

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. METODE DAN JENIS PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan design *cross-sectional* yang bertujuan untuk menganalisis dan membuktikan bahwa adanya transmisi patogen dari ternak yang mempengaruhi *gut microbiome* pada orang yang tinggal dekat dengan ternak.

#### **B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN**

Pengambilan sampel penelitian dilakukan di daerah peternakan Kecamatan Mlati Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Pemeriksaan laboratorium untuk spesimen feses dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Analisis *gut microbiome* dengan menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS). Jangka waktu penelitian adalah 15 bulan meliputi: tahap persiapan alat dan bahan, pengajuan ijin penelitian dan *Ethical Clearance*, pengambilan data di lapangan, pengambilan data di laboratorium, analisis data, dan penulisan disertasi (Lampiran 1).

#### **C. SUBJEK PENELITIAN**

Subyek pada penelitian ini menggunakan total sampel yaitu seluruh peternak yang tinggal dekat dengan ternak di Kecamatan Mlati, Sleman, DIY sejumlah 50 orang. Untuk jumlah sampel hewan yang diperlukan, mengikuti jumlah hewan yang dimiliki oleh subyek penelitian.

##### **1. Kriteria inklusi dan eksklusi**

###### **a. Kriteria inklusi:**

- 1) Kriteria kelompok orang yang tinggal dekat dengan ternak (HCA):
  - a) Orang yang setiap hari kontak langsung dengan ternak
  - b) Tempat tinggal pada jarak  $\leq 200$  meter dari kandang
- 2) Kriteria kelompok tinggal jauh dengan ternak (HNC) adalah:
  - a) Tempat tinggal di Kecamatan Mlati
  - b) Tidak ada riwayat memelihara dan kontak langsung dengan ternak

*commit to user*

- b. **Kriteria eksklusi:** tidak menandatangani *Informed consent* dan tidak menyerahkan sampel feses.

Data yang dikumpulkan berupa data karakteristik subyek yang meliputi usia, jenis kelamin, pendidikan, berat badan, tinggi badan, data pemeriksaan analisis *gut microbiome* (Lampiran 2). Metode yang digunakan dengan menggunakan wawancara dan pengisian koesioner. Data tinggi badan diukur menggunakan *microtoise* dengan tingkat ketelitian 0,1 cm, sedangkan berat badan menggunakan timbangan badan digital.

## 2. Besar Sampel

Analisis *gut microbiome* dilakukan pada 10 orang yang tinggal dekat dengan hewan ternak (HCA) dan hewan ternaknya (ANL) yang dipilih berdasarkan hasil randomisasi dari total 39 orang yang tinggal dekat dengan hewan ternak. Randomisasi yang digunakan adalah dengan cara mengundi. Sedangkan total kelompok orang yang jauh dari hewan ternak (HNC) adalah 10 orang (Tabel 4.1). Berikut merupakan tabel pembagian kelompok yang digunakan:

Tabel 4.1 Tabel pembagian kelompok

Nama Sampel	Kelompok	Nama Sampel	Kelompok	Nama Sampel	Kelompok
A001	HCA (Orang tinggal dekat dengan hewan ternak)	HA001	ANL (Hewan ternak dari kelompok HCA)	B001	HNC (Orang jauh dengan hewan ternak)
A003		HA003		B002	
A005		HA005		B003	
A014		HA014		B004	
A015		HA015		B005	
A023		HA023		B006	
A026		HA026		B007	
A028		HA028		B008	
A031		HA031		B009	
A032		HA032		B010	

## 3. Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah total sampling yaitu semua peternak yang bertempat tinggal dekat dan kontak langsung dengan ternak (sapi maupun kambing), sedangkan sebagai kelompok kontrol atau orang yang jauh dengan ternak merupakan orang tanpa riwayat kontak dengan ternak dan bertempat tinggal di wilayah Kecamatan Mlati, Sleman, Yogyakarta. Kedua

kelompok tersebut telah menandatangani *informed consent*. Pengambilan data karakteristik responden menggunakan metode wawancara dan menggunakan koesioner secara mendalam (lampiran 1).

#### **D. JENIS VARIABEL PENELITIAN**

1. Variabel bebas : Kontak manusia dan ternak (Sapi dan Kambing)
2. Variabel terikat: Keanekaragaman alfa (*alfa diversity*); Keanekaragaman beta (*beta diversity*), dan Infeksi Parasit
3. Variabel luar
  - a. Terkendali:
    - 1) Kontak dekat dengan ternak
    - 2) Tempat tinggal berdekatan dengan kandang ternak
  - b. Tidak terkendali : kontak dengan hewan lain (anjing, kucing, unggas dan rodentia) dan status imun.

#### **E. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL**

##### **1. Variabel bebas**

Tinggal dekat dengan ternak (Sapi atau Kambing). Ternak dibatasi hewan besar yaitu sapi dan kambing yang dimiliki oleh subyek yang diambil sebagai sampel penelitian.

##### **2. Variabel terikat**

- a. Keanekaragaman alfa (*alpha diversity*) merupakan analisis struktur komunitas ekologi yang berkaitan dengan kekayaannya (jumlah kelompok taksonomi), pemerataan (distribusi kelimpahan kelompok), atau keduanya. Analisis keragaman alfa dari data sekuensing ampikon merupakan pendekatan dalam menilai perbedaan antar lingkungan (kelompok). Keanekaragaman alfa meliputi jumlah *Operational Taxonomy Unit* (OTU) (*diversity*), Indeks Simpson (diversitas) dan Indeks Shannon (kemerataan).

Indeks Shannon adalah indeks statistik yang dapat mengasumsikan semua spesies dalam sampel secara random.  $p$  adalah proporsi ( $n / N$ ) individu dari satu individu spesies yang ditemukan ( $n$ ) dibagi dengan jumlah

total individu yang ditemukan (N), di alam log,  $\Sigma$  adalah jumlah kalkulasi, dan s adalah jumlah spesies.

$$\text{Shannon Index (H)} = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

$$\text{Simpson Index (D)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

Indeks Simpson merupakan indeks dominasi karena memberikan bobot lebih umum atau dominan. Indeks Simpson, p adalah proporsi (n / N) individu dari satu individu spesies yang ditemukan (n) dibagi dengan jumlah individu yang ditemukan (N),  $\Sigma$  masih merupakan penjumlahan perhitungan, dan s adalah jumlah spesies (Morgan and Huttenhower, 2012). Untuk memperhitungkan beberapa perbandingan pada setiap tingkat taksonomi, nilai-p ( $P \leq 0.05$ ).

Skala: Ratio

- b. Keanekaragaman beta (*beta-diversity*) merupakan penilaian keragaman antara 2 atau lebih komunitas. *beta-diversity* merupakan jumlah spesies yang sama dibagi komunitas. *beta-diversity* dinilai menggunakan matriks jarak *Jensen-Shannon divergence* (JSD). Untuk melihat profil komunitas bakteri pada sampel yang dibandingkan. *Operational Taxonomy Unit* (OTU) dapat mengidentifikasi filum, kelas, ordo, famili, genera, dan spesies sesuai dengan data referensi. Tes Wilcoxon *signed-rank* untuk menguji perbedaan kelimpahan relatif dalam sampel yang dibandingkan. Untuk memperhitungkan beberapa perbandingan pada setiap tingkat taksonomi, nilai-p ( $P \leq 0.05$ ).

