasil pemeriksaan PCR dikatakan positif jika pada pada ketinggian 99 bp dengan menggunakan petanda (DNA *marker*) 100bp DNA *ladder*, terdapat pita dari sampel dan posisi tersebut sejajar dengan kontrol positif yaitu DNA *M.leprae* strain Thai 53 dari *nude mice* yang dibiakkan di Leprosy Research Center, Tokyo, Jepang. Skala data nominal, yaitu ada dan tidak.
2. Keberadaan penderita kusta dari daerah prevalensi kusta tinggi :
Ada tidaknya penderita kusta, yaitu penderita yang telah didiagnosa sebagai penderita penyakit kusta berdasarkan kriteria WHO, baik yang merupakan

kasus baru, masih dalam pengobatan maupun yang sudah selesai pengobatan (RFT). Skala data nominal, yaitu ada dan tidak.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan untuk sterilisasi alat pengambilan sampel air dan tanah

1. Alkohol 70%.
2. Sarung tangan karet *disposable*.

4.4.2 Bahan untuk ekstraksi DNA dan pemeriksaan PCR

1. Bahan-bahan untuk ekstraksi DNA dengan menggunakan *Qiagen miniprep kit*.
2. PCR master *mixture (Failsafe)* berisi : 1). Enzym Taq DNA polymerase 0.2 μ l; 2). Premix G yang berisi : Tris-HCl (pH 9.0 pada suhu ruangan) 10mM, KCl 50mM, MgCl 1.5mM, campuran deoxynucleosidetriphosphate (dNTP-dATP, dTTP, dCTP, dGTP) masing-masing 200mM; 3). Primer oligonukleotida 5 μ M; 4). Aquades steril.

Primer yang digunakan adalah :

LPF : 5'TATCGATGCAGGCGTGAGTGT3'

LPR : 5'CTAACACGATACTGCTGCAC3'

LP3 : 5'TGAGGTGTCGGCGTGGTC3'

LP4 : 5'CAGAAATGGTGCAAGGGA3'

3. DNA *template* dari tiap sampel air dan tanah.
4. Gel agarose HS untuk elektroforesis konsentrasi 3% dengan pelarut TBE (*Tris-Boric EDTA*).
5. Ethidium bromide 0.1 μ g/ml digunakan untuk mewarnai gel hasil elektroforesis.
6. 6X loading buffer produk TAKARA.

7. Petanda DNA (100bp DNA *ladder*).

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Instrumen yang digunakan untuk pengambilan sampel air dan tanah

1. Botol steril kualitas pro analisis.
2. Gelas plastik steril.
3. Membran milipore filter 0.22 μm
4. Tabung sentrifus 50 ml steril.
5. Sendok teh bergagang panjang steril.

4.5.2 Instrumen yang digunakan untuk ekstraksi DNA dan pemeriksaan PCR

1. Sentrifus Kubota 4000 rpm suhu kamar.
2. Sentrifus 5417 R Eppendorf 13.000 rpm.
3. Alat untuk *Vortex*.
4. Takara PCR *thermal cycler*.
5. Pipet mikro dengan tip berfilter steril buatan eppendorf ukuran 0.5-1.0 μl , 20-100 μl , 100-200 μl , 100-1000 μl .
6. Tabung eppendorf steril ukuran 1.5 ml, 0.5 ml, 0.2 ml.
7. Pinset steril.
8. Box pendingin.
9. Tangki elektroforesis.
10. Transluminator (sinar UV).
11. Kamera dan program foto digital kodak EDAS 290.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di daerah endemis kusta di kabupaten Lamongan Jawa Timur, yaitu di desa Sedayu lawas dan desa Brengkok dari wilayah puskesmas Brondong kecamatan Brondong. Ekstraksi DNA dan pemeriksaan PCR dilakukan di laboratorium *Leprosy Study Group, Institute of Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga Surabaya*. Penelitian dilakukan selama 6 bulan, mulai Februari sampai Juli pada tahun 2009.

4.7 Prosedur dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur pengambilan sampel air dan tanah

4.7.1.1 Prosedur pengambilan sampel air (Matsuoka *et.al.*, 1999)

1. Air dari sumber air dihomogenkan terlebih dahulu dengan cara diaduk.
2. Air di ambil dari permukaan sumber air dengan menggunakan gelas plastik steril sekali pakai dan dimasukkan ke dalam botol steril.
3. Sampel air dibawa ke laboratorium dalam suhu kamar.
4. 50 ml sampel air di filter dengan menggunakan membran milipore filter 0.22 μ m.
5. Membran diambil dan dimasukkan dalam tabung 50 ml steril, kemudian dicuci dengan larutan PBST sebanyak 1.5 ml dan divorteks selama 10 menit.
6. Supernatan di pindahkan ke tabung eppendorf steril 1.5 ml dan disentrifus pada 13.000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit .
7. Pelet dari hasil sentrifus kemudian digunakan untuk ekstraksi DNA.

4.7.1.2 Prosedur pengambilan sampel tanah (Lavania *et.al.*, 2008; Matsuoka *et.al.*, 1999)

1. Tanah dari daerah di sekitar rumah penduduk dalam radius 5 meter diambil pada kedalaman 12 cm dan dimasukkan ke dalam tabung 50 ml steril.
2. Sampel tanah dibawa ke laboratorium dalam suhu kamar.
3. 100 mg tanah kering ditimbang.
4. Ditambahkan larutan PBS tween 80 0.01% sebanyak 1.5 ml dan divorteks selama 10 menit.
5. Disentrifus pada 100xg selama 10 menit.
8. Supernatan di pindahkan ke tabung eppendorf steril 1.5 ml dan disentrifus kembali pada 13.000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit.
9. Pelet dari hasil sentrifus kemudian digunakan untuk ekstraksi DNA.

4.7.2 Prosedur ekstraksi DNA dan pemeriksaan PCR

4.7.2.1 Ekstraksi DNA dari sampel air dan tanah

Sampel air dan tanah yang sudah berupa pelet kemudian diekstraksi menggunakan *Qiagen miniprep kit* sesuai dengan prosedur dalam buku manualnya.

4.7.2.2 Amplifikasi DNA dengan metode PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan tehnik *nested PCR*, diawali dengan PCR pertama dengan memasukkan PCR *mixture*, primer LPF-LPR dan DNA *template* ke dalam tabung PCR 0.2 ml. Selanjutnya tabung 0.2 ml dimasukkan dalam mesin *thermal cycler* PCR dengan kondisi *denaturation* 98°C, *annealing* 56°C dan *extention* 72°C, diulang sebanyak 35 siklus. Produk PCR pertama dengan hasil amplifikasi 280bp akan dijadikan DNA *template* untuk proses PCR yang kedua dengan menggunakan primer LP3-LP4 dengan kondisi PCR yang sama tetapi diulang sebanyak 30 siklus. Produk PCR kedua

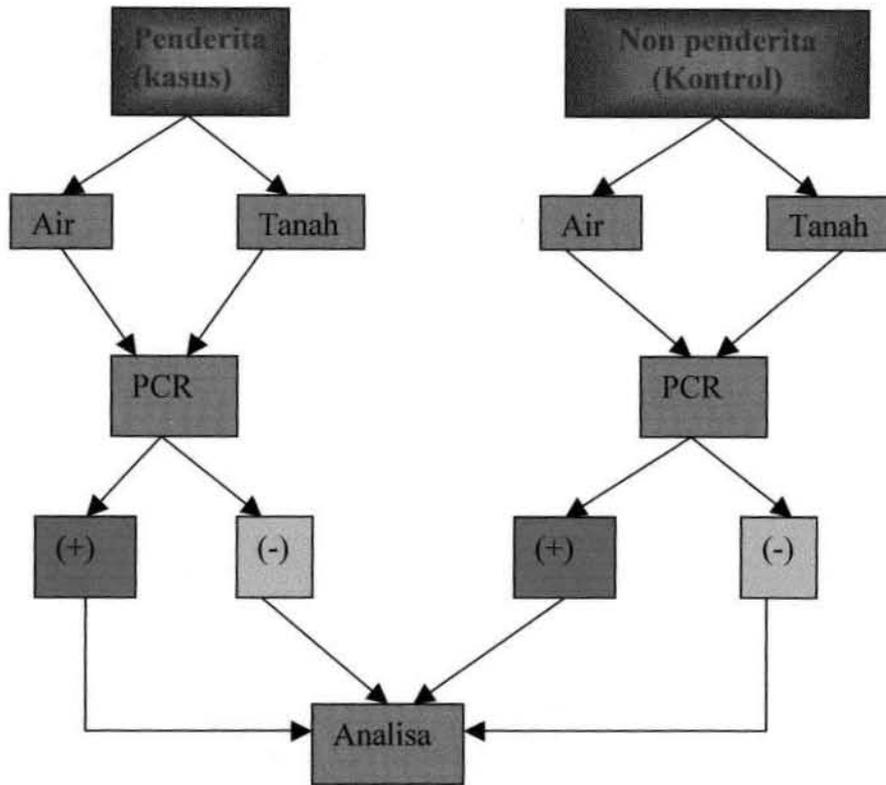
adalah hasil amplifikasi 99bp yang dapat dilihat dengan menggunakan gel agarose 3% yang dijalankan dalam medan elektroforesis. Gel kemudian diwarnai dengan ethidium bromida 0.1µg/ml dan dilihat dengan transluminator (sinar UV) kemudian difoto dengan menggunakan foto digital Kodak EDAS 290. Hasil dianggap positif bila ditemukan pita pada ketinggian yang sesuai dengan pita dari kontrol positif *M.leprae*, yaitu 99 bp pada 100bp DNA ladder.

4.8 Analisa Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan uji Chi Square, yaitu untuk membandingkan eksistensi *M.leprae* pada sampel air dan tanah dengan keberadaan penderita kusta di daerah prevalensi tinggi daerah endemis kusta. Apabila syarat menggunakan uji Chi Square tidak terpenuhi, maka digunakan uji Fisher's Exact.

Alasan penggunaan uji Chi Square adalah karena variabel pada penelitian ini menggunakan skala pengukuran nominal (ada tidaknya DNA *M.leprae* pada sampel air dan tanah serta ada tidaknya penderita kusta), variabel mempunyai 2 kategori (tabel 2x2), sampel yang diambil merupakan data tidak berpasangan.

4.9 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian