

TINGKAT PREVALENSI *ESCHERICHIA COLI* DALAM DAGING AYAM BEKU YANG DILALULINTASKAN MELALUI PELABUHAN PENYEBERANGAN MERAK

(PREVALANCE OF *ESCHERICHIA COLI* IN FROZEN CHICKEN MEAT WHICH WAS TRANSPORTED THROUGH MERAK PORT)

G.I. Dewantoro¹⁾, M.W. Adiningsih²⁾, T. Purnawarman³⁾, T. Sunartatie⁴⁾, U. Afiff⁴⁾

ABSTRACT

The aimed of this study was to determine prevalence of *Escherichia coli* in frozen chicken meat transported through Merak port. The samples were taken from DKI Jakarta (16 samples), Bekasi (11 samples), Bogor (8 samples), and Serang (18 samples). The average number of *E. coli* in frozen chicken meat from DKI Jakarta was $0.43 \times 10^1 \pm 0.28 \times 10^1$ MPN/g, Bekasi was $10.4 \times 10^1 \pm 33.04 \times 10^1$ MPN/g, Bogor was $0.28 \times 10^1 \pm 0.23 \times 10^1$ MPN/g, and Serang was $6.72 \times 10^1 \pm 25.79 \times 10^1$ MPN/g. Based on the result of ANOVA, the four areas had no significance in difference ($p > 0.05$). The conclusion of this study showed that the average number of *E. coli* from Bekasi and Serang were over the maximum limit of microbial contamination as permitted by SNI 01-7388-2009 (1×10^1 MPN/g), whereas DKI Jakarta and Bogor were under the maximum limit. The prevalence of *E. coli* in frozen chicken meat from DKI Jakarta was 31.25%, Bekasi 31.25%, Bogor 27.27%, and Serang was 27.78%.

Keywords: *Escherichia coli*, frozen chicken meat, Merak port.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat prevalensi cemaran *Escherichia coli* pada daging ayam beku yang dilalulintaskan melalui pelabuhan penyeberangan Merak. Sampel daging ayam beku diambil dari DKI Jakarta (16 sampel), Bekasi (11 sampel), Bogor (8 sampel) dan Serang (18 sampel). Hasil rata-rata jumlah cemaran *E. coli* pada daging ayam beku menunjukkan dari DKI Jakarta ($0.43 \times 10^1 \pm 0.28 \times 10^1$ MPN/g), Bekasi ($10.4 \times 10^1 \pm 33.04 \times 10^1$ MPN/g), Bogor ($0.28 \times 10^1 \pm 0.23 \times 10^1$ MPN/g) dan Serang ($6.72 \times 10^1 \pm 25.79 \times 10^1$ MPN/g). Berdasarkan *analysis of variant* (ANOVA), jumlah cemaran *E. coli* dari keempat daerah tersebut menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa rata-rata jumlah cemaran *E. coli* pada daging ayam beku dari Bekasi dan Serang melebihi batas maksimum cemaran mikroba menurut SNI 01-7388-2009 ($> 1 \times 10^1$ MPN/g), sedangkan daging ayam beku dari DKI Jakarta dan Bogor di bawah batas maksimum cemaran mikroba. Tingkat prevalensi cemaran *E. coli* pada daging ayam beku dari DKI Jakarta, Serang, Bekasi dan Bogor berturut-turut adalah 31.25%, 29.78%, 27.27% dan 12.50%.

Kata kunci: *Escherichia coli*, daging ayam beku, Pelabuhan Merak.

PENDAHULUAN

Permintaan pangan hewani (daging, telur dan susu) dari waktu ke waktu cenderung meningkat sejalan dengan pertumbuhan penduduk, perkembangan ekonomi, perubahan pola hidup,

peningkatan kesadaran akan gizi dan perbaikan pendidikan masyarakat (Djaafar dan Rahayu 2007) Saat ini konsumsi daging nasional didominasi oleh karkas atau daging ayam. Konsumsi daging ayam diproyeksikan meningkat sebanyak 2.14% per tahun, dibandingkan dengan daging sapi yang hanya 2.02% per tahun dalam periode 2009-2014 (Reni *et al.*, 2009).

