

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian deskriptif kualitatif untuk melihat ada tidaknya cemaran bakteri *E. coli* pada air minum isi ulang di kelurahan Penkase Oeleta Kota Kupang.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel air minum isi ulang dilakukan di Kelurahan Penkase Oeleta Kota Kupang. Sampel selanjutnya dianalisa di Laboratorium Bakteriologi Prodi DIII Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2025

C. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah variabel tunggal yaitu mengidentifikasi bakteri *E. coli* pada air minum isi ulang di Kelurahan Penkase Oeleta Kota Kupang.

D. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah 35 depot air minum isi ulang yang beredar di Kelurahan Penkase Oeleta Kota Kupang.

E. Sampel dan Teknik Sampling

Pada penelitian ini digunakan 26 sampel air minum isi ulang dari depot air minum isi ulang di Kelurahan Penkase Oeleta yang dihitung menggunakan rumus slovin (Adnyana et al., 2021)

$$\begin{aligned} s &= \frac{N}{1+Nd^2} \\ &= \frac{35}{1+35(0,1)^2} \\ &= 26 \text{ sampel} \end{aligned}$$

s : Ukuran sampel

N : Ukuran populasi

d : Signifikansi yang dikehendaki

Pada penelitian ini dilakukan dengan teknik *simple random sampling*. Teknik *simple random sampling* dilakukan dengan teknik pengundian acak dengan peluang yang sama.

F. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala	Hasil Pengukuran
Identifikasi cemaran bakteri <i>E. coli</i>	Metode yang digunakan untuk mengetahui cemaran bakteri <i>E. coli</i> pada air minum isi ulang melalui media LB, EMBA, Endo, pewarnaan gram dan uji biokimia.	Nominal	<p>LB</p> <p>Positif : keruh dan gas pada tabung durham</p> <p>Negatif : tidak keruh dan tidak ada gas dalam tabung durham</p> <p>EMBA</p> <p>Positif : koloni berwarna hijau metalik</p> <p>Negatif : koloni tidak berwarna</p> <p>Endo</p> <p>Positif : koloni berwarna merah atau merah muda</p> <p>Negatif : koloni tidak berwarna</p> <p>Pewarnaan Gram</p> <p>Positif : bakteri berwarna merah dan bentuk batang</p> <p>Negatif : bakteri berwarna ungu dan tidak berbentuk batang</p> <p>Uji Biokimia</p> <p>Indol : terbentuk lapisan atau cincin berwarna merah</p> <p>MR : terbentuk warna merah</p> <p>VP : tidak terbentuk warna merah</p> <p>Simmon citrat : tidak terjadi perubahan warna pada media</p> <p>TSIA : A/A dan terbentuk gas</p>
Menilai Standar	Standar kelayakan air minum isi ulang menurut Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 2 Tahun 2023	Nominal	<p>Layak : tidak mengandung bakteri <i>E.coli</i></p> <p>Tidak layak : mengandung bakteri <i>E.coli</i></p>

G. Prosedur Penelitian

1. Tahap perencanaan
 - a. Meminta persetujuan dari pembimbing penelitian untuk melakukan seminar proposal
 - b. Pengurusan dan pengajuan kode etik untuk penelitian
 - c. Mengurus permohonan izin untuk melakukan penelitian
 - d. Melakukan pengambilan sampel penelitian

2. Tahap persiapan alat dan bahan

- a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoclave, oven, batang pengaduk, beaker glass, botol steril, cawan petri, gelas ukur, hot plate, inkubator, korek api, *laminar air flow*, lampu spritus, ose jarum, ose bulat, rak pewarnaan, rak tabung, tabung durham, tabung reaksi, timbangan analitik, mikroskop, objek glass, pipet ukur steril, kotak sterofom, dan botol steril.

- b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air minum isi ulang, alkohol 70%, aquadest steril, kapas, media *Laktosa Broth (LB)*, media *Brilliant Green Lactosa Broth (BGLB)*, media *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)*, media Endo, media *Sulfur Indole Motility (SIM)*, reagen Kovach, media *Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP)*, larutan Methyl Red, larutan a – naphtol, larutan KOH 10 %, media Simon Sitrat, media *Triple Sugar Iron*

Agar (TSIA), cat gram (kristal violet, lugol, iodine, dan safranin), benang, kertas coklat, kertas label, plastik wayang, plastik wrap, dan oil imersi.

3. Prosedur kerja

a. Persiapan alat dan bahan

Sebelum melakukan penelitian dilakukan sterilisasi pada alat dan media yang akan digunakan terlebih dahulu. Media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, sementara alat gelas disterilkan oven selama 30 menit. Ose disterilkan dengan cara dibakar di atas api bunsen sebelum dan setelah penggunaannya.

- 1) Pembuatan LB : Media Lactose Broth diukur sesuai dengan jumlah yang diperlukan (13 gr/L) dan kemudian ditambahkan akuadest sesuai dengan takaran yang ditentukan, lalu dipanaskan sampai tercampur rata (Safitri & Djasfar, 2023). Siapkan 26 tabung reaksi yang masing-masing tabung dengan 10 ml media LB lalu lakukan sterilisasi.
- 2) Pembuatan EMBA : Media EMBA ditimbang sebanyak 9,73 gr, dilarutkan dengan aquades sampai mendapatkan 260 mL media, dan diaduk hingga semuanya larut. Panaskan media hingga mendidih menggunakan hot plate yang diaduk dengan batang pengaduk. Setelah media tercampur rata, disterilkan dengan autoclave selama 15 menit (Putri dkk., 2023).

3) Pembuatan Endo : Media Endo ditimbang sebanyak 10,4 g, dilarutkan dengan aquades sampai mendapatkan 260 mL media, dan diaduk hingga semuanya larut. Panaskan media hingga mendidih menggunakan hot plate yang diaduk dengan batang pengaduk. Setelah media tercampur rata, disterilkan dengan autoclave selama 15 menit .

b. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan membeli secara langsung air minum isi ulang dengan menggunakan botol sampel yang telah disterilkan. Dilakukan sterilisasi ruang kerja pengambilan sampel dengan menggunakan alkohol 70% dan nyala api spritus. Air dialirkan untuk menghilangkan kotoran, setelah itu dilakukan pengambilan sampel ke dalam botol sampel steril dengan memanaskan leher botol terlebih dahulu. Setelah itu botol sampel ditutup rapat lalu dimasukkan kedalam tempat yang telah disiapkan untuk dibawa ke laboratorium.

c. Prosedur kerja

1) Identifikasi cemaran bakteri *E. coli*

a) Media LB

Pada sampel air minum isi ulang media LB. Tiap tabung telah dipenuhi dengan 10 ml media LB ditambahkan sampel 1 ml. Selanjutnya tabung durham dimasukkan dengan cara terbalik secara hati-hati. Pastikan tidak ada

gelembung yang terbentuk di dalam tabung durham. Tabung reaksi ditutup menggunakan kapas yang dilapisi dengan kasa. Diinkubasi selama 24 jam, apabila belum ada perubahan, lanjutkan hingga 48 jam di dalam inkubator dengan suhu tetap 44° C (Hidayati dkk., 2022).

b) Media EMBA

Tabung media LB positif diteruskan dengan mengambil kultur menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada permukaan media EMBA dengan cara streak plate. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam sampai terbentuk koloni bakteri (Hidayati dkk., 2022).

c) Media Endo

Tabung media LB positif diteruskan dengan mengambil kultur menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada permukaan media EMBA dengan cara streak plate. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam sampai terbentuk koloni bakteri.

d) Pewarnaan Gram (Rahmatullah dkk., 2021)

(1) Kaca objek dibersihkan menggunakan alkohol 95% dan dilewatkan beberapa kali di atas nyala api bunsen untuk memastikan bebas dari kotoran.

(2) Kaca objek dipanaskan dengan cara dilewatkan di atas api bunsen, kemudian dibiarkan hingga sedikit dingin.

