

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA USU. Jl Unit 3, FMIPA, Padang Bulan, Medan Baru, Medan City, North Sumatra.

3.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret – April 2022.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kaca, tabung durham, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, autoclave, beaker glass, inkubator, spiritus, pipet ukur, batang pengaduk, hot plate, erlemeyer, kapas, tisu, cling wrap, aluminium foil, mikroskop, objek glass, cover glass, spatula, kertas label.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Media NA (*Nutrient Agar*), Media LB (*Lactose Broth*), Media BGLB (*Briliant Green Lactose Broth*), Media EMB (*Eosin Methylen Blue*), Media MR-VP, Methyl Red, Alfa Naftol, KOH 40%, Simon sitrat, preaksi indol, alkohol 70% dan sampel air dan aquades.

3.3 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini air yang diambil dari sumber air Simbara yang terletak di Dusun Galiaman Kecamatan Kerajaan Kab. Pakpak Bharat.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dari sumber air di Dusun Galiaman Kec. Kerajaan kab. Pakpak Bharat. Metode pengambilan sampel digunakan pada penelitian ini adalah mengambil sampel air dari 3 stasiun. Stasiun pertama bagian hulu air berjarak sekitar ± 1000 m dari pemukiman masyarakat, stasiun ke dua bagian tengah

sumber air yang berjarak sekitar $\pm 100\text{m}$ dari titik awal pengambilan sampel, dan stasiun bagian hilir sumber air yang memiliki jarak $\pm 100\text{m}$. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam botol kaca yang sudah disterilisasi dan tertutup, botol diberi tanda/ label.

3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat dalam suatu benda alat ataupun bahan yang akan digunakan. Tujuan dari sterilisasi untuk menghambat pertumbuhan dan menyingkirkan semua mikroorganisme yang ada pada alat dan bahan. Alat dan bahan yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan cara dicuci kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dan oven. Pada oven temperature yang digunakan $150\text{--}170^\circ\text{C}$ selama minimal 1 jam. Sterilisasi pada autoklaf pada suhu 121°C (Yusmaniar, 2017).

3.4.3 Pembuatan Media

a. Media *Nutrient Agar*

Dibuat dengan tujuan sebagai media kultur isolat bakteri. Media *Nutrient Agar* (NA) media yang sangat umum digunakan pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*) Medium NA dibuat dengan cara di timbang media NA 2,8 gr dan larutkan dalam 100 ml aquadest kemudian panaskan diatas *hotplate* hingga homogen, kemudian sterilkan pada *autoklaf* pada suhu 121°C Selama 1 Jam guna menghindari tumbuhnya mikroorganisme yang tidak diinginkan. Setelah sterilisasi, media dapat dituang secara aseptis, pada cawan petri steril untuk penggunaan. Sebelum menuang media, ditunggu hingga suam-suam kuku ($\pm 40^\circ\text{C}$) lalu dibiarkan pada suhu ruang hingga media memadat dengan sempurna (Juariah, 2018).

b. Pembuatan Media LB (*Lactose Broth*).

Media LB *double strenght* membutuhkan 2,34 gram media yang dilarutkan dalam 90 ml akuades. Sedangkan untuk membuat media LB *single strenght* membutuhkan sebanyak 2,106 gram dan dilarutkan ke dalam 162 ml

aquades. Kemudian dipanaskan diatas hot plate sambil diaduk hingga larut dan mendidih. Selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf 10-15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Lalu media LB double strenght dimasukkan dalam tabung besar berisi tabung durham masing-masing 10 ml. Sedangkan media LB single strenght dimasukkan dalam tabung kecil berisi tabung durham masing-masing 9 ml (Umaya, 2017).

c. Pembuatan Media BGLB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*).

Media BGLB merupakan media yang digunakan untuk pemeriksaan MPN *Coliform*. Pembuatan media BGLB ditimbang media sebanyak 40 gram, lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer diukur pH 7,0 ditambahkan aquadest sebanyak 1 liter, kemudian masukkan kedalam tabung reaksi 16 x 160 mm sebanyak 5 ml (lengkap dengan tabung durham), lalu disterilkan pada autoklaf dengan suhu 121°C selama 15-20 menit (Kamaliah, 2017).

d. Pembuatan Media EMBA (*Eosin Methylen Blue Agar*).

Media EMBA merupakan medium pertumbuhan selektif dan diferensial untuk mendeteksi dan membedakan kelompok bakteri *Coliform* dengan bakteri lain. Formula EMBA 37,5 gram/ liter aquades (atau sesuaikan pada botol media EMBA). Ditimbang medium menggunakan timbangan analitik agar, larutkan 37,5 gram medium kedalam 1 liter aquades dengan cara dipanaskan pada suhu 80°C sambil diaduk medium dengan sempurna tanpa ada gumpalan menggunakan alat hot palte dan magnetik stirrer, atur pH medium hingga $6,8 \pm 0,2$ setelah suhu medium mencapai 25°C, kemudian medium dimasukkan kedalam Erlenmeyer ditutup dengan rengang. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 Atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi medium cair dimiringkan hingga 45-50°C. Medium dalam erlemeyer dituang dalam cawan steril secara aseptis, ditunggu hingga media memadat (Microbeholc, 2020).

3.4.4 Pembuatan UjiIMVIC

Media IMVIC digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri tertentu, Menimbang 4,5 gram bubuk SC, dilarutkan dalam 200 ml aquadest, dipanaskan

menggunakan hot plate, diaduk perlahan hingga homogen dan jernih menggunakan magnetic stirrer atau batang pengaduk.

3.4.5 Metode MPN

a. Penduga

Pembuatan media LB membutuhkan 9 tabung reaksi berisi tabung durham terbalik yang dibagi dalam tiga seri untuk masing-masing sampel yaitu 3 tabung Double Strenght (dua kali resep) berisi sampel 10 ml, 6 tabung Single Strenght (satu kali resep) yang berisi 3 tabung sampel 1 ml dan 3 tabung sampel 0,1 ml. Selanjutnya diinkubasi masing-masing sampel pada suhu 35- 37°C selama 48 jam. Jika terdapat gelembung pada tabung durham menandakan sampel positif bakteri gram negatif (-) maka dapat dilakukan uji selanjutnya (Umaya, 2017).

b. Penegasan

Uji penegasan dilakukan setelah melihat hasil uji penduga sampel positif mengandung bakteri gram negatif (-). Selanjutnya dilakukan inokulasi sampel positif dari LB Double dan Single streinght kedalam media BGLB (*Briliant Green Lactose Broth*). Inokulasi dilakukan dengan cara memasukkan jarum ose kedalam media LB yang positif dan dimasukkan kedalam media BGLB. Langkah ini dilakukan didalam Laminar Air Flow didekat api bunsen untuk mencegah kontaminasi. Selanjutnya disimpan dan diinkubasi sampel pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Lalu dilihat jika terbentuk gelembung pada tabung durham menandakan sampel positif Bakteri *Coliform* menggunakan analisis ragam 3- 3-3 (Supardan, 2018).

c. Uji pelengkap

Uji pelengkap dilakukan jika pada uji penegasan positif mengandung bakteri *Coliform*. Uji ini dilakukan dengan memasukkan jarum ose kedalam media BGLB lalu dilanjutkan metode streak. Pada uji ini media EMBA dibagi sesuai jumlah perlakuan yang positif mengandung Bakteri *Coliform*. Selanjutnya cawan petri ditutup dengan plastic wrap. Pada suhu 35°C biakan diinkubasi selama 24 jam. Jika terbentuk koloni berwarna hijau metalik maka positif mengandung

bakteri *Coliform* fekal dan jika koloni berwarna merah muda hingga coklat maka positif mengandung bakteri *Coliform* non fekal (Winasari, 2015).Selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri secara makroskopis dari bentuk, warna, elevasi dan tepi dari koloni bakteri berdasarkan literatur (Putri, 2018).

