

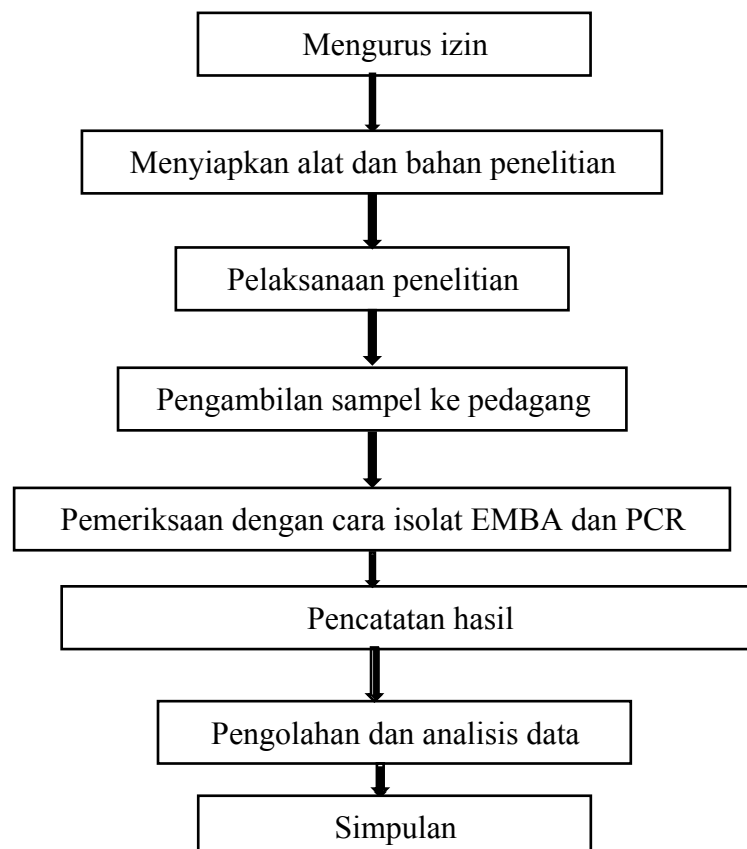
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan desain deskriptif. Penelitian kuantitatif merupakan penelitian yang menyajikan data berupa angka sebagai hasil. Metode penelitian deskriptif adalah metode dalam penelitian tentang status kelompok manusia, suatu objek, suatu kondisi, suatu pemikiran, atau peristiwa pada saat ini. Penelitian ini digunakan untuk menggambarkan pemeriksaan STEC dan ESBL dengan menggunakan.

B. PCR. B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Tempat penelitian identifikasi bakteri pembawa patogen pada sampel *lawar plek* secara molekuler dilaksanakan di laboratorium biologi molekuler Poltekkes Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari tahun 2024. Penelitian ini dimulai dari penyusunan usulan penelitian sampai dengan penyeteroran skripsi ilmiah setelah ujian akhir program.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah pedagang lawar plek di desa Ketewel ganyar sebanyak 23 pedagang.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah *lawar plek* terbuat dari darah dan daging babi, sapi maupun ikan laut mentah pada penjual lawar di desa Ketewel. *Lawar plek* yang diperoleh kemudian diisolasi untuk mendapatkan DNA template yang akan digunakan dalam proses PCR.

a. Unit Analisa

Unit analisa pada penelitian ini adalah identifikasi bakteri *Escherichia coli* pembawa patogen toxin STEC dan ESBL pada *lawar plek* di Desa Ketewel.

b. Besar Sampel

Ukuran sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 sampel, dari masing masing sampel berkisar 25gr.

c. Teknik Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan diambil secara random (acak) pada pedagang lawar plek di Desa Ketewel.

1) Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu lawar plek yang terbuat dari campuran darah dan daging sapi, babi, ikan laut mentah di Desa Ketewel.

2) Kriteria Eksklusi

Kriteria Eksklusi pada penelitian ini yaitu olahan lawar yang tidak menggunakan bahan baku daging dan darah babi, sapi, ikan laut mentah sebagai campurannya.

3. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel meliputi *conical tube* untuk menyimpan sampel dan *ice box* untuk menjaga kondisi sampel tetap utuh. Pada pemeriksaan alat yang digunakan yaitu mikropipet, tip, petridish, erlemeyer, gelas ukur, labu ukur, vortex mixer, hot plate, neraca analitik, pipet tetes, ph meter, *beker glass*, autoclave, alat PCR.

b. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian yaitu, serbuk EMBA , aquadest, Nacl, sampel lawar, reagen kit PCR.

4. Prosedur Kerja

1) Pra-analitik

a) Pengambilan sampel pada pedagang lawar plek di Desa Ketewel sebanyak 30 sampel.

b) Sterilisasi alat:

1. Disiapkan alat yang terbuat dari bahan kaca.
2. Disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit

c) Pembuatan media EMBA

1. Siapkan perlengkapan dan peralatan yang dibutuhkan untuk membuat media EMBA.
2. ditimbang 9,37 gram media EMBA bubuk.
3. Larutkan dalam wadah Erlenmayer dengan 250 mL akuades steril.
4. Panaskan Erlenmayer secara merata menggunakan kompor listrik hingga larut.
5. Setelah itu tutup dengan kapas steril dan autoklaf selama 1,5 jam pada suhu 121°C untuk mensterilkannya.
6. Biarkan media memanaskan setelah diautoklaf.
7. Media dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri (petridish) berkapasitas ± 20 ml, dibiarkan memadat, kemudian didinginkan pada suhu 30°C .

d) Pembuatan Tris HCl 0,05

1. Persiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk pembuatan Tris HCl 0,05
2. Masukkan 2ml Tris HCl pekat ke dalam conical tube
3. Tambahkan 38ml aquades
4. Homogenkan

e) Pembuatan PCIA

1. Persiapkan alat dan bahan yang akan digunakan pada saat pembuatan PCIA
2. 10 gr phenol ditambahkan 10ml Tris HCl 0,05
3. Homogenkan

f) Pembuatan gel agarose

1. Pastikan konsentrasi atau persentase agarosa yang diperlukan, yang bergantung pada ukuran fragmen DNA yang diperiksa
2. Persentase gel agarosa yang disarankan adalah sebagai berikut: agarosa 1,5% untuk fragmen DNA 200-3.000 bp, agarosa 0,7% untuk fragmen DNA 800-12.000 bp, agarosa 0,5% untuk fragmen DNA 1.000-30.000 bp, dan agarosa 2,0% untuk fragmen DNA 50-2.000 miliar pasangan basa;
3. Pilih varietas agarosa yang akan dimanfaatkan. Agarosa standar digunakan pada sebagian besar kasus. Misalnya, jika 200 ml 1 x buffer TAE digunakan untuk membuat gel agarosa 2%, maka jumlah agarosa yang perlu ditimbang adalah $2 \text{ g}/100 \text{ ml} \times 200 \text{ ml}$, atau 4 g;
4. Pindahkan 4 g agarosa ke dalam labu Erlenmeyer, tambahkan 1 x larutan buffer TAE hingga menjadi 200 ml, dan kocok untuk memastikan dispersi merata;
5. Didihkan campuran dalam microwave agar bening
6. Setelah agarosa mendingin hingga suhu sekitar 60°C , tambahkan 5ul etidium bromida (10 mg/ml) dan aduk hingga tercampur rata
7. Selanjutnya, isi baki dengan larutan, masukkan sisir yang sudah terbentuk rapi ke dalamnya, dan tunggu selama 30 menit, atau hingga gel mengeras. Setelah sisir yang terbentuk dengan baik telah dihilangkan

dengan hati-hati, gel agarosa disiapkan untuk elektroforesis; (Irianto, 2017).

2) Analitik

1. Diambil 23 sampel lawar plek pada pedagang
2. Tiap sampel ditimbang sebanyak 25 g, dimasukkan ke dalam 200 ml NaCl 0,9%, dan dihomogenisasi.
3. Dengan menggunakan pengenceran, ambil media EMBA yang telah disiapkan. Selanjutnya, ambil satu sampel dan regangkan pada setiap media EMBA yang telah disiapkan.
4. Selama sehari penuh, inkubasi media pada suhu 37°C.
5. Ditemukan koloni-koloni yang semakin meluas; positif jika warnanya hijau metalik.
5. Identifikasi PCR
6. Ekstraksi Sampel:
 - a. Diambil koloni bakteri pada media EMBA dan dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml, tambahkan 1 ml inhibitex buffer ke dalam sampel dan ivorteks selama 1 menit, sampai sampel homogen
 - b. Disentrifus selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm
 - c. Disiapkan tabung mikrosentrifus 2 ml yang baru dan ditambahkan 25µL proteinase K, tambahkan 600µL dari langkah no. 4, kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml yang telah terdapat proteinase K dan 600µL buffer AL setelah itu divorteks selama 15 detik
 - d. Dilakukan inkubasi pada suhu 70°C, selama 10 menit

