

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah deskriptif dengan teknik analisis kuantitatif pemeriksaan *non fecal coli* dan *fecal coli* dengan Metode MPN (*Most Probable Number*) pada air minum isi ulang.

3.2 Populasi

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh depo air minum isi ulang di wilayah kerja Puskesmas Medokan Ayu Kecamatan Rungkut Kota Surabaya sebanyak 20 depo air isi ulang.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini air minum isi ulang sebanyak 20 sample.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi

Lokasi penelitian di wilayah kerja Puskesmas Medokan Ayu Kecamatan Rungkut, sedangkan pemeriksaan sample air isi ulang dilakukan di Laboratorium Dinas Kesehatan Kota Surabaya dengan alamat Jl. Pucang Jajar no. 31 Surabaya

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Agustus 2011, sedangkan pengambilan sampel dan pemeriksaannya dilakukan pada hari tanggal 11 - 18 Juli 2011.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variable dalam penelitian ini adalah kandungan *E. Coli* pada air minum isi ulang yang di jual di wilayah kerja Puskesmas Medokan Ayu Surabaya.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Air minum isi ulang adalah air minum yang di produksi oleh Depot air minum, yaitu usaha industri yang melakukan proses pengolahan air baku menjadi air minum dan menjual langsung kepada konsumen.

Non fecal coli dan *fecal coli* merupakan jasad indikator air, bahan makanan dan sebagainya oleh kehadiran jasad berbahaya, misalnya : *Salmonella*, *Shigella* mempunyai karakteristik bakteri gram negatif bentuk batang, tidak mempunyai spora dan mampu memfermentasi Laktosa pada suhu 37°C dengan membentuk asam dan gas dalam waktu kurang dari 48 jam.

MPN (Most Probable Number) merupakan perhitungan kelompok bakteri *Non fecal coli* dan *fecal coli* tanpa memperhatikan jenis-jenis di dalam kelompok tersebut. Menggunakan medium cair dalam tabung reaksi yang diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Menurut Kepmenkes Nomor 492/ MENKES/ PER/ IV/ 2010 ,persyaratan kualitas air minum harus mempunyai MPN 0/ 100 ml sampel air.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data yang digunakan adalah seluruh air isi ulang yang dijual di depo air isi ulang di wilayah kerja Puskesmas Medokan Ayu Surabaya.

3.6 Tahapan Penelitian

3.6.1 Peralatan dan Media

Peralatan yang diperlukan pada pengambilan sampel air sampai tahap pemeriksaan antara lain : Botol steril, tabung reaksi, rak tabung, tabung durham, ose cincin, bunsen, incubator, autoclave, pipet ukur steril (10ml, 1ml dan 0.1 ml), erlemeyer, kapas berlemak dan spidol.

Media yang diperlukan untuk pemeriksaan sampel adalah :LB I (*Lactose Broth Single Strength*), LB III (*Laktose Broth Triple Strength*) dan BGLB (*Brilliant Green Laktose Bile Broth*)

1.6.2 Pemeriksaan MPN *Non fecal coli*

1. Pengambilan Sampel :

Pengambilan sampel harus dilakukan secara steril guna memastikan tidak terdapatnya organisme yang mengkontaminasi sampel tersebut.

2. Penanganan dan pengiriman sampel :

Sampel yang sudah ditempatkan ke dalam botol steril disertai dengan keterangan yang lengkap tentang sampel, segera dimasukkan dalam termos yang didalamnya telah diletakkan es (cool pack). Bila lama pengiriman < 4 jam, tidak perlu temperatur seperti refrigerator, yang penting cukup dingin.

3. Metode :

Metode tabung ganda dengan ragam 5-1-1 (5 x 10 ml, 1 x 1 ml, 1 x 0,1 ml) yang meliputi tes pendahuluan (tes perkiraan) dan tes penegasan.

4. Prinsip :

Pertumbuhan *non fecal coli* dan *fecal coli* setelah sampel diinokulasikan pada media cair yang sesuai yang di tandai dengan adanya fermentasi dan pembentukan gas pada tabung Durham.