Skala: Ratio

- c. *Phylogenetic analysis gut microbiome* manusia dan hewan: analisis filogenetik molekuler dari *gut microbiome* manusia yang kontak dengan ternak dan tidak serta ternak dinyatakan dalam pohon filogenetik. Filogenetik molekuler adalah penggunaan data molekuler dalam taksonomi dan biogeografi. Filogenetika molekuler dan evolusi molekuler menunjukkan

korelasi satu dengan lainnya. Analisis filogenetik molekuler untuk membuat kesimpulan dan disajikan dalam bentuk konstruksi pohon filogenetik.

d. Identifikasi spesies Parasit

Identifikasi spesies parasit pada orang yang tinggal dekat dengan ternak beserta ternaknya (sapi/kambing) dan orang yang tinggal jauh dengan ternak: sampel feses ternak yang diperiksa dibatasi pada ternak besar yaitu sapi dan kambing yang dimiliki oleh subyek yang diambil sebagai sampel penelitian. Bila subyek penelitian tidak memiliki ternak sesuai kriteria, namun memiliki riwayat kontak dengan ternak, maka sampel feses hewan tersebut juga dipergunakan.

**3. Variabel luar**

a. Variabel terkendali:

- 1) Kontak dekat dengan ternak: riwayat kebiasaan subyek penelitian untuk kontak dengan ternak. Kontak dapat berupa: memberi makan, memegang, memandikan, dan membersihkan kotoran hewan.
- 2) Tempat tinggal berdekatan dengan kandang ternak: tempat tinggal yang ditempati oleh manusia sekaligus ternak dan penggunaan sumber air yang bersamaan.
- 3) Variabel pengganggu (*confounding variable*) yang dapat dikendalikan yaitu transport dan pengawetan spesimen, variabel pengganggu yang tidak dapat dikendalikan yaitu kontak dengan hewan lain (selain sapi dan kambing) dan status imun subyek penelitian.

**F. PELAKSANAAN PENELITIAN**

**1. Ijin Penelitian (Etik Penelitian)**

Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran UNS (lampiran 1). Penelitian ini tidak termasuk prosedur invasif seperti pengumpulan darah atau penggunaan obat-obatan. *Informed consent* tertulis diperoleh dari orang tinggal dekat dengan ternak dan orang yang tinggal jauh dengan ternak untuk mengumpulkan sampel feses dari responden diberitahu bahwa sampel anonim.



## 2. Pengumpulan data

Subyek pada penelitian ini adalah peternak yang tinggal dekat dengan hewan ternak dan orang yang setiap hari kontak langsung dengan ternak di Kecamatan Mlati yang memenuhi kriteria dilakukan wawancara, dan pengumpulan sampel feses (Thumbi *et al.*, 2015). Analisis *gut microbiome* dilakukan pada 10 orang yang tinggal dekat dengan hewan ternak (HCA) dan hewan ternaknya (ANL) dipilih berdasarkan hasil randomisasi dari total 39 orang tinggal dekat dengan hewan ternak. Randomisasi yang digunakan adalah dengan cara mengundi.

## 3. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari, satu minggu setelah wawancara. Sampel feses dari subyek orang dan ternak dikumpulkan menggunakan *fecal collection tube* (Zymo Research). Semua sampel diberi label, disegel, dan diangkut di atas es dari lapangan ke laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai akhir selanjutnya dibekukan pada  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 4. Pemeriksaan Identifikasi bakterial *microbiome* dengan NGS

### a. *Stool concentration*

*Stool concentration* dengan *water ether stool*. Sejumlah 200 $\mu\text{l}$  sampel tinja dicampur dengan 700  $\mu\text{l}$  aquades dalam 1,5 ml kemudian divortex selama 30 detik. Tambahkan 400  $\mu\text{l}$  Diethyl ether lalu vortex dan sentrifus pada 13.000 rpm selama 1 menit. Buang supernatan dan sedimen yang menempel dicuci 3 kali menggunakan aquades dan sisakan sekitar 50  $\mu\text{l}$  cairan pada pencucian yang terakhir kemudian masukkan 100  $\mu\text{l}$  Lysis buffer, vortex selama 10 detik. Sampel feses yang sudah dikonsentrasikan ini kemudian dilakukan pemeriksaan lanjut.

