

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis/Rancangan Penelitian dan Metode Pendekatan

Jenis rancangan penelitian termasuk penelitian deskriptif dengan pendekatan *Cross-Sectional*. Studi *Cross-Sectional* merupakan studi yang melakukan kegiatan observasi dan pengukuran variabel dalam satu kali pengamatan pada suatu saat. Variabel dalam penelitian yang akan dianalisis adalah mekanisme resistensi nyamuk *Ae. aegypti* dari dataran tinggi Provinsi Jawa Tengah terhadap insektisida piretroid yang dideteksi pada gen VGSC kodon 1016.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi sasaran dalam penelitian adalah nyamuk *Ae. aegypti*. Populasi sumber dalam penelitian adalah nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari daerah endemis DBD di dataran tinggi Provinsi Jawa Tengah. Populasi kasus dan kontrol berdasarkan hasil uji resistensi standar WHO setelah *holding* 24 jam, yakni populasi kasus adalah nyamuk *Ae. aegypti* yang resisten/hidup dan populasi kontrol adalah nyamuk *Ae. aegypti* yang *susceptible*/mati.

2. Sampel

a. Pemilihan Sampel

Sampel penelitian merupakan nyamuk yang dikoleksi dari 3 kabupaten/kota di Provinsi Jawa Tengah antara lain Kabupaten Semarang, Kabupaten Pemalang dan Kota Semarang yang diidentifikasi sebagai nyamuk *Ae. aegypti* dengan karakteristik nyamuk berumur 3-5 hari anggota tubuh nyamuk masih lengkap dari kepala hingga kaki. Ciri-ciri nyamuk *Ae. aegypti* diketahui pada punggung terdapat bentuk garis seperti *lyre* dengan dua garis lengkung dan dua garis lurus putih serta pada kaki bagian femur kaki tengah terdapat garis-garis putih memanjang. Sampel kasus dan kontrol dipilih menggunakan teknik *purposive sampling*.

b. Besar Sampel

Berdasarkan tipe uji terdapat dua jenis dalam pembagian jumlah sampel sebagai berikut:

1) Besar Sampel Survai Vektor

Ae. aegypti diperoleh berdasarkan survai larva dalam radius 50 meter (sekitar 10 rumah) dari laporan kasus DBD di dataran tinggi Provinsi Jawa Tengah tahun 2015-2016. Larva yang diperoleh selanjutnya dipelihara hingga menjadi nyamuk dewasa (*rearing*).

2) Besar Sampel *Bioassay*

a) Besar sampel berdasarkan uji resistensi terhadap bahan aktif sipermetrin 0,05% mengacu pada standar WHO yaitu pada setiap daerah dilakukan 1 kali uji. Setiap uji membutuhkan 125 nyamuk karena pengambilan sampel dari 5 lokasi maka jumlah sampel dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$n = 125 \times 5 = 625$$

b) Besar sampel pada uji molekuler tiap lokasi menggunakan 2 sampel nyamuk *Ae. aegypti* resisten/hidup dan 2 sampel nyamuk *Ae. aegypti susceptible*/mati.

C. Variabel dan Definisi Operasional

Variabel bebas dalam penelitian adalah alel 1016G gen VGSC sedangkan variabel terikat adalah status resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap insektisida piretroid (sipermetrin 0,05%) dengan variabel lain yang dianalisis adalah riwayat penggunaan insektisida. Variabel dan definisi operasional tercantum dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran Variabel	Kategori/Satuan	Skala
Alel 1016G gen VGSC	Titik penanda mutasi <i>knockdown resistance</i> pada alel gen VGSC akibat paparan insektisida piretroid sehingga terjadi perubahan asam amino Valin menjadi Glisin yang dideteksi melalui analisis molekuler	0. tidak terdeteksi 1. terdeteksi V/V 2. terdeteksi V/G 3. terdeteksi G/G	Nominal

Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran Variabel	Kategori/Satuan	Skala
<i>aegypti</i> terhadap insektisida piretroid	dengan menggunakan <i>impregnated paper</i> mengandung bahan aktif sipermetrin 0,05%	1. Resisten 2. Toleran 3. Rentan	
Riwayat penggunaan insektisida	Analisis penggunaan insektisida <i>fogging</i> maupun rumah tangga di sekitar tempat tinggal daerah endemis DBD hasil dari wawancara dan survai serta Puskesmas/ Dinas Kesehatan	Resistensi individu 0. <i>Susceptible</i> 1. Resisten 0. Tidak 1. Ya	Nominal
Daerah asal habitat	Wilayah kelurahan/desa yang berada di kabupaten/kota daerah endemis DBD yang digunakan sebagai lokasi survai vektor berdasarkan angka insidensi tertinggi kasus DBD menurut Puskesmas	1. Kabupaten Semarang 2. Kabupaten Pemalang 3. Kota Semarang	Nominal
Dataran tinggi	Letak ketinggian suatu objek dari suatu titik tertentu yang diukur dengan menggunakan <i>global positioning system</i> (GPS) untuk menentukan lokasi survai vektor berdasarkan kasus DBD	Meter di atas permukaan laut (mdpl)	Rasio

D. Alur Penelitian

1. Penentuan Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dipilih dengan kriteria kabupaten/kota endemis DBD di dataran tinggi Provinsi Jawa Tengah (IR tertinggi) yaitu Kabupaten Semarang, Kabupaten Pemalang dan Kota Semarang. Tiap kabupaten/kota dipilih Puskesmas dengan IR DBD tertinggi dan tiap Puskesmas diseleksi desa/kelurahan endemis DBD dengan IR tertinggi.

2. Survai Larva *Ae. aegypti*

Sasaran survai adalah tempat penampungan air (TPA) di dalam rumah sekitar kasus DBD yang tercatat di Puskesmas periode tahun 2015-2016. Larva selanjutnya dipelihara hingga menjadi nyamuk berumur 3-5 hari di Laboratorium Entomologi Universitas Muhammadiyah Semarang.

3. Uji resistensi berdasarkan standar WHO

Sebanyak 125 ekor nyamuk *Ae. aegypti* betina berumur 3-5 hari dikontakan satu jam dengan *impregnated paper* berbahan aktif sipermetrin 0,05% melalui metode *susceptibility test* sesuai standar WHO, kemudian dilakukan *holding*

