

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan merupakan jenis deskriptif yang dilakukan dengan eksperimental terhadap bakteri *Coliform*. Pada penelitian ini, peneliti ingin mengetahui apakah kualitas air tiga DAMIU di Kelurahan Cangkring Malang, Kabupaten Pasuruan memenuhi persyaratan mikrobiologi dengan menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada 21 Maret sampai 7 April 2022.

3.2.2 Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi di Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Populasi sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh DAMIU yang ada di Kelurahan Cangkring Malang, Kabupaten Pasuruan.

Sampel dalam penelitian ini adalah tiga unit usaha DAMIU yang berlokasi di Desa Nyangkring RT.03, Desa Jodokan RT.03, Desa Selorawan RT.03 di Kelurahan Cangkring Malang, Kabupaten Pasuruan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol gelap, erlenmeyer, beaker glass, inkubator 35°C dan 44°C, oven, pipet ukur, mikropipet, tip mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pembakar bunsen, autoklaf, cawan

petri, tabung durham, ose bulat, kaca arloji, spatula, batang pengaduk, botol semprot, hot plate, ice box.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Media LB (*Lactose Broth*), Media EMB (*Eosin Methylene Blue*), akuades, alkohol, kapas, aluminium foil.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah air minum isi ulang di Kelurahan Cangkring Malang, Kabupaten Pasuruan.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan bakteri *Coliform* pada air minum isi ulang menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*).

3.6 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Skala Ukur	Hasil
Kualitas air minum isi ulang	Uji kualitas air minum isi ulang memenuhi persyaratan mikrobiologi atau tidak	Parameter mikrobiologi	Metode MPN (<i>Most Probable Number</i>)	Rasio	Hasil positif pada uji penduga ditandai dengan terbentuknya gelembung gas di dalam tabung durham dan asam (keruh) pada media.
					Hasil positif pada uji konfirmasi ditandai dengan terbentuknya koloni bakteri <i>Coliform</i> yang menunjukkan warna merah muda atau hijau metalik pada media EMB agar (James G. Cappuccino, 2013).

3.7 Metode Penelitian

3.7.1 Pengambilan sampel

Menyiapkan alat dan bahan, seperti botol gelap steril, spritus, dan kertas label. Membuka penutup botol sampel, kemudian melewati api pada mulut botol sampel. Mensterilkan mulut kran pengisian menggunakan alkohol. Memasukkan sampel air sampai kira-kira 200 ml. Melewatkan api pada mulut botol sampel. Menutup rapat botol sampel dan memberikan label. Menyimpan sampel pada kotak sampel yang sudah disediakan (Kamaliah, 2017).

3.7.2 Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi merupakan suatu proses untuk menghilangkan atau mematikan semua jenis mikroorganisme yang terdapat pada suatu benda. Pada penelitian ini sterilisasi yang digunakan ada dua yaitu, sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Alat dan media yang digunakan untuk pengujian dilakukan sterilisasi basah dengan bantuan alat autoklaf dengan waktu 15 menit pada suhu 121°C. Alat yang dilakukan sterilisasi basah seperti alat yang tidak tahan panas diantaranya seperti tip mikropipet dan botol gelap. Pada sterilisasi kering alat yang digunakan adalah oven dengan waktu 60 menit pada suhu 180°C. Alat yang dilakukan sterilisasi kering seperti alat yang tahan panas. Sterilisasi bertujuan agar alat-alat dan media yang digunakan tidak terkontaminasi, sehingga bakteri yang tumbuh dalam media benar berasal dari air minum isi ulang tersebut.

3.7.3 Pembuatan Media

1. Media LBSS (*Lactose Broth Single Strength*)

Menimbang media LB sebanyak 13 gram dan memasukkan ke dalam erlenmeyer. Melarutkan dengan akuades sebanyak 1 liter, kemudian mengukur hingga pH 7,0. Dipanaskan di atas hot plate hingga larut. Memasukkan 10 ml ke dalam tabung reaksi dan diberi tabung durham dengan posisi terbalik. Mensterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit (Kamaliah, 2017).

2. Media LBDS (*Lactose Broth Double Strength*)

Menimbang media LBDS sebanyak 39 gram dan memasukkan ke dalam erlenmeyer. Melarutkan dengan akuades sebanyak 1 liter,

kemudian mengukur hingga pH 7,0. Dipanaskan di atas hot plate hingga larut. Memasukkan 10 ml ke dalam tabung reaksi dan diberi tabung durham dengan posisi terbalik. Mensterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit (Kamaliah, 2017).

3. Media EMB (*Eosin Methylene Blue*)

Menimbang media EMB sebanyak 37,5 gram dan memasukkan ke dalam erlenmeyer. Melarutkan dengan akuades sebanyak 1 liter. Dipanaskan diatas hot plate hingga larut. Mensterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Menuang media pada cawan petri steril hingga memadat (Kamaliah, 2017).

3.7.3 Pengujian Sampel

1. Uji Penduga (*Presumptive test*)

Menghomogenkan sampel air dengan cara membolak balik botol sampel sebanyak 3 kali. Memipet 10 ml sampel ke dalam tabung yang berisi LBDS 10 ml sebanyak 5 tabung. Memipet 1 ml sampel ke dalam tabung yang berisi LBSS 10 ml sebanyak 5 tabung. Memipet 0,1 ml sampel ke dalam tabung yang berisi LBSS 10 ml sebanyak 5 tabung. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam (James G. Cappuccino, 2013).

Uji penduga merupakan uji spesifik yang digunakan untuk mendeteksi bakteri *Coliform*. Pada uji penduga dilakukan dengan cara memasukkan media LB 10 ml kedalam 5 seri tabung reaksi yang masing-masing tabung diinokulasi dengan sampel air yang berbeda-beda sebanyak 10 ml, 1 ml, 0,1 ml. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin besar jumlah sampel yang dimasukkan (semakin rendah pengenceran yang dilakukan), maka semakin sering menghasilkan tabung positif yang akan muncul. Semakin kecil jumlah sampel yang dimasukkan (semakin tinggi pengenceran yang dilakukan), maka semakin jarang menghasilkan tabung positif yang akan muncul (Kamaliah, 2017).

Kemudian menambahkan 1 tabung reaksi untuk dilakukan uji kontrol dengan cara memipet 10 ml media LB dan 10 ml akuades steril yang

berfungsi untuk mengetahui apakah media yang digunakan steril dan prosesnya aseptis.

2. Uji Konfirmasi (*Confirmed Test*)

Mengambil 1 ose LB positif dan ditanam ke media EMB. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Dilihat adanya pertumbuhan koloni berwarna merah muda pekat atau hijau metalik pada media EMB, maka sampel tersebut mengandung bakteri *Coliform* (James G. Cappuccino, 2013).

Uji konfirmasi berfungsi untuk menegaskan adanya bakteri *Coliform* di dalam suatu sampel air yang menunjukkan hasil uji penduga yang positif. Uji konfirmasi dilakukan dengan cara diinokulasi dengan biakan dari tabung kaldu laktosa yang positif pada uji penduga dengan menggunakan teknik gores. Setelah diinokulasi, kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jika dalam waktu 24 jam terdapat merah muda pekat, maka sampel dinyatakan positif mengandung bakteri *Coliform*. Uji konfirmasi dilakukan inkubasi pada suhu 37°C karena berdasarkan pertumbuhan bakteri seperti golongan *Coliform* fekal dapat tumbuh secara optimal pada suhu tersebut sehingga bakteri lain tidak dapat tumbuh (Kamaliah, 2017)

3.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data diperoleh dari hasil pemeriksaan air minum isi ulang di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang berdasarkan jumlah tabung yang positif, jumlah tabung yang negatif dan indeks MPN per 100 ml sampel.

Untuk melakukan uji bakteri digunakan metode MPN (*Most Probable Number*). Uji kualitatif *Coliform* yang dilakukan terdiri dari 2 tahap yaitu uji penduga dan uji konfirmasi menggunakan metode MPN dengan 5 seri tabung pada setiap pengenceran.

3.8.2 Penyajian dan Analisis Data

Tabel 3. 1 Hasil Uji penduga pada sampel air minum isi ulang menggunakan media LB (*Lactose Broth*)

Kode Sampel	Hasil Pemeriksaan															Jumlah Sampel Positif			Hasil Indeks MPN per 100 ml Sampel
	10 ml					1 ml					0,1 ml					10 ml	1 ml	0,1 ml	
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5				
A1																			
A2																			
B1																			
B2																			
C1																			
C2																			

Keterangan :

(+) = Positif (ditandai dengan terbentuknya gelembung gas dan asam)

(-) = Negatif (ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung gas dan asam)

Tabel 3. 2 Hasil uji konfirmasi pada sampel air minum isi ulang menggunakan media EMB (*Eosin Methylen Blue*)

Kode Sampel	Hasil Pemeriksaan															Jumlah Tabung Positif Bakteri <i>Coliform</i>		
	10 ml					1 ml					0,1 ml					10 ml	1 ml	0,1 ml
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
A1																		
A2																		
B1																		
B2																		
C1																		
C2																		

Keterangan :

(+) = Positif (ditandai dengan terbentuknya koloni bakteri *Coliform* yang menunjukkan warna merah muda pekat)

(-) = Negatif (ditandai dengan tidak terbentuknya koloni bakteri)

(*) = Ditandai dengan terbentuknya koloni bakteri *Escherichia coli* yang menunjukkan berwarna hijau metalik

(x) = Tidak dilakukan pengujian