### b. Ekstraksi DNA dan Purifikasi DNA genom

Isolasi DNA dari sampel tinja manusia dan hewan mengacu pada protokol isolasi DNA sampel tinja dari Genecraft. Isolasi tinja DNA dilakukan dengan menggunakan *QIAmp® DNA Stool Mini Kit* no cat: 51504 (Qiagen, German). Prosedur yang digunakan sesuai dengan manual kit (QIAGEN).

- 1) Sampel tinja yang diambil sebanyak 50-100  $\mu$ l kemudian dimasukkan ke dalam tabung dan ditambah dengan 2000  $\mu$ l buffer ASL. Suspensi selanjutnya dihomogenisasi selama 1 menit kemudian ditambahkan lisat sebanyak 500  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l ke dalam tabung 1,5 ml dan diinkubasikan pada suhu 70°C selama 5 menit di dalam *waterbath*.
- 2) Suspensi selanjutnya dihomogenisasi selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml sebanyak 1.000  $\mu$ l dan ditambahkan tablet inhibifex pada masing-masing sampel. Supernatan tersebut dihomogenisasi sampai tablet larut menjadi suspensi dan diinkubasikan pada suhu 70°C selama 1 menit ke dalam *waterbath*. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Suspensi dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.
- 3) Supernatan diambil sebanyak 200  $\mu$ l ke dalam tabung 1,5 ml ditambah dengan 2  $\mu$ l proteinase K dan 200  $\mu$ l buffer AL. Supernatan dihomogenisasi selama 15 detik dan diinkubasikan pada suhu 70°C selama 10 menit dan ditambah 200  $\mu$ l ethanol 96% dan dihomogenisasi sampai larut.
- 4) Lisat dipindahkan ke dalam sistem kolom dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Cairan dalam tabung 1,5 ml dibuang. Tabung koleksi diganti sistem kolom dibuka ditambahkan 500  $\mu$ l buffer AW 1 kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.
- 5) Tabung koleksi diganti dan ditambahkan 500  $\mu$ l buffer AW 2 disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Tabung koleksi 2 ml diganti kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit.
- 6) Sistem kolom diganti dengan tabung mikro 1,5 ml yang baru dan dimasukkan buffer AE ke dalam Qiamp membran dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 1 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Isolat DNA disimpan dalam freezer dengan suhu -20 °C untuk mencegah kerusakan DNA hingga proses selanjutnya. Proses selanjutnya adalah purifikasi DNA menggunakan Kit Purifikasi DNA genome (Promega) sesuai manual kit dari pabrik.

### c. Kuatifikasi DNA

Kuantifikasi DNA digunakan untuk memastikan DNA yang didapatkan dari ekstraksi. Selain itu, kuantifikasi DNA dalam sampel juga penting dalam pemeriksaan PCR. Dalam pemeriksaan DNA tidak diharapkan jumlah DNA yang terlalu kecil atau jumlah DNA yang terlalu banyak. Jumlah DNA yang dikehendaki untuk pemeriksaan DNA adalah antara 0.5 ng – 2.0 ng.

### d. Pemeriksaan Identifikasi *bacterial microbiome* dengan NGS

DNA *genome* diekstraksi menggunakan *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Jerman) sesuai dengan manual dari pabrikan. Primer 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') dan 806R (5' GGACTACNNG GGTATCTAAT-3') digunakan untuk amplifikasi 16S wilayah rRNA V3 – V4. Setiap reaksi adalah 30 µL dan terdiri dari 15 µL Phurs Mix (2er), 1,5 µL dari setiap primer, 10 µL DNA templat, dan 2 µL ddH<sub>2</sub>O. Kondisi siklus adalah sebagai berikut: pra-denaturasi pada 98 ° C selama 1 menit, denaturasi pada 98 ° C selama 10 detik, annealing pada 55 ° C selama 30 detik, dan ekstensi 72 ° C selama 30 detik, 35 siklus, dan final ekstensi pada 72 ° C selama 5 menit. Produk PCR dicampur dengan volume pemuatan 1 × yang sama penyangga (mengandung Gel hijau) dan terdeteksi melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%. Sampel pada pita terang 400 bp dan 450 bp dikeluarkan dan dicampur pada rasio kepadatan yang sama dan dimurnikan menggunakan Kit Ekstraksi Gel Qiagen (Qiagen, Hilden, Jerman). *Library* disintesis menggunakan *TruSeq®DNA PCR-Free Sample Preparation Kit* (Illumina, San Diego, California, USA) dan diukur menggunakan Qubit® 3.0 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). *Library* yang telah dikuantifikasi selanjutnya disekuensing menggunakan Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, California, AS).



