

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yaitu untuk memperoleh ALT (*Angka Lempeng Total*) air minum isi ulang pada depo yang ada di Wilayah Kelurahan Tanah Kali Kedinding Surabaya.

#### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.2.1 Populasi sampel**

Dalam penelitian ini populasi yang digunakan adalah air minum isi ulang yang ada di Wilayah Kelurahan Tanah Kali Kedinding.

##### **3.2.2 Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan adalah 10 sampel air minum isi ulang pada depo yang ada di Wilayah Kelurahan Tanah Kali Kedinding Surabaya.

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.3.1 Lokasi penelitian**

Lokasi pengumpulan sampel di wilayah Kelurahan Tanah Kali Kedinding Surabaya dan penelitian sampel dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

##### **3.3.2 Waktu penelitian**

Waktu penelitian yaitu mulai Desember 2016 sampai April 2017.

### **3.4 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini adalah angka lempeng total didapatkan dengan cara pemeriksaan jumlah bakteri secara keseluruhan kelompok besar mikroorganisme melalui metode cawan tuang (*pour plate method*) menggunakan media *Nutrient Agar* dengan perhitungan jumlah mikroorganisme dalam tiap 1 ml/1 gr sampel yang diperiksa.

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Pengambilan Sampel (Sampling bahan)**

Sampel yang diperiksa adalah air minum depo isi ulang yang di jual di Wilayah Kelurahan Tanah Kali Kedinding Surabaya. Sampel diambil dengan menggunakan botol steril dan diambil secara *steril*. Kemudian pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

#### **3.5.2 Alat – alat Pemeriksaan**

Alat – alat yang digunakan untuk pemeriksaan ALT sebagai berikut : petridisk (cawan petri) steril, tabung reaksi steril, Erlenmeyer steril, pipet ukur steril, *beaker glass*, inkubator, oven, autoklaf, gelas ukur, *hot plate*, timbangan, *colony counter*, rak tabung reaksi, spirtus.

#### **3.5.3 Bahan Pemeriksaan**

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan ALT sebagai berikut : sampel (air minum isi ulang), natrium klorida (NaCl) 0,85% dan *nutrient agar*.

### 3.5.4 Pembuatan Reagen dan Media

A. Reagen Natrium klorida 0,85% 1500 ml

1) Melakukan perhitungan

$$\begin{aligned} \text{gr} &= \frac{0,85\% \times 50\text{ml} \times 30}{100\%} \\ &= 12,75 \text{ gram} \end{aligned}$$

2) Menimbang 12,75 gram NaCl dan dilarutkan dalam 1.500 ml aquadess sampai homogen dan larut sempurna.

3) Memasukkan dalam erlenmeyer, kemudian di tutup menggunakan kasa.

4) Mensterilisasi dalam autoclave pada suhu 121° C dalam waktu 15 menit.

B. Media Nutrient Agar 2400 ml

1) Melakukan perhitungan

$$\begin{aligned} \text{gr} &= \frac{21 \times 16\text{ml} \times 150}{1000} \\ &= 50,4 \text{ gram} \end{aligned}$$

2) Menimbang 50,4 gr *nutrient agar*, homogenkan dan larutkan dalam 2.400 ml aquadest hingga larut sempurna diatas hot plate.

3) Menyuum - suam media tersebut dan diukur dengan pH 7,4.

4) Menyiapkan 150 Petridisk steril untuk setiap Petridisk diisi 16 ml media *nutrient agar*.

5) Mensterilisasi dalam autoclave pada suhu 121° C dalam waktu 15 menit.

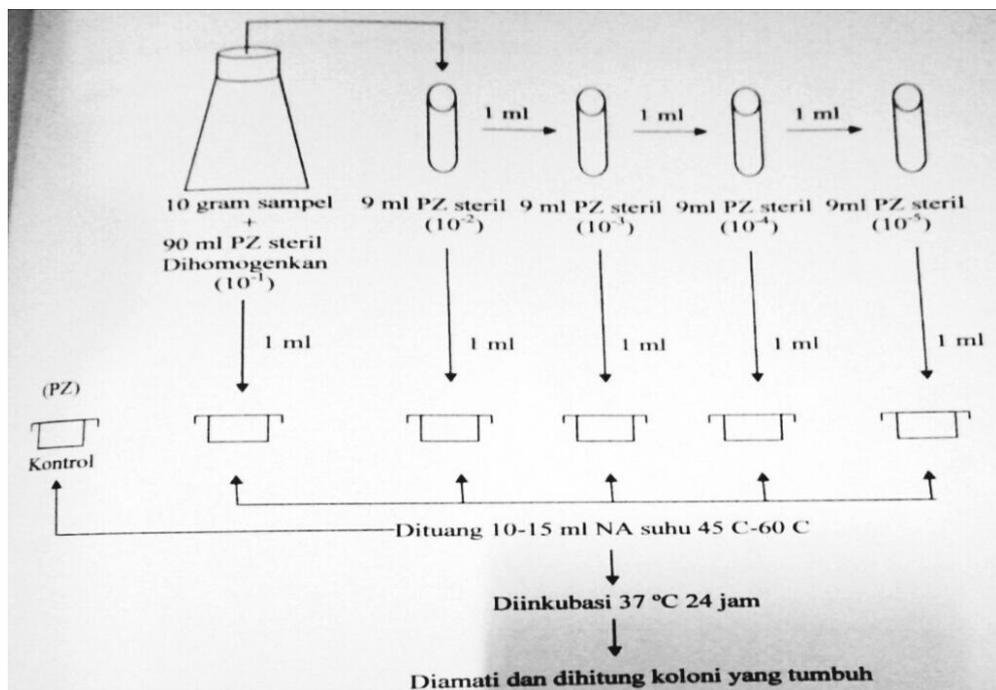
### 3.5.5 Pemeriksaan ALT

Pemeriksaan dikerjakan dalam waktu kurang dari 24 jam sejak saat pengambilan sampel. Alur pemeriksaan ALT dapat dilihat pada gambar 3.1 dan prosedur pemeriksaan ALT adalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Menyiapkan 4 tabung reaksi steril dalam rak tabung, masing-masing tabung secara berurutan diberi tanda  $10^{-2}$  ,  $10^{-3}$  ,  $10^{-4}$  ,  $10^{-5}$
3. Memasukkan 9 ml pZ steril dalam tabung reaksi ke 2 sampai 5 tersebut.
4. Untuk  $10^{-1}$  masukkan 90 ml PZ steril (NaCl 0,85%) pada erlenmeyer steril beri tanda  $10^{-1}$ .
5. Mengambil 10 ml sampel yang telah dikocok secara steril (dekat nyala api) dengan pipet, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi PZ steril ( $10^{-1}$ ) dan homogenkan.
6. Menyiapkan 5 cawan petri Media NAP : 5 cawan Petri diberi tanda  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan satu cawan petri untuk kontrol.
7. Mengambil masing-masing 1 ml dari Erlenmeyer pertama ( $10^{-1}$ ) untuk dipindahkan kedalam plate pertama  $10^{-1}$  dan tabung kedua  $10^{-2}$ . Selanjutnya dipipet 1 ml dari tabung kedua masukkan pada tabung ketiga dan seterusnya sampai tabung kelima. Begitu juga pindahkan ke cawan petri dengan kode pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ).
8. Setiap pengenceran pada tabung dihisap tiup beberapa kali supaya homogen.
9. Untuk kontrol, dimasukkan 1 ml PZ steril dalam cawan Petri yang berlabel kontrol.

10. Bila telah selesai, masukkan cawan Petri kedalam inkubator  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam dengan posisi terbalik.
11. Menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada tiap cawan petri dapat dilakukan setelah 24 – 48 jam.

Dibawah ini adalah bagan alur pemeriksaan angka lempeng total dari pengenceran sampai inkubasi sampel.



Gambar 3.1 Bagan Alur Pemeriksaan Angka Lempeng Total

(Fardiaz dalam Cahyani, 2014)

### 3.5.6 Perhitungan Jumlah Kuman

Untuk melaporkan hasil analisis mikrobiologi dengan cara hitungan cawan (*Total Plate Count*) digunakan suatu standard yang disebut *Standard Plate Count (SPC)* menurut Fadiaz (1993) sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 dan 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar di mana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Suatu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Standard Plate Count (SPC) ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan terdiri dari 2 angka, yaitu angka pertama didepan koma dan angka dibelakang koma. Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua.
2. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan angka kurang dari 30 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
3. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung.

4. Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2, tentukan rata – rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil terkecil.
5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) perpengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat di antara 30 dan 300.



### **3.6.2 Teknik Pengambilan Data**

Pengambilan data penelitian sebanyak 10 sampel dilakukan 3x pengulangan dengan waktu selisih satu minggu sekali dari setiap pengulangan. Data yang di peroleh di tabulasikan seperti Tabel 3.1.

### **3.6.3 Teknik Analisa Data**

Angka lempeng total yang diperoleh dibandingkan dengan Standart Nasional Indonesia (SNI) 7388-2009. Jika angka lempeng total pada air isi ulang melebihi SNI maka air isi ulang dinyatakan tidak memenuhi syarat.