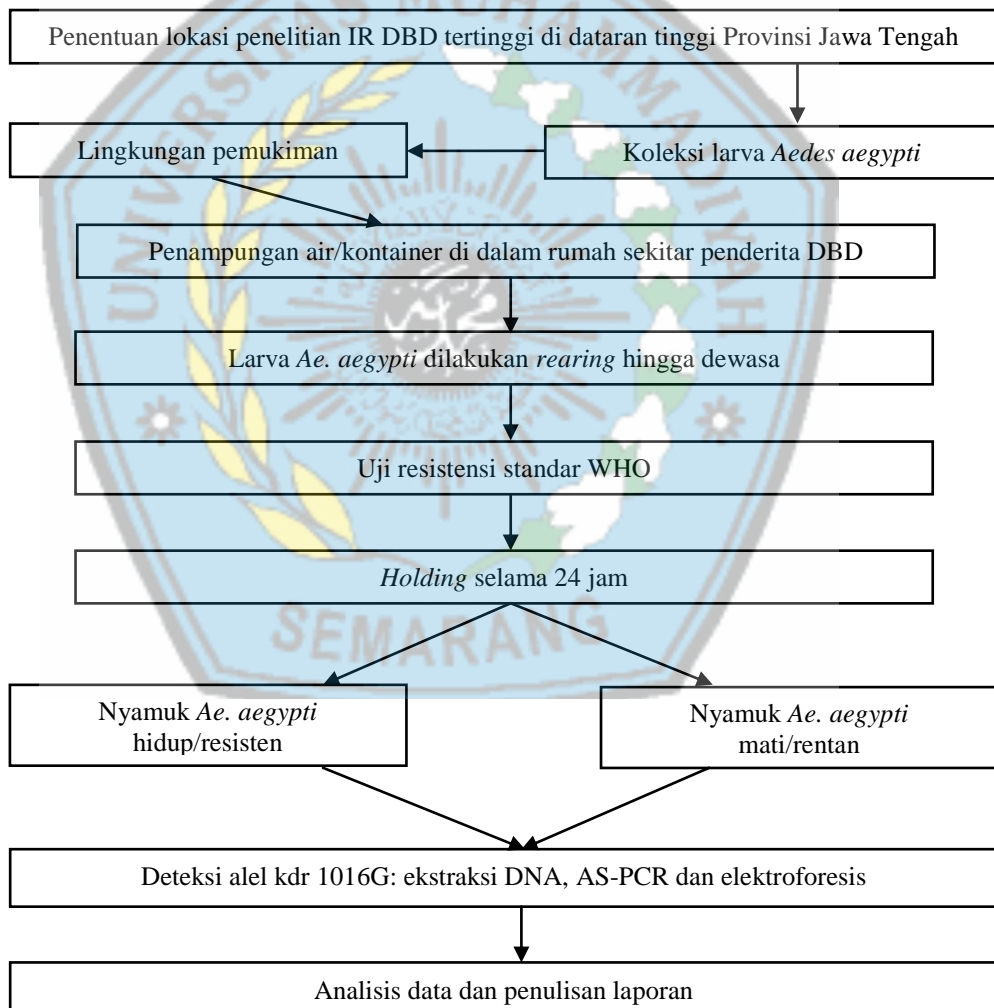
selama 24 jam. Status resistensi populasi ditentukan dengan menghitung mortalitas nyamuk pasca *holding*.

4. Deteksi Alel Kdr 1016G

Proses deteksi alel kdr 1016G dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang dengan tahap-tahap ekstraksi DNA, AS-PCR dan elektroforesis.

5. Analisis Data dan Penulisan Laporan

Data hasil penelitian dianalisis statistik secara deskriptif, kemudian disusun menjadi laporan penelitian pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

E. Metode Pengumpulan Data

1. Jenis Data yang Dikumpulkan

Data sekunder yang dikumpulkan mencakup data endemis DBD tahun 2015-2016 di Provinsi Jawa Tengah dan riwayat penggunaan insektisida sedangkan data primer yang dikumpulkan meliputi larva dan pupa *Ae. aegypti*, nyamuk rentan dan resisten terhadap insektisida piretroid, DNA nyamuk *Ae. aegypti* rentan dan resisten terhadap insektisida piretroid serta distribusi alel kdr 1016G.

2. Pengumpulan Data Sekunder

Data endemis DBD tahun 2015-2016 di Provinsi Jawa Tengah diperoleh dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. Data endemisitas DBD tingkat kecamatan dan kelurahan diperoleh dari Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota (DKK) sedangkan data kasus/penderita DBD terbaru dan penggunaan insektisida diperoleh dari Puskesmas setempat.

3. Pengumpulan Data Primer

Larva *Ae. aegypti* dari tiap lokasi penelitian diperoleh dari survai larva pada tempat penampung air/kontainer di dalam rumah warga. Larva diambil dengan menggunakan aspirator dan ditampung dalam botol plastik secara terpisah menurut tempat penelitian.

