

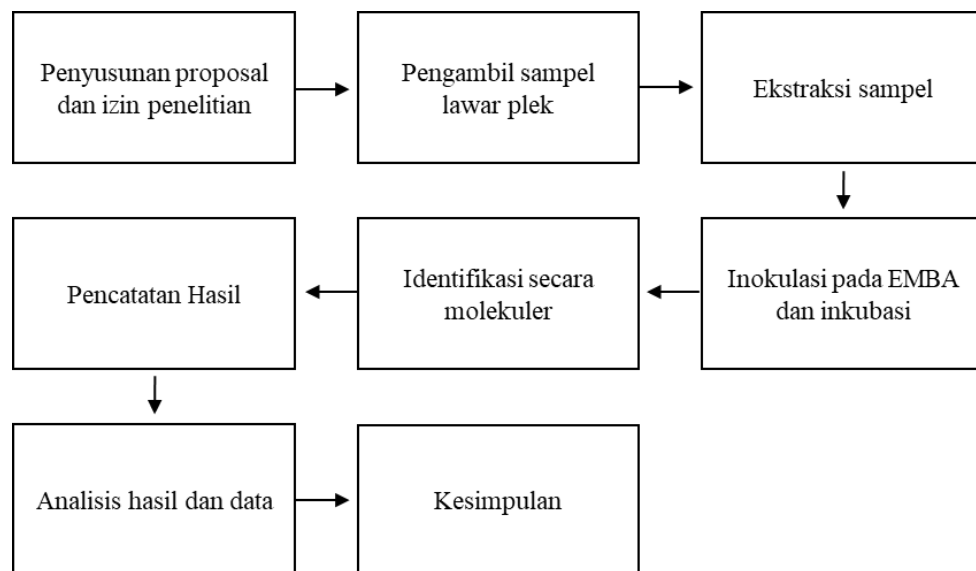
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk kedalam penelitian deskriptif yakni penelitian yang memberikan suatu gambaran fenomena yang ada atau digunakan untuk menganalisis atau menggambarkan hasil tetapi tidak dimaksudkan untuk memberikan implikasi yang lebih luas (Adiputra *et al*, 2021).

B. Alur Penelitian



C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar beralamat di Jalan Pulau Moyo Nomor 33A, Pedungan, Denpasar. Pengambilan sampel dilakukan pada penjual lawar plek di Desa Ketewel, Gianyar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dimulai dari penyusunan proposal pada bulan September 2023 sampai pelaksanaan penelitian pada bulan April hingga Mei 2024.

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi adalah seluruh subjek dari suatu penelitian yang berada dalam suatu lokasi (Nalendra *et al*, 2021). Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah pedagang lawar plek di Desa Ketewel, Gianyar sejumlah 14 pedagang.

2. Sampel Penelitian

Sampel adalah sebagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi yang secara nyata diteliti dan ditarik kesimpulan (Masturoh and Anggita, 2018). Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah sampel lawar plek yang dijual oleh pedagang lawar plek di Desa Ketewel, Gianyar.

3. Unit Analisis

Unit analisis dari penelitian ini yaitu identifikasi koloni pada EMBA dan hasil identifikasi PCR.

4. Jumlah dan Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 12 buah sampel. Jumlah sampel ditentukan dengan Rumus Slovin (Nalendra *et al*, 2021).

$$n = \frac{N}{1 + Ne^2}$$

Keterangan:

n = Jumlah sampel

N = Jumlah populasi

e = persentase kesalahan

$$n = \frac{N}{1 + Ne^2}$$

$$n = \frac{14}{1 + (14 \times 0,1^2)}$$

$$n = \frac{14}{1 + (14 \times 0,01)}$$

$$n = \frac{14}{1 + (0,14)}$$

$$n = \frac{14}{1,14}$$

$n = 12,28$ dibulatkan menjadi 12

5. Kriteria Sampel

Kriteria inklusi sampel lawar plek yakni lawar yang dibuat dengan menggunakan bahan baku mentah dan tidak melalui proses pemasakan. Kriteria eksklusi sampel lawar plek yakni lawar yang sudah tidak segar.

6. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *non probability sampling* secara *purposive sampling*. *Non Probability Sampling* adalah cara pengambilan sampel dengan semua objek atau elemen dalam populasi tidak

memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai sampel. *Purposive sampling* adalah teknik pengambilan sampel dengan memilih subjek berdasarkan pada karakteristik tertentu yang dianggap mempunyai hubungan dengan karakteristik populasi yang sudah diketahui sebelumnya (Masturoh and Anggita, 2018).

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *conical tube*, rak *conical tube*, label, *ice box*, spatula, neraca analitik, *aluminium foil*, *Erlenmeyer*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, kapas berlemak, *autoclave*, *bio safety cabinet*, cawan petri, lemari pendingin, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, kertas pH, gelas ukur, *vortex*, mikropipet, tip mikropipet, labu ukur, gelas beaker, kompor listrik, cetakan (*tray*) *agarose*, sisir (*comb*) *agarose*, jarum ose, api bunsen, *incubator*, alat tulis, *microtube*, *spindown*, *thermal cyclcer*, *tray* elektroforesis, *electric current for electrophoresis*, *UV doc*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel lawar plek, media EMB, *aquadest*, *phenol*, *chloroform*, *isoamyl alcohol*, *tris*, HCl (*hydrogen chloride*) pekat, EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), NaCl (*natrium chloride*), SDS (*Sodium dodecyl sulfat*), serbuk *agarose*, TAE (*Tris-acetate-EDTA*), *primer*, *pcr reagent*.

3. Prosedur Kerja

a. Pengambilan Sampel

Prosedur pengambilan sampel berdasarkan penelitian oleh Anggreni (2021) yang telah dimodifikasi oleh penulis. Sampel diambil oleh penulis dengan membeli lawar plek dari pedagang lawar plek di Desa Ketewel, Gianyar. Sampel dimasukkan ke *conical tube* dan diberi label. Tabung *conical* diletakkan dalam *ice box* dan dibawa menuju Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

b. Pembuatan Media, Reagen, dan Agarose

1) Pembuatan Media EMB

Prosedur pembuatan media EMB berdasarkan penelitian Anggreni (2021), yang telah dimodifikasi oleh penulis. Disiapkan alat dan bahan. Diambil media EMB dari wadah media dengan spatula. Ditimbang media EMB dengan menggunakan neraca analitik. Digunakan *aluminium foil* sebagai wadah media. Media yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam *erlenmeyer*. Ditambahkan aquadest untuk melarutkan media. Dihomogenkan dengan proses pemanasan dengan *hot plate* dan *magnetic stirrer*. Setelah larut *erlenmeyer* ditutup dengan kapas dan disterilkan dengan menggunakan *autoclave*. Setelah media selesai di-*autoclave*, ditunggu hingga suhu menjadi hangat. Dilakukan proses penuangan pada *bio safety cabinet*. Dituang media ke dalam cawan petri steril, kemudian ditunggu hingga menjadi padat. Disimpan media pada lemari pendingin.

2) Pembuatan Reagen Ekstraksi *Phenol Chloroform Isoamyl Alcohol* (PCIA)

Dilarutkan Tris sebanyak 1,2114 gram dalam 8 ml *aquadest*. Disesuaikan nilai pH menjadi 8 dengan menambahkan HCl pekat tetes demi tetes dengan pipet tetes. Diukur dengan kertas pH. Dipastikan volume akhir dari reagen menjadi 10

