

Eko Sugeng Pribadi
Arman Deskiarto

TATA LAKSANA PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGIK
CONTOH ASAL LINGKUNGAN

TATA LAKSANA PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGIK

CONTOH ASAL LINGKUNGAN

EKO SUGENG PRIBADI
eko.spribadi@yahoo.co.id

Divisi Mikrobiologi Medik
Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Institut Pertanian Bogor
Kampus Dramaga Jl. Agatis Dramaga Kabupaten Bogor Jawa Barat 16680

Center for Tropical Animal Studies (CENTRAS)
Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Institut Pertanian Bogor
Jl. Padjadjaran Kota Bogor Jawa Barat 16143

ARMAN DESKIHARTO
rayschwarz@ymail.com

Center for Tropical Animal Studies (CENTRAS)
Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Institut Pertanian Bogor
Jl. Padjadjaran Kota Bogor Jawa Barat 16143

SEKAPUR SIRIH

Pemeriksaan mikrobiologik terhadap contoh-contoh asal lingkungan, seperti udara, tanah, dan air, membutuhkan keterampilan tersendiri.

Sudah banyak panduan kerja yang membantu mahasiswa dan pelaksana pemeriksaan di laboratorium. Mahasiswa dan pelaksana pemeriksaan akan lebih mudah melaksanakan pekerjaan yang diarahkan setelah terlebih dahulu memahami kegiatan di laboratorium mikrobiologik. Buku ini hanyalah salah satu panduan yang memberikan arahan-arahan praktis, terutama untuk mahasiswa, ketika melakukan pemeriksaan mikrobiologik terhadap contoh-contoh asal lingkungan. Sebagian besar teknik pemeriksaan yang diberikan dalam buku ini sudah dicantumkan juga dalam buku-buku lainnya. Namun, tidak tertutup kemungkinan ada beberapa teknik di dalam Buku ini yang belum ada di buku lain kecuali tertulis dalam jurnal-jurnal penelitian.

Setiap bab percobaan diberikan rangsangan untuk memahami kegiatan yang dilaksanakan dengan melakukan pembahasan atas pekerjaan yang dilakukan melalui beberapa pertanyaan.

Semoga Buku memberikan manfaat dalam peningkatan kemampuan pemeriksa yang sudah bekerja dengan tekun di laboratorium mikrobiologik.

Bogor, 23 Desember 2023

Eko S. Pribadi

DAFTAR ISI

Percobaan 1 PENERAPAN KEAMANAN BEKERJA DI LABORATORIUM	1
Percobaan 2 MEMBUAT KURVA PERTUMBUHAN BAKTERI	15
Percobaan 3 PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGIK MUTU UDARA	21
Percobaan 4 MELACAK JASAD RENIK DI PERAIRAN (Cara Angka Paling Mungkin, <i>Most Probable Number</i> - MPN)	31
Percobaan 5 MELACAK JASAD RENIK DI PERAIRAN (Melacak Virus Enterik)	41
Percobaan 6 MELACAK BAKTERI BENTUK KOLI PADA AIR, MAKANAN DAN PERMUKAAN MENGGUNAKAN CARA RODAC DAN PETRIFILM™	49
Percobaan 7 (Melacak Bakteriofaga/Faga)	57
Percobaan 8 PEMERIKSAAN JASAD RENIK DI TANAH MENGGUNAKAN CARA PAPAN GELAS SENTUH	63
Percobaan 9 JASAD RENIK TANAH: BAKTERI, KAPANG, KHAMIR, DAN AKTINOMISETA	71
Percobaan 10 JASAD RENIK TANAH: CENDAWAN BERFILAMEN (<i>FILAMENTOUS FUNGI</i>)	93
Percobaan 11 KEBUTUHAN OKSIGEN SECARA BOKIMIAWI (<i>BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND</i> , BOD)	103
Percobaan 12 NITRIFIKASI DAN DENITRIFIKASI	111