- e. Ditambahkan 600µL etanol 96-100 % dan divorteks selama 15detik
- f. Dipindahkan 600µL, ketabung spin column
- g. Disentrifus selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm
- h. Dibuang cairan/filtrat pada tabung
- i. Diulangi sampai lisatnya habis
- j. Dipastikan pada tabung spin column, pada tahap terakhir tidak ada cairan (jika ada, maka dilakukan sentrigase ulang); setelah itu dipindahkan top dari tabung spin column, kedalam collecting tube yang baru;
- k. Ditambahkan 500µL buffer AW1, setelah itu disentrifus selama 1 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm, kemudian dibuang cairan/filtrate pada collecting tube dan tambahkan 500µL buffer AW2, lalu disentrifus selama 3 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm
- l. Dibuang cairan/filtrate pada collecting tube; Disentrifus selama 3 menit kecepatan 20.000 g/ 14.000 rpm
- m. Dipindahkan top dari tabung spin column, kedalam tabung mikrosentrifus 2 ml yang baru (QIAGEN, 2020).

7. Preparasi PCR

Terdapat beberapa langkah untuk mix PCR yaitu sebagai berikut:

- a. Langkah awal sebelum dilakukan mix PCR yaitu menyiapkan alat dan bahan; kemudian campurkan semua reagen dengan menggunakan ketentuan sebagai berikut:

Reagen	Quantity	Final Concetration
Water, nuclease-free	38.1	-
10x ViBuffer A	5.0	1x
2mM Dntp mix	2.	0.08mM
50Mm MgCl ₂	1.5	1.5 Mm
10 μ M Forward primer	1.0	0.2 μ M
10 μ M Reverse primer	1.0	0.2 μ M
Control DNA	1.0	5 ng
Taq DNA polymerase	0.4	2 unit
Total volume	50.0	-

Tabel 2. Prosedur PCR Mix

b. Lakukan *homogenisasi* reagen, dan centrifuge beberapa detik agar larutan yang menempel pada tutup dan dinding eppendorf turun ke bawah.

c. Masukkan ke dalam alat PCR untuk dilakukan tahap amplifikasi

8. Proses PCR

a. Memasukan sampel ke dalam alat PCR; Pada alat kemudian tekan login, lalu tekan STEC & ESBL, kemudian tekan program overview

b. Tekan three step, kemudian tekan open template; Atur suhu 95°C selama; 3 menit untuk pre denaturasi

c. Atur suhu 95°C selama 30 detik untuk denaturasi; Atur suhu 55°C selama 30 detik untuk annealing

- d. Atur suhu 32°C selama 1 menit untuk extension
- e. Atur suhu 72°C selama 10 detik untuk final extension
- f. Atur suhu 4°C selama waktu tak terhingga untuk elemetion; Kemudian tunggu sampel runing

9. Proses *Elektroforesis*

- a. A. Setelah baki agarosa dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis, isi dengan 1 x larutan buffer TAE hingga mencapai sekitar 1 mm di atas permukaan gel.
- b. A. Dengan menggunakan mikropipet, ambil bahan sebanyak yang dapat ditampung dalam sumur—biasanya 4–8 µl. Setelah menempatkan sampel pada cling film atau bungkus plastik, tambahkan buffer pewarna hingga 1/10 volume sampel dan aduk agar merata. Dengan menggunakan mikropipet, ambil cairannya dan masukkan ke dalam sumur agarose gel
- c. Tutup tangki elektroforesis setelah sampel dimasukkan ke dalam sumur, kemudian nyalakan arus listrik (hati-hati, tegangan listriknya cukup kuat). Selanjutnya, prosedur elektroforesis dapat dimulai.
- d. Jumlah gel agarosa, tegangan arus listrik, dan ukuran molekul DNA semuanya mempengaruhi berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk elektroforesis. Untuk mendemonstrasikan prosedur elektroforesis diperlukan listrik sebesar 100 volt. Karena ukuran fragmen DNA yang dianalisis berkisar antara 50 hingga 2000 pasangan basa, prosedur elektroforesis memakan waktu sekitar 30 menit.
- e. Setelah prosedur elektroforesis selesai, lepaskan baki sambil

mengenakan sarung tangan dan matikan arus listrik. Setelah gel dimasukkan ke dalam UV transilluminator, carilah pita molekul DNA.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan
 - a. Data primer. Data primer yang digunakan pada penelitian ini yaitu hasil pemeriksaan *sampel lawar plek* di Desa Ketewel.
 - b. Data sekunder. Data sekunder dalam penelitian ini berupa jenis data dari studi literature yang telah tercatat dan dipublikasikan dari beberapa sumber beserta artikel, buku terkait.

