

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai kualitas es batu yang di gunakan penjual dikawasan Universitas Sahid Surakarta dilakukan pengujian dengan metode *Most Probable Number* (MPN). MPN dalam pengujian untuk mendeteksi bakteri *E. Coli*, terdapat tiga langkah dalam teknik MPN yaitu *presumptive test*, *confirmed test* dan *Complated test*. Penelitian ini dilakukan pada bulan oktober-november 2020, dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi adalah generalisasi yang terdiri atas objek/subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang diterapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulan (Sugiono, 2015). Populasi pada penelitian ini adalah seluruh es batu yang dijual pedagang yang menjual minuman dingin dengan tambahan es batu di kawasan Universitas Sahid Surakarta.

3.2.2 Sampel

Sampel adalah bagian yang dapat mewakili populasi untuk dijadikan sebagai objek dari penelitian (Sani, 2016). Pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling* yaitu teknik pengambilan berdasarkan karakteristik yang sudah ditentukan atau diinginkan oleh peneliti. Dimana pada penelitian ini peneliti hanya mengambil sampel es batu dari 12 pedagang yang berada di Kawasan Universitas Sahid Surakarta.

3.3 Instrumen Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Tabel 3.1 Alat dan Bahan

Alat	Bahan
Pipet ukur	Sampel es batu
Lampu spiritus	Media <i>Lactose Broth</i> (LB)
Tabung durham	Media <i>Eosin Metylene Blue Agar</i> (EMBA)
Kapas	Media <i>Brilliant Green Lactose Broth</i> (BGLB)
Tabung reaksi dan rak	Aquadest
Inkubator	Bakteri <i>Ecoli</i>
Autoklaf	PH meter
Botol steril	
Jarum Ose	
Cawan petri	

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari orang, obyek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan ditarik kesimpulanya (Sugiono, 2015). Variabel pada penelitian ini adalah bakteri *E. Coli* pada es batu yang berada di kawasan Universitas Sahid Surakarta.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel dengan cara memberikan arti atau menspesifikasi kegiatan, ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk mengukur konstruk atau variabel tersebut. Kegunaan definisi operasional dalam penelitian adalah untuk memberi batasan dan pengertian yang jelas tentang variabel sehingga tidak terjadi kesalahfahaman mengenai data yang akan dikumpulkan dan menghindari kesesatan alat pengumpulan data. Adapun definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Total Bakteri *E. Coli* adalah jumlah *E. Coli* dalam 100 ml air minum berdasarkan tabel MPN.
- b. Kualitas es batu adalah hasil temuan yang tidak memenuhi persyaratan bakteriologis air minum menurut permenkes RI No. 497/MENKES/PER/IV/2010 tentang persyaratan kualitas air minum untuk parameter total *E. Coli* kadar maksimum yang digunakan adalah 0 per 100 ml sampel (Permenkes, 2010).
- c. Kawasan Universitas Sahid Surakarta yang berada di sekitar jalan Adi Sucipto dengan jarak 300 meter dari Universitas Sahid Surakarta.
- d. Es batu merupakan wujud lain dari air yang didinginkan pada suhu 0°C (Elfidasari, 2011). Es batu yang diambil sebagai sampel adalah es batu dari 12 pedagang di kawasan Universitas Sahid Surakarta.
- e. *E. Coli* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm dan

bersifat anaerob fakultatif (Juliantina, 2008). Keberadaan bakteri *E. Coli* merupakan indikator pencemaran fases dalam air (Purnawijayanti, 2001).

3.6 Jalanya Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum alat digunakan, semua alat disterilkan dengan menggunakan metode sterilisasi panas kering terlebih dahulu dengan cara alat dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan kedalam oven pada suhu 160°C selama 1 jam, sedangkan untuk alat yang tidak tahan panas maka disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%. Sterilisasi bahan menggunakan sterilisasi panas basah dengan menggunakan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.2 Pembuatan Media

a. Media *Lactose Broth* (LB)

Dilarutkan sebanyak 13 gram media *Lactose Broth* (LB) kedalam 1000 ml aquades, kemudian dipanaskan sampai homogen. Larutan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham dalam keadaan terbalik, kemudian disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Media *Brilian Green Lactose Broth* (BGLB)

