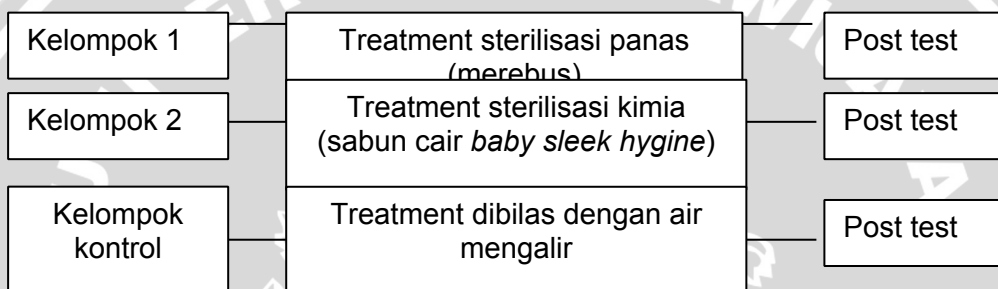


BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rencana Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *True experimental with control group design* dengan pendekatan *post test only*. Penelitian kuantitatif bertujuan untuk menjelaskan ada tidaknya hubungan antar variabel yang diteliti (Putra, 2013). Adapun desain penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 4.1 Desain Penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua peralatan yang digunakan dalam penyajian susu pada anak. Peralatan penyajian susu yang dijadikan sampel dalam penelitian ini adalah botol susu yang digunakan oleh para ibu dalam memberikan susu pada anak mereka. Jumlah sampel yang digunakan dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Federer, 1963 dalam Irwan, 2011)

$$\text{Rumus} \quad : (n - 1) (k - 1) \geq 15$$

Keterangan :

n = jumlah sample (mewakili pengulangan perlakuan pada kelompok sample)

k = jumlah kelompok perlakuan (kelompok perlakuan yang diberikan sebanyak 3)

sehingga didapatkan hasil :

$$(n - 1) (k - 1) \geq 15$$



$$(n - 1) (3 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (2) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 9$$

Jadi jumlah sampel yang diperlukan sebanyak 9 pada masing- masing kelompok perlakuan dengan metode pengambilan *simple random sampling*.

a. Kriteria inklusi

- Botol susu baru
- Botol susu dengan material *Polypropylene* (PP)
- Botol susu 120 ml
- Susu sapi dengan kandungan laktosa

b. Kriteria eksklusi

- Botol susu yang sudah pernah digunakan sebelumnya.
- Botol susu dengan material tidak tahan panas

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel independen / bebas (X)

Variabel independen dalam penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *E. coli*

4.3.2 Variabel dependen / terikat (Y)

(Y₁) : metode sterilisasi panas dengan sistem panas (merebus)

(Y₂) : metode sterilisasi kimia(sabun cair) dengan *sleek baby hygine*

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 tempat penelitian

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.4.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 minggu, mulai dari tanggal 1 Januari 2014 sampai 30 Januari 2014.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat dan Bahan Persiapan Botol Susu

Alat dan bahan untuk persiapan botol susu yang akan digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

1. Botol susu
2. Susu formula
3. Pipet
4. *E. coli*
5. Media *Nutrien broth*

4.5.2 Alat dan Bahan Proses Sterilisasi

Alat dan bahan proses sterilisasi menggunakan metode panas (merebus) adalah sebagai berikut :

1. Panci perebusan
2. Air
3. Kompor pemanas

Alat dan bahan proses sterilisasi dengan menggunakan metode kimia (sabun) adalah sebagai berikut :

1. Cairan kimia (sabun cair *sleek baby hygiene*)
2. Air
3. Wadah perendaman tertutup

4.5.3 Alat dan Bahan Pengambilan Sampel

Alat dan bahan dalam pengambilan sampel usap pada botol susu adalah sebagai berikut : (Adhiyah F, 2014)

- Botol susu sample
- Botol semprot
- Rak tabung reaksi
- Tabung reaksi
- *Cotton bud* / lidi kapas
- Korek api
- Tisu / kapas
- Gunting
- Formulir pemeriksaan laboratorium
- Alkohol 70%
- Aquades 100ml
- Label
- Spidol

4.5.4 Alat dan Bahan Uji Cemaran *E. coli* dengan metode TPC

Alat dan bahan dalam uji jumlah cemaran *E. coli* (TPC) adalah sebagai berikut: (Adhiyah F, 2014)

- Pipet 1 ml
- Cawan petri
- Spidol
- Media MacConkey agar
- Inkubator
- Tabung reaksi
- Aquades

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional

variabel	Definisi operasional	Cara pengukuran	Hasil pengukuran	Skala data
Botol susu	Botol susu yang digunakan dalam penelitian adalah botol susu yang memenuhi kriteria inklusi yaitu : botol susu baru 120 ml dengan material <i>Polypropylene</i> (PP). Serta penggunaan susu yang berlaktosa	Dengan cara observasi secara langsung pada saat penelitian.	Botol susu yang digunakan sesuai dengan kriteria inklusi.	Nominal
<i>E. coli</i> (<i>Eschericia coli</i>)	Bakteri oportunistik yang ada pada permukaan botol susu dan merupakan indikator mikrobiologi yang dinilai melalui uji laboratorium <i>E. coli</i>	Menggunakan metode usap dan kemudian dilakukan pemeriksaan cemaran <i>E. coli</i> dengan menggunakan TPC (<i>Total Plate Count</i>).	Dari suspensi 100 ml <i>Tryptic Soy Broth</i> didapatkan jumlah <i>E. coli</i> 10^6 sampai 10^8 cfu/ml yang diinokulasikan kedalam 2L susu formula. Positif <i>E. coli</i> apabila pada <i>MacConkey Agar</i> ditemukan warna merah, dan pada <i>EMBA</i> ditemukan warna hijau metalik.	Rasio
Metode sterilisasi panas (merebus)	Metode sterilisasi yang menggunakan air untuk merebus hingga mendidih (suhu 100°C) dalam alat panci perebusan tertutup selama 10 menit. Setelah itu didinginkan dalam panci yang sama selama 60 menit dan dilanjutkan dengan	Dengan cara observasi secara langsung pada saat penelitian	Metode sterilisasi panas (merebus) bila sterilisasi dilakukan selama 10 menit dengan menggunakan alat panci perebusan tertutup	Nominal

	mengambilan sampel usap.			
Metode sterilisasi kimia (sabun cair <i>sleek baby hygiene</i>)	Metode sterilisasi dengan menggunakan air yang ditambah cairan kimia (sabun cair <i>sleek baby hygiene</i>) dengan jumlah 1 ml untuk 1 liter air, yang kemudian direndam selama 30 menit dalam wadah tertutup. Setelah itu dibilas dengan air matang dilanjutkan dengan air hangat. Kemudian langsung dilakukan pengambilan sampel usap pada botol susu tanpa pengeringan terlebih dahulu.	Dengan cara observasi secara langsung pada saat penelitian	Sterilisasi kimia bila sterilisasi dilakukan selama 30 menit dengan menggunakan sabun (<i>sleek baby hygiene</i>)	Nominal

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Teknik Persiapan Botol Susu : (Arias *et al.*, 2001; WHO, 2007; Maloy, 2012)

a. Teknik pembuatan suspensi *E. coli* : (Arias *et al.*, 2001)

- Isolat *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari manusia.
- Isolat *E. coli* disimpan pada *Nutrien broth* miring pada suhu -70°C .
- Kultur dipindahkan dengan menggunakan loop inokulum sebanyak 2 kali dengan interval 24 jam kedalam tabung erlenmeyer 250 ml

yang berisi 100 ml *Nutrien broth* pH 7, dan diinkubasi selama 35°C selama 24 jam.

- Maka didapatkan jumlah koloni 10^6 cfu/ml yang dihitung dengan menggunakan spektrofotometri.

b. Teknik pembuatan susu formula : (Arias *et al.*, 2001; WHO, 2007)

- Pembuatan susu dilakukan dengan menambahkan bubuk susu : jumlah air disesuaikan dengan cara pembuatan pada kemasan susu formula.
- Wadah diisi dengan 2 liter air kemudian dicampur dengan jumlah bubuk susu sesuai yang tertera pada kemasan.
- Kemudian dimasukkan 100 ml suspensi *E.coli*.

c. Teknik persiapan sampel botol susu : (Arias *et al.*, 2001; Maloy, 2012)

- Botol susu yang baru dibeli kemudian direbus dengan air selama 5 menit.
- 2100 ml susu dimasukkan ke dalam 27 botol susu, sehingga masing-masing botol diisi dengan 77,7 ml susu, kemudian dibiarkan di dalam suhu ruang selama 24 jam.
- Setelah 24 jam, susu formula didalam botol dibuang kemudian botol susu dicuci dengan menggunakan air bersih yang mengalir selama 1 menit sambil disikat dengan sikat botol, kemudian dikeringkan dengan posisi terbalik di atas tisu kering.

4.7.2 Teknik Sterilisasi Panas (Merebus)

Cara sterilisasi botol susu dengan cara merebus adalah sebagai berikut : (WHO, 2007)

- Pilih panci dengan ukuran yang lebar agar dapat meredam seluruh botol susu secara merata
- Masukkan semua peralatan botol susu dengan memisahkan masing- masing bagiannya dan ditambahkan air
- Tutup panci secara rapat
- Rebus diatas api hingga mendidih selama 10 menit.
- Diamkan hingga dingin dalam panci yang sama selama 60 menit.
- Setelah itu ambil satu per satu botol untuk dilakukan swab

4.7.3 Teknik Sterilisasi Kimia (Sabun Cair *sleek baby hygiene*)

Cara sterilisasi botol susu dengan air dingin adalah sebagai berikut : (Johnson and Taylor, 2001)

- Siapkan wadah yang cukup besar disertai dengan penutup yang rapat
- Campurkan preparat kimia yang berbentuk cair (*sleek baby hygiene*) pada air dingin sesuai dengan indikasi yang tertera pada label kemasan, yaitu 1 ml untuk 1 liter air.
- Tutup wadah dengan rapat dan diamkan atau rendam botol susu selama 30 menit
- Kemudian botol susu dibilas dengan memasukan dalam wadah yang berisi air matang
- Dilanjutkan dengan memindahkan botol susu dari wadah yang berisi air matang kedalam wadah yang berisi air hangat.
- Ambil sampel satu persatu untuk segera di usap

4.7.4 Teknik Pengambilan Sample Usap pada Botol Susu

Cara pengambilan sampel teknik usap adalah sebagai berikut :

- a. Semprotkan alkohol 70% pada permukaan meja kerja, kemudian bersihkan permukaan meja dengan menggunakan tisu atau kapas. Dekatkan semua peralatan yang akan digunakan dan meletakkannya tepat dihadapan pengambil sampel
- b. Menggunakan sarungan tangan steril untuk mulai mengambil sampel botol susu
- c. Ambil secara acak masing- masing botol susu
- d. Persiapkan catatan formulir dan label dengan membagi botol susu kedalam kelompok- kelompok, yaitu kelompok sterilisasi rebus dan kelompok sterilisasi kimia (sabun cair)
- e. Ambil kapas lidi steril atau *cotton bud* dari tempatnya secara aseptis, kemudian buka tutup botol aquades steril ukuran 100 ml yang berisi 10 ml aquades dan masukan kapas lidi kedalamnya dengan cara aseptis
- f. Kapas lidi steril dalam botol ditekan ke dinding botol untuk membuang airnya, baru diangkat dan diusapkan pada setiap botol susu yang akan dijadikan sampel.
- g. Permukaan tempat botol susu yang diusap adalah permukaan dasar bagian dalam dari botol susu seluas (± 6 mm)
- h. Setiap bidang permukaan yang diusap dilakukan 3 kali berturut- turut secara sirkuler, dan satu kapas lidi steril digunakan hanya untuk 1 botol susu.
- i. Setiap selesai melakukan usapan, lidi kapas dimasukkan kedalam tabung reaksi, lidinya dipatahkan dengan cara digunting, dan bibir tabung reaksi dipanaskan dengan api yang kemudian ditutup.

- j. Setelah semua botol susu yang diusap jangan lupa untuk memberikan label yang berisi nama botol susu, lokasi pengambilan, tujuan pemeriksaan dan catatan lain yang dianggap perlu.

(Maloha, 2002).

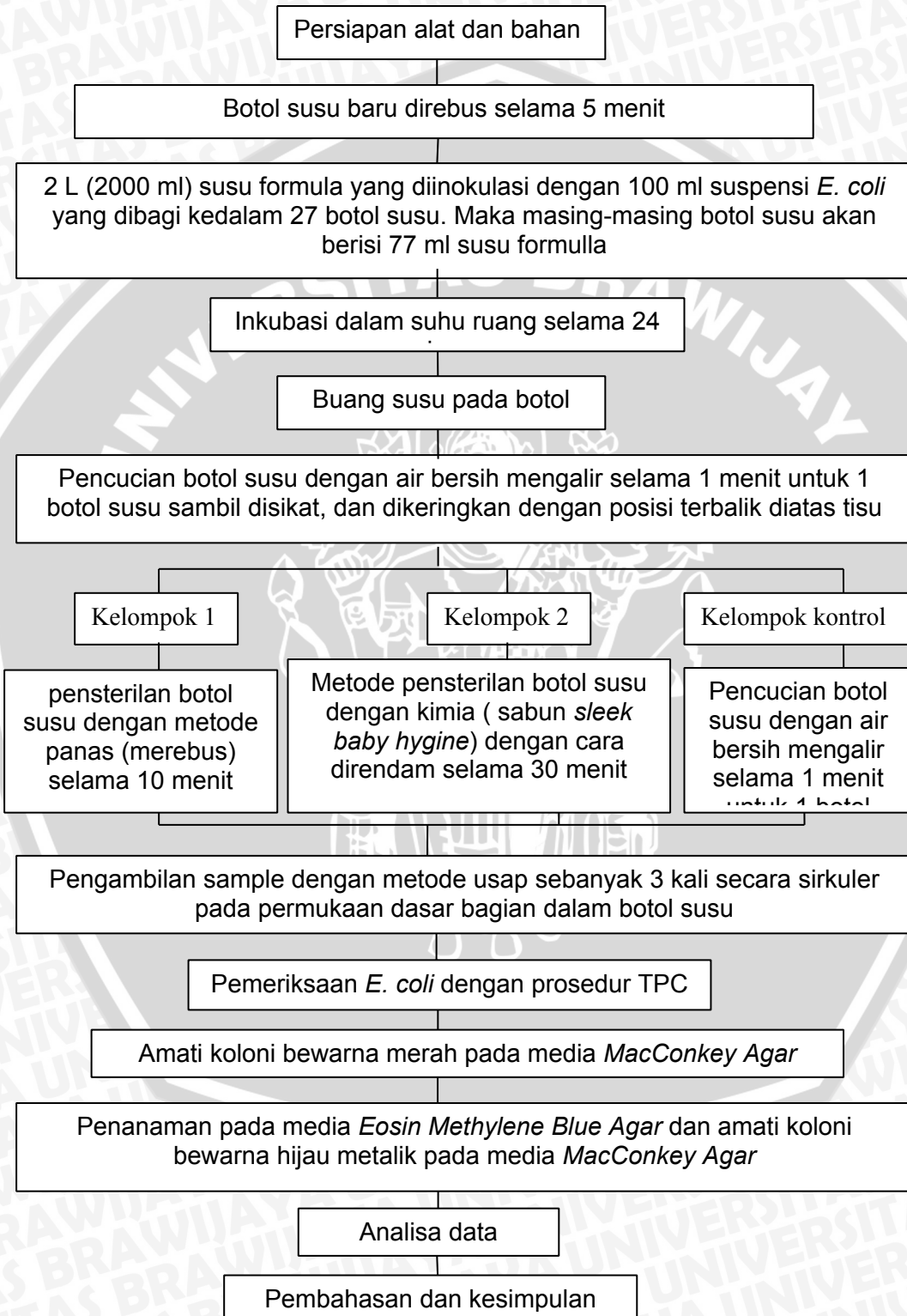
4.7.5 Teknik penghitungan jumlah *E. coli* dengan metode TPC

Data cemaran *E.coli* diperoleh dengan mengambil sampel botol susu dengan metode *swab*, selanjutnya diuji di laboratorium menggunakan metode TPC sebagai berikut : (Adhiah, 2014)

- a. Ambil lidi kapas yang digunakan untuk melakukan pengambilan sampel usap yang ada didalam tabung reaksi tanpa pengenceran. Pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dst dilakukan apabila dari hasil penghitungan bakteri *E. coli* pada sampel tanpa pengenceran didapati lebih dari 300 koloni bakteri *E. coli*.
- b. Kemudian lidi kapas digoreskan ke dalam cawan petri yang berisi *MacConkey Agar*.
- c. Beri label pada cawan petri sesuai no urut dari sampel.
- d. Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.
- e. Pengamatan pada media yang terbentuk koloni merah bata.

4.7.6 Prosedur Penelitian

Alur pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 4. 2 Alur Pelaksanaan Penelitian

4.8 Analisa Data

Analisa ini untuk mengetahui apakah hipotesis diterima atau ditolak dengan menggunakan pengolahan data secara komputersasi SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for windows versi 20,0 uji *One way Anova*. Uji *One Way Anova* dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh sterilisasi botol susu terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli*. Langkah-langkah dalam uji *One Way Anova* adalah sebagai berikut :

1. Melakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-wilk* untuk sampel kurang atau lebih dari sama dengan 50.
2. Kemudian dilakukan *Levene's test* untuk melakukan uji homogenitas (perbedaan varians). Data dikatakan homogen atau signifikan apabila $p > 0,05$. Jika varian data sama atau homogen maka dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*.
3. Uji *Post Hoc* dilakukan untuk menilai apakah ada perbedaan yang signifikan diantara perlakuan.