

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif yang bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada air sumur.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta pada Bulan Februari 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh air sumur di Dukuh Nawud Desa Tegalmade Kecamatan Mojolaban Kabupaten Sukoharjo.

2. Sampel

Sampel yang diambil dalam penelitian ini adalah sebanyak 4 sampel air sumur yang terdapat di Dukuh Nawud Desa Tegalmade Kecamatan Mojolaban Kabupaten Sukoharjo secara *purposive sampling*, *purposive sampling* adalah teknik pengambilan sampel sumber data dengan pertimbangan tertentu yakni :

- a. Dua sampel (A1, A2) diambil dari air sumur yang jaraknya ≤ 10 meter dari *septic tank*.
- b. Dua sampel (B1, B2) diambil dari air sumur yang jaraknya ≥ 10 meter dari *septic tank*.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pembakar spiritus, botol steril, korek api, inkas, Pipet ukur steril 1 ml dan 10 ml, rak tabung reaksi, tabung reaksi, tabung Durham, jarum ose, jarum ent, kapas, cawan petri, *autoclave*, *incubator* dan erlenmeyer.

2. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Lactosa Broth* (LB), media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB), media *Endo Agar* (EA), media *Kliger's Iron Agar* (KIA), media *Sulfide Indol Agar* (SIM), media *Lysine Iron Agar* (LIA), dan media *Simmons Citrat Agar* (Citrat).

E. Variabel Penelitian

Variabel bebas dari penelitian ini adalah air sumur. Variabel terikat dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang dilakukan pada air sumur.

F. Prosedur Kerja

1. Sterilisasi Alat dan bahan

Sterilisasi alat dan bahan yang diperlukan dengan menggunakan sterilisasi uap panas kering (Oven).

- a. Alat – alat dibungkus dengan menggunakan kertas yang bersih.
- b. Dimasukkan ke dalam oven bersuhu 108°C selama 2 jam.
- c. Sterilitas bahan dilakukan dengan bahan yang akan di sterilkan dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.
- d. Semua botol beserta tali dan pemberatnya dibungkus dengan kertas coklat atau kertas timah dan diikat dengan benang lalu di sterilisasi dengan *autoclave* selama 30 menit pada suhu 120°C.

2. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan pengambilan secara langsung pada air sumur dengan botol steril.

- a. Dibuka bungkus botol yang telah steril.
- b. Dengan posisi mulut botol menghadap keatas dan pada bagian botol diikat tali.
- c. Diulurkan botol tersebut kedalam sumur secara perlahan – lahan jangan sampai menyentuh dinding sumur.

- d. Dichelupkan seluruh permukaan botol ke dalam air sumur hingga mencapai pertengahan sumur.
- e. Botol yang sudah terisi penuh dengan air ditarik secara perlahan – lahan, dibuang seperempat bagian dari air tersebut.
- f. Botol ditutup dan dibungkus dengan kertas steril tadi dan di beri label.

3. Uji Penduga

- a. Disiapkan 9 tabung media *Lactose Broth* (LB) yang telah dilengkapi dengan tabung Durham.
 - 3 tabung I berisi masing-masing 10 ml media (Kelompok I)
 - 3 tabung II berisi masing-masing 5 ml media (Kelompok II)
 - 3 tabung III berisi masing-masing 5 ml media (Kelompok III)
- b. Dipipet sampel asli (tanpa pengenceran) sebanyak:
 - 10 ml sampel dimasukkan masing-masing ke dalam 3 tabung kelompok I
 - 1 ml sampel dimasukkan masing-masing ke dalam 3 tabung kelompok II
 - 0,1 ml sampel dimasukkan masing-masing ke dalam 3 tabung kelompok III
- c. Dimasukkan ke dalam inkubator, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- d. Jumlah tabung yang positif diamati (keruh dan terbentuknya gas pada tabung Durham).

4. Uji Penegasan

- a. Diambil 2-3 ose secara aseptik dari tabung yang positif dan dimasukkan ke dalam BGLB cair.
- b. Kemudian diinkubasi pada suhu 44°C selama 24 jam (untuk jumlah bakteri *Escherichia coli*)
- c. Diamati jumlah tabung BGLB yang positif (keruh dan terbentuknya gas pada tabung Durham).

5. Uji Pelengkap

a. Isolasi Bakteri *Escherichia coli* pada Media Agar

1. Diambil 1 ose secara aseptik dari tabung yang positif dan di isolasi pada media *Endo Agar* (EA) dengan cara goresan empat kuadran.
2. Diinkubasi pada *inkubator* suhu 37°C selama 24 jam.
3. Kemudian diamati pertumbuhan koloni pada media tersebut.
 - Pada media *Endo Agar* (EA), media berwarna merah dan koloni kilat logam/merah metalik.

b. Uji Biokimia

1. *Kliger's Iron Agar* (KIA)
 - Diambil koloni dari media EA dengan menggunakan jarum ent lalu ditusukkan dan digoreskan pada media KIA.
 - Diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam.
 - Pada media KIA hasilnya A/A G S(-)
2. *Sulfide Indol Motility Agar* (SIM)
 - Diambil koloni dari media EA dengan menggunakan jarum ent lalu ditusukkan pada media SIM.
 - Diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam.
 - Pada media SIM hasilnya Sulfida (-), Indol (+), Motilitas (+)
3. *Lysine Iron Agar* (LIA)
 - Diambil koloni dari media EA dengan menggunakan jarum ent lalu ditusukkan dan digoreskan pada media LIA.
 - Diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam.
 - Pada media LIA hasilnya K/K S(-)
4. *Simmons Citrat Agar* (Citrat)
 - Diambil koloni dari media EA dengan menggunakan jarum ent lalu digoreskan pada media Citrat.

- Diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam.
- Pada media Citrat hasilnya Negatif (-)

6. Interpretasi Hasil

Tabel 3.1 Interpretasi Hasil

NO	MEDIA	INTERPRETASI HASIL
1.	<i>Lactose Broth</i> (LB)	Jumlah tabung yang positif diamati (keruh dan terbentuknya gas pada tabung Durham).
2.	<i>Brilliant Green Lactose Broth</i> (BGLB)	Jumlah tabung yang positif diamati (keruh dan terbentuknya gas pada tabung Durham).
3.	<i>Endo Agar</i> (EA)	<ul style="list-style-type: none"> - Media berwarna merah. - Koloni berwarna kilat logam/merah metalik.
4.	<i>Kliger's Iron Agar</i> (KIA)	A/A G S(-)
5.	<i>Sulfide Indol Motility Agar</i> (SIM)	Sulfida (-), Indol (+), Motilitas (+)
6.	<i>Lysine Iron Agar</i> (LIA)	K/K S(-)
7.	<i>Simmons Citrat Agar</i> (Citrat)	Hijau (-)

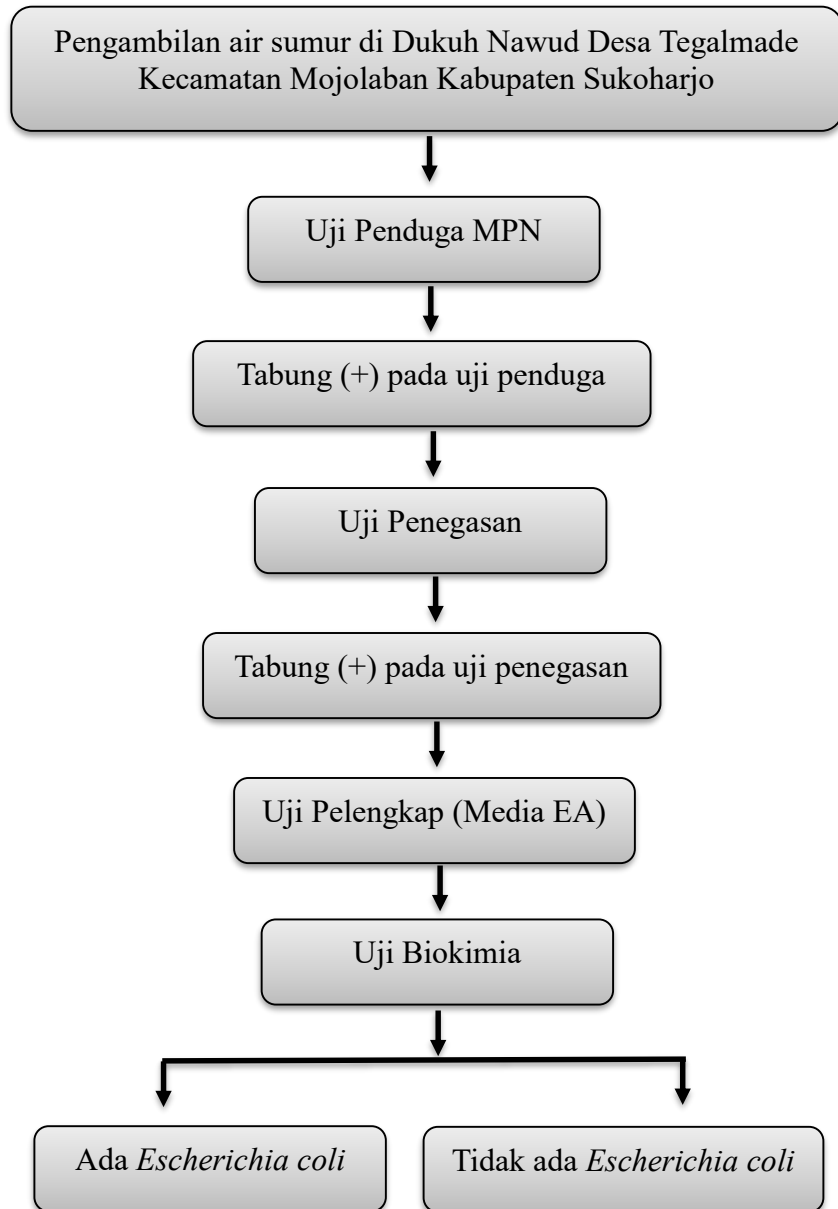
G. Teknik Pengumpulan Data

Data yang didapatkan dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari pemeriksaan langsung terhadap identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada sampel air sumur.

H. Teknik Analisis Data

Data penelitian hasil uji bakteri dari sampel air sumur terhadap bakteri *Escherichia coli* akan dijelaskan secara deskriptif dalam bentuk tabel untuk melihat identifikasi bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan metode MPN dan uji biokimia.

I. ALUR PENELITIAN



Gambar 3.12 Alur Penelitian