---

#### e. Analisis Bioinformatika

---

Analisis data diawali dengan menghapus barcode dan primer sekuen kemudian kontrol kualitas sekuen dianalisis sehingga diperoleh tag efektif (Magoč and Salzberg, 2011; Bokulich *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2011; Edgar *et al.*, 2011; Caporaso *et al.*, 2011). Software yang digunakan untuk mengelompokkan tag efektif dari semua sampel dan kluster sekuen ke dalam *Operational Taxonomy Unit* (OTU) dengan 97% kesamaan adalah software UPARSE (Versi 7.0.1001). Sedangkan software yang digunakan untuk sekuen OTU adalah software Mothur (Versi 1.35.1) dan basis data SSUrRNA SILVA (ambang batas 0.8-1.0) (Quast *et al.*, 2013), sehingga informasi taksonomi dan keanekaragaman bakteri komunitas di setiap sampel di setiap peringkat klasifikasi (*Kingdom, Phylum, Class, Order, Family dan Genus*) dapat diketahui. Software MUSCLE (Versi 3.8.31) digunakan untuk *multi-sequence alignment* dan software QIIME (Versi 1.9.1) digunakan untuk menentukan spesies: *chao1*, *Shannon*, *Simpson*, *ACE*, *goods-coverage*, dan *PD\_whole\_tree indices*. *Rarefaction curve* dan *rank abundance curve* diplot menggunakan software R (Versi 2.15.3).

Berdasarkan kelompok orang yang tinggal dekat dengan ternak (HCA) dan orang yang tinggal jauh dengan ternak (HNC) untuk menganalisis perbedaan antara indeks keanekaragaman  $\alpha$  antar kelompok dan untuk analisis keragaman  $\beta$  menggunakan Software R. *Box plot* secara visual digunakan untuk mencerminkan median, dispersi, maksimum, minimum, dan nilai outlier keanekaragaman spesies antar sampel. Jarak Unifrac dihitung menggunakan Software QIIME, sedangkan pengelompokan sampel menggunakan *Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) *sample clustering*. Analisis LEfSe (LDA skor = 4) menggunakan software LEfSe (Galaxy Versi 1.0). Analisis metastat dilakukan menggunakan Software R, dan nilai *q* dari setiap peringkat klasifikasi *Phylum, Class, Order, Family dan Genus* dapat ditentukan.

---

## 5. Identifikasi Parasit

---

### a. Pemeriksaan Langsung (*Direct smear*)

Pemeriksaan *Direct smear* atau pemeriksaan langsung adalah pemeriksaan yang menggunakan mikroskop. Pemeriksaan ini menggunakan larutan salin dan lugol iodin. Larutan salin digunakan untuk mendeteksi larva dan *trofozoit motile*. Selain itu juga dapat mendeteksi eritrosit, leukosit pada apusan tinja, sedangkan larutan lugol iodin digunakan untuk melihat adanya kista (WHO, 2019). Metode pemeriksaan ini yaitu dengan menyiapkan sampel feses segar, kemudian diletakkan pada *object glass* yang telah ditetesi dengan larutan salin pada bagian kiri, serta lugol iodin pada sebelah kanan. Kemudian sampel diratakan lalu ditutup dengan *deck glass* secara hati-hati agar tidak ada gelembung yang dapat mengganggu pengamatan. Preparat kemudian diamati pada mikroskop dengan perbesaran 10x kemudian 40x (WHO, 2019). Meskipun pemeriksaan feses secara langsung merupakan pemeriksaan yang paling mudah dan murah namun sensitivitas metode ini cukup rendah yaitu sekitar 42.8% (Nikolay *et al.*, 2014).