DAFTAR GAMBAR

1	Kabinet keamanan hayati	1
2	Contoh Kurva pertumbuhan jasad renik	15
3	Cara pembuatan pengenceran seri desimal	18
4	Contoh rangkaian pengenceran <i>E. coli</i> dari tiga pengenceran yang ditempatkan pada permukaan agar dalam cawan. Penambahan pengenceran dilakukan dari cawan di kiri ke kanan. Cawan A yang dapat dihitung karena terdapat pertumbuhan koloni dengan jumlah diperkirakan dalam kisaran 30-300 koloni	19
5	Peralatan <i>Impinger</i> cair untuk menangkap aerosol biologik	21
6	Penangkap partikel udara enam tingkat Anderson	22
7	Penggunaan penyaring membran	25
8	Uji MPN. Perangkat tabung (a) dan tabung uji yang memperlihatkan hasil positif (kiri, b)	32
9	Penambahan contoh air ke tabung MPN	36
10	Inokulasi ke atas media EMBA dan ENDO AGAR dan tampilan bakteri	37
11	Tata kerja pemekatan contoh air dan isolasi virus enterik	43
12	Efek sitopatogenik (CPE): Lapisan tunggal Buffalo Green Monkey Cell sebelum diinfeksi (a) dan efek sitopatogenik khas yang disebabkan oleh enterovirus (b)	46
13	Persiapan cara menggunakan PetriFilm™	52
14	Skematik bakteriofag	57
15	Tahap kerja mengisolasi fag	59
16	Plak fag yang tumbuh di atas permukaan agar	60
17	Pembenaman gelas objek pada contoh tanah dalam gelas piala	65
18	Cara menekan dan mencabut gelas objek yang akan diwarnai (a) dan hasil pencabutan yang diharapkan (b)	66
19	Panduan pengamatan jasad renik yang tertangkap di gelas objek	68
20	Cara pengenceran desimal	74
21	Cara penggoresan untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Öse harus dipanaskan/disuci-hamakan di setiap tahapan sebelum melakukan tahap goresan berikutnya	80
22	Skema uji antibiogram/uji kepekaan terhadap antibiotika	81

23	Apusan kapas bergagang yang telah dicelupkan ke suspensi bakteri ke atas permukaan media (a) dan penempatan cakram antibiotika di atas permukaan media (b)	83
24	Contoh Hasil uji antibiogram	84
25	Pertumbuhan sejumlah kapang yang diisolasi dari tanah setelah dilakukan pengenceran desimal	94
26	Skema tata kerja penghitungan cendawan berfilamen	96
27	Sketsa struktur sel berfilamen	99
28	Siklus nitrogen	111

DAFTAR TABEL

1	Teknik pemeriksaan contoh mikrobiologik lingkungan	4
2	Contoh pelarut yang digunakan dalam pengambilan contoh permukaan	10
3	Teknik pengambilan contoh permukaan lingkungan	11
4	Pengenceran dari titik waktu biakan <i>E. coli</i> yang akan ditempatkan dalam cawan	19
5	Daftar bahan dan peralatan	24
6	Tabel MPN 3 tabung pengenceran	34
7	Tabel MPN 5 tabung positif	35
8	Uji biokimiawi indol, methyl merah, Voges-Proskauer, dan sitrat (IMViC) dan bakteri negatif Gram yang dikenali	35
9	Pemanfaatan fag untuk petunjuk mutu lingkungan	58
10	Tingkat BOD terhadap mutu air limbah	103
11	Volume contoh air yang diperlukan berdasarkan perkiraan nilai BOD	107

Percobaan 1

PENERAPAN KEAMANAN BEKERJA DI LABORATORIUM

Bekerja di laboratorium mikrobiologik berarti bersentuhan dengan jasad-jasad renik baik yang patogen maupun yang tidak patogen. Beragam jasad renik mungkin saja berada di permukaan peralatan dan ruangan di laboratorium. Jasad renik patogen dapat menginfeksi peneliti, atau pekerja laboratorium yang sedang bekerja dengan jasad renik patogen tersebut jika tidak dikendalikan dengan baik. Oleh karena itu, perlu tata kerja yang harus dipatuhi selama berkegiatan di laboratorium.