ml dengan menambahkan *aquadest*. Reagen disimpan dalam *conical tube* di-*autoclave* dan disimpan pada suhu ruang. Dibuat reagen Tris menjadi 0,05 M. Ditimbang 10 gram *phenol* dan tuang ke dalam tabung yang berisi 10 ml reagen 0,05 M TrisCl dengan pH 8. Dihomogenkan dengan bantuan alat *vortex*. Didiamkan selama 1 jam sampai terbentuk 2 lapisan larutan dalam tabung. Dibuang *supernatant* dengan bantuan mikropipet. Dilakukan proses pencucian dengan menambahkan larutan TrisCl 0,05 M dan dihomogenkan. Kemudian didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan dan buang *supernatant*. Diukur pH dan pastikan mencapai nilai antara 7 dan 8. Disiapkan tabung *conical* yang baru. Dibuat larutan *chloroform* : *isoamyl alcohol* dengan perbandingan 24:1. Volume *chloroform* yakni 6 ml dan *isoamyl alcohol* yakni 0,25 ml. Disiapkan tabung *conical* baru dan pipet 5 ml *phenol* yang diambil dari dasar tabung larutan *phenol* dan TrisCl 0,05 M. Ditambahkan 5 ml larutan *chloroform* : *isoamyl alcohol*. Dihomogenkan. Ditambahkan 5 ml 0,05 M TrisCl. Disimpan tabung pada lemari pendingin.

3) Pembuatan *lisis buffer* dan proteinase K

Dibuat 100 ml *lisis buffer* dengan cara, ditimbang 0,6057 g Tris, 0,1861 EDTA, 0,5844 NaCl, dan 10 ml 10% SDS. Dimasukkan semua bahan ke dalam 50 ml labu ukur dan ditambahkan *aquadest*. Dihomogenkan.

4) Pembuatan *Agarose Gel*

Prosedur pembuatan *agarose gel* berdasarkan penelitian Kurniawati, Sumaryam, dan Hayati (2019) yang telah dimodifikasi oleh penulis. Ditimbang serbuk *agarose* dengan neraca analitik. Diukur TAE dan larutkan dengan *aquadest*. Dimasukkan TAE kedalam Erlenmeyer dan ditambahkan *agarose*.

Dihomogenkan dan panaskan dengan kompor listrik. Dilarutkan hingga menjadi jernih. Dituang larutan kedalam cetakan dan pasang sisir atau *comb agarose*. Didiamkan hingga memadat.

c. Preparasi dan Inokulasi Sampel

Prosedur berdasarkan penelitian oleh Pratiwi (2022) yang telah dimodifikasi oleh penulis. Diambil 25 gram sampel lawar dan ditampung dalam plastic *autoclave*. Ditambahkan *sodium chloride* sebanyak 225 ml dan homogenkan. Diinokulasikan hasil ekstraksi dengan bantuan ose dan *streak* pada EMBA. Diinkubasi didalam *incubator*. Diidentifikasi koloni yang tumbuh pada media.

d. Ekstraksi Koloni dengan PCIA

Disiapkan koloni bakteri. Disiapkan *microtube* dan diisi dengan 500 µl *lysis buffer*. Diambil 1 koloni tunggal bakteri. Dimasukkan ke dalam *microtube*. Ditambahkan 12,5 µl *proteinase K* dan dihomogenkan dengan *vortex*. Diinkubasi pada oven dengan suhu 56°C selama 30 menit. Ditambahkan 500 µl reagen PCIA dan dihomogenkan dengan *vortex*. Diinkubasi selama 10 menit. Disentrifus pada kecepatan 15.000 g selama 5 menit. Dipindahkan 1,5 ml lapisan atas larutan dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Ditambahkan 700 µl *ethanol*. Dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 24 jam. Disentrifus dengan kecepatan 15.000 g selama 10 menit. Dibuang bagian *supernatant* dan ditambakan 500 µl *ethanol*. Dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Disentrifus dengan kecepatan 15.000 g selama 5 menit. Dibuang bagian *supernatant* dan keringkan hasil selama 30 menit. Ditambahkan 50 µl TE buffer dan dihomogenkan.

e. Identifikasi PCR

Disiapkan hasil ekstraksi. Dimasukkan ke dalam tabung *microtube*.

Ditambahkan reagen PCR dan *primer* seperti yang disajikan pada tabel 2.