- a. Pemeliharaan (*rearing*) larva menjadi nyamuk di Laboratorium Entomologi Universitas Muhammadiyah Semarang. Larva dipelihara dalam nampan (*tray*) plastik berukuran 20-30 cm dan diberi pakan *dog food* hingga menjadi pupa. Stadium pupa berlangsung 2-3 hari. Pupa segera dipindahkan ke dalam gelas plastik yang ditutup dengan kain kasa agar nyamuk muda yang keluar dari pupa tidak lepas. Nyamuk muda diberi makan larutan gula 10% dengan membasahinya pada kapas,
- b. Penentuan status resistensi ditentukan dengan metode *susceptibility test* sesuai standar WHO menggunakan *impregnated paper* berbahan aktif sipermetrin 0,05%. Pelaksanaan uji menggunakan 4 pasang tabung yang di dalamnya telah dilapisi dengan *impregnated paper* dan diberi tanda warna merah sedangkan 1 pasang tabung selanjutnya sebagai tabung kontrol dilapisi dengan kertas bebas insektisida sesuai standar kontrol

pengujian dan diberi tanda warna hijau. Tiap pengujian menggunakan 25 ekor nyamuk *Ae. aegypti* betina (umur 3-5 hari) kenyang darah. Nyamuk selanjutnya dikontakkan dengan insektisida selama 60 menit dan jumlah nyamuk yang jatuh pingsan (*knockdown*) dilakukan penghitungan setiap lima menit. Nyamuk kontrol dimasukkan ke dalam tabung berwarna hijau dan dibiarkan selama 60 menit. Setelah 60 menit seluruh nyamuk yang diuji selanjutnya dipindahkan ke dalam gelas *holding* dan dilakukan penghitungan jumlah nyamuk yang mati setelah 24 jam kemudian. Selama *holding* suhu udara tetap dijaga berkisar $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dan kelembapan $75 \pm 10\%$ ⁽⁷⁴⁾. Kriteria kerentanan nyamuk terhadap insektisida di suatu wilayah berdasarkan standar WHO adalah rentan (kematian nyamuk antara 98-100%), toleran (kematian nyamuk antara 80-98%), resisten (kematian nyamuk $< 80\%$) ⁽⁷⁵⁾. Jika terjadi kematian pada nyamuk kontrol 5-20% dapat dikoreksi dengan menggunakan rumus Abbott ⁽⁷⁴⁾. Nyamuk yang hidup setelah periode *holding* dikelompokkan sebagai populasi resisten dan yang mati sebagai populasi rentan.

4. Identifikasi PNT V1016G
 - a. Sampel terdiri dari 2 kelompok nyamuk yaitu nyamuk resisten (kode R) dan rentan/*susceptible* (kode S),
 - b. Pemisahan (*dissecting*) bagian tubuh nyamuk antara toraks dan abdomen dengan kaki, sayap dan kepala. Abdomen dan toraks *Ae. aegypti* diambil secara individual dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml untuk ekstraksi DNA, sedangkan kaki, sayap dan kepala disimpan,
 - c. Ekstraksi DNA Genom dengan Metode *Chelex 100*
 - 1) Abdomen dan toraks nyamuk *Ae. aegypti* ditambahkan dengan 100 μl ddH₂O dan dihancurkan (*grinding*) menggunakan palu (*pestle*) teflon hingga menjadi homogenat,
 - 2) Sebanyak 1 mL saponin 0,5% ditambahkan ke dalam homogenat dan disimpan dalam suhu 4°C semalam,

- 3) Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan kemudian cairan (*supernatant*) dibuang dengan hati-hati sampai habis, hanya disisakan endapan homogenat,
- 4) Sebanyak 1 ml larutan PBS 1X ditambahkan ke dalam tabung endapan homogenat dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Seluruh *supernatant* kemudian dibuang secara hati-hati dan disisakan endapan,
- 5) Sebanyak 100 µl ddH₂O dan 50 µl *Chelex* (20% *Chelex* dalam PBS 1X) ditambahkan ke dalam tabung endapan homogenat,
- 6) Campuran dididihkan selama 10 menit dan dihomogenkan (*vortex*) tiap 5 menit,
- 7) Campuran disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit,
- 8) Cairan (*supernatant*) DNA genom dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml yang bersih dan selanjutnya disimpan pada suhu -20°C.