3.4.6 Metode EMBA (*Eosin Methylen Blue Agar*)

Media EMBA digunakan untuk menguji kualitas air. Untuk membedakan bakteri *Coliform* fekal dan bakteri *Coliform* Non-fekal yang menandakan kemungkinan terjadi kontaminasi mikroorganisme pathogen dalam sampel air. Bakteri gram negatif yang memfermentasi laktosa dapat menghasilkan asam, dengan perubahan menjadi warna ungu gelap atau hijau metalik merupakan indikator bakteri yang dapat memfermentasi laktosa dengan kuat atau yang disebut dengan bakteri *Coliform* fekal, pada bakteri yang memfermentasi laktosa dengan lambat akan menghasilkan asam dengan jumlah yang sedikit sehingga koloni akan berwarna coklat atau merah muda. Pada bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa koloni akan berwarna merah muda atau transparan disebut juga dengan bakteri *Coliform* non-fekal. Metode EMBA (*Eosin Methylen Blue Agar*) bakteri *Coliform* ditumbuhkan pada media EMBA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Ciri *Coliform* yang tumbuh yaitu koloni berwarna merah, merah muda dan hijau metalik. Bentuk koloni dengan pusat berwarna gelap. Jumlah koloni *Coliform* dilakukan perhitungan dan dikoleksi dengan menginokulasikan pada *nutrient agar* miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Baehaqi, 2015).

3.4.7 Metode IMVIC

- Uji Indol

Satu ose biakan bakteri dari NA miring diinokulasikan kedalam media MIO, lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C ditambahkan 0,02-0,03 ml pereaksi indol ke dalam masing-masing tabung, dikocok dan didamkan selama beberapa menit. Warna merah cherry pada permukaan membentuk cincin

menandakan reaksi indol positif, warna jingga menunjukkan reaksi indol negatif (Sari, 2014).

- *Uji Methyl red*

Untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi dan memelihara kestabilan asam dari proses akhir fermentasi glukosa. *Methyl red* merupakan indikator pH, inokulasikan ke dalam media MR-VP kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, Ditambahkan 5 tetes methyl red, dikocok dan didiamkan selama beberapa menit. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif dan warna merah menunjukkan reaksi positif (Sari, 2014).

- *Uji Voges Proskauer*

Satu ose dari biakan NA miring diinokulasikan ke dalam media MR-VP, lalu diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C, ditambahkan 3 tetes larutan alfa naftol dan 2 tetes KOH 40%. Dikocok dan didiamkan selama beberapa menit. Warna merah muda sampai merah tua menunjukkan hasil positif, jika tidak terjadi perubahan warna maka menunjukkan hasil negatif (Sari, 2014).

- Uji Sitrat

Satu ose dari biakan NA miring diinokulasikan ke dalam media simmons citrar, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, hasil positif ditandai warna hijau menjadi warna biru (Irianto, 2006).

3.4.8 Identifikasi Bakteri

Proses Identifikasi pada sampel bakteri yang diambil dari sumber air simbara akan dilakukan, Pengamatan makroskopis, mikroskopis, uji pewarnaan gram.

- a. Pengamatan makroskopis

Pengamatan makroskopik merupakan isolat bakteri dengan mengamati permukaan atau untuk melihat bentuk koloni, mengamati dari samping untuk melihat elevasi koloni, pigmentasi koloni, ukuran koloni dan tepi koloni.

- b. Pengamatan mikroskopis

Pewarnaan gram isolat bakteri pada media NA diambil menggunakan jarum ose secara aseptis kemudian disuspensikan dengan aquades yang ada diatas

objek glass. Kemudian preparat difiksasi diatas api Bunsen sampai kering, lalu ditetesi menggunakan Kristal violet, lalu didiamkan selama satu menit dan dicuci dengan air mengalir kemudian diangin-anginkan. Preparat ditetesi larutan iodion lalu didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Kemudian hasil dari preparat yang kering ditetesi dengan larutan etanol 96% dan didiamkan selama 30-45 detik. Kemudian preparat ditetesi safranin dan diratakan, selanjutnya preparat didiamkan selama 1 menit dan dicuci menggunakan air mengalir. Preparat ditunggu hingga mengering kemudian diamati dibawah mikroskop dan ditetesi minyak imersi. Uji pewarnaan gram, hasil positif ditandai dengan adanya warna ungu pada bakteri dan warna merah ditandai dengan negatif (Hadioentomo, 1993).



3.5 Analisis Data

Data dalam penelitian ini akan dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui apakah terdapat bakteri *Coliform* dan bagaimana karakteristik bakteri *coliform* pada sumber air. Dimana data yang diperoleh dari hasil isolasi dan identifikasi bakteri akan di deskripsikan sebagaimana adanya.