### b. Pemeriksaan *trichome staining*

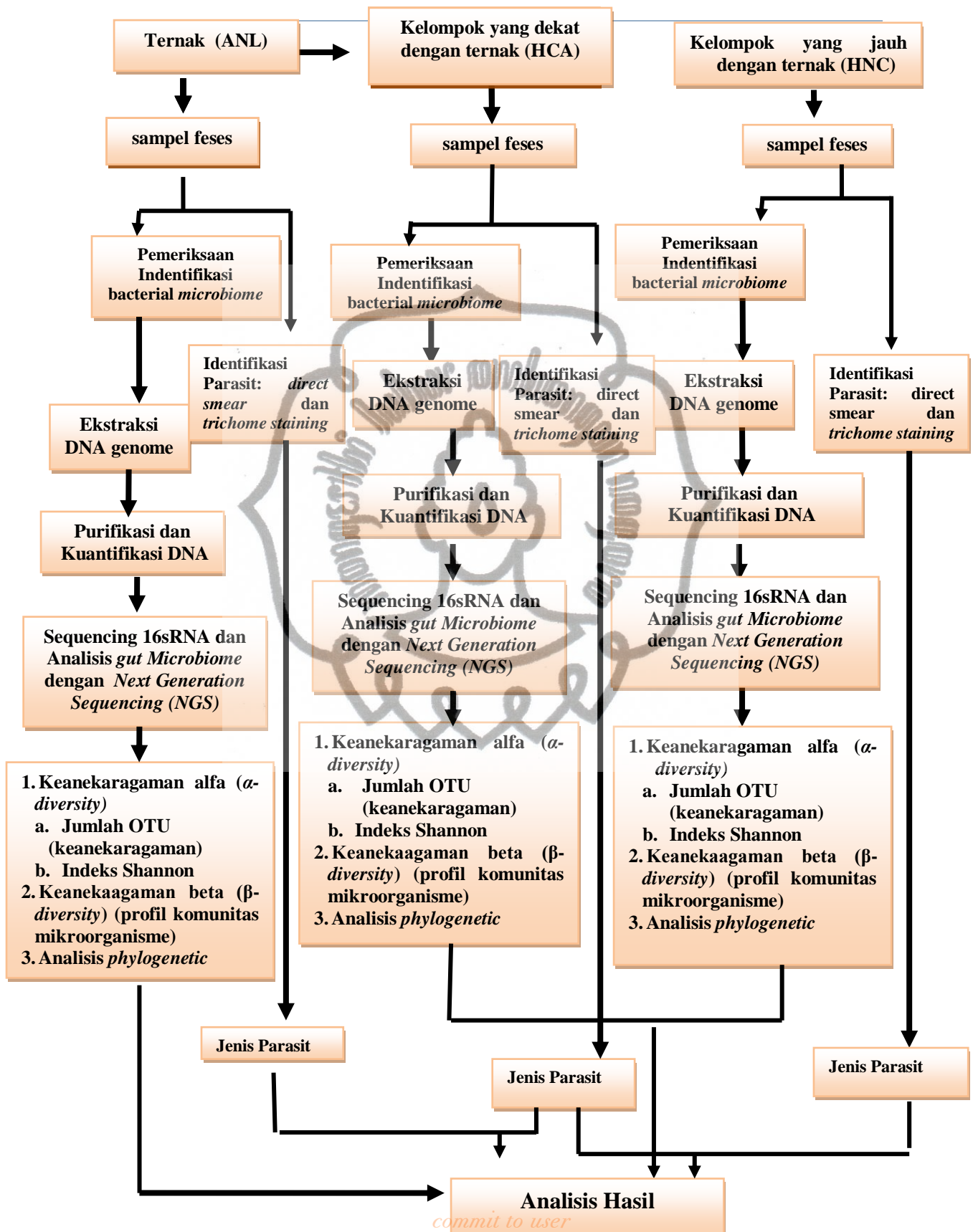
Langkah-langkah pemeriksaan parasit menggunakan metode *trichrome staining*:

