

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif analitik suatu metode penelitian yang dilakukan dengan tujuan utama membuat gambaran atau deskripsi tentang suatu keadaan melalui analisis. Pendekatan yang digunakan adalah *cross sectional*, yaitu objek hanya diobservasi sekali saja dan pengukuran dilakukan terhadap karakter atau variabel objek pada saat pemeriksaan.

4.2 Populasi dan Sampel**4.2.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh bakso daging sapi yang dijual di lima Kecamatan di Kota Malang yaitu Kecamatan Klojen, Blimbing, Kedungkandang, Lowokwaru, dan Sukun dengan dijual menetap maupun keliling beserta alat saji yang digunakan.

4.2.2 Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara *simple random sampling* yaitu teknik pengambilan sampel yang dilakukan secara acak sehingga setiap elemen dalam populasi memiliki kesempatan yang sama besar untuk dipilih sebagai sampel penelitian dan cenderung menghasilkan sampel yang representatif.

4.2.2.1 Sampel Bakso Daging Sapi

Setiap Kecamatan di Kota Malang diambil empat sampel bakso. Dua sampel dari pedagang keliling dan dua sampel lainnya dari pedagang menetap.

4.2.2.2 Sampel Alat Saji

Alat saji yang dijadikan sampel terdiri dari sendok, garpu, mangkok, dan penjepit. Alat saji bakso daging sapi berasal dari dua pedagang keliling dan dua pedagang menetap di setiap Kecamatan di Kota Malang.

4.2.2.3 Kriteria Inklusi (Kriteria Penerimaan)

4.2.2.3.1 Kriteria Inklusi Pedagang Bakso Keliling

Pemilihan bakso dan alat saji pada pedagang keliling yang dijadikan sebagai sampel mempunyai kriteria sebagai berikut:

- a. Bakso yang terbuat dari daging sapi sebagai bahan baku utama.
- b. Bakso yang dijual berkeliling menggunakan gerobak.
- c. Bakso tertampil/terpajang di kaca etalase.
- d. Alat saji terdiri dari sendok, garpu, mangkok, dan penjepit.

4.2.2.3.2 Kriteria Inklusi Pedagang Bakso Menetap

Pemilihan bakso dan alat saji pada pedagang menetap yang dijadikan sebagai sampel mempunyai kriteria sebagai berikut:

- a. Bakso yang terbuat dari daging sapi sebagai bahan baku utama.
- b. Bakso yang dijual menetap/tidak berpindah tempat.
- c. Bakso tertampil/terpajang di kaca etalase.
- d. Alat saji terdiri dari sendok, garpu, mangkok, dan penjepit.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi (Kriteria penolakan)

Bakso yang cara penjualannya dilakukan berkeliling dan menetap.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*.

4.3.2 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah bakso daging sapi dan alat saji.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian



Gambar 4.1 Peta Administratif Kota Malang (BPS Kota Malang, 2015)

Lokasi pengambilan sampel bakso daging sapi dari penelitian ini didasarkan pada lima kecamatan di Kota Malang yaitu Kecamatan Klojen, Blimbing, Kedungkandang, Lowokwaru, dan Sukun. Sedangkan pengujian sampel dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian ini dilakukan selama 15 bulan yaitu pada bulan Februari 2015 hingga Mei 2016.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah bakso daging sapi, sendok, garpu, mangkok, penjepit, larutan NaCl 0,1% sebanyak 9 ml, larutan NaCl 0,1% sebanyak 2 ml, dan *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB Agar).

4.5.2 Alat

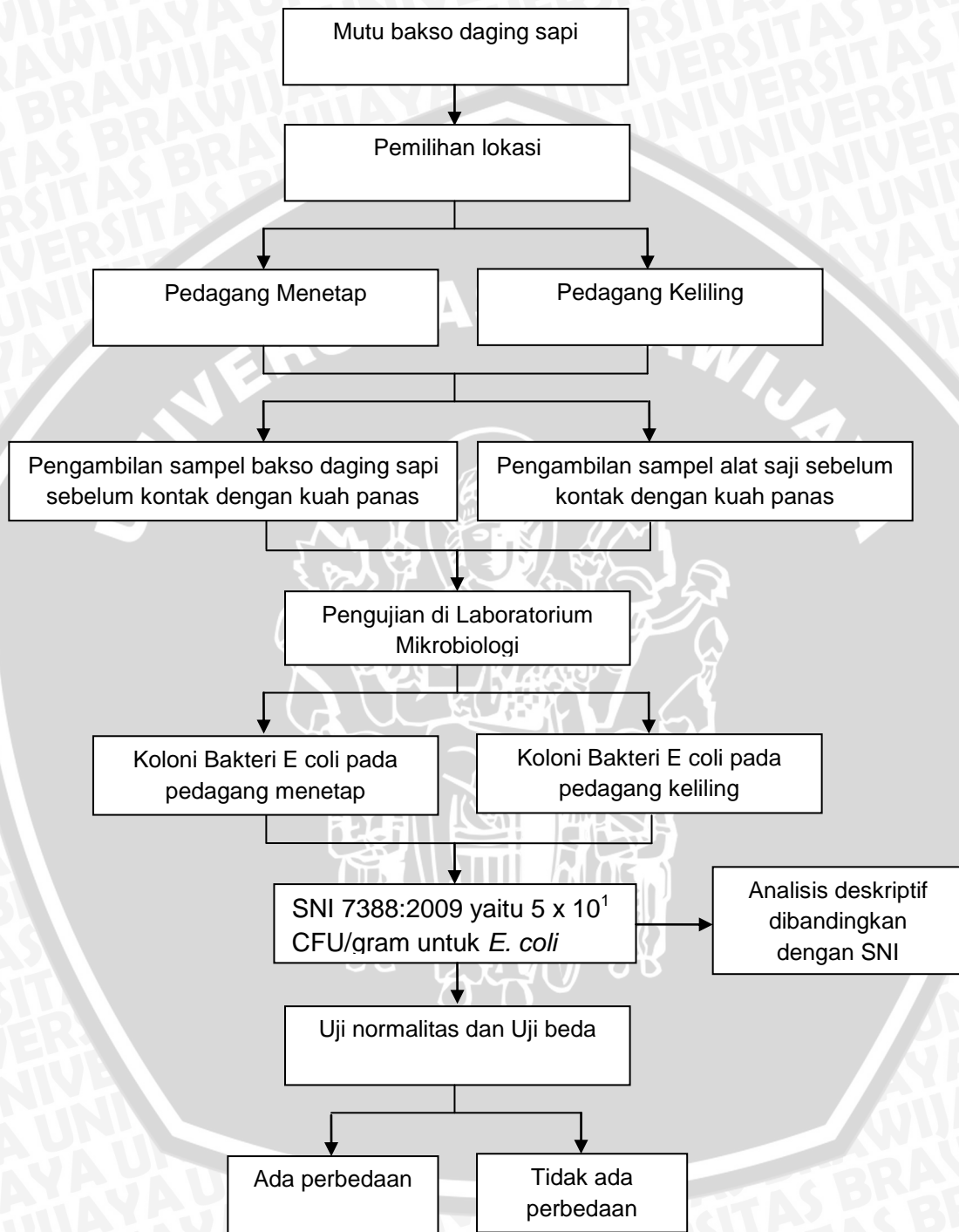
Alat penelitian yang digunakan adalah *cotton swab*, plastik klip, timbangan analitik, aluminium foil, mortar, stamper, *quebec colony counter*, labu erlenmeyer, cawan petri, rak tabung, tabung reaksi, *ice box*, pipet, dan termometer.



4.6 Definisi Istilah/Operasional

Istilah	Definisi	Metode Pengukuran	Alat Ukur	Satuan	Skala
<i>Escherichia coli</i> pada bakso	Jumlah koloni yang terbentuk berwarna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni dengan metalik kehijauan yang mengkilat pada media EMBA dari sampel bakso	Uji Total Plate Count (TPC) Media EMBA	<i>Colony Counter</i>	CFU/gram	Rasio
<i>Escherichia coli</i> pada alat saji	Ada atau tidaknya koloni yang terbentuk berwarna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni dengan metalik kehijauan yang mengkilat pada media EMBA dari sampel alat saji	Uji Total Plate Count (TPC) Media EMBA	<i>Colony Counter</i>	CFU/gram	Rasio
Bakso	Olahan daging sapi yang berbentuk bulatan dengan tekstur halus yang diambil dari etalase kecil.	Observasi	-	-	Nominal
Alat saji	Alat yang digunakan dalam penyajian bakso yaitu sendok, garpu, mangkok, dan penjepit yang terbuat dari jenis bahan <i>stainless steel</i> , beling, dan kayu.	Observasi	-	-	Nominal
Bakso yang dijual berkeliling	Bakso yang dijual menggunakan gerobak dorong dengan berpindah-pindah dari satu tempat ke tempat lain dalam satu kecamatan di Kota Malang.	Observasi	-	-	Nominal
Bakso yang dijual menetap	Bakso yang dijual di warung atau toko dengan tidak berpindah-pindah dari satu tempat ke tempat lain dalam satu kecamatan di Kota Malang.	Observasi	-	-	Nominal

4.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alir Penelitian

4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.8.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel bakso daging sapi dan *swab* alat saji didasarkan pada lima kecamatan di Kota Malang. Setiap kecamatan diambil empat sampel pedagang bakso. Dua sampel dari pedagang keliling dan dua sampel lainnya dari pedagang menetap. Setiap alat saji yaitu penjepit, sendok, garpu, dan mangkuk di *swab* di bagian kepala depan dan belakang dengan menggunakan *cotton swab*. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril yang dibawa dengan *ice box* kemudian disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -0°C .

4.8.2 Preparasi Sampel

Pada dasarnya preparasi sampel dilakukan secara aseptis yaitu dengan menggunakan alat yang steril. Setelah dikeluarkan dari wadahnya, bakso daging sapi dibungkus dengan aluminium foil dan ditumbuk sampai halus atau dihomogenkan dengan menggunakan mortar dan stamper, begitu pula dengan *cotton swab* alat saji dikeluarkan dari wadahnya secara aseptis.

4.8.3 Prosedur Metode TPC (*Total Plate Count*)

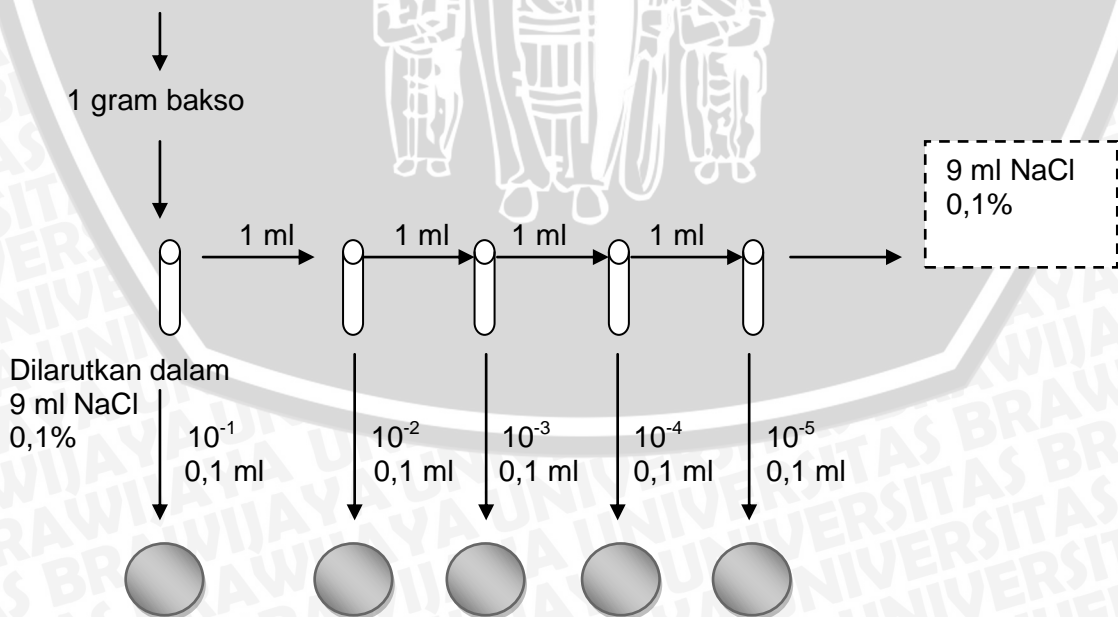
Penelitian deteksi bakteri *Escherichia coli* dilakukan melalui metode TPC (*Total Plate Count*) dengan menanam suspensi bahan uji pada media selektif EMB untuk kemudian dihitung dengan menggunakan *Quebec Colony Counter*.

a. Isolasi Sampel Bakso

Sampel bakso diencerkan dengan pengenceran bertingkat untuk memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan sehingga memudahkan penghitungan mikroba yang tumbuh dan proses isolasi. Pengenceran dilakukan dalam beberapa tahap yaitu :