2. Teknik pengumpulan data

Data penelitian ini diperoleh dari survey pedagang *lawar plek* di Desa Ketewel dengan cara pengambilan sampel *lawar plek* ke pedagang – pedagang di sekitar Desa Ketewel. Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan dengan cara konvensional dan PCR di laboratorium Poltekkes Denpasar

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen pengumpulan data yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- Formulir data responden, yang digunakan untuk mengumpulkan data responden berupa nama tempat makan, jenis lawar yang dijual, dan isian lawar
- Alat tulis, yang digunakan untuk mencatat hasil wawancara responden
- Smartphone, yang digunakan untuk dokumentasi kegiatan penelitian.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data.

Proses mendapatkan rangkuman data atau angka melalui penggunaan rumus atau metodologi tertentu disebut dengan pengolahan data. Untuk memberikan panduan bagi penelitian tambahan, pemrosesan data berupaya mengubah data mentah hasil pengukuran menjadi data yang lebih tertata. (Sudjana, 2001). Teknik pengolahan data dalam penelitian ini menggunakan Microsoft Excel, di mana data yang diperoleh akan diolah di Microsoft Excel dan disajikan dalam bentuk tabel serta narasi. (Sudjana, 2001). Teknik pengolahan data dalam penelitian ini menggunakan Microsoft Excel. Dimana data-data yang akan diperoleh diolah pada Microsoft Excel dan disajikan dalam bentuk tabel serta narasi.

Proses pengolahan data yang dilakukan adalah:

- a. Editing, yaitu proses memverifikasi dan menganalisis kembali informasi yang diperoleh dari jawaban kuesioner
- b. Tabulasi, yaitu proses mengubah data ke dalam bentuk tabel dengan cara mengolah jumlah frekuensi secara manual atau mekanis untuk setiap kategori.

2. Analisis data

Dalam penelitian kuantitatif, analisis data dilakukan setelah seluruh data responden terkumpul. Statistika digunakan dalam prosedur analisis data penelitian kuantitatif. Statistik deskriptif dan statistik inferensial adalah dua bentuk statistik yang digunakan untuk menganalisis data. Pada penelitian ini dilakukan analisis data secara kuantitatif dengan design deskriptif. Statistik deskriptif adalah statistik yang digunakan untuk menganalisis data dengan cara mendeskripsikan data yang telah terkumpul. Dimana uji ini dilakukan untuk mengetahui ada dan tidak adanya bakteri pembawa gen toxin.

3. Etika penelitian

Prinsip etika penelitian terdiri dari tiga jenis yaitu:

- a. Menghormati harkat dan martabat manusia (*respect for persons*).
Memberikan penghormatan kepada manusia sebagai individu yang mempunyai hak kebebasan dalam memilih, berkehendak, serta tanggung jawab atas keputusan mereka sendiri. Pada penelitian ini responden diberikan penjelasan tentang penelitian yang dilakukan serta meminta persetujuan dengan memberikan informed consent sebagai bukti bahwa responden bersedia sebagai subyek penelitian.
- b. Berbuat baik dan tidak merugikan (*beneficence and non-maleficence*).
Melakukan kebaikan melibatkan kewajiban untuk membantu sesama dengan usaha yang sebanyak yang Anda bisa dan meminimalkan kerugian. Peneliti memberikan pembenaran atas keuntungan penelitian dan manfaat responden sebelum memulai penyelidikan. Penelitian yang dilakukan tidak memberikan pengaruh yang signifikan dan tidak menimbulkan kerugian apapun bagi partisipan. Manfaat yang diperoleh partisipan penelitian dari penelitian ini adalah kemampuan mereka dalam menjaga kualitas makanan olahan dan mencegah kontaminasi bakteri.
- c. Keadilan (*justice*). Prinsip ini menekankan kewajiban etik untuk memperlakukan individu dengan benar dan adil, serta memberikan hak-hak yang sepatutnya sesuai dengan moral dan keadilan. Pada penelitian ini, peneliti memastikan kesetaraan dalam pemeriksaan yang dilakukan terhadap responden, sehingga setiap responden memiliki peluang yang sama untuk berpartisipasi. Selain itu, peneliti juga menjaga kerahasiaan identitas

responden secara merata.