Adanya peningkatan permintaan daging ayam berdampak pada kasus penyebaran penyakit yang berasal dari pangan asal hewan ke manusia atau *foodborne disease*. Salah satu faktor terjadinya penyebaran penyakit melalui daging ayam akibat perdagangan antar wilayah atau daerah. Terkait hal

¹⁾ Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

²⁾ Instalasi Karantina Kelas 2, Cilegon, Badan Karantina Pertanian.

³⁾ Dep. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

⁴⁾ Dep. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

tersebut, pelabuhan penyeberangan berperan dalam peredaran daging ayam antar pulau, sehingga keberadaan Balai Karantina Pertanian di pelabuhan sangat penting. Pelabuhan penyeberangan Merak merupakan salah satu pelabuhan di pulau Jawa. Pasokan daging ayam yang didistribusikan melalui pelabuhan penyeberangan Merak sebagian besar berasal dari Jakarta, Bogor, Serang dan Bekasi. Jawa Barat merupakan daerah pemasok daging ayam terbesar di Indonesia (Bappenas, 2010)

Untuk mendapatkan daging ayam atau produk olahannya yang berkualitas adalah dengan memenuhi persyaratan kualitas produk unggas yang ditetapkan oleh Badan Standardisasi Nasional. Salah satu persyaratan kualitas produk unggas adalah bebas mikroba patogen seperti *Salmonella* sp. dan *Campylobacter* sp., sedangkan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* tidak diperbolehkan melebihi batas maksimum cemaran mikroba pada daging ayam (SNI, 2009).

Cemaran mikroba patogen pada daging ayam maupun produk olahannya dapat menyebabkan berbagai penyakit bagi manusia yang mengkonsumsinya. Daging ayam dapat terkontaminasi mikroba patogen akibat menggunakan air dari sanitasi yang buruk untuk proses pemotongan maupun pengolahan daging ayam (Nugroho, 2005).

Sanitasi yang buruk dapat diindikasikan dengan keberadaan bakteri indikator, seperti *E. coli*. *E. coli* merupakan mikroflora normal pada saluran pencernaan dan sering ditemukan dalam air akibat kontaminasi feses hewan atau manusia (Kornacki dan Johnson, 2001). Keberadaan mikroba patogen, seperti *E. coli* pada daging ayam dapat menyebabkan kekhawatiran masyarakat akan bahayanya jika mengonsumsi daging ayam.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat prevalensi cemaran *E. coli* di atas batas maksimum cemaran mikroba pada daging ayam beku yang dilalulintaskan melalui pelabuhan penyeberangan Merak.

BAHAN DAN METODE

Sampel

Sampel berupa daging ayam beku yang dilalulintaskan melalui pelabuhan penyeberangan Merak. Menurut Thursfield (2005), jumlah sampel daging ayam beku yang diuji ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$N = \frac{4.PQ}{L^2}$$

Keterangan:

n = besaran sampel yang digunakan

P = asumsi prevalensi

Q = (1-P)

L = galat yang diinginkan

Dengan tingkat konfidensi 95% dan galat yang diinginkan 0.05 serta asumsi prevalensi untuk *E. coli* 3.4%, maka didapat:

$$\begin{aligned} n &= \frac{4 \times 0.034 \times 0.966}{(0.05)^2} \\ &= 53 \text{ sampel.} \end{aligned}$$

Sebanyak 53 sampel daging ayam beku yang diambil berasal dari daerah DKI Jakarta (16 sampel), Bekasi 11 sampel, Bogor 8 sampel dan Serang 18 sampel.

Metode Penelitian

Metode pengujian yang dilakukan mengacu pada *Bacteriological Analytic Manual, Food and Drug Administration, OAC International (BAM 2006)* dan SNI 01-2897-2008 tentang metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya (SNI 2008).

Uji Dugaan

Sebanyak 25 g sampel dimasukkan ke dalam plastik steril, kemudian ditambahkan 225 ml larutan *buffered phosphat water* (BPW) 0.1% (pengenceran 10^{-1}) dan di-*stomacher* selama 1-2 menit dengan kecepatan 230 rpm. Sebanyak 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} dipindahkan dengan pipet steril ke dalam 9 ml larutan BPW 0.1%. (pengenceran 10^{-2}). Pengenceran 10^{-3} didapatkan dengan cara yang sama, seperti untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} , yaitu 1 ml suspensi pengenceran 10^{-2} dipindahkan ke dalam 9 ml larutan BPW 0.1%. Selanjutnya, sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} diambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *lauryl tryptose broth* (LTB) dan tabung durham. Setiap pengenceran dimasukkan ke dalam 3 tabung LTB (*triplo*) dan diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 48±2 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gas di dalam tabung durham.

