

BAB 3

METODE PENELITIAN

1.1 Ruang Lingkup Penelitian

3.1.1 Lingkup Tempat

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium terpadu Universitas Diponegoro

3.1.2 Lingkup Waktu

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari - Juni 2016

3.1.3 Lingkup Ilmu

Penelitian ini mencakup bidang Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Kedokteran Biomolekuler.

3.2 Rancangan Penelitian

Berdasarkan tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini, maka jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian observasional dengan rancangan *cross sectional*. Menggunakan 4 (empat) kelompok perlakuan dan 1 (satu) kontrol negatif, dengan 11 (sebelas) sampel tiap kelompok perlakuan, dan 1 (satu) sampel kelompok kontrol negatif.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Jumlah usapan mukosa bukal

3.3.2 Variabel tergantung

Kuantitas DNA

3.4 Definisi Operasional variable

No	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Skala	Nilai
1.	Jumlah Usapan	Jumlah usapan adalah berapa kali usapan yang mengenai mukosa dalam pipi kanan individu dilakukan secara menyeluruh oleh peneliti menggunakan <i>cytoswab</i> .	Numerik	jumlah swab yang digunakan adalah 5x, 10x, 20x, dan 30x.
2.	Kuantitas DNA	Jumlah DNA yang diukur dari hasil ekstraksi menggunakan metode <i>nano drop</i> .	Numerik	Nanogram (ng)

Tabel 4: Definisi Operasional

3.5 Populasi dan Sampel

3.5.1 Populasi Penelitian

a. Populasi Target

Buccal swab dengan jumlah usapan yang berbeda yang dilakukan pada Laki- laki yang telah memenuhi kriteria

b. Populasi Terjangkau

Buccal swab dengan Jumlah usapan yang berbeda yang dilakukan pada Mahasiswa laki-laki Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro angkatan 2013 yang telah memenuhi kriteria

3.5.2 Sampel penelitian

3.5.2.1 Kriteria Inklusi

Buccal swab dengan jumlah usapan 5x, 10x, 20x dan 30x yang dilakukan pada Mahasiswa laki-laki Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro angkatan 2013 yang tidak merokok tidak minum alkohol, tidak mempunyai riwayat diabetes, anemia dan radioterapi di sekitar mulut.

3.5.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Menolak untuk mengikuti seluruh proses pengusapan dari 5x 10x 20x dan 30x
2. Mengalami penyakit pada mukosa mulut yang dapat mempengaruhi kuantitas DNA di tengah rangkaian penelitian
3. Mengalami perlukaan pada mukosa bukal akibat pengusapan

3.5.3 Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan rumus besar sampel untuk analitis numerik tidak berpasangan.

$$\frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{(x_1 - x_2)^2}$$

$$(x_1 - x_2)^2$$

Keterangan :

α = kesalahan tipe 1

β = kesalahan tipe 2

S = variasi data variabel yang diteliti

$X_1 - X_2$ = perbedaan rerata yang dianggap bermakna

Nilai α , β , dan $X_1 - X_2$ ditetapkan oleh peneliti sesuai dengan kebutuhan penelitian, sedangkan nilai S didapatkan dari kepustakaan.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sampel} &= \frac{2 (2,236 + 1,96)^2 1,4^2}{(2,5)^2} \\ &= 11 = 11 \text{ sampel tiap kelompok perlakuan} \end{aligned}$$

Total sampel = 44

3.5.4 Cara Pegambilan Sampel

Metode pengambilan sampel adalah dengan menggunakan *purposive random sampling* berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sampai didapat jumlah sampel yang dibutuhkan.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat dan bahan untuk pengambilan swab

