

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah studi *cross-sectional* yang merupakan penelitian eksploratif dengan jenis penelitian observasional laboratorik.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah ibu hamil yang tinggal di daerah penelitian, yaitu di wilayah puskesmas Sungai Pinang dan Peramasan, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah ibu hamil yang menderita malaria *falciparum* atau malaria *falciparum* campuran berdasarkan gejala-gejala klinis penyakit malaria seperti demam, sakit kepala, menggigil, disertai dengan hasil pemeriksaan sediaan tetes tebal darah tepi.

4.2.3 Besar sampel

Besar sampel adalah keseluruhan jumlah sampel yang diperoleh mulai bulan Maret tahun 2008 sampai Maret tahun 2010.

4.2.4 Kriteria penerimaan sampel

1. Kriteria inklusi

Ibu hamil yang menderita malaria *falciparum* atau malaria *falciparum* campuran yang bersedia ikut dalam penelitian dengan menandatangani lembar persetujuan mengikuti penelitian (*informed consent*)

2. Kriteria eksklusi

- Ibu hamil yang menderita malaria *falciparum* atau malaria *falciparum* campuran tetapi tidak bersedia berpartisipasi dalam penelitian dan menolak menandatangani lembar persetujuan mengikuti penelitian (*informed consent*)
- Ibu hamil yang tidak menderita malaria *falciparum* atau malaria *falciparum* campuran

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dalam penelitian ini adalah polimorfisme gen *Pfdhfr* dan polimorfisme gen *Pfdhps*

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Polimorfisme gen *Pfdhfr* adalah terjadinya mutasi pada gen yang mengkode enzim *dihydrofolate reductase (dhfr)* pada biosintesis folat dalam *P. falciparum*. Mutasi yang diidentifikasi adalah pada kodon 108 dan 51. Pada kodon 108 terjadi perubahan dari serin menjadi asparagin atau threonin, sedangkan pada kodon 51

terjadi perubahan dari asparagin menjadi isoleusin. Deteksi adanya mutasi gen *Pfdhfr* dilakukan dengan menggunakan teknik *nested* PCR-RFLP

2. Polimorfisme gen *Pfdhps* adalah terjadinya mutasi pada gen yang mengkode enzim *dihydropteroate synthase (dhps)* pada biosintesis folat dalam *P. falciparum*. Mutasi yang diidentifikasi adalah pada kodon 437, 540 dan 581. Pada kodon 437 terjadi perubahan dari alanin menjadi glisin, kodon 540 terjadi perubahan dari leusin menjadi glutamat dan kodon 581 terjadi perubahan dari alanin menjadi glisin. Deteksi adanya mutasi gen *Pfdhps* dilakukan dengan menggunakan teknik *nested* PCR-RFLP.

4.4 Bahan penelitian

4.4.1 Bahan untuk pengambilan sampel, pembuatan hapusan darah dan pewarnaan Giemsa

1. Kapas alkohol 70%
2. Kapas kering
3. Pewarna Giemsa (stok)
4. Buffer fosfat pH 7,2
5. Air pembilas

4.4.2 Bahan untuk ekstraksi DNA dengan Qiagen DNA blood kit

Bahan- bahan yang terdapat dalam kit komersial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Inc).

4.4.3 Bahan untuk identifikasi spesies *Plasmodium* dengan teknik *nested PCR* (Kimura, 1997)

1. PCR *mixture*, terdiri dari :

- Enzim Taq DNA polymerase (Takara)
- *Deoxyribonucleotide triphosphate* (dNTP)
- *Primer* oligonukleotida
- Aquades steril

Primer yang digunakan adalah :

PF : 5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3'

PR : 5'-GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT – 3'

PfR : 5'-CAATCTAAAATCACCTCGAAAGATG-3'

PvR : 5'-CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3'

PmR : 5'-GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT-3'

PoR : 5'-ACTGAAGCAATCTAAGAAATTT-3'

2. DNA *template*
3. Gel agarose untuk elektroforesis konsentrasi 2 % dengan pelarut 0,5 X TAE (Tris-Acetate EDTA)
4. Ethidium bromide ug/ml untuk mewarnai gel hasil elektroforesis
5. Loading buffer (Takara)
6. Petanda DNA (100 bp DNA *ladder*)