- (3) Isolat bakteri diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan dioleskan tipis pada kaca objek.
- (4) Fiksasi spesimen dilakukan dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak tiga kali, dengan memastikan tidak terjadi pemanasan yang berlebihan.
- (5) Kristal violet diteteskan pada kaca objek hingga menutupi seluruh sediaan. Setelah itu, didiamkan selama 30-60 detik pada suhu ruangan, lalu dicuci perlahan dengan aquadest selama 5 detik.
- (6) Kaca objek yang telah berwarna biru ditetesi dengan larutan Lugol, dibiarkan selama 1-2 menit pada suhu ruangan, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 detik.
- (7) Selanjutnya, dilakukan dekolorsasi dengan meneteskan alkohol 95%.
- (8) Preparat dibilas dengan air selama 5 detik untuk menghentikan proses dekolorisasi.
- (9) Kaca objek kemudian ditetesi dengan safranin dan didiamkan selama 1 menit, setelah itu dibilas perlahan dengan air selama 5 detik dan dikeringkan dengan diangin-anginkan.
- (10) Setelah itu, preparat diamati di bawah mikroskop untuk mengamati bentuk bakteri berdasarkan zat warna. Jika

bakteri terlihat berwarna ungu, hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut adalah Gram positif. Jika bakteri terlihat berwarna merah, hal ini menandakan bahwa tersebut adalah Gram negatif.

f) Uji Biokimia

Dalam menentukan jenis bakteri *E.coli*, dilakukan pengujian biokimia IMVIC (Indol, Metil Merah, Voges Proskauer, dan Simmon Citrat).

(1) Uji Indol : Dari kultur EMBA, ambil beberapa koloni yang tumbuh dan diinokulasikan ke dalam media SIM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Ditambahkan 2-3 tetes reagen Kovac ke dalam tabung. Warna merah tua pada permukaan media menunjukkan reaksi indol yang positif (Gunawan dkk., 2022).

(2) Uji *Methyl Red* : Dari biakan EMBA beberapa koloni yang tumbuh dan diinokulasikan ke media MRVP. Kemudian, media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan 5 tetes methyl red, diaduk, dan dibiarkan selama beberapa menit. Warna kuning mengindikasikan reaksi negatif, sedangkan warna merah menunjukkan reaksi positif. Warna merah muda hingga merah tua menandakan

reaksi positif, sementara warna yang tidak berubah menunjukkan reaksi negatif (Gunawan dkk., 2022).

- (3) Uji *Voges Proskauer* : Dari biakan EMBA beberapa koloni yang tumbuh dan diinokulasikan ke media MRVP. Kemudian, media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan Setelah diinkubasi ditambahkan 3 tetes larutan alfa naftol dan 2 tetes larutan KOH 10%, dikocok dan didiamkan selama beberapa menit. Warna tidak berubah menunjukkan reaksi positif, sedangkan warna merah muda sampai merah tua menunjukkan reaksi negatif (Gunawan dkk., 2022).
- (4) Uji *Simmons Citrat* : Dari kultur EMBA, beberapa koloni dimasukkan ke dalam media simmon sitrat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Warna hijau menunjukkan hasil positif, sedangkan warna biru menunjukkan hasil negatif (Gunawan dkk., 2022).
- (5) Uji TSIA : Dari kultur EMBA, beberapa koloni dimasukkan ke dalam media simmon sitrat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif bila lereng dan dasar berwarna kuning serta terbentuk gas pada dasar tabung.

- 2) Menilai standar kelayakan air minum
 - a) Layak ditandai dengan tidak terdapat cemaran bakteri *E.coli* pada sampel air minum isi ulang.
 - b) Tidak layak ditandai dengan terdapat cemaran bakteri *E.coli* pada sampel air minum isi ulang.

H. Analisis Hasil

Data dari hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel yang dibandingkan dengan syarat kualitas air minum yang ditetapkan dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 2 Tahun 2023 tentang persyaratan kualitas air minum. Data dari hasil penelitian ini dianalisa secara deskriptif dan disertai dengan penjelasan naratif.