Uji Penegasan

Biakan positif pada uji pendugaan dipindahkan dengan menggunakan *ose* ke dalam tabung yang berisi *Escherichia coli* broth (EC broth) dan tabung Durham, kemudian diinkubasikan pada suhu 45°C selama 48±2 jam. Gas yang terbentuk merupakan hasil positif. Dari tabung EC broth yang positif, dibuat goresan pada agar *levine-eosin methilin blue* (L-EMB). Biakan pada agar L-EMB diinkubasikan pada suhu 36±1 °C selama 18-24 jam. Koloni tersangka diperhatikan yaitu warna hitam/gelap pada bagian pusat koloni dengan/tanpa warna metalik kehijauan. Dengan menggunakan *ose*, koloni tersangka diambil dari masing-masing agar L-EMB dan dipindahkan ke agar miring *plate count agar* (PCA) untuk pengujian biokimia. Agar miring tersebut diinkubasikan pada suhu 36±1 °C selama 18-24 jam. Selanjutnya, diuji dengan menggunakan uji Indol, *Methyl Red*, *Voges Proskauer* dan Citrat (IMViC) sebagai uji penegasan.

Analisis Data

Data yang dihasilkan dari penelitian ini dianalisis secara deskriptif dan menggunakan *one-way analysis of variant* (ANOVA) untuk membandingkan jumlah *E. coli* pada daging ayam beku dari tiap daerah asal (Mattjik dan Sumertajaya, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian rata-rata jumlah *E. coli* dan log rata-rata jumlah *E. coli* pada 53 sampel daging ayam beku dari keempat daerah asal pengambilan sampel ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Menurut SNI 01-7388-2009 tentang Batas Maksimum Cemar Mikroba dalam Pangan, bahwa batas maksimum cemaran mikroba (BMCM) *E. coli* yang diperbolehkan ada pada daging ayam beku adalah kurang dari 1x10¹ MPN/g. Hanya sampel daging ayam beku yang berasal dari Bekasi (10.4x10¹±33.04x10¹ MPN/g) dan Serang (6.72x10¹±25.79x10¹ MPN/g) memiliki rata-rata jumlah *E. coli* di atas BMCM. Namun, rata-rata jumlah *E. coli* dari keempat daerah asal pengambilan sampel (total sampel) berada di atas BMCM *E. coli* yang diperbolehkan ada pada daging ayam beku.

Hasil uji ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) dari keempat daerah pengambilan sampel. Hal tersebut menunjukkan, bahwa daerah pengambilan sampel daging ayam beku bukan merupakan faktor yang menyebabkan terjadinya kontaminasi cemaran *E. coli*, tetapi

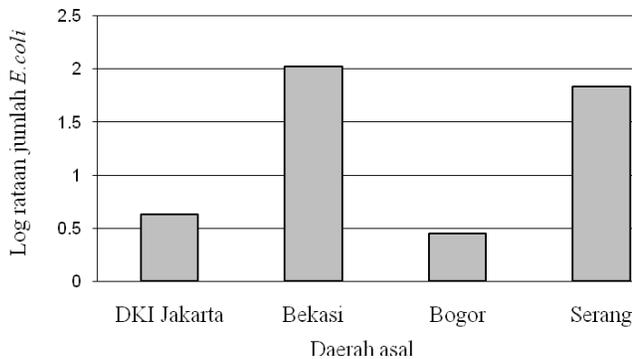
terdapat faktor lainnya, misalnya masalah sanitasi dan higiene.