d. Amplifikasi AS-PCR

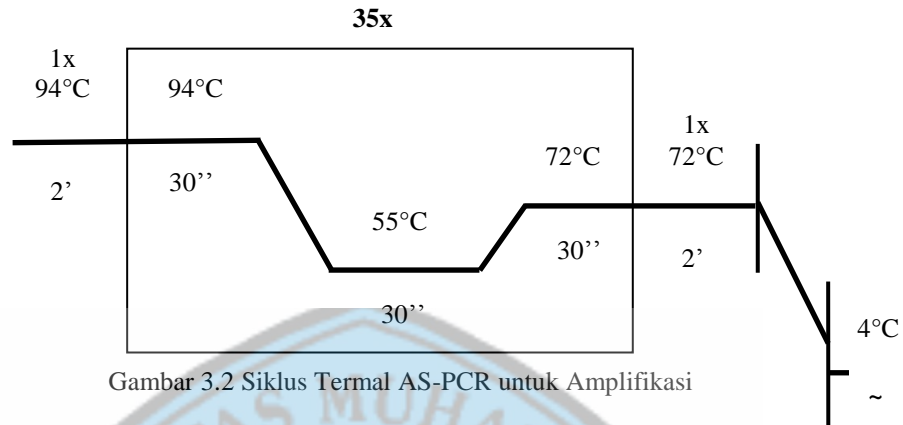
Setiap reaksi amplifikasi dilakukan dalam volume 25 µl yang terdiri dari 1,5 mM MgCl₂, PCR buffer 1X, 0,25 µM *forward primer*, 0,125 µM masing-masing untuk *reverse primer* Gly atau Val, 200 µM campuran dNTP, 0,2 unit Taq polimerase dan 25 ng DNA genom. Produk amplifikasi AS-PCR yang dihasilkan berukuran 60 bp untuk Val dan 80 bp untuk Gly.

Tabel 3.2 Urutan Basa *Forward Primer* dan *Reverse Primer* ⁽⁴³⁾

<i>Forward Primer</i>	5'-ACCGACAAATTGTTTCCC-3'
<i>Reverse Primer</i> (Gly)	5'-GCGGGCAGGGCGGGGGCGGGG CAGCAAGGCTAAGAAAAGGTTAACTC-3'
<i>Reverse Primer</i> (Val)	5'-GCGGGCAGCAAGGCTAAGAAAAGGTTAATTA-3'

Kondisi siklus termal AS-PCR dimulai dengan pra-denaturasi DNA *template* selama dua menit pada suhu 94°C, diikuti 35 siklus selama 30 detik pada suhu 94°C (denaturasi), 30 detik pada suhu 55°C (*annealing*) dan 30

detik pada suhu 72°C (ekstensi), kemudian diikuti dengan dua menit pada 72°C untuk perpanjangan akhir.



Gambar 3.2 Siklus Termal AS-PCR untuk Amplifikasi

e. Elektroforesis

1) Pembuatan Gel Agarosa

Konsentrasi agarosa dalam gel ditentukan berdasarkan panjang basa amplifikasi hasil AS-PCR yakni 2%. Dua gram agarosa dilarutkan dalam 100 ml larutan TAE 1X. Larutan dipanaskan dalam oven selama 90 detik, lalu ditambahkan 5,33 µl Etidium bromida (EtBr) dan dipanaskan kembali selama 30 detik. Larutan selanjutnya dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir sesuai kebutuhan. Larutan agarosa dibiarkan selama 50 menit agar menjadi padat dan kemudian sisir dicabut sehingga menghasilkan sumuran kecil (*well*).

2) Pengisian *Well*

Gel agarosa dipasang dalam tangki elektroda (mesin elektroforesis). Sebanyak 5 µl produk PCR dimasukkan ke dalam *well*. Lubang pertama diisi cairan *marker* (DNA *ladder*) lalu diikuti produk PCR dari sampel-sampel kontrol negatif dan atau positif.

3) *Running*

Setelah produk PCR dan marker dimasukkan ke dalam *well*, tangki elektroda ditutup dan mesin dinyalakan. Tegangan listrik diatur sesuai kecepatan yang diinginkan, 100 volt selama 50 menit. Tegangan listrik kemudian diturunkan hingga nol dan mesin dimatikan bila gerakan

sampel produk PCR telah mencapai garis batas (mendekati 1 cm dari tepi gel agarosa).

4) *Imaging*

Gel agarose diambil dari kotak elektroda dan difoto dalam mesin foto dengan bantuan perangkat lunak *Quantity One*. Proses PCR apabila berhasil dengan baik maka amplikon muncul dalam gambar berupa pita-pita cahaya seperti pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Hasil gel elektroforesis penelitian alel kdr *Ae. aegypti* di Thailand⁽⁴³⁾, masing-masing dari tiga genotip menunjukkan dari kiri ke kanan antara lain *wild-type* homozigot (V/V), mutan heterozigot (V/G) dan mutan homozigot (G/G). Lajur sebelah kiri merupakan DNA *ladder* (L)

f. Menghitung Frekuensi Alel

Rumus:

$$\text{Frekuensi alel X} = \frac{\sum \text{alel X}}{\sum \text{total alel dalam populasi}} \times 100\%$$

F. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Data Uji Kerentanan

a. Status Resistensi

1) Status resistensi populasi berdasarkan hasil uji resistensi standar WHO yang terdiri dari 3 kategori sebagai berikut:

Kode 1 = resisten, bila mortalitas nyamuk uji kurang dari 80 persen

Kode 2 = toleran, bila mortalitas nyamuk uji antara 80-98 persen

Kode 3 = rentan, bila mortalitas nyamuk uji 98 persen atau lebih

2) Status resistensi individu berdasarkan uji resistensi dan *holding* selama 24 jam yang terdiri dari 2 kategori sebagai berikut:

Kode 0 = rentan (mati)

Kode 1 = resisten (hidup)

Status resistensi populasi untuk mendeskripsikan kondisi populasi nyamuk yang berasal dari lingkungan pemukiman, sedangkan status resistensi individu untuk analisis molekuler.

b. Rasio Resistensi

Data diperoleh dari analisis probit dengan membandingkan logaritma *knockdown time* (KDT) 50% dan 95%. KDT menggambarkan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai nyamuk pingsan. Rasio resistensi terdiri dari 4 kategori sebagai berikut:

Kode 1 = rendah (RR kurang dari 5)

Kode 2 = sedang (RR 5-10)

Kode 3 = tinggi (RR lebih dari 10)

Kode 4 = sangat tinggi (RR lebih dari 50)

2. Data Analisis Molekuler

Analisis data molekuler pada kodon 1016 gen VGSC terdiri dari 2 kategori sebagai berikut:

Kode 0 = tidak terdeteksi

Kode 1 = terdeteksi V/V (*wild-type*)

Kode 2 = terdeteksi V/G (mutan heterozigot)

Kode 3 = terdeteksi G/G (mutan homozigot)

3. Daerah Asal Habitat

Kode 1 = Kabupaten Semarang

Kode 2 = Kabupaten Pemalang

Kode 3 = Kota Semarang

G. Jadwal Penelitian

Tabel 3.3 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Pengajuan judul proposal	■									
Penyusunan proposal		■								
Bimbingan proposal			■							
Penyerahan proposal				■						
Seminar proposal (BabI-BabIII)					■					
Revisi proposal						■				
Persiapan alat dan bahan							■			
Pengambilan sampel								■		
Penelitian dan pengamatan									■	
Analisis data										■
Penyusunan skripsi										■
Penyerahan skripsi										■
Sidang skripsi										■
Revisi skripsi										■

Keterangan: I=April 2016; II=Mei 2016; III=Juni 2016; IV=Juli 2016; V=Agustus 2016; VI=September 2016; VII=Oktober 2016; VIII=November 2016; IX=Desember 2016; X=Januari 2017