

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dengan menggunakan studi deskriptif. Penelitian ini meneliti bagaimana kualitas air pada sumber mata air dengan parameter mikrobiologi (*Escherichia coli*) di kecamatan suboh.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Untuk lokasi penelitian dilakukan di laboratorium mikro Poltekkes Kemenkes Malang. Sedangkan untuk waktu penelitian terbagi atas dua tahap yaitu persiapan dan tahap pelaksanaan. Tahap persiapan dilaksanakan pada bulan Oktober 2021 – januari 2022. Tahap pelaksanaan penelitian dilaksanakan pada bulan maret 2022.

3.3. Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Lactose Broth* Tunggal (LB), *Lactose Broth* Ganda, Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB), *Eosin Metilen Blue* (EMB), dan aquades serta sampel air. Pada penelitian ini menggunakan 3 sampel. Pengambilan sampel dilakukan pada tiga tempat sumber mata air yang berbeda di kecamatan suboh dengan kode mata air A, mata air B dan mata air C.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Tabung reaksi, Inkubator 37 °C, Tabung durham, pipet ukur 10.0 ml, pipet ukur 1,0 ml, mikropipet 0,1 ml serta autoklaf, cawan petri, ose bulat, bunsen, rak tabung, erlenmeyer dan beaker glass, lemari es, kompor listrik dan laminar air flow.

3.4. Variabel

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu air yang berasal dari sumber mata air yang akan diuji kualitasnya.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kualitas air pada sumber mata air.

3.5. Definisi Operasional Variabel

| Variabel | DO | Alat ukur | Cara ukur | Skala ukur | Hasil |
|-----------------------------------|---|------------------|---|------------|---|
| Kualitas air pada sumber mata air | Uji Kualitas air sumber mata air dengan mengetahui ada tidaknya bakteri | Uji mikrobiologi | Metode MPN -Uji penduga -Uji konfirmasi -Uji pelengkap | Rasio | Jumlah tabung positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas pada tabung durham |
| | | | | | Jumlah tabung negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham. |

3.6. Prosedur Penelitian Metode MPN

3.6.1. Pengambilan sampel

Menyiapkan alat dan bahan, seperti botol sampel steril, spritus, dan kertas label. Membuka penutup botol sampel lalu melewati api pada mulut botol sampel. Memasukkan sampel air sampai kira-kira 300 ml. Melewatkan lagi api pada mulut botol sampel. Menutup rapat botol sampel dan memberikan label dengan mencantumkan Nama sampel, Nama petugas pengambilan sampel, Tanggal dan jam pengambilan sampel. Menyimpan sampel pada kotak sampel yang sudah disediakan. (Kamaliyah, 2017)

Pengambilan sampel

- Menyiapkan alat yang akan digunakan yaitu botol steril, spritus, dan kertas label.
- Membuka tutup botol dan melewati api pada mulut botol sampel
- Mengambil sampel air sampai kira-kira 300 ml
- Melewatkan lagi api pada mulut botol sampel dan menutup botol
- Dan memberikan label dengan mencantumkan Nama sampel, Nama petugas pengambilan sampel, Tanggal dan jam pengambilan sampel .
- Menyimpan sampel pada kotak sampel yang sudah disediakan

3.6.2. Pembuatan media

a. Lactose Broth (LB)

Ditimbang media Lactose Broth sebanyak 13 gram, lalu dimasukkan ke dalam beaker glass yang sudah diberi label. Dilarutkan dengan air suling sebanyak 1 liter. Dicek pH, bila terlalu basa ditambahkan HCl dan bila terlalu asam ditambahkan NaOH. Dimasukkan 9 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham. Disterilkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 15 Past pada suhu 121°C selama 15 menit.

Lactose Broth (LB)

- Ditimbang media Lactose Broth sebanyak 13 gram dan dimasukkan ke dalam beaker glass
- Dilarutkan dengan air suling sebanyak 1 liter kemudian dipanaskan hingga larut
- Dipipet 9 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham.
- Disterilkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 15 Past pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media Lactose Broth (LB)

b. Lactose Broth Double Strength (Lactose Broth Ganda/LBDS)

Ditimbang media Lactose Broth sebanyak 39 gram. Lalu, dimasukkan ke dalam beaker glass. Kemudian, ditambahkan aquades sebanyak 1 liter. Dipanaskan sampai larut sempurna di atas Hot Plate. Kemudian, dimasukkan ke dalam tabung reaksi 16 x 160 mm sebanyak 9 ml (lengkap dengan tabung durham). Lalu disterilkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Lactose Broth Double Strength (LBDS)