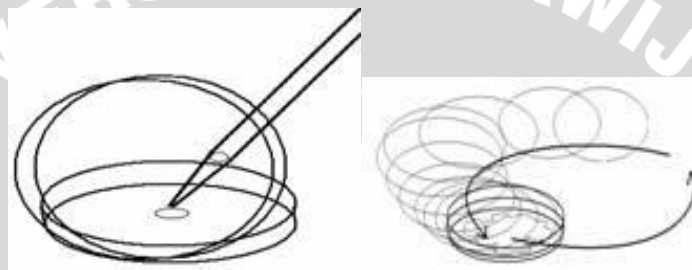
- 1) Menyiapkan 5 tabung reaksi berisi NaCl 0,1% masing-masing 9 ml, dan 5 buah medium *eosin methylene blue agar* (EMBA) untuk setiap sampel bakso. lalu memberi kode pada tabung reaksi dan medium lempeng.
- 2) Menimbang 1 gram sampel bakso daging sapi (di atas alumunium foil) yang sudah dihaluskan, kemudian secara aseptik memasukkannya ke dalam 9 ml NaCl 0,1% dalam tabung reaksi pertama.
- 3) Mengambil 1 ml suspensi dalam tabung reaksi pertama dengan menggunakan pipet volumetrik steril, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua.
- 4) Melakukan hal yang sama untuk pengenceran sampel secara bertahap sampai dengan tabung reaksi kelima.
- 5) Menghomogenkan tabung reaksi yang berisi sampel dengan menggunakan *vortex*, maka diperoleh suspensi dengan tingkat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} .

1 buah bakso dihaluskan dengan mortar



Gambar 4.3 Teknik Pengenceran Sampel Bakso

Sampel bakso yang telah diencerkan sampai 10^{-5} , dipipet sebanyak 1 ml dan ditetaskan pada cawan petri. kemudian dituangi media EMB (*Eosin Methylene Blue*) yang dicairkan. Masing-masing cawan petri yang berisi medium EMBA ditutup dan diputar dengan gerakan melingkar atau gerakan seperti angka delapan sampai homogen dan memastikan medium tidak keluar dari tepi cawan petri. Setelah media EMB menjadi padat kembali, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 4.4 Proses Inokulasi Bakteri dan Penghomogenan Larutan

Setelah 24 jam, seluruh koloni yang berdiameter 2 mm sampai 3 mm, warna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni dengan metalik kehijauan yang mengkilat (*Escherichia coli*) dihitung. Satuan koloni ditetapkan berdasarkan jumlah koloni per 1 gram sampel. Koloni besar, kecil, menjalar dianggap berasal dari satu bakteri. Menghitung jumlah koloni pada masing-masing cawan, baik koloni yang ada di permukaan agar maupun yang ada di dalam agar. Penghitungan koloni dapat dilakukan menggunakan alat hitung koloni (*quebec colony counter*), yang terdiri dari sumber cahaya dan lensa/kaca pembesar dengan cara:

- 1) Metakkan cawan petri terbalik/telungkup, dan nyalakan sinar.

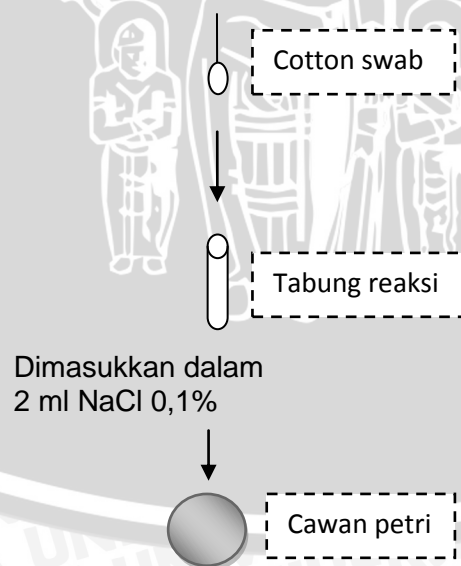
- 2) Menandai koloni yang telah dihitung supaya tidak terhitung ulang dengan pena khusus untuk menunjukkan koloni yang secara otomatis mencatat angka setiap kali koloni disentuh. Kemudian dimasukkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah koloni} = \text{koloni yang terhitung} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

b. Isolasi Sampel Alat Saji

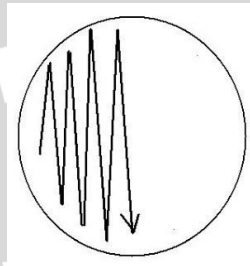
Sampel alat saji diisolasi dengan tahapan sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan satu tabung reaksi berisi NaCl 0,1% sebanyak 2 ml, dan 1 buah medium *eosin methylene blue agar* (EMBA) untuk setiap sampel *cotton swab*. lalu memberi kode pada tabung reaksi dan medium lempeng.
- 2) Memasukkan sampel secara aseptik ke dalam tabung reaksi 2 ml NaCl 0,1% dan ditutup dengan menggunakan kapas.
- 3) Menghomogenkan tabung reaksi yang berisi sampel dengan mengocok atau memutar diantara kedua tangan sampai homogen maka diperoleh suspensi.