- 1) Membersihkan obyek glass. Smear tipis feses diatas obyek glass kemudian dikeringkan pada suhu 35-37<sup>0</sup> C selama 1 jam atau dipanaskan diatas api  $\pm$  60<sup>0</sup> C sekitar 4 menit hingga kering.
- 2) Memasukkan slide kedalam Etanol-Iodine selama 1 menit. Selanjutnya ethanol 70% selama 5 menit dan ethanol 70% selama 3 menit.
- 3) Memasukkan slide pada *Wheatley Trichrome Stain* selama 10 menit. Kemudian slide dimasukkan ke Etanol 90% selama 1-3 detik. Celupkan dalam ethanol 95% beberapa kali. Masukkan slide ke dalam Ethanol 95% selama 3 menit. Dilanjutkan Ethanol 95% pada *chamber* berbeda selama 3 menit.

- 4) Memasukkan slide ke dalam Xylene S selama 5-10 menit. Kemudian tutup dengan *cover slip* dan biarkan mengering selama semalaman pada suhu kamar atau selama 1 jam di 35-37°C. Selanjutnya periksa slide mikroskopis menggunakan minyak imersi.
- 



## G. ALUR PENELITIAN



Gambar 4.1. Alur Penelitian

## PENJELASAN ALUR PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari 3 kelompok yaitu kelompok orang tinggal dekat dengan ternak (HCA), ternak (ANL) dan kelompok orang yang tinggal jauh dengan ternak (HNC). Setelah menandatangani *Informed consent* dan wawancara setiap kelompok diambil sampel feses kemudian dilanjutkan dengan identifikasi potensi infeksi parasit dengan metode *direct smear* dan *trichome staining* dan dilakukan ekstraksi genome purifikasi dan kuantifikasi DNA. Setelah dilakukan identifikasi potensi parasit selanjutnya dianalisis dan dibandingkan jenis spesies parasit yang ditemukan. Sedangkan ekstraksi genome purifikasi dan kuantifikasi DNA ini digunakan untuk indentifikasi *bacterial microbiome*.

Sampel DNA yang telah diperoleh dan memenuhi kriteria untuk dilanjutkan sekuensing menggunakan metode *Next Generation Sequencing* (NGS) dengan target gen 16sRNA region V1-V3 dan analisis *gut microbiome*. Setelah dilakukan sekuensing menggunakan metode NGS, selanjutnya dilakukan analisis bioinformatika yang meliputi:

1. Keanekaragaman alfa ( $\alpha$ -diversity): Jumlah OTU (keanekaragaman), Indeks Shannon dan Indeks Simpson
2. Keanekaagaman beta ( $\beta$ -diversity) (profil komunitas mikroorganisme)
3. Analisis *phylogenetic*

Setelah dilakukan analisis bioinformatika kemudian dilakukan analisis hasil.



## H. JADWAL PENELITIAN

**Tabel 4.2. Jadwal Penelitian mulai bulan Juni 2019-September 2020**

No	Rincian Kegiatan	Bulan ke-														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Penyusunan proposal															
2	Ujian Seminar Proposal															
3	Pengurusan Ijin Penelitian dan <i>Ethical Clearance</i>															
4	Survei lokasi penelitian															
5	Pengambilan sampel di lapangan															
6	Identifikasi Parasit (Isolasi DNA, Purifikasi dan PCR)															
7	Analisis <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)															
8	Sequensing dan analisis data Indentifikasi Parasit															
9	Analisis hasil NGS															
10	Penulisan hasil dan Pembahasan															
11	Penulisan Publikasi															
12	Seminar Hasil															