Dilarutkan sebanyak 40 gram media *Media Brilian Green Lactose Broth* (BGLB) kedalam 1000 ml aquades, selanjutnya

dipanaskan sampai homogen. Larutan dimasukan kedalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham dalam keadaan terbalik, kemudian disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)*

Dilarutkan sebanyak 36 gram media *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)* kedalam 1000 ml aquades, selanjutnya diaduk, larutan yang telah diaduk disterilkan dengan metode panas basah dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah di steril tuang pada cawan petri yang telah steril hingga dingin dan mengeras.

3.6.3 Uji perkiraan (*presumptive test*)

Sederetan tabung berisi media *Lactose Broth (LB)* masing-masing diisi sampel 10 ml, 1 ml, 0,1 ml dengan menggunakan pipet ukur yang telah steril dan menggunakan pipet baru pada setiap sampel yang berbeda, serta pengisian dilakukan dengan teknik aseptik mungkin. Semua tabung dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37°C dan ditunggu 48 jam. Hasil fermentasi positif jika terjadi fermentasi laktosa oleh bakteri *E. Coli* sampel, sehingga terbentuk gas yang dapat dilihat berupa rongga kosong pada bagian atas tabung durham terbalik yang ada dalam media LB.

3.6.4 Uji penegasan (*confirmation test*)

Dari tabung yang positif gas pada *presumptive test* dipindahkan menggunakan jarum inokulasi kedalam media *Brilian Green Lactose Broth (BGLB)* secara aseptik. Inkubasikan pada suhu 37⁰ C selama 24-48 jam. Uji dikatakan positif bila terdapat koloni membentuk gelembung pada tabung durham.

3.6.5 Uji kelengkapan (*completed test*)

Berdasarkan hasil yang positif pada percobaan uji penegasan maka dilanjutkan uji kelengkapan uji penyempurnaan dilakukan penanaman pada media *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)*. Diambil 1 ose lalu digoreskan pada permukaan agar yang telah membeku (padat). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk memudahkan dan dapat dibedakan dalam pengamatan koloni yang tumbuh *E. Coli* yang tumbuh berwarna hijau mengkilat (Natalia, 2014).

3.7 Analisis Data

Analisis data dengan cara deskriptif berdasarkan hasil pengamatan bakteri *E. Coli* dari es batu yang dijual dikawasan Universitas Sahid Surakarta. Data dianalisis menggunakan tabel MPN 5 1 1 formula Thomas dan kemudian ditampilkan menggunakan bentuk tabel. Dalam metode MPN dari setiap pengenceran dimasukan 1 ml masing-masing kedalam tabung yang berisi media, dimana untuk setiap pengenceran digunakan tiga seri tabung atau lima

seri tabung. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, dihitung jumlah tabung yang positif yaitu tabung yang ditumbuhi jasad renik yang dapat ditandai dengan timbulnya kekeruhan. Misalnya pada pengenceran pertama ketiga tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran kedua tabung positif, pada pengenceran ketiga satu tabung positif, dan pada pengenceran terakhir tidak ada tabung yang positif. Kombinasinya menjadi 3, 2, 1, 0 dan jika diambil pengenceran yang pertama kombinasinya akan 3, 2, 1. Angka kombinasi ini kemudian di cocokan dengan Tabel MPN (Fardiaz, 2017).

Tabel 3.2 Tabel MPN 5 1 1 Formula Thomas

Jumlah tabung positif			MPN/100 ml
5 X 10 ml	1 X 1 ml	1 x 0,1 ml	
5	1	1	< 240
5	1	0	240
5	0	1	96
5	0	0	38
5	-	-	16
4	1	0	21
4	0	1	20
4	0	0	15
4	-	-	16
3	1	0	12
3	0	0	8,8
3	-	-	9,2
2	1	0	7,6
2	0	0	5,0
2	-	-	5,1
1	1	0	4,4
1	0	0	2,2
1	-	-	2,2
0	1	0	2,0
0	0	0	2,0
0	-	-	2,2

Sumber : Fardiaz, 2017