Gambar 4.5 Teknik Isolasi Sampel Alat Saji

Sampel cair dalam tabung reaksi diambil secukupnya dengan jarum ose dan digoreskan di atas permukaan pelat agar dalam cawan petri yang telah berisi media EMB (*Eosin Methylrene Blue*) dengan bentuk sinambung tunggal. Masing-masing cawan petri yang berisi medium EMBA ditutup kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 4.6 Proses Inokulasi Bakteri dengan Teknik Penggoresan

Setelah 24 jam, seluruh koloni yang berdiameter 2 mm sampai 3 mm, warna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni dengan metalik kehijauan yang mengkilat (*Escherichia coli*) dilihat keberadaannya pada jenis alat saji.

4.8.4 Prosedur Pewarnaan Gram

- 1) Menyediakan kaca benda yang bersih, lalu melewatkan di atas nyala lampu spiritus.
- 2) Meneteskan setetes *aquades* steril di atas kaca benda tersebut.
- 3) Secara aseptik mengambil inokulum bakteri yang akan diperiksa, lalu meletakkan di atas tetesan *aquades* itu. Kemudian meratakan perlahan-lahan dan menunggu sampai mengering.
- 4) Melakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan tersebut di atas nyala api lampu spiritus dengan cepat.
- 5) Meletakkan sediaan di atas kawat penyangga yang berada di atas mangkok pewarna. Lalu meneteskan larutan Kristal Violet di atas sediaan tersebut.

Menunggu selama 1 menit kemudian membuang kelebihan zat warna tersebut ke dalam mangkok dan membilas sediaan dengan air kran.

- 6) Meneteskan larutan iodine di atas sediaan itu, lalu menunggu selama 2 menit kemudian membuang kelebihan larutan iodine ke dalam mangkok dan membilas sediaan dengan air kran.
- 7) Meneteskan alkohol 95% di atas sediaan, biarkan selama 1 menit kemudian membuang sisa alkohol itu ke dalam mangkok dan membilas sediaan dengan air kran.
- 8) Meneteskan larutan safranin di atas sediaan, biarkan selama 30 detik kemudian membuang kelebihan larutan safranin itu ke dalam mangkok, lalu membilas dengan air kran.
- 9) Mengeringkan sediaan secara hati-hati dengan kertas pengisap, lalu memeriksa di bawah mikroskop.

4.9 Analisis Data

4.9.1 Analisis Univariat

Analisis univariat digunakan untuk mengetahui gambaran deskriptif dari data-data yang dikumpulkan. Data cemaran TPC dan *Escherichia coli* dianalisa dan diinterpretasikan. Hasil perhitungan dilakukan sesuai dengan SNI 7388:2009 yaitu 5×10^1 CFU/gram untuk *Escherichia coli*. Apabila melebihi batas maksimum cemaran mikroba berarti tidak memenuhi syarat Standar Nasional Indonesia (SNI) 7388:2009 dan apabila kurang dari batas maksimum cemaran mikroba berarti memenuhi syarat Standar Nasional Indonesia (SNI) 7388:2009. Analisa data dalam penelitian deskriptif ini diolah secara manual dan disajikan dalam bentuk narasi, diagram, dan tabel.

4.9.2 Analisis Bivariat

Analisis bivariat dilakukan untuk mengetahui perbedaan variabel dependen (jumlah bakteri *Escherichia coli*) dan independen (bakso daging sapi dan alat saji) menggunakan program SPSS versi 16 yang kemudian disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi disertai narasi yang sebelumnya dilakukan uji kenormalan data menggunakan metode *Shapiro-Wilk*.

Setelah dilakukan uji normalitas, selanjutnya dilakukan uji beda. Uji beda parametrik (*Independent T-test*) digunakan untuk mengetahui perbedaan antar variabel jika distribusi data normal. Sedangkan uji beda non parametrik (*Mann Whitney*) digunakan untuk mengetahui perbedaan variabel jika distribusi data tidak normal. Apabila dari hasil pengujian diperoleh hasil $p\text{-value} < \alpha$ (0,05), maka ada perbedaan yang signifikan antara kedua variabel. Sebaliknya apabila hasil pengujian diperoleh hasil $p\text{-value} > \alpha$ (0,05), maka tidak ada perbedaan yang signifikan antara kedua variabel.