Tabel 2
Komposisi Komponen PCR

No	Komposisi	Jumlah (µl)
1	<i>SensiFast SYBR No-ROX Mix</i>	5
2	<i>Forward Primer</i>	0,4
3	<i>Reverse Primer</i>	0,4
4	<i>DNA Template</i>	2
5	H ₂ O	2,2
Volume Total		10

Sumber: (Meridian Bioscience)

Pada tabel 2, komposisi dan jumlah yang digunakan untuk masing-masing komponen yang digunakan untuk reaksi PCR. Daftar primer dan target gen disajikan pada tabel 3

Tabel 3
Daftar *Primer* Dalam Penelitian

<i>Target Gen</i>	<i>Primer Design</i>	<i>Primer</i>	<i>PCR Product (base pairs)</i>	<i>Variant</i>
Elt (LT)	ACGGCGTTACTATCCTCTC	LT	273	ETEC
estA2-4 (ST)	TGGTCTCGGTCAGATATGTG TTCACCTTTCCCTCAGGATG CTATTCATGCTTTCAGGACCA	Sth	120	ETEC

Sumber: (Sukrama *et al*, 2020)

Pada tabel 3, disajikan ukuran produk hasil PCR. Dilanjutkan proses penelitian. Diletakkan *microtube* pada alat PCR. Diatur suhu pada alat PCR sesuai dengan program yang disajikan pada tabel 4.

Tabel 4
Program PCR ETEC

<i>Primer</i>	<i>Program</i>	<i>Temperature (°C)</i>	<i>Time</i>	<i>Cycle (x)</i>
Elt (LT)	<i>Pre-denaturation</i>	95	3 minutes	1
estA2-4 (ST)	<i>Denaturation</i>	95	10 seconds	35
	<i>Annealing</i>	55	10 seconds	
	<i>Extension</i>	72	20 seconds	
	<i>Final Extension</i>	72	5 minutes	1

Sumber: (Meridian Bioscience; Sukrama *et al*, 2020)

Dilakukan *running* pada alat. Diletakkan *agarose gel* pada *tray* elektroforesis. Direndam dengan TAE. Dimasukkan hasil PCR pada sumur *agarose*. Dipasang kabel kutub pada alat elektroforesis dan dialirkan aliran listrik. Setelah selesai, hasil dibaca dengan alat *UV Doc*.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

a. Data Primer

Data primer adalah data yang diperoleh atau dikumpulkan oleh peneliti secara langsung dari sumber datanya (Masturoh dan Anggita, 2018). Data primer dalam penelitian ini adalah hasil pemeriksaan laboratorium dan hasil observasi di lokasi pembelian sampel.

b. Data Sekunder

Data sekunder adalah data yang diperoleh peneliti dari berbagai sumber yang telah ada (Masturoh and Anggita, 2018). Dalam penelitian ini data sekunder yang digunakan bersumber dari jurnal dan penelitian sebelumnya serta data dan peraturan dari pemerintah.

2. Teknik Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, teknik pengumpulan data yang digunakan adalah dengan observasi dan pemeriksaan laboratorium. Sampel lawar plek diperiksa di laboratorium untuk diidentifikasi keberadaan bakteri *Escherichia coli* dengan patogenitas ETEC.

3. Instrumen Pengumpulan Data

Instrumen pengumpulan data yang digunakan penulis adalah:

- a. Alat Tulis, digunakan untuk menulis dan mencatat data dan hasil penelitian.
- b. Alat dokumentasi, digunakan dalam bentuk kamera *handphone* untuk mendokumentasikan penelitian.
- c. Peralatan dan bahan laboratorium, digunakan untuk memperoleh sampel dan melakukan pemeriksaan di laboratorium.

G. Pengolahan dan Analisis Data

Data primer dalam penelitian berupa hasil *positive* dan *negative* dari setiap uji identifikasi ditampilkan dalam bentuk tabel dan naratif. Data dianalisis dengan pencarian nilai persentase.

H. Etika Penelitian

1. Hak dan Kewajiban Responden

- a. Responden berhak untuk menyetujui ataupun tidak menyetujui pemberian data kepada peneliti.
- b. Responden berhak untuk dihargai privasinya.
- c. Responden berhak untuk memperoleh jaminan keamanan dan keselamatan akibat informasi yang diberikan.
- d. Responden wajib memberikan informasi yang diperlukan dengan jujur.

2. Hak dan Kewajiban Peneliti

- a. Peneliti berhak memperoleh informasi yang diperlukan dari responden.
- b. Peneliti wajib menjaga privasi responden.