4.4.4 Bahan untuk deteksi mutasi genetik gen *Plasmodium falciparum-dhfr* dan *dhps* dengan teknik nested PCR-RFLP (Tinto, 2007)

1. PCR *mixture*, terdiri dari :

- Enzym Taq DNA polymerase (Takara)
- Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)
- Primer oligonukleotida
- Aquades steril

Primer yang digunakan :

Pfdhfr

PR1 : 5'-TTTATATTTTCTCCTTTTAA-3'

PR2 : 5'- CATTATATTATTCG-TTTTCT-3'

SRA : 5'- ATGATGGAACAAGTCTGCGAC-3' (kodon 108)

SRB : 5'- ACATTTTATTATTCGTTTTCT-3'

IN1 : 5'- GGAAATA-AAGGAGTATTACAATGGAAA-3' (kodon 51)

IN2 : 5'- TATAAACATCTCATCAAAATCTTC-3'

Pfdhps

SD1 : 5'- GTTTAATCACATGTTTGCACCTTTC-3'

SD2 : 5'- CCATTCCTCATGTGTATAACACAC-3'

SFA : 5'- TGATACCCGAATATAAGCATAATG-3'

SFB : 5'- ATAATAGCTGTAGGAAGCAATTG-3'

2. DNA *template* adalah DNA dari hasil identifikasi spesies yang positif

P.falciparum

3. Enzim pemotong : Alu I (Ser-108), Bsr I (Asn-108), Scrf I (Thr-108), Tsp509I (Ile-51), AvaII (Gly-437), Folk I (Glu-504) dan Bst UI (Gly-580)
4. Gel agarose untuk elektroforesis konsentrasi 2 % dengan pelarut TAE (Tris-Acetat EDTA)
5. Ethidium bromide ug/ml untuk mewarnai gel hasil elektroforesis
6. Loading buffer (Takara)
7. Petanda DNA (100 bp DNA *ladder*)

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Instrumen untuk pengambilan sampel, pembuatan hapusan darah dan pewarnaan Giemsa

1. Lancet
2. Kertas Saring
3. Gelas objek
4. Box penyimpanan gelas objek
5. Rak untuk pewarnaan dan pengeringan

4.5.2 Instrumen untuk ekstraksi DNA dengan Qiagen DNA blood kit

1. Pipet mikro dengan ukuran 0,5-1,0 μ l, 20-100 μ l, 100-200 μ l, 100-1000 μ l
2. Aliquot steril ukuran 1,5 ml
3. Aliquot dengan tutup (*screw*)
4. Kolum (*column*)
5. Sentrifus
6. Inkubator (Sanyo)

4.5.3 Instrumen untuk identifikasi spesies *Plasmodium* dengan teknik *nested* PCR dan deteksi mutasi genetik gen *Pfdhfr* dan *Pfdhps* dengan teknik *nested* PCR-RFLP

1. Pipet mikro dengan ukuran 0,5-1,0 μ l, 20-100 μ l, 100-200 μ l, 100-1000 μ l
2. Tabung steril ukuran 0,5 ml, 0,2 ml
3. Sentrifus
4. Sentrifus mini
5. PCR thermal cycler
6. Alat elektroforesis
7. Transluminator (sinar UV)
8. Kamera dan program foto digital

4.6 Lokasi dan Waktu penelitian

Pengambilan spesimen darah penderita dilaksanakan di Puskesmas Sungai Pinang dan Bidan di Desa di wilayah Puskesmas Sungai Pinang serta Puskesmas Peramasan, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan. Pemeriksaan spesimen darah meliputi mikroskopis malaria, ekstraksi DNA, pemeriksaan PCR dan polimorfisme gen *Pfdhfr* dan *Pfdhps* dilakukan di laboratorium Malaria, *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga Surabaya.