5. Prosedur :

a. Tes Pendahuluan

Menyiapkan :

1. 5 tabung yang masing-masing berisi LB III (*Lactose Broth Triple Stength*) di isi sample sebanyak 10 ml (tabung 1-5).
2. 1 tabung yang masing-masing berisi LB I (*Lactose Broth Triple Stength*) di isi sample sebanyak 1 ml (tabung 6)
3. 1 tabung yang masing-masing berisi LB I (*Lactose Broth Triple Stength*) di isi sample sebanyak 0,1 ml (tabung 7)
4. Masing-masing tabung diberi keterangan :
 - a. Nomor urut
 - b. Volume
 - i. Menggunakan pipet steril untuk mengisi sampel air ke dalam tabung 1-5 masing-masing 10 ml, ke dalam tabung ke-6 sebanyak 1 ml dan tabung ke-7 sebanyak 0,1 ml.
 - ii. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 diperiksa ada atau tidaknya pembetukan gas pada tabung durham. Apabila setelah 24 jam masa incubasi tidak tampak menghasilkan gas maka inkubasi dilanjutkan selama 24 jam ke dua.

iii. Mengamati gas pada tabung Durham, jika terbentuk gas maka kuman mengadakan fermentasi sehingga hasil pada tes perkiraan dinyatakan positif (+) dan dilanjutkan dengan tes penegas. Bila tidak terbentuk gas berarti *non fecal coli* negatif (-).

b. Tes Penegasan

1. Cara pemeriksaan :

- a. Dari tiap-tiap tabung yang positif (+) pada tes pendahuluan dipindahkan 1-2 mata ose ke dalam tabung tes penegasan yang berisi 10 ml BGLB. 2 seri (duplo) dengan suhu 37°C dan 44°C
- b. Satu seri tabung BGLB diincubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.dan
- c. Satu seri tabung BGLB diincubasi pada suhu 44°C selama 24 – 48 jam

2. Pembacaan hasil :

Pembacaan hasil dari incubasi suhu 37°C dari tes penegasan dilakukan dengan menghitung jumlah tabung yang menunjukkan adanya gas pada tabung Durham.

Contoh :

- a. Dari penanaman dengan 10 ml diperoleh 3 tabung BGLB positif (+) gas.
- b. Dari penanaman dengan 1 ml diperoleh 1 tabung BGLB Positif (+) gas.

- c. Dari penanaman dengan 0,1 ml diperoleh 1 tabung BGLB Positif (+) gas

Angka yang diperoleh dari data di atas adalah 3-1-1, setelah dicocokkan dengan tabel MPN diperoleh indeks MPN/100 ml adalah 16, artinya dalam sampel air tersebut diperkirakan mengandung 16 *non fecal coli* setiap 100ml-nya.

c. Uji Komplit (Completed Test)

1. Dari tabung uji penegasan yang menunjukkan hasil positif baik di incubasi suhu 37°C dan 44°C dilakukan penanaman pada :

a. Media EMB (*Eosine Methylin Blue*)

Ambil satu mata ose sampel yang positif kemudian tanam Media EMB (*Eosine Methylin Blue*) baik dari suhu 37°C maupun 44°C incubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam

b. Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Ambil koloni dari EMB dengan menggunakan ose jarum kemudian tanam dengan menusukkan pada media dan strain pada lereng media, incubasi pada suhu 37°C.

c. Media IMViC (*Indol, Metil Red/MR, Voges Proskover/VP, Simon Citrat Agar*).

Ambil koloni dari EMB dengan menggunakan mata ose kemudian tanam, incubasi pada suhu 37°C.

2. Dibaca pada tabel perbedaan reaksi IMViC *fecal coli* dan *non fecal coli*.

3. Pembacaan Hasil :

a. Pada Media EMB didapatkan pertumbuhan koloni yang tidak metalisin (warna hitam)

b. Pada media TSIA didapatkan hasil :

Lereng : Acid

Dasar : Acid

Gas : (+) Positif

H₂S : (-) Negatif

c. Indol di tetesi dengan reagen Kovac tidak membentuk cincin merah

d. Methyl Red/MR : ditetesi dengan reagen Methyl red tidak membentuk warna merah.

e. Voges Proskover/VP : ditetesi dengan reagen alfa naptol 5% (0,6 ml) dan KOH 40% (0,2 ml) tidak membentuk warna merah.

f. Simon Citrat : terjadi Perubahan warna dari warna hijau menjadi Biru.

Kesimpulan dari pemeriksaan secara mikrobiologi air minum isi ulang adalah bakteri *non fecal coli* (Pestariati, 2010)

3.7 Metode Analisis Data

Dari hasil penelitian di laboratorium yang sudah terkumpul di buat tabel kemudian disajikan dalam bentuk persentase.