BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penetlitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang mengarah pada gejala-gejala, fakta-fakta atau kejadian-kejadian secara sistematis dan akurat, mengenai sifat-sifat populasi atau daerah tertentu (Hardani, 2020). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi jumlah bakteri pada air zamzam kemasan yang diperjualbelikan di Kawasan embong arab kota malang.

3.2 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari hingga Februari 2025 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, *hot plate, laminar air flow, beaker glass* 50 ml , beaker glass 250 mL, beaker glass 100 mL, timbangan, batang pengaduk, spatula, kaca arloji, *magnetic stirrer*, gelas ukur 100 mL, autoklaf, Erlenmeyer 250 mL, Erlenmeyer 500 ml, rak tabung reaksi, tabung reaksi, cawan petri, mikropipet, *vortex*, bola pump, pipet ukur 10 mL, *colony counter*, bunsen, korek api, *blue tips 1000* µl, labu ukur 100 ml dan inkubator.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel air zamzam kemasan media *Pepton Water,* media *Yeast Extract Agar*, aluminium foil, kapas steril, tisu, label, kertas dan akuades.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah sampel air zamzam kemasan yang dijual di Embong Arab Kota Malang.

3.4.2 Sampel

Sampel yang diperoleh terdiri dari 3 sampel air zamzam kemasan. Sampel diambil satu sampel dengan harga paling murah dari tiga toko yang berada di Embong Arab Kota Malang. Jumlah toko di sekitar Embong Arab yang berjualan air zamzam kemasan terdapat 6 toko. Sampel air zamzam kemasan yang dijual di Embong Arab Kota Malang.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variable bebas

Variabel bebas adalah variabel yang berperan dalam mempengaruhi atau menyebabkan terjadinya perubahan pada variabel dependen (terikat) (Ridha, 2017). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah air zamzam kemasan.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi konsekuensi dari variabel bebas (Ridha, 2017). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah cemaran bakteri dengan menggunakan metode Angka Lempeng Total.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat ukur	Kriteria
Jumlah koloni *bakteri* pada Sampel air zamzam kemasan	Menentukan jumlah koloni dalam air zamzam pada pengenceran 10^{-2}	Jumlah koloni dalam setiap sampel yang dianalisis	Menggunakan Metode Angka Lempeng Total (ALT) yang mengacu pada SNI 6242-2023	Numerik

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pembuatan pengencer pepton

Sebanyak 1 gram pepton ditimbang dan dilarutkan aquades sebanyak 1000 ml, kemudian dipanaskan menggunakan hot plate dan diaduk menggunakan magnetic stirrer. Selanjutnya digunakan pH meter untuk mengecek pHnya. pH disesuaikan dengan menambahkan larutan sodium hidroksida [c(NaOH) = 1 mol/L) atau asam klorida [c(HCL) = 1 mol/L] sehingga setelah sterilisasi dalam autoklaf pada (121 ±3)°C selama (15 ± 1) menit. pH akan menjadi 7,0 ± 0,5 pada 25 °C.

3.7.2 Pembuatan HCL 1 N

Pembuatan larutan HCL 2N dilakukan dengan metode pengenceran dari HCL pekat 12 N. Setelah perhitungan, sejumlah HCL pekat 12 N dipipet sebanyak 8,26 mL menggunakan pipet ukur 10 mL di lemari asam, Larutan HCL pekat tersebut kemudian dimasukkan secara perlahan ke dalam labu ukur 100 ml yang telah diisi sebagian dengan aquadest. Setelah itu, larutan diencerkan hingga tanda batas pada labu ukur dengan menambahkan aquades, kemudian dikocok perlahan hingga homogen.

3.7.3 Pembuatan NaOH 1 N

Pembuatan larutan NaOH 1 N dilakukan dengan menimbang sebanyak 4 gram NaOH menggunakan neraca analitik. NaOH yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam sebagian aquades dengan volume kurang lebih 50 mL di dalam gelas beaker 100 mL, sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga seluruh butiran NaOH larut sempurna. Setelah larutan homogen, campuran dipindahkan ke dalam labu ukur kemudian ditambahkan aquades secara perlahan hingga mencapai tanda batas labu ukur. Selanjutnya, larutan dikocok perlahan hingga homogen, labu ukur dengan menambahkan aquadest, kemudian dikocok perlahan hingga homogen.

3.7.4 Pembuatan Media Yeast Extract Agar

Sebanyak 6,9 gram media yeast extract agar ditimbang dan dilarutkan aquades 300 ml. Panaskan menggunakan hot plate. PH disesuaikan menjadi 7.2±0.2 pada 25 °C. Gunakan pH meter untuk

mengecek nya. Tuang ke dalam erlenmeyer 500 ml. Sterilisasi dalam autoklaf pada (121 ±3) °C selama (15 ± 1) menit Untuk penggunaan, cairkan media pembiakan, biarkan dingin dan jaga suhunya pada (45 ± 1) "C menggunakan penangas air. Dianjurkan untuk menyimpan media pembiakan ini tidak lebih dari 4 jam pada 45 °C. apabila melebihi maka harus dibuang.