1. Cytoswab



Gambar 12 : Cytoswab

2. Masker

3. *Handsocon*

4. Air Mineral

3.6.2 Alat dan bahan untuk ekstraksi

1. Waterbath

2. vortex

3. Sentrifuse

4. tabung *mikrocentrifuge*

5. Larutan Chelex 10%

6. Mikropipet

7. ddH₂O

8. Saponin

3.6.3 Alat dan bahan untuk kuantifikasi

1. *Nanodrop spectrophotometer*

2. Micropipet

3. *Deionized water*

4. Kain steril

3.7 Alur penelitian

Sejumlah subjek akan diambil *buccal swab* dengan menggunakan *cytoswab* oleh peneliti pada pipi sebelah kanan, sebelum dilakukan swab subjek diinstruksikan untuk tidak mengkonsumsi makanan apapun selama 2 jam dan berkumur dengan air mineral. Pada minggu pertama akan diambil sampel dengan 5x usapan pada tiap subjek, lalu pada minggu kedua akan dilakukan pengambilan sampel dengan 10x usapan,

pada minggu yang ketiga akan diambil sampel dengan 20x usapan dan pada minggu ke 4 akan diambil sampel dengan 30x usapan .

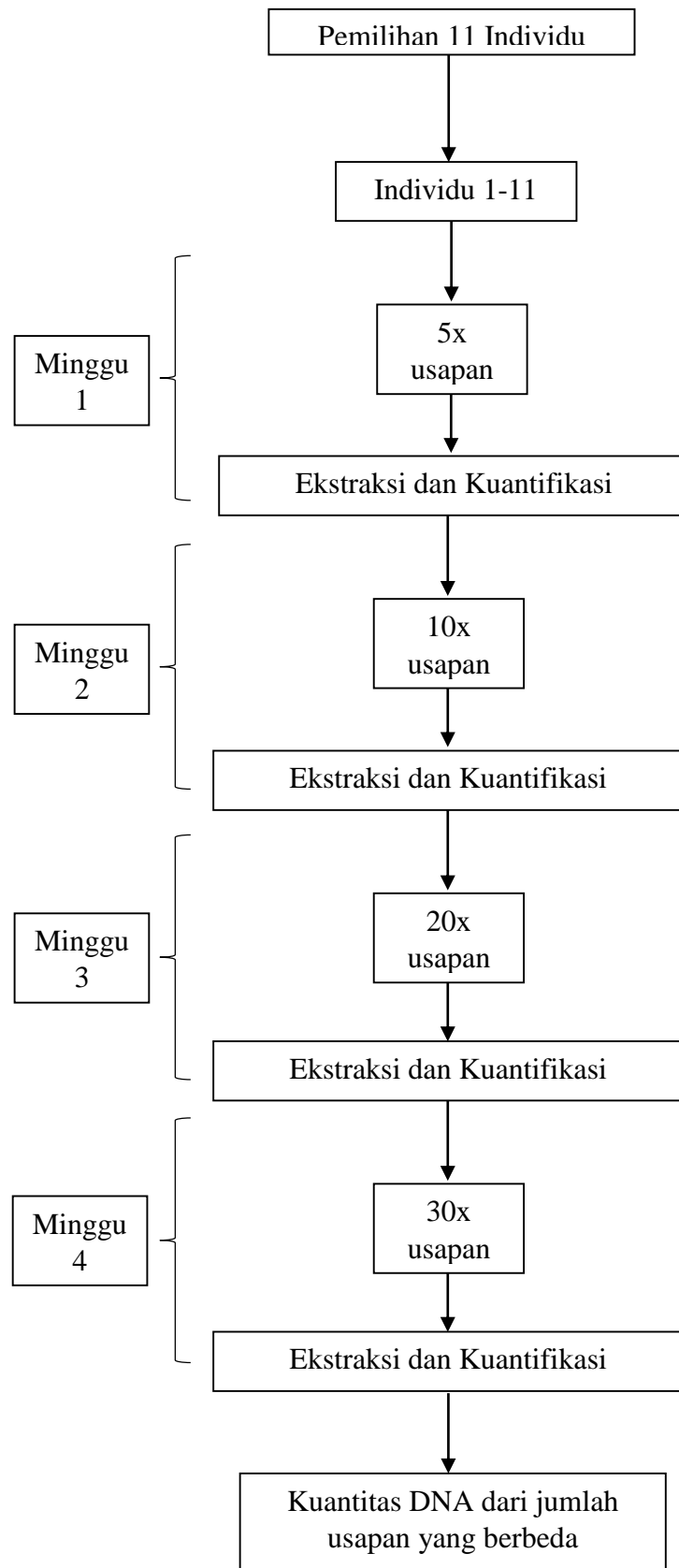
Akan disertakan juga kontrol negatif yaitu pemeriksaan DNA pada alat swab yang tidak digunakan untuk melakukan pengusapan pada subjek.

