

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pada penelitian ini sampel air sumur diambil di rumah-rumah penduduk sekitar Kecamatan Semampir Surabaya dari 5 kelurahan diantaranya Ujung, Ampel, Pegirian, Wonokusumo, dan Sidotopo. Masing-masing kelurahan di ambil 3 sampel air sumur. Pengujian sampel air dilakukan di Balai Riset dan Standardisasi Industri Surabaya, Laboratorium Lingkungan dan Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya mulai bulan November 2010 sampai bulan April 2011.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut : *autoclave*, oven, pinset, cawan petri, bunsen, pipet mikro, LAF (*Laminar Air Flow*), gelas ukur, timbangan, gelas beker, erlenmeyer, pengaduk, mikroskop, kaca objek, pipetor, jarum ose, tabung reaksi, cover, label, spektrometer, pH meter, termometer, turbidimeter

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel air sumur di pemukiman Kecamatan Semampir Surabaya. Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu aquades, kapas, media SSA (*Salmonella-Shigella Agar*), media

EMB (*Eosin Metilen Blue*), media NA (*Nutrien Agar*), media TCBS (*Thiosulfate Citrate Bilesalt Sucrose*), larutan *Kristal violet*, alkohol, iodine, safranin, pereaksi *kovac's*, pereaksi *methyl red*, alfa naftol 5% , KOH 40%, media Urea Broth, media semi solid agar.

3.3 Kriteria Sumur

Sumur yang dijadikan pengambilan sampel memiliki kriteria tersendiri untuk tujuan mendapatkan data yang diinginkan. Kriteria dari sumur yang dijadikan tempat pengambilan sampel adalah sebagai berikut :

- Jarak sumur dengan septik tank ataupun wc berjarak kurang dari 9 meter
- Tinggi sumur lebih tinggi dari permukaan tanah
- Sumur tidak menggunakan pompa

3.4 Pengukuran Parameter Fisika, Kimia, dan Bakteriologis

Berdasarkan peraturan menteri kesehatan Republik Indonesia Nomor 416/Menkes/Per/IX/1990 tentang pengawasan dan syarat-syarat kualitas air yang disebut sebagai air minum adalah air yang memenuhi syarat kesehatan yang dapat langsung diminum, sedangkan yang disebut sebagai air bersih adalah air yang memenuhi syarat kesehatan, yang harus dimasak terlebih dahulu sebelum diminum. Syarat-syarat yang ditentukan sesuai dengan persyaratan kualitas air secara fisika, kimia dan bakteriologis.

1) Parameter Fisika

- a. Bau air adalah bau air sumur berdasarkan hasil penciuman penelitian yang dilakukan terhadap air sumur.

- b. Warna air adalah warna air sumur yang ditentukan berdasarkan alat Spektrometer
- c. Kekeruhan air
Kekeruhan air adalah kekeruhan air sumur, yang ditentukan dengan menggunakan Turbidity meter
- d. Suhu
Suhu adalah suhu air sumur yang ditentukan dengan menggunakan Termometer

2) Parameter Kimia

- a. pH air adalah pH air sumur berdasarkan hasil pengukuran yang dilakukan dengan menggunakan kertas Ph
- b. Krom (Cr) adalah banyaknya kandungan krom pada air sumur dengan menggunakan alat Spektrometer.
- c. Nitrat (NO₃) adalah banyaknya kandungan nitrat (NO₃) pada air sumur dengan menggunakan alat Spektrometer.
- d. Nitrit (NO₂) adalah banyaknya kandunagan nitrit (NO₂) pada air sumur artetis dengan menggnakan alat Spektrometer.
- e. Clorida (Cl) adalah banyaknya kandungan klorida pada air sumur dengan menggunakan alat Spektrometer.

3) Parameter Bakteriologis

- a. Jumlah bakteri Escherichia coli dan keberadaan bakteri patogen lainnya pada air sumur

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Teknik Pengambilan Sampel Air Sumur

Sampel diambil dari air sumur di pemukiman penduduk di Kelurahan Ampel, Kelurahan Pergirian, Kelurahan Sidotopo Wetan, Kelurahan Ujung, dan Kelurahan Wonokusumo, Kecamatan Semampir Surabaya. Penentuan letak-letak pengambilan sampel air sumur pada lokasi dilakukan dengan beberapa kriteria yaitu menentukan 3 (tiga) sumur untuk setiap kelurahan dengan lokasi sumur berdekatan dengan kamar mandi. Sampel diambil dengan cara menimba air lalu botol yang sudah disterilkan lebih dulu dimasukkan ke dalam alat timba dengan kondisi botol masih tertutup rapat, kemudian botol di buka dalam air sampai terisi lebih dari setengah isi botol dan tutup rapat botol di dalam alat timba lalu diberi label lalu dimasukkan ke dalam *box ice*.