Tingkat prevalensi cemaran *E. coli* pada daging ayam beku dari tiap daerah asal dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 2. Secara berurutan tingkat prevalensi cemaran *E. coli* pada daging ayam beku dari yang tertinggi hingga terendah, yaitu : DKI Jakarta (31.25%), Serang (27.78%), Bekasi (27.27% dan Bogor (12.50%). Tabel 1. menunjukkan bahwa DKI Jakarta memiliki rata-rata jumlah *E. coli* pada daging ayam beku di bawah BMCM, akan tetapi pada Tabel 2 menunjukkan DKI Jakarta memiliki tingkat prevalensi tertinggi (31.25%). Hal ini dapat dijelaskan, bahwa faktor yang mempengaruhi tingginya tingkat prevalensi pada daging ayam beku bukan akibat rendah atau tingginya rata-rata jumlah *E. coli*. Faktor yang mempengaruhi tingkat prevalensi adalah banyaknya sampel yang memiliki cemaran melebihi 1x10¹ MPN/g (positif *E. coli*), karena tingkat prevalensi merupakan jumlah sampel yang positif *E. coli* berbanding jumlah sampel daging ayam beku yang diuji dikalikan 100%.

Hasil penelitian tentang jumlah *E. coli* pada daging ayam beku yang telah dilakukan, ternyata tidak jauh berbeda dengan yang telah dilakukan oleh Setiowati dan Mardiasuti. Setiowati dan Mardiasuti (2009) menyatakan, bahwa sebanyak 28% sampel daging ayam dari pasar tradisional dan swalayan di DKI Jakarta yang diuji pada tahun 2006 sampai 2009, melebihi BMCM *E. coli* yang diperbolehkan SNI. Hal tersebut menunjukkan bahwa masih rendahnya higiene dan buruknya sanitasi di tempat pemotongan maupun saat pengolahan atau pengemasan daging ayam di DKI Jakarta.

Hasil penelitian Ardana *et al.* (2006) tentang jumlah cemaran *E. coli* pada daging ayam yang berasal dari Bali, NTB, dan NTT pada tahun 2003 sampai 2004, menyebutkan bahwa 19.6% sampel yang diuji melebihi BMCM yang diperbolehkan SNI No.01-6366-2000 tahun 2001 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan. Adanya cemaran *E. coli* diduga berasal dari rumah potong unggas (RPU). Pencemaran mikroba yang tinggi di RPU sangat dimungkinkan karena sebagian besar kondisi RPU yang ada tidak memenuhi persyaratan higiene dan sanitasi lingkungan.

E. coli yang mencemari daging ayam umumnya berasal dari ruangan, peralatan maupun meja tempat pemotongan ayam, serta air yang digunakan selama proses pemotongan hingga pengolahan daging ayam. Selain itu, peningkatan jumlah *E. coli* juga dipengaruhi oleh faktor intrinsik dari produk pangan tersebut (Nugroho, 2005).



Gambar 1. Diagram batang log rata-rata jumlah *E. coli* dari tiap daerah asal.

ke karkas serta dari alat pencabut bulu. Jumlah *E. coli* pada kulit ayam akan meningkat selama proses pencabutan bulu (Lukman, 2010).

Tingginya jumlah *E. coli* pada sampel daging ayam beku dari daerah DKI Jakarta, Bekasi, dan Serang menunjukkan adanya kontaminasi. Adanya kontaminasi *E. coli* pada daging ayam dimungkinkan akibat penggunaan air yang sudah tercemar *E. coli*. Air tersebut digunakan dalam kegiatan di peternakan, tempat pemotongan, tempat pengolahan hingga dihidangkan di atas meja (Nugroho, 2005).

Tabel 1. Rataan jumlah dan log rata-rata jumlah *E. coli* pada daging ayam beku dari tiap daerah asal.

Asal daerah	Jumlah sampel	Rataan jumlah <i>E. coli</i> (MPN/g)	Log rata-rata jumlah <i>E. coli</i> (MPN/g)
DKI Jakarta	16	$0.43 \times 10^1 \pm 0.28 \times 10^1$ ^a	0.63 ± 0.45
Bekasi	11	$10.4 \times 10^1 \pm 33.04 \times 10^1$ ^a	2.02 ± 2.52
Bogor	8	$0.28 \times 10^1 \pm 0.23 \times 10^1$ ^a	0.45 ± 0.36
Serang	18	$6.72 \times 10^1 \pm 25.79 \times 10^1$ ^a	1.83 ± 2.41
Total	53	$4.61 \times 10^1 \pm 21.08 \times 10^1$	0.23 ± 0.38

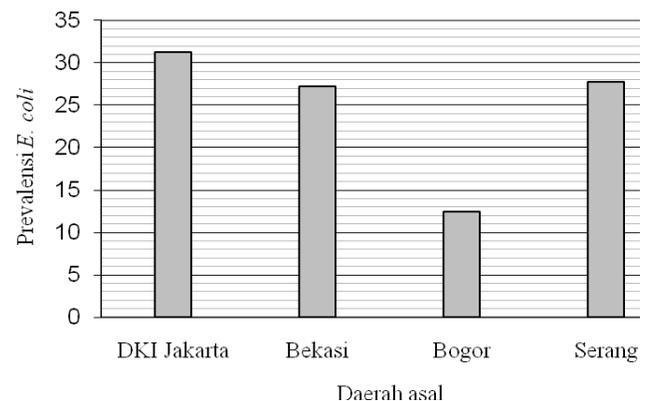
Keterangan: huruf superscript yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0.05$).

Tabel 2. Tingkat prevalensi *E. coli* pada daging ayam beku dari tiap daerah asal.

Asal daerah	Jumlah sampel	Jumlah sampel positif	Tingkat prevalensi (%)
DKI Jakarta	16	5	31.25
Bekasi	11	3	27.27
Bogor	8	1	12.50
Serang	18	5	27.78
Total	53	14	24.70

Keterangan: Menurut SNI 01-7388-2009, sampel positif ditunjukkan jika jumlah *E. coli* > 1×10^1 MPN/g.

Nugroho (2005) menambahkan, bahwa tahap-tahap yang berpotensi terjadinya kontaminasi silang mikroba pada pemrosesan karkas ayam di RPU dapat terjadi pada saat penyembelihan, *scalding* dan pencabutan bulu, pengeluaran jeroan, pendinginan, *grading*, dan pemotongan. Organ jeroan terutama usus merupakan habitat dari *E. coli*, sehingga *E. coli* dapat mencemari daging jika daging ayam tersebut kontak dengan isi usus ayam dan tangan pegawai yang mengolah daging tersebut. Pada proses pencabutan bulu dapat terjadi penyebaran kontaminasi (kontaminasi silang) mikroba dari karkas



Gambar 2. Tingkat prevalensi *E. coli* pada daging ayam beku dari tiap daerah asal.

Menurut Djaja (2008), tingkat kontaminasi makanan oleh *E. coli* di DKI Jakarta diakibatkan oleh beberapa faktor, antara lain akibat kontaminasi air (12.9%) dan kontaminasi tangan (12.5%). Hal tersebut membuktikan bahwa faktor sanitasi dan penanganan yang kurang baik merupakan faktor terjadinya kontaminasi *E. coli* di tempat pengolahan produk pangan.

Persyaratan higiene sangat penting dalam usaha pemotongan ayam, antara lain kebersihan

bangunan, perlengkapan, dan peralatan yang digunakan, agar tidak menjadi sumber kontaminasi pada daging ayam. Tata laksana sanitasi meliputi pembersihan dengan menggunakan detergen dan desinfektan. Umumnya desinfektan dikombinasikan dengan detergen untuk membersihkan ruangan maupun peralatan RPU. Dalam menghasilkan daging ayam, produsen dan pengolah diharapkan dapat menerapkan cara-cara berproduksi yang baik atau *good manufacture practices* (GMP) dan penerapan sistem keamanan pangan atau *hazard analysis critical control point* (HACCP), sehingga daging ayam yang dihasilkan aman dan sehat dikonsumsi (Abubakar 2003).

KESIMPULAN

Rataan jumlah *E. coli* pada daging ayam beku yang berasal dari Bekasi ($10.4 \times 10^1 \pm 33.04 \times 10^1$ MPN/g) dan Serang ($6.72 \times 10^1 \pm 25.79 \times 10^1$ MPN/g) melebihi batas maksimum cemaran *E. coli* yang diperbolehkan SNI 01-7388-2009. Rataan jumlah *E. coli* pada daging ayam beku yang berasal dari DKI Jakarta ($0.43 \times 10^1 \pm 0.28 \times 10^1$ MPN/g) dan Bogor ($0.28 \times 10^1 \pm 0.23 \times 10^1$ MPN/g) di bawah batas maksimum cemaran *E. coli* yang diperbolehkan SNI 01-7388-2009.

Tingkat prevalensi cemaran *E. coli* melebihi BMCM yang diperbolehkan SNI 01-7388-2009 pada sampel daging ayam beku asal daerah DKI Jakarta, Bekasi, Bogor dan Serang berturut-turut adalah sebesar 31.25%, 27.27%, 12.50% dan 27.78%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar. 2003. Mutu Karkas Ayam Hasil Pemotongan Tradisional dan Penerapan Sistem Hazard Analysis Critical Control Point. J Litbang Pertanian 22: 33-39.
- Ardana, I.G.P.S., Handayani, Dewi, A.A.S., Riti, N. 2005. Cemara Mikroba dan Residu Antibiotika pada Produk Asal Hewan di Provinsi Bali, NTB, dan NTT tahun 2003-2004. www.bppv.or.id [1 Agustus 2010].
- [BAM] Bacteriological Analytical Manual. 2006. Food and Drug Administration. AOAC International.
- [Bappenas] Badan Perencanaan dan Pembangunan Nasional. 2010. Data Peternakan Unggas 2009. www.bappenas.go.id [1 Juli 2010].
- Djaafar, T.F., Rahayu, S. 2007. Cemaran Mikroba pada Produk Pertanian, Penyakit yang Ditimbulkan dan Pencegahannya. J Litbang Pertanian 26: 67-75.
- Djaja, I.M. 2008. Kontaminasi *E. coli* pada Makanan dari Tiga Jenis Tempat Pengelolaan Makanan (TPM) di Jakarta Selatan 2003. Makara, Kesehatan 12: 36-41.
- Kornacki, J.L., Johnson, J.L. 2001. Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators. Di dalam: Downes FP, Ito K, editor. Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. Ed ke-4. Washington DC: American Public Health Association. hlm 69-82.
- Lukman, D.W. 2010. Higiene Pangan dan Kesmavet. <http://higiene-pangan.blogspot.com/2010/02/mikrobiologi-daging.html> [1 Agustus 2010].
- Mattjik, A.A., Sumertajaya, I.M. 2002. Perancangan Percobaan. Jilid I. Ed ke-2. Bogor: IPB Pr.
- Nugroho, W.S. 2005. Aspek Kesehatan Masyarakat Veteriner Staphylococcus Bakteri Jahat yang Sering Disepelekan. <http://weesnugroho.staff.ugm.ac.id> [1 Agustus 2010].
- Prima, I.B. 2009. Manajemen Bisnis di Rumah Pemotongan Unggas (RPU). <http://duniaveteriner.com> [6 Oktober 2010].
- Rahardjo, A.H.D., Santoso, B.S. 2005. Kajian terhadap Kualitas Karkas Broiler yang Disimpan pada Suhu Kamar Setelah Perlakuan Pengukusan. JAP 7: 1-5.
- Reni, et al., 2009. Model Proyeksi Jangka Pendek Permintaan dan Penawaran Komoditas Pertanian Utama. Jakarta : Pusat Analisis Sosial Ekonomi dan Kebijakan Pertanian, Departemen Pertanian.
- Setiowati, W.E., Mardiatuty, E. 2009. Tinjauan Bahan Pangan Asal Hewan yang ASUH berdasarkan Aspek Mikrobiologi di DKI Jakarta. Prosiding PPI Standardisasi 2009; Jakarta, 19 Nov 2009. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional Indonesia. hlm 1-11.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2008. Metode Pengujian Cemaran Mikroba dalam Daging, Telur dan Susu, serta Hasil Olahannya. SNI

- 01-2897-2008. Jakarta : Dewan Standardisasi Nasional.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2009. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan. SNI 01-7388-2009. Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- Thrusfield, M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. Ed ke-3. London: Blackwell Publisher Company.
- Thompkin, R.B., McNamara, A.M., Acuff, G.R. 2001. Meat and Poultry Products. Di dalam Downes PF, Ito K, editor. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. Ed ke-4. Washington DC: American Public Health Association. hlm 463-471.