

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif dengan pendekatan analitik yaitu melakukan pemeriksaan bakteriologis untuk menganalisis adanya bakteri *Coliform* dan mendapatkan nilai *Most Probable Number* (MPN) pada limbah air akhir Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Komunal di Janti Barat Padepokan, Kota Malang.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga Mei 2023.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

- Botol sampel
- Gelas ukur 100 ml
- Pipet tetes
- Pipet ukur 10 ml
- Tabung reaksi
- Tabung durham
- Rak tabung
- Beaker glass 600 ml
- Beaker glass 250 ml
- Ose bulat
- Spatula
- Batang pengaduk
- Bola hisap
- Kaca arloji

- Mikropipet 1000 μL
- Bunsen spiritus
- LAF
- Chiller /kulkas
- Hot plate
- Timbangan analitik
- Oven
- Autoclave
- Inkubator

3.3.2 Bahan

- Sampel limbah air akhir IPAL Komunal
- Aquades
- *Lactose Broth* (LB)
- *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB)
- Alkohol 70%
- Kapas
- Aluminium foil
- Kertas perkamen
- Kertas label

3.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas (*independent variable*) pada penelitian ini adalah sampel limbah air akhir IPAL Komunal di Janti Barat Padepokan, Kota Malang. Sedangkan variabel terikat (*dependent variable*) yaitu bakteri *Coliform* yang terkandung dalam limbah air akhir IPAL Komunal.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1.	Limbah air akhir IPAL Komunal di Janti Barat Padepokan, Kota Malang.	Air limbah yang dimaksud adalah air limbah hasil pengolahan IPAL Komunal di Janti Barat Padepokan, Kota Malang.	Observasi	-	Pengamatan warna dan bau.
2.	Bakteri <i>Coliform</i>	Bakteri yang di temukan pada limbah air akhir IPAL Komunal di Janti Barat Padepokan, Kota Malang sebagai pencemaran air.	Metode <i>Most Probable Number</i> (MPN)	Nominal	Positif : jika adanya gas dalam tabung durhan maka sampel dinyatakan positif dan dihitung nilai MPN. Nilai MPN yang diperoleh dari hasil pengujian menunjukkan jumlah bakteri

					<i>Coliform</i> pada sampel per 100 ml. Negatif : tidak adanya gas pada tabung durham.
--	--	--	--	--	--

3.6 Prosedur Penelitian

Metode penentuan Total Bakteri *Coliform* menggunakan metode MPN berpedoman pada SNI 06-4158-1996 tentang metode pengujian jumlah total bakteri golongan koli dalam air dengan tabung fermentasi.

a. Sterilisasi Alat

1. Menyiapkan alat-alat yang akan disterilisasi.
2. Bungkus alat menggunakan kertas perkamen.
3. Sterilisasi alat menggunakan oven dengan suhu 180° C selama 1 jam.

b. Pengambilan Sampel

1. Siapkan botol sampel yang telah steril.
2. Ambil sampel air secara aseptik.
3. Beri label pada tiap botol sampel, kemudian bawa sampel ke laboratorium.
4. Sampel siap untuk diperiksa.

c. Preparasi Sampel

1. Sampel limbah cair sebanyak 1 ml dimasukkan dalam 9 ml aquades dengan pengenceran 10^{-1} .
2. Hasil pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml dan dimasukkan dalam 9 ml aquades dengan pengenceran 10^{-2} .
3. Hasil pengenceran 10^{-2} diambil 1 ml dan dimasukkan dalam 9 ml aquades dengan pengenceran 10^{-3} .

d. Pembuatan Media dan Pengujian

1. Uji Pendahuluan/Uji Penduga

- a. Timbang media *Lactose Broth* (LB) sebanyak 3,9 gram, masukkan dalam beaker glass dan larutkan dengan 300 ml aquades.
 - b. Panaskan diatas hot plate hingga mendidih dan larut sempurna, pastikan tidak ada yang menggumpal.
 - c. Siapkan tabung reaksi yang telah disterilkan, masukkan tabung durham dalam posisi terbalik kedalamnya.
 - d. Pipet sebanyak 9 ml media LB dan masukkan pada masing-masing tabung reaksi, amati tabung durham, jika ada gelembung kocok perlahan hingga gelembung menghilang.
 - e. Media LB yang telah dibuat disterilisasi dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.
 - f. Setelah disterilisasi dinginkan media terlebih dahulu.
 - g. Lakukan penambahan sampel di LAF dan pastikan dalam keadaan steril.
 - h. Ambil 1 ml dari setiap pengenceran dan masukkan dalam tabung berisi media LB.
 - i. Kocok tabung perlahan-lahan agar sampel menyebar rata ke seluruh bagian medium atau sampel homogen, kemudian inkubasi pada inkubator dengan suhu 35°C-37°C selama 48 jam.
 - j. Amati timbulnya gas pada setiap tabung durham, catat jumlah tabung yang positif dan lanjutkan kepengujian berikutnya.
2. Uji Penegasan/ Uji Konfirmasi
- a. Timbang media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB) sebanyak 12,03 gram, masukkan dalam beaker glass dan larutkan dengan 300 ml aquades.
 - b. Panaskan diatas hot plate hingga mendidih dan larut sempurna, pastikan tidak ada yang menggumpal.
 - c. Siapkan tabung reaksi yang telah disterilkan, masukkan tabung durham dalam posisi terbalik kedalamnya

- d. Menyiapkan tabung berisi media BGLB sebanyak 9 mL, amati tabung durham, jika ada gelembung kocok perlahan hingga gelembung menghilang.
- e. Media BGLB yang telah dibuat disterilisasi dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C
- f. Setelah disterilisasi lakukan pemindahan biakan di LAF dan pastikan dalam keadaan steril.
- g. Memindahkan sebanyak 1 atau 2 mata ose inokulasi cairan dari tabung LB yang positif ke dalam tabung reaksi yang berisi media BGLB.
- h. Inkubasi tabung pada inkubator dengan suhu 35°C-37°C selama 48 jam.
- i. Lakukan pengamatan, hitung tabung yang positif dan cocokkan dengan tabel MPN untuk mengetahui jumlah total *Coliform* (Sulistiyawati, 2019).

3.7 Metode Analisis

Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif kuantitatif yang dilakukan dengan mendiskripsikan keberadaan bakteri *Coliform*, dengan metode pengujian yang digunakan untuk perhitungan total *Coliform* menggunakan metode MPN.

3.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data diolah dengan memberikan kode untuk setiap sampelnya, pada penelitian ini peneliti memberikan kode sebagai berikut :

- **Sampel**

Sampel 1	kode S1
----------	---------

Sampel 2	kode S2
----------	---------

- **Hasil**

Positif	kode +
---------	--------

Negatif	kode –
---------	--------

3.8.2 Penyajian Data

Data akan disajikan dalam bentuk tabel yang menunjukkan ada atau tidaknya bakteri *Coliform* pada sampel limbah air akhir IPAL Komunal kemudian dijabarkan dalam bentuk narasi, sehingga menggambarkan karakteristik dan tujuan penelitian.

Tabel 3. 2 Hasil pengujian media LB

Sampel	0,1 ml					0,01 ml					0,001 ml					Kombinasi positif
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
S1																
S2																

Tabel 3. 3 Hasil pengujian media BGLB

Sampel	0,1 ml					0,01 ml					0,001 ml					Kombinasi positif
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
S1																
S2																

Tabel 3. 4 Hasil Indeks MPN

Sampel	MPN/100ml	Baku mutu	Keterangan
S1		3.000/ml	Memenuhi persyaratan /tidak memenuhi
S2		3.000/ml	Memenuhi persyaratan /tidak memenuhi

3.8.3 Analisis Data

Analisis kelimpahan total *Coliform* dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{MPN/100ml} = \text{Nilai Tabel MPN} \times \frac{10}{\text{volume terbesar dalam seri pengenceran}}$$

Analisis data menggunakan teknik analisis secara deskriptif kuantitatif. Hasil analisis dibandingkan dengan baku mutu air limbah sesuai Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan No. 68 tahun 2016 tentang baku mutu air limbah domestik.