3.7.5 Pengujian ALT

Penelitian ini menggunakan metode cawan tuang. Penggunaan volume porsi uji dilakukan pengenceran dari Tingkat pengencer 10^{-1} hingga 10^{-5}. Pada metode hitungan cawan digunakan pengenceran secara desimal Untuk pengenceran desimal (satu per sepuluh kali), ukur 9 mL pengencer dan masukkan pada botol atau tabung pengencer steril dan 1 ml sampel ,untuk membuat pengenceran 10^{-2} sebanyak 1 ml dari larutan tadi 10^{-1} dimasukan kedalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml larutan pengencer steril, dan langkah ini dulang pada dua sampel yang lainya hingga 10^{-5}.Pengencer dengan volume tersebut telah disterilisasi terlebih dahulu pada botol bertutup ulir. Seluruh proses dilakukan secara aseptis di dalam air flow untuk mencegah kontaminasi.

Media yang dibutuhkan dicairkan dalam penangas air. Tempatkan media cair tersebut di penangas air pada suhu (45 ± 1) °C dalam waktu yang cukup sehingga suhu media sama dengan suhu penangas. Siapkan dan tandai cawan Petri yang diperlukan. Buat pengenceran yang diperlukan. Setelah dikocok dengan merata, bagikan porsi uji ke dalam cawan. Pindahkan setiap tabung atau wadah media yang sudah mencair dari penangas air, keringkan bagian luarnya dan lewatkan bagian lehernya pada api. Tambahkan media ke tiap cawan Petri dan campur dengan hati-hati sehingga diperoleh distribusi mikroorganisme yang merata pada cawan sebanyak 15 mL media dan digunakan untuk porsi uji sebanyak 1 ml. Biarkan cawan memadat pada permukaan datar. Segera sesudah agar memadat, inkubasi cawan.

Kemudian di inkubasi satu set pada (36 ± 2) °C selama (44 ± 4) jam. Cawan dibalikkan. Amati cawan segera setelah dikeluarkan dari inkubator.

Abaikan setiap cawan yang pertumbuhannya melebar (tidak ada batas sambungan) dan atau berlebihan menutupi cawan.

3.7.6 Perhitungan koloni (ISO 8199)

Setelah inkubasi amati cawan, lakukan validasi periode penyimpanan sehingga sesuai dengan metode. Perhitungan hasil pada bagian ini dapat digunakan pada kasus dimana jumlah total koloni pada cawan adalah antara 10 dan 300. Mengingat setiap koloni diasumsikan berasal dari satu mikroorganisme atau dari agregat tunggal mikroorganisme, maka hasil dinyatakan sebagai jumlah koloni dalam satu volume acuan spesifik dari contoh (umumnya 100 ml atau 1 mL) dengan menggunakan persamaan :

$C_s = \frac{Z}{Vtot} \times V_s$

C_s adalah estimasi jumlah koloni dalam volume Vs contoh

Z adalah jumlah koloni yang dihitung pada cawan atau pada membrane yang

Diperoleh dari pengenceran d1,d2…,d, atau diperoleh dari volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran)

V_s adalah volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganisme dalam contoh;

V_{tot} adalah volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang di enumerasi. V_{tot} adalah jumlah volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran) atau dihitung menggunakan persamaan(2):

$V_{tot} = (n_1V_1d_1) + (n_2V_2d_2) + \ldots\ldots + (n_1V_1d_1)$

V_{tot} adalah volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang di enumerasi

$n_1,n_2,..n_i$ adalah jumlah cawan yang dihitung untuk pengenceran $d_1,d_{2,\ldots}d_i$

$V_1,V_2,..V_i$ adalah volume uji yang digunakan sebanyak 1 ml

$d_1,d_2,..d_i$ adalah pengenceran yang digunakan untuk volume uji $V_1,V_2,..V_i$($_d$ =1 untuk contoh yang tidak diencerkan, d =0,1 untuk pengenceran sepersepuluh dan seterusnya.

3.8 Pengolahan dan Penyajian Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data-data yang dikumpulkan dari hasil pengujian dan observasi diolah dengan menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu data disajikan dalam bentuk tabel dengan narasi.

3.8.2 Penyajian Data

Tabel 3. 2 Hasil Data Pengamatan air zamzam kemasan

SAMPEL	**PENGENCERAN**					**Blanko (Media + Pengencer)**	**Blanko (Media)**
	10^{-1}	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**		
A 1							
A 2							
A 3							
B 1							
B 2							
B 3							
C 1							
C 2							
C 3							

Tabel 3. 3 Tabel data hasil perhitungan ALT

Nilai ALT(CFU/g)				
Sampel Uji	**Replikasi 1**	**Replikasi 2**	**Replikasi 3**	**Rata-rata**
Sampel A				
Sampel B				
Sampel C				

.