1.1 Keamanan hayati (*biosafety*)

Keamanan hayati dalam kegiatan di laboratorium mikrobiologik adalah serangkaian kegiatan terstruktur dalam upaya pencegahan munculnya dampak dan keadaan berbahaya akibat kegiatan laboratorik terhadap peneliti, atau pekerja laboratorium. Laboratorium harus memiliki panduan kerja pelaksanaan keamanan hayati baku. Tujuan utama keamanan hayati adalah melakukan pemeriksaan terhadap bahan kimia, jasad renik, radiasi, dan lainnya secara berkala selama pelaksanaan kegiatan di laboratorium. Misalnya, peneliti, atau pekerja laboratorium harus melaksanakan tata cara pencegahan terinfeksi penyakit antraks ketika sedang bekerja dengan bakteri *Bacillus anthracis*. Pekerja di laboratorium sebaiknya bekerja menggunakan kabinet keamanan hayati (*biosafety cabinet*, *laminar flow cabinet*) seperti yang disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Kabinet keamanan hayati (Sanders, 2012)

1.2 Pengamanan hayati (*biosecurity*)

Pengamanan hayati mengacu pada serangkaian tindakan perlindungan, pengendalian, dan akuntabilitas terhadap jasad renik patogen dan toksin biologik yang memiliki dampak tinggi terhadap kesehatan manusia dan hewan. Pengamanan hayati bertujuan mencegah kepemilikan, kehilangan, pencurian, penyalahgunaan, pengalihan, dan pelepasan jasad renik patogen dan toksin biologik yang melanggar hukum, baik disengaja maupun tidak disengaja.

1.3 Analisis risiko

Analisis risiko merupakan satu kegiatan yang harus dibiasakan dilakukan oleh peneliti dan penata-laksana laboratorium. Analisis risiko diperlukan untuk mengenali potensi bahaya, menilai risiko yang terkait dengan bahaya tersebut, dan menetapkan tindakan pencegahan dan tata kerja baku untuk meminimalkan paparan risiko tersebut terhadap karyawan yang mengerjakan isolat jasad renik, terutama yang jasad renik patogen.

Penilaian risiko biologik secara kualitatif harus dilakukan dan kemungkinan akan melibatkan pertimbangan profesional dan sumber data tertulis yang ada. Ketidakpastian atau kurangnya data ilmiah menyebabkan penilaian risiko sering kali didasarkan pada pengetahuan atau informasi yang tidak lengkap. Keterbatasan bawaan dan asumsi yang dibuat dalam proses juga ada, dan persepsi risiko yang dapat diterima berbeda-beda bagi setiap orang. Risikonya tidak pernah nol, dan potensi kesalahan manusia selalu ada.

Langkah awal penilaian risiko di laboratorium adalah mengenali potensi bahaya di laboratorium. beragam sifat bahaya mikrobiologik yang akan ditemui sejak contoh dikumpulkan, diperiksa, disimpan hingga

dibuang secara tetap. Berbagai data tertulis akan diperlukan untuk mengenali bahaya di laboratorium secara menyeluruh. Tidak ada satu pendekatan atau metode baku yang pasti dan benar untuk melakukan penilaian risiko. Namun, lima langkah berikut ini dapat digunakan untuk membantu melakukan penilaian risiko, yakni

- 1) kenali bahaya yang terkait dengan jasad renik yang dituju, terutama jika jasad renik tersebut bersifat patogenik dan infeksius;
- 2) kenali kegiatan yang mungkin menyebabkan terpapar oleh jasad renik;
- 3) pertimbangkan kemampuan dan pengalaman pekerja laboratorium;
- 4) mengevaluasi dan mengutamakan risiko (menilai kemungkinan suatu paparan akan menyebabkan infeksi yang didapat di laboratorium (*laboratory-acquired infections*, LAI) dan tingkat keparahan dampak jika infeksi terjadi);
- 5) mengembangkan, menerapkan, dan menilai pengendalian untuk meminimalkan risiko terpapar (Miller *et al.*, 2012).

1.4 Pengelolaan contoh (sampel)

Contoh yang sering diperiksa di laboratorium mikrobiologi lingkungan biasanya berupa contoh air, contoh udara, dan permukaan benda mati. Pengambilan contoh-contoh lingkungan tersebut membutuhkan biaya dan waktu yang cukup besar karena melibatkan sejumlah peubah dalam protokol, analisis dan penafsiran hasil.