4.7 Prosedur dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur pengambilan sampel, pembuatan hapusan darah dan pewarnaan Giemsa (WHO,1988)

1. Bersihkan ujung jari pasien dengan kapas alkohol, biarkan kering sendiri
2. Tusuk dengan lanset steril, tetesan darah pertama dihapus dengan kapas kering. Tunggu sampai darah keluar lagi
3. Sentuhkan tetesan darah pada gelas objek sebanyak 3 tetes (20 μ l) untuk sediaan darah tebal dan pada kertas saring
4. Tetesan darah pada gelas objek dibuat sediaan darah tebal dengan cara tetesan darah diaduk secara memutar dengan gerakan melingkar keluar dalam diameter 1,5 cm.
5. Sediaan tebal dibiarkan kering, kemudian dilakukan lisis eritrosit dengan menggunakan aquades, dan kemudian dibiarkan kering
6. Siapkan campuran pewarna Giemsa dengan buffer fosfatpH 7,2 dengan konsentrasi 5 % (1:20), ditetaskan pada sediaan darah tebal hingga menggenangi sediaan darah tersebut. Biarkan selama 40 menit, kemudian dibilas dengan air dan dibiarkan kering
7. Pemeriksaan hapusan darah yang telah terwarnai dengan Giemsa dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 1000X dan dengan menggunakan oil immersi.

4.7.2 Prosedur ekstraksi DNA dengan Qiagen DNA *blood* kit

1. Kertas saring dipotong-potong secara steril kemudian disimpan dalam aliquot 1,5 ml
2. Sampel dalam aliquot 1,5 ml ditambah dengan 0,5 ml saponin 0,5% (w/w) dalam HBS buffer pada temperatur ruang (RT) selama 1,5 jam, setiap 30 menit campur dengan baik
3. Sentrifus 3000 rpm selama 1 menit, kemudian buang larutan
4. Sampel dicuci dengan menambahkan 0,5 – 1 ml HBS buffer pada RT selama 10 menit, campur dengan baik
5. Sentrifus 3000 rpm selama 1 menit, kemudian tambahkan 0,5 – 1 ml HBS buffer pada RT selama 10 menit
6. Sentrifus 3000 rpm selama 1 menit, kemudian buang larutan dengan sempurna
7. Tambahkan ATL buffer 180 μ l, inkubasi 85°C selama 15 menit. Campur dengan baik sebelum diinkubasi
8. Tambahkan proteinase K 20 μ l, campur dengan baik (vortex), inkubasi 56°C selama 1 jam.
9. Simpan pada RT sampai temperatur sama dengan RT
10. Tambahkan AL buffer 200 μ l inkubasi 56°C selama 10 menit, campur dengan baik (vortex)
11. Biarkan di RT, sentrifus 5000 rpm 1 menit, kemudian pindahkan larutan ke aliquot baru

12. Sentrifus 5000 rpm 1 menit, pindahkan larutan ke aliquot baru
13. Tambahkan ethanol absolut 200 μ l, campur dengan baik
14. Sentrifus 3000 rpm 1 menit. Pindahkan larutan ke column, tunggu RT selama 1 menit dari kolom terakhir ke membran yang sudah tersaring sebagian
15. Sentrifus 8000 rpm 1 menit, transfer kolom ke aliquot baru
16. Tambahkan AW 1 buffer 500 μ l, tunggu pada RT 1 menit dari kolom terakhir
17. Sentrifus 8000 rpm 1 menit, transfer kolom ke aliquot baru
18. Tambahkan AW 2 buffer 500 μ l, tunggu pada RT selama 1 menit dari kolom terakhir
19. Sentrifus 8000 rpm 1 menit
20. Ubahlah aliquot di atas sebelum dimasukkan sentrifus, kemudian sentrifus 8000 rpm 8-10 detik (cepat). Transfer kolom ke kolom baru
21. aliquot dengan tutup beri label, buka tutupnya dan letakkan di atas tissue, kemudian letakkan kolom di dalam aliquot
22. Tambahkan 40 μ l AE buffer pada bagian tengah membran, inkubasi RT selama 5 menit dari column terakhir
23. Sentrifus 8000 rpm 1 menit, pindah posisi aliquot dan kolom ke posisi yang berlawanan
24. Sentrifus 8000, 8-10 detik (cepat), transfer kolom ke tas plastik
25. Tutup aliquot dan simpan dalam suhu -20°C hingga digunakan