- Ditimbang media Lactose Broth sebanyak 39 gram dan dimasukkan ke dalam beaker glass
- Dilarutkan dengan air suling sebanyak 1 liter kemudian dipanaskan hingga larut
- Dipipet 9 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham.
- Disterilkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 15 Psi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media Lactose Broth Double Strength

c. Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)

Ditimbang media Brilliant Green Lactose Broth sebanyak 40 gram lalu dimasukkan ke dalam beaker glass. Dilarutkan dalam 1 liter aquades. Dimasukkan magnetic stirrer. Dipanaskan di atas hot plate sampai larut. Dimasukkan 9 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham. Disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)

- Ditimbang media Brilliant Green Lactose Broth sebanyak 40 gram lalu dimasukkan ke dalam beaker glass.
- Dilarutkan dalam 1 liter akuades. Dimasukkan magnetic stirrer.
- Dipanaskan diatas hot plate hingga larut.
- Dimasukkan 9 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham.
- Disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

Media Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)

d. Eosin Methylene Blue (EMB)

Ditimbang sebanyak 37,5 gram bubuk media Eosin Methylen Blue (EMB). Dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Dilarutkan dengan aquades sebanyak 1 liter, dimasukkan magnetic stirrer. Dilakukan pemanasan hingga mendidih untuk melarutkan media. Disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Menunggu hingga suhu hangat dan tidak terlalu panas (45°C-50°C), kemudian dihomogenkan. Dituang ke dalam cawan petri steril.

Eosin Methylene Blue (EMB)

- Ditimbang sebanyak 37,5 gram bubuk media Eosin Methylen Blue (EMB). Dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
- Dilarutkan dengan aquades sebanyak 1 liter, dimasukkan magnetic stirrer.
- Dipanaskan hingga mendidih dan media larut.
- Disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Menunggu hingga suhu hangat dan tidak terlalu panas (45°C-50°C),
- Dituang ke dalam cawan petri steril di laminar air flow

Media Eosin Methylene Blue (EMB)

3.6.3. Prosedur pengujian

a. Uji penduga

Uji penduga adalah uji pertama yang dilakukan, dengan menginokulasi sampel ke dalam media LB. Pertama memasukkan sampel sebanyak 10 mL, 1 mL, dan 0,1 mL ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 tabung sehingga total tabung reaksi adalah 9 yang masing-masing tabung telah berisi 9 mL media LB Ganda untuk sampel 10 mL, tabung berisi 9 mL media LB untuk sampel 1 mL dan 0,1 mL yang setiap tabung telah berisi tabung durham. Kemudian tabung diberikan label sesuai jumlah sampel. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dan setelah inkubasi diamati perubahannya. Hasil positif terdapat bakteri ditunjukkan dengan terbentuknya gas pada tabung durham.

Uji penduga

- Memasukkan sampel air sebanyak 10 mL ke dalam 3 tabung reaksi yang berisi 9 ml media LB Ganda
- Dan memasukkan sampel air sebanyak 1 mL ke dalam 3 tabung reaksi yang berisi 9 ml media LB Ganda
- Memasukkan sampel air sebanyak 0,1 mL ke dalam 3 tabung reaksi yang telah berisi 9 ml media LB Ganda
- Dan tabung reaksi diberi label
- Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dan setelah inkubasi diamati perubahannya

Positif apabila terdapat gas dalam tabung durham

b. Uji konfirmasi

Hasil positif pada uji pendugaan terbentuk gas pada tabung durham. Selanjutnya dilakukan uji konfirmasi. Sampel dari media lactose broth dipindah sebanyak 100 mikroliter ke dalam tabung yang sudah berisi media BGLB (*Brilliant Green Lactose Broth*) serta tabung durham. Dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Hasil yang positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas pada tabung

durham. Setelah itu jumlah tabung yang positif dicocokkan pada tabel MPN.