Setelah dilakukan usapan *cytoswab* diberi label dan dikeringkan pada suhu ruangan dengan tidak terkena sinar matahari langsung lalu dikirim ke Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro untuk dilakukan ekstraksi menggunakan metode chelex dengan langkah-langkah sebagai berikut²³:

1. Cytoswab dipotong menggunakan *cutter* steril ($\pm 0,2$ mm)
2. Ditambahkan 100 μ l ddH₂O dan 1000 μ l 0.05% Saponin
3. Sampel disentrifuse 12000 rpm 10 menit 4 derajat
4. Supernatant dibuang tambahkan 1000 μ l ddH₂O
5. Sampel + ddH₂O disentrifuse 12000 rpm 10 menit 4 derajat.
6. Supernatant dibuang, tambahkan 100 μ l ddH₂O dan 50 μ l Chelex
7. Sampel dan Chelex 10 % diinkubasi pada suhu 95 °C selama 20 menit.
8. Sampel dan Chelex 10 % divortex kembali selama 10 – 15 menit.
9. Sampel dan Chelex 10 % disentrifuge menggunakan *microcentrifuge* dengan kecepatan tinggi.
10. Supernatan yang mengandung genom DNA diambil dan dipindahkan ke *microtube* yang baru, sampel siap dianalisa.

Setelah didapatkan hasil ekstraksi dilakukan kuantifikasi dengan nanodrop spectrophotometer dengan langkah-langkah²³ :

1. Permukaan *nanodrop* dibersihkan dengan meneteskan 1-2 μ *deionized water* pada permukaan optik bawah lalu ditutup kemudian di keringkan menggunakan kain steril.
2. Program *nanodrop* dibuka dan dipilih model asam nukleat.
3. *Spectrophotometer* dimulai dengan diteteskan 1 μ air bersih ke permukaan optik bawah lalu ditutup dan dipilih “*initialize*” pada program *nanodrop* setelah 10 detik permukaan optik dibersihkan kembali menggunakan kain steril.
4. Pengukuran blanko menggunakan *deionized water* sebanyak 1 μ dan memilih “*blank*” pada program *nanodrop* lalu dibersihkan kembali menggunakan kain steril.
5. Sampel hasil ekstraksi diteteskan ke permukaan optik sebanyak 1 μ lalu dipilih “*measure*” pada program *nanodrop* dan dibersihkan kembali menggunakan kain steril.



Gambar 13 : Alur Penelitian

3.8 Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data primer diolah dengan program komputer SPSS 16.00 dan diuji normalitas dengan Saphiro Wilk karena besar sampel kurang dari 50. Setelah didapatkan distribusi data normal dan variasi data yang sama, uji hipotesis yang digunakan adalah uji parametrik One Way Anova karena data yang diuji adalah data numeric dan lebih dari 2 kelompok, jika data tidak mempunyai distribusi yang normal atau variasi yang homogeny maka akan digunakan uji Kruskal-wallis.²⁴

3.9 Etika Penelitian

Etika penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran UNDIP / RSUP Dr. Kariadi Semarang.