4.7.3 Prosedur identifikasi spesies *Plasmodium* dengan teknik *nested* PCR

Total volume campuran 20 μ l berisi 2 μ l sampel DNA *template*, 200 μ M dNTP, 0,4 μ M masing-masing *primer* dan 1 U enzim taq DNA polimerase. Kondisi reaksi amplifikasi adalah : inisial denaturasi pada 94°C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan denaturasi pada 94°C untuk 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 50°C selama 30 detik dan perpanjangan rantai (*extension*) pada 72°C selama 1 menit, diulang sebanyak 30 siklus, dengan perpanjangan final pada 60°C selama 5 menit. Untuk *nested* PCR, sebagai cetakan untuk reaksi amplifikasi adalah hasil PCR pertama yang diencerkan 50 kali. *Primer* untuk PCR kedua, adalah PF dan *primer* yang spesifik untuk masing-masing spesies *Plasmodium*. Reagensia dan kondisi untuk PCR kedua sama dengan PCR pertama, hanya saja jumlah siklusnya 20. Reaksi ini menggunakan Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystem. Produk PCR dapat dilihat dengan menggunakan gel agarose 2% yang dijalankan dalam medan elektroforesis. Gel kemudian diwarnai dengan ethidium bromida dan dilihat dengan transluminator kemudian difoto dengan menggunakan foto digital. Hasil dianggap positif bila ditemukan pita pada ketinggian yang sesuai dengan ketinggian pita dari kontrol positif *P. falciparum* pada 100 bp DNA *ladder*.

4.7.4 Prosedur deteksi mutasi genetik gen *Pfdhfr* dan *Pfdhps* dengan teknik *nested* PCR-RFLP

Produk PCR dari hasil *nested* PCR diatas dipakai sebagai sampel DNA. Total volume reaksi 20 μ l berisi 2 μ l sampel DNA, 200 μ M dNTP, 0,4 μ M masing-

primer dan 1 U enzim taq DNA polimerase. Untuk *nested* PCR, DNA dari hasil PCR I terlebih dahulu diencerkan 10x dengan H₂O, reagensia untuk PCR kedua sama dengan PCR pertama. *Primer* dan kondisi reaksi amplifikasi dapat dilihat pada tabel 4.1. Reaksi ini menggunakan Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystem. Produk PCR dapat dilihat dengan menggunakan gel agarose 2% yang dijalankan dalam medan elektroforesis. Gel kemudian diwarnai dengan ethidium bromida dan dilihat dengan transluminator kemudian difoto dengan menggunakan foto digital. Hasil dianggap positif bila ditemukan pita pada ketinggian yang sesuai dengan ketinggian pita dari kontrol positif *P. falciparum* pada 100 bp DNA ladder.

RFLP dilakukan dengan pemberian enzim pemotong pada suhu optimal dan waktu yang diperlukan sesuai dengan yang ditunjukkan pada brosur dari produsen. Produk PCR digunakan tanpa pemurnian, total volum 50 µl terdiri dari 5 µl sampel, enzim 5 U/µl, 5 µl buffer, 5 µl BSA dan 30 µl H₂O. Selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan gel agarose 2% dan diwarnai dengan ethidium bromida, marker (100 bp), dilihat dengan transluminator kemudian difoto dengan menggunakan foto digital.

Tabel 4.1 *Primer*, kondisi reaksi amplifikasi, enzim restriksi dan DNA kontrol untuk deteksi mutasi genetik gen *Pfdhfr* dan *Pfdhps*