Uji konfirmasi

- Menginokulasi dengan memipet sampel dari media LB ganda dan LB yang positif sebanyak 100 mikro kedalam media BGLB
- Kemudian diinkubasi pada 37° C selama 24 jam
- Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gas pada tabung durham
- Dan dicocokkan dengan tabel MPN

Tabel MPN

c. Uji pelengkap

Pada pengujian ini diambil satu ose suspensi bakteri dari media BGLB kemudian ditumbuhkan pada media agar atau *Eosin Methylen Blue* (EMB) untuk melihat kenampakan koloni. Menginkubasi bakteri pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Jika koloni berwarna hijau metalik maka bakteri tersebut kemungkinan adalah bakteri *Escherichia coli*.

Uji pelengkap

- Mengambil satu ose dari media BGLB yang positif
- Meng inokulasi ke media EMB dengan cara digores
- Menginkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam
- Mengamati cawan petri
- Hasil positif bakteri *Escherichia coli* pada media EMB ditunjukkan dengan koloni berwarna hijau metalik

Positif apabila koloni berwarna hijau metalik

3.6.4. Metode analisis

Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode MPN (Most Probable Number). Metode tersebut digunakan untuk memperkirakan populasi mikroorganisme yang diduga berada dalam sampel air sumber mata air di Kecamatan Suboh. Sumber mata air yang digunakan

dalam penelitian ini sebanyak 3 sampel dengan kode mata air A untuk sampel sumber mata air pertama, mata air B untuk sampel sumber mata air yang kedua dan mata air C untuk sampel sumber mata air ketiga. Perhitungan metode MPN dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif yaitu yang ditumbuhi oleh mikroba setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu atau dilihat dari timbulnya kekeruhan/ terbentuknya gas dalam tabung durham. Setelah itu jumlah tabung yang positif dicocokkan pada tabel MPN. Tabel MPN yang digunakan yaitu 3 tabung.

3.6.5. Pengolahan, Penyajian dan Analisis data

Data diperoleh dari hasil uji atau pemeriksaan di laboratorium. Data disajikan dalam bentuk tabel data. Tabel data berisikan sampel, angka tabung positif dan indek per 100 ml sampel. Berikut adalah tabel pembanding.

Table 3.1. Hasil Uji Penduga pada sampel air sumber mata air menggunakan media LB Ganda dan LB

| No | Kode sampel | Hasil pengamatan tabung positif | | | | | | | | | Jumlah tabung Positif |
|----|-------------|---------------------------------|---|---|------------|---|---|---------------|---|---|-----------------------|
| | | LB Ganda | | | LB | | | LB | | | |
| | | Tabung 10 ml | | | Tabung 1ml | | | Tabung 0,1 ml | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | |
| 1. | A1 | | | | | | | | | | |
| | A2 | | | | | | | | | | |
| 2. | B1 | | | | | | | | | | |
| | B2 | | | | | | | | | | |
| 3. | C1 | | | | | | | | | | |
| | C2 | | | | | | | | | | |

Table 3.2. Hasil Uji Konfirmasi pada sampel air sumber mata air menggunakan media BGLB

| No | Kode sampel | Hasil pengamatan tabung positif | | | | | | | | | Jumlah tabung Positif |
|----|-------------|---------------------------------|---|---|------------|---|---|---------------|---|---|-----------------------|
| | | BGLB | | | BGLB | | | BGLB | | | |
| | | Tabung 10 ml | | | Tabung 1ml | | | Tabung 0,1 ml | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | |
| 1. | A1 | | | | | | | | | | |
| | A2 | | | | | | | | | | |
| 2. | B1 | | | | | | | | | | |
| | B2 | | | | | | | | | | |
| 3. | C1 | | | | | | | | | | |
| | C2 | | | | | | | | | | |

Table 3.3. Hasil Total bakteri *E.Coli* dari aspek uji MPN

| No | Kode Sampel | Jumlah tabung positif | | | Indek MPN/100 ml | Keterangan |
|----|-------------|-----------------------|------|--------|------------------|------------|
| | | 10 ml | 1 ml | 0,1 ml | | |

| | |
|----------|----|
| 1 | A1 |
| 2 | A2 |
| 3 | B1 |
| 4 | B2 |
| 5 | C1 |
| 6 | C2 |

Table 3.4 Hasil Uji Pelengkap pada sampel air sumber mata air menggunakan media EMB

| No | Tabung | Kode sampel | | | | | |
|-----------|---------------|--------------------|----|----|----|----|----|
| | | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 |
| 1 | 10 ml | | | | | | |
| 2 | 1 ml | | | | | | |
| 3 | 0,1 ml | | | | | | |