3.5.2 Pemeriksaan Bakteriologis

Sampel mewakili tiap kelurahan di Kecamatan Semampir, kemudian sampel di bawa ke laboratorium untuk di uji bakteri patogen yang terkandung di dalam sampel.

3.5.2.1 Tahap Isolasi

Jumlah sampel air yang dianalisis dari setiap kelurahan diambil 3 sampel dari 5 kelurahan sehingga seluruhnya ada 15 sampel. Air pada botol sampel dikocok terlebih dahulu sebelum digunakan agar penyebaran bakteri merata. Kemudian diambil 1 ml lalu dikultur pada media SSA (*Salmonella-Shigella agar*), EMB (*Eosin Metilen Blue*), dan TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose*).

Untuk pendeteksian bakteri patogen yang terduga sebagai bakteri *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* dengan melakukan pengamatan secara morfologis pada masing-masing koloni biakan EMB (*Eosin Metilen Blue*), SSA (*Salmonella-Shigella agar*), dan TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose*), kemudian koloni yang di duga sebagai bakteri *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* di murnikan dengan cara memindahkan ke dalam NA (*Nutrient Agar*) miring dengan cara mengambil 1 ose koloni yang di duga sebagai bakteri *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* pada masing-masing media lalu menggoreskan (*streak*) pada media NA (*Nutrient Agar*) kemudian di inkubasikan pada suhu 36-37°C selama 2x24 jam untuk mendapatkan kultur murni dari *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp*.

3.5.2.2 Tahap Identifikasi

A. Uji Morfologi

Pada uji morfologi, kultur bakteri di NA (*Nutrient Agar*) miring diambil \pm 1 ose lalu dilakukan pengecatan gram kemudian diamati di bawah mikroskop.

- **Pengecatan Gram**

Bakteri yang ada di masing-masing NA (*Nutrient Agar*) diambil \pm 1 ose lalu dioleskan pada gelas objek untuk membuat apusan. Setelah itu gelas objek di fiksasi dengan cara melewatkan apusan di atas api bunsen. Setelah itu apusan ditetesi beberapa tetes larutan *Kristal violet* dan dibiarkan selama 2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Kemudian apusan

ditetesi beberapa tetes iodine lalu dibiarkan selama 2 menit setelah itu dicuci kembali menggunakan air mengalir dan dikering anginkan.

Setelah itu apusan ditetesi alkohol biarkan 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Terakhir apusan diberi beberapa tetes safranin lalu biarkan selama 30 detik kemudian dicuci menggunakan air mengalir setelah itu dikering anginkan. Selanjutnya apusan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x10.

B. Uji Fisiologis

1. Uji pada Media TSIA (*Tripel Sugar Iron Agar*)

Kultur murni *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* yang didapat dari pengkulturan pada media miring NA (*Nutrient Agar*) di kultur kembali pada media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) untuk uji fisiologis, dengan cara memindahkan 1 ose kultur pada media NA (*Nutrient Agar*) ke dalam media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*).

2. Uji Indol

Koloni *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* dari media NA (*Nutrient Agar*) miring diinokulasikan kedalam *tryptone broth*. Diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pada biakan yang diinkubasi 24 jam ditambahkan 0,2-0,3 ml pereaksi *kovac's* kedalam masing-masing tabung dan didiamkan selama 10 menit. Reaksi indol positif ditandai dengan terbentuknya lapisan merah pada permukaan biakan.

3. Uji Methyl Red

Koloni *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* dari media NA (*Nutrient Agar*) miring diambil masing-masing 1 ose dan dimasukkan ke dalam MR-VP media. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam, setelah itu ke dalam masing-masing biakan yang telah diinkubasi selama 48 jam ditambahkan 3 tetes pereaksi *methyl red*. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah.

4. Uji Voges Proskauer

Koloni *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* dari media NA (*Nutrient Agar*) diambil masing-masing 1 ose dan diinokulasikan ke dalam MR-VP media. Diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 48 jam kemudian ke dalam masing-masing biakan yang telah diinkubasi selama 48 jam ditambahkan 0,6 ml alfa naftol 5% dan 0,2 ml KOH 40% kemudian di vorteks dan didiamkan. Uji VP positif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda.

5. Uji Urease

Koloni *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* dari media NA (*Nutrient Agar*) diambil masing-masing 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media Urea Broth. Diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

6. Uji Motilitas

Koloni *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio sp* dari media NA (*Nutrient Agar*) diambil masing-masing 1 ose dengan cara tusukkan kedalam media semi solid agar. Diinkubasi dalam suhu 37⁰C selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika ada pertumbuhan yang menyebar dari garis inokulasi sehingga berarti ada motilitas.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan selanjutnya dilakukan analisis secara deskriptif dan pengidentifikasian mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Sehingga data yang dianalisis dalam penelitian ini berupa jenis bakteri patogen yang ditemukan setelah isolasi dan identifikasi pada setiap sumur.