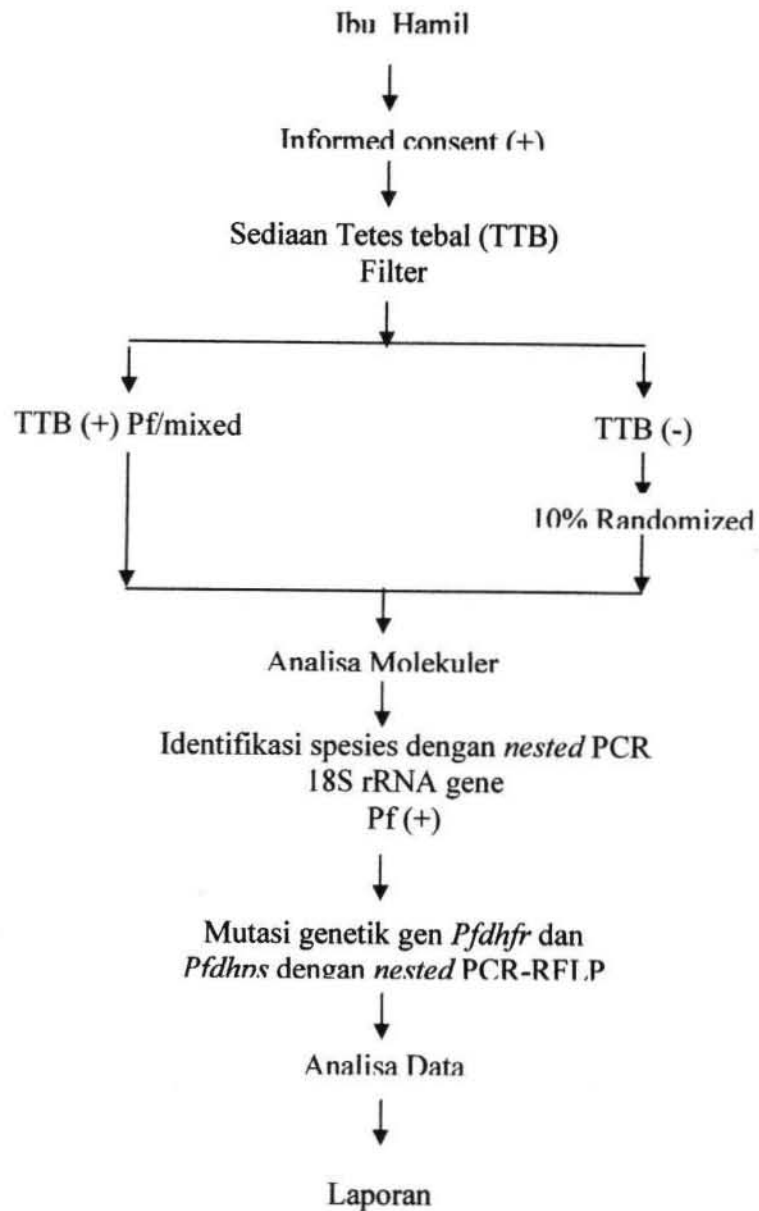
Gen	Kodon	Primer	Panjang fragmen	Kondisi Reaksi	Enzim restriksi	Kontrol DNA
<i>Pfdhfr</i> PCR I		PR1 PR2	720	95°C x 3 menit; 92°C x 30 detik, 45°C x 45 detik; 72°C x 45 detik, x 45 siklus; 72°C x 3 menit		
<i>Nested</i>	108	SRA SRB	700	94°C x 5 menit; 95°C x 30 detik, 52°C x 1 menit; 72°C x 1 menit,	Alu I,	FCR3/

	51	IN1 IN2		x 35 siklus; 72°C x 8 menit. 95°C x 3 menit; 92°C x 30 detik, 45°C x 30 detik; 72°C x 30 detik, x 30 siklus; 72°C x 3 menit	Bsr I, Scrf I. Tsp509I	3D7 KI
<i>Pfdhps</i> PCR I	437 540 581	SD1 SD2	1330	95°C x 3 menit; 92°C x 30 detik, 50°C x 45 detik; 72°C x 1 menit, x 30 siklus; 72°C x 3 menit.	Ava II Folk I Bst UI	FCR3 3D7 KI
<i>Nested</i>		FSA FSB	1115	95°C x 3 menit; 92°C x 30 detik, 48°C x 30 detik; 72°C x 30 detik, x 30 siklus; 72°C x 3 menit.		

4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis statistik deskriptif

4.9 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian