

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian Deskriptif. Penelitian dilakukan untuk mengetahui Kualitas air minum isi ulang terhadap cemaran bakteri *Escherichia coli*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat pengambilan sampel air minum isi ulang dilakukan di Kelurahan Lasiana Kota Kupang selanjutnya sampel air diperiksa di laboratorium bakteriologi Prodi DIII Teknologi Laboratorium Medik yang akan dilaksanakan pada bulan Februari sampai Maret 2025.

C. Variabel Penelitian

Variabel dari penelitian ini variabel tunggal adalah bakteri *Escherichia coli* pada air minum isi ulang di Kelurahan Lasiana Kota Kupang.

D. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh depot air minum isi ulang yang terdapat di wilayah Kelurahan Lasiana Kota Kupang.

E. Sampel dan Teknik Sampling

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini di ambil dari 24 depot air minum isi ulang di Kelurahan Lasiana Kota Kupang.

2. Teknik Sampling

Pada penelitian ini cara pengambilan sampel adalah dengan menggunakan sampling total.

F. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

No	Variabel	Defisini	Skala Ukur	Hasil Ukur
1	Identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i>	Mengidentifikasi cemaran bakteri pada air minum isi ulang di Kelurahan Lasiana	Nominal	<i>LB</i> : terdapat gelembung gas didalam tabung durham, serta perubahan warna media yang menjadi keruh. <i>EMBA</i> : terdapat koloni bakteri berwarna hijau metalik. Endo : terdapat koloni bakteri berwarna merah atau merah muda. Pewarnaan Gram : terdapat bakteri gram negatif berbentuk batang. Uji Biokimia Indol : terbentuk lapisan atau cincin berwarna merah MR : terbentuk warna merah VP : tidak terbentuk warna merah Simmons citrate :

				tidak terjadi perubahan warna pada media TSIA : A/A dan terbentuk gas.
2	Standar kelayakan air minum isi ulang	Membandingkan kelayakan air minum isi ulang sesuai dengan standar kelayakan air minum isi ulang berdasarkan peraturan PerMenKes Nomor 2 Tahun 2023	Nominal	Layak : tidak terdapat bakteri <i>Escherichia coli</i> . Tidak layak : terdapat bakteri <i>Escherichia coli</i> .

G. Prosedur Penelitian

1. Tahap perencanaan penelitian
 - a. Melakukan seminar proposal dengan persetujuan pembimbing penelitian.
 - b. Pembuatan dan pengajuan kode etik untuk penelitian.
 - c. Membuat permohonan izin untuk melakukan penelitian.
 - d. Melakukan pengambilan sampel.
 - e. Melakukan pemeriksaan sampel.
2. Persiapan alat dan bahan
 - a. Alat

Alat yang digunakan yaitu Autoclave, Alumunium foil, Beaker glass, Erlenmeyer ukuran 50 ml, 100 ml, 250 ml, Incubator, Jarum Ose, Lampu Bunsen, Petri dish, Pipet Ukur 1 ml, 5 ml, 10 ml, Rak tabung,

Tabung Durham, Tabung reaksi, Timbangan Analitik, Botol steril, Pipet tetes, box dan ice pack.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kertas label, Sampel air minum isi ulang, Laktosa Broth, Kapas, korek api, Aquadest (Steril), *Eosin Methylen Blue Agar (EMBA)*, Endo agar, *Metil merah*, Alkohol, Cat gram, reagen Kovack, alfa-naftol, Voges-Proskauer, reagen kovac, KOH 40 % media SIM, media TSIA dan media Simmon's citrate.

3. Prosedur kerja

a. Persiapan alat dan bahan

Melakukan sterilisasi alat, bahan dan media terlebih dahulu. Alat gelas dan media harus disterilkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 1 jam. Sedangkan ose harus disterilkan dengan cara dipanaskan di atas api bunsen sebelum dan sudah digunakan.

b. Prosedur pemeriksaan

1) Uji pada media *Lactosa broth*

- a) Siapkan tabung berisi *lactosa broth* yang telah steril.
- b) Masukkan sampel air minum secara hati hati sebanyak 1 ml.
- c) Lalu dihomogenkan agar sampel tersebut menyebar rata, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- d) Kemudian amati pada tabung tersebut.

- e) Positif bila terbentuk asam atau gas pada tabung durham yang terdapat dalam tabung reaksi.
- 2) Uji pada media Eosin Methylen Blue Agar
- a). Siapkan media berisi media *EMBA* yang telah steril
 - b). Sampel yang positif dari media LB di goreskan pada media *EMBA*.
 - c). Inkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - d). Setelah 24 jam amati koloni yang terbentuk pada media *EMBA*.
 - e). Positif jika terbentuk koloni bakteri yang mengkilat berwarna hijau metalik.
- 3) Uji pada media Endo agar
- a) Siapkan cawan petri yang berisi media Endo agar.
 - b) Sampel yang positif dari media LB di goreskan pada media Endo agar.
 - c) Inkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - d) Setelah 24 jam amati koloni yang terbentuk pada media Endo agar.
 - e) Positif jika terbentuk koloni bakteri merah metalik.
- 4) Pewarnaan Gram
- Berikut adalah Langkah-langkah dari pewarnaan gram:
- a) Sterilisasi objek glass dengan melakukan fiksasi slide.
 - b) Panaskan jarum ose di atas nyala lampu bunsen hingga steril.
 - c) Teteskan sedikit larutan NaCl pada permukaan kaca ojek.

- d) Menggunakan jarum ose bulat, ambil koloni biakan dari media *EMBA* dan Endo, buat apusan pada kaca objek, lalu biarkan hingga kering.
- e) Teteskan pewarna kristal violet pada preparat, diamkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
- f) Teteskan larutan lugol pada preparat lalu diamkan selama 1 menit.
- g) Dekolorasi dengan larutan alkohol-aseton selama 30 detik, lalu bilas dengan air.
- h) Teteskan pewarna safranin, diamkan 1 menit, bilas dengan air mengalir dan keringkan.
- i) Setelah kering, amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 x menggunakan oil imersi. Hasil dianggap positif untuk bakteri *Escherichia coli* jika tampak gram negatif, berbentuk batang, dan tidak membentuk spora.

5) Pengujian biokimia(Uji IMVIC)

a) Uji SIM

Jarum ose dipanaskan hingga berpijar, kemudian didinginkan sesaat untuk menghindari kerusakan sel bakteri. Selanjutnya, satu koloni biakan dari media Eosin Methylene Blue Agar diambil dan diinokulasikan ke dalam media indol. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam. Setelah inkubasi, sebanyak 0,2–0,3 ml reagen Kovac

ditambahkan ke dalam tabung untuk mendeteksi produksi indol. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk cincin berwarna merah tua pada permukaan media. Selain uji indol, juga dilakukan observasi terhadap kemampuan motilitas dan produksi hidrogen sulfida (H_2S) pada area tusukan menggunakan jarum ose.

b) Uji Methyl red

Jarum ose dipanaskan hingga berpijar untuk proses sterilisasi, kemudian didinginkan sesaat agar tidak merusak sel bakteri. Setelah itu, satu koloni biakan dari media *Eosin Methylene Blue Agar* diambil dan diinokulasikan ke dalam media Methyl Red–Voges Proskauer (MR-VP). Media kemudian diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Setelah inkubasi, ditambahkan sebanyak 5 tetes larutan indikator metil merah, kemudian dikocok dan didiamkan selama beberapa menit. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah, sedangkan warna kuning menunjukkan hasil negatif.

c) Uji Voges Proskauer

Jarum ose dipanaskan hingga berpijar, lalu didinginkan sejenak agar suhunya tidak terlalu tinggi. Selanjutnya, satu koloni biakan dari media *Eosin Methylene Blue Agar* diambil dan diinokulasikan ke dalam media *MR-VP*. Inkubasi dilakukan

pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, tambahkan sebanyak 3 tetes larutan *alfa-naftol* dan 2 tetes larutan kalium hidroksida (KOH) 40%, kemudian tabung dikocok dan diamkan selama beberapa menit. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah muda hingga merah tua, sedangkan tidak adanya perubahan warna menunjukkan hasil negatif.

d) Uji Simmons Sitrat

Jarum ose dipanaskan hingga berpijar untuk sterilisasi, kemudian didinginkan sesaat agar tidak terlalu panas. Setelah itu, satu koloni biakan dari media Eosin Methylene Blue Agar diambil dan diinokulasikan ke dalam media Simon's Citrate. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna media menjadi biru, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tetapnya warna hijau pada media (Habibah, 2016).

e) Uji TSIA

Jarum ose terlebih dahulu dipanaskan hingga berpijar untuk sterilisasi, kemudian didinginkan sejenak agar tidak merusak sel bakteri. Setelah itu, satu koloni dari media spesifik diambil dan diinokulasikan ke dalam media uji dengan metode tusuk lurus serta diratakan pada permukaan agar lempeng. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi,

diamati perubahan warna yang terjadi: warna hitam menunjukkan produksi gas hidrogen sulfida (H_2S), warna merah menunjukkan kondisi basa, sedangkan warna kuning mengindikasikan kondisi asam.

Tabel 3.2 Intrepetasi hasil uji biokimia pada *E. coli*

No	Jenis uji	Intrepetasi hasil
1	Indol	+
2	Methyl red	+
3	Voges proskaer	-
4	Simmons citrate	-
5	TSIA	+

H. Analisis Hasil

Data hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel dan disertai dengan penjelasan naratif lalu dibandingkan dengan standar kualitas air yang ditetapkan dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 2 Tahun 2023, yang merupakan aturan pelaksanaan dari Peraturan Pemerintah Nomor 66 Tahun 2014 tentang kesehatan lingkungan.