1.4.1 Contoh udara

Cemaran biologik di udara biasanya berupa aerosol yang dapat berbentuk padatan, atau cair. Aerosol bisa mengandung sel-sel virus, bakteri, kapang, khamir, dan serbuk. Partikel aerosol biologik memiliki ukuran yang beragam dari seukuran $\leq 1,0 \mu\text{m}$ hingga $\geq 50,0 \mu\text{m}$. Beberapa faktor yang mempengaruhi keberadaan aerosol biologik (*bioaerosol*) diantaranya

- media pembawa (udara);
- suhu;
- kelembapan relatif;
- kepekaan oksigen; dan
- paparan terhadap sinar ultra violet (UV), atau radiasi elektromagnetik

Beberapa sel vegetatif mungkin tidak dapat bertahan di udara kecuali menggunakan penutup pelindung. Misalnya bahan organik, atau anorganik kering. Ada beberapa jasad renik patogen yang dapat bertahan di udara, seperti bakteri *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, dan spora cendawan. Mereka bisa bertahan dalam masa yang lama di udara dan dapat berpindah tempat (yang jauh) mengikuti gerakan aliran udara dan tetap hidup.

Contoh udara mikrobiologik diperlukan untuk menentukan jumlah dan jenis jasad renik yang ada dalam udara di dalam ruangan. Yang menjadi masalah adalah hingga kini tidak ada acuan baku mengenai jumlah kandungan jasad renik untuk diterapkan dalam satu ruangan. Penerapan pengendalian mutu kandungan jasad renik ditentukan oleh masing-masing pihak terkait kepentingan dan keadaan ruangan. Misalnya, spora *Aspergillus fumigatus* merupakan salah satu faktor risiko bagi penderita neutropenik. Tetapi tidak ada acuan yang menetapkan jumlah spora kapang tersebut yang dapat menyebabkan munculnya penyakit tersebut.

Mutu udara ruangan dipengaruhi oleh

- lalu lintas yang terjadi di dalam ruangan;
- pengunjung yang memasuki ruangan;
- suhu;
- waktu (hari, atau tahun);
- kelembapan relatif;
- kandungan relatif partikel, atau jasad renik; dan
- kinerja perangkat tatanan pengatur udara ruangan.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan ketika mengambil contoh udara,

- a) memperhatikan sifat dan keadaan aerosol, termasuk ukuran partikel/jasad renik, kandungan relatif bahan dalam (*inert material*), jumlah jasad renik, dan faktor-faktor lingkungan;
- b) memperhatikan peralatan pengambil contoh, waktu pengambilan contoh, dan masa program pengambilan contoh;
- c) memperhatikan jumlah contoh yang diambil;
- d) meyakini kesesuaian peralatan dan reagen yang digunakan untuk pengambilan contoh;
- e) memperhatikan teknik pengujian yang digunakan dapat memberikan kesempatan jasad renik dapat berkembang secara optimal;
- f) meyakinkan kemampuan laboratorium yang dipilih, seandainya tidak menggunakan laboratorium sendiri, mampu melakukan pemeriksaan secara optimal;
- g) memastikan contoh udara dapat disimpan di dalam lemari pendingin seandainya contoh tidak diperiksa secara langsung dalam hari yang sama.

Bakteri, cendawan, dan partikel di udara dapat dikenali dan dihitung jumlahnya dengan teknik yang sama. Teknik dasar untuk melakukannya, diantaranya

- a) penumbukan dalam cairan (*impingement in liquid*);
- b) penempatan pada permukaan keras (*impaction on solid surface*);
- c) pengendapan (sedimentasi, *sedimentation*);
- d) penyaringan (filtrasi, *filtration*);
- e) pemusingan (sentrifugasi, *centrifugation*);
- f) presipitasi elektrostatis (*electrostatic precipitation*);
- g) presipitasi suhu (*thermal precipitation*).

Prinsip dan tujuan penggunaan teknik-teknik pemeriksaan di atas disajikan dalam Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Teknik pemeriksaan contoh mikrobiologik lingkungan (Sehulster dan Chinn, 2003)

No.	Teknik	Penjelasan teknik	Tujuan pengukuran	Media pengumpulan, atau permukaan	Kecepatan pengumpulan (L/menit)	Alat bantu yang diperlukan	Hal yang diperhatikan
6.1	<i>Impingement in liquid</i>	Udara dialirkan menggunakan pendorong kecil dan disentuhkan langsung ke permukaan cairan	Makhluk hidup, menghitung jumlah dari waktu ke waktu. Misalnya, pengambilan contoh aerosol air untuk pemeriksaan <i>Legionella spp.</i>	Penyangga gelatin, garam tryptose, pepton, dan <i>nutrient broth</i> (NB)	12,5	Diperlukan	Memerlukan bahan anti pembentukan busa. Suhu dan kelembapan ambien akan mempengaruhi lama pengumpulan contoh.
6.2	<i>Impaction on solid surface</i>	Udara dialirkan ke pengambil contoh. Partikel-partikel ditempatkan di permukaan kering.	Partikel-partikel yang hidup; partikel-partikel yang hidup (di atas permukaan yang tidak ada makanan, terbatas untuk organisme dan spora yang tahan keadaan kering); pengukuran ukuran dan jumlah dalam waktu yang berlebihan. Contoh: pengambilan contoh untuk	Permukaan kering, permukaan yang ditutupi, dan agar	28 (saringan), 30-800 (celah)	Diperlukan	Dapat digunakan sebagai penabrak (<i>impactor</i>) saringan, atau celah. Penabrak saringan dapat digunakan untuk mengukur besaran partikel. Penegak celah memiliki kaki pemutar untuk memegang cawan agar untuk mengukur jumlah dalam waktu yang berlebihan.

No.	Teknik	Penjelasan teknik	Tujuan pengukuran	Media pengumpulan, atau permukaan	Kecepatan pengumpulan (L/menit)	Alat bantu yang diperlukan	Hal yang diperhatikan
			spora <i>Aspergillus</i> spp.				
6.3	Sedimentasi	Partikel dan jasad renik ditempatkan ke atas permukaan karena proses gaya berat (gravitasi).	Partikel-partikel hidup. Contoh penggunaan: udara yang dijadikan contoh untuk pemeriksaan bakteri di sekitar dan selama proses pekerjaan; pengukuran mutu mikrobiologik udara secara umum	<i>Nutrient Agar</i> (NA)	Tidak ada acuan	Tidak diperlukan	Cawan-cawan yang ditempatkan
6.4	Filtrasi	Udara dialirkan melalui saringan. Partikel-partikel tertangkap. Ukuran pori-pori saringan sebesar 0,2 μm	Partikel-partikel yang hidup; partikel-partikel yang hidup (di atas permukaan yang tidak ada makanan, terbatas untuk organisme dan spora yang tahan keadaan kering); pengukuran ukuran dan jumlah dalam	Kertas. Selulosa. Wol gelas (<i>glass wool</i>). Busa gelatin. Saringan membran.	1-50	Diperlukan	Saringan harus dicuci untuk melepaskan jasad renik yang terjebak. Cairan pencuci harus diperiksa juga. Lebih banyak digunakan untuk mengambil debu dan bahan kimia.

No.	Teknik	Penjelasan teknik	Tujuan pengukuran	Media pengumpulan, atau permukaan	Kecepatan pengumpulan (L/menit)	Alat bantu yang diperlukan	Hal yang diperhatikan
			waktu yang berlebihan. Contoh: pengambilan contoh untuk spora <i>Aspergillus</i> spp. dan cendawan lainnya, dan debu				
6.5	Pemusingan	Aerosol dikumpulkan dengan daya pemusatan (sentrifugal). Partikel ditekan ke atas permukaan padat.	Partikel-partikel yang hidup; partikel-partikel yang hidup (di atas permukaan yang tidak ada makanan, terbatas untuk organisme dan spora yang tahan keadaan kering); pengukuran ukuran dan jumlah dalam waktu yang berlebihan. Contoh: pengambilan contoh untuk spora <i>Aspergillus</i> spp.	Gelas yang diselimuti, atau potongan plastik, dan permukaan agar	40-50	Diperlukan	Sulit melakukan kalibrasi karena hanya bisa dilakukan oleh pabrik. Secara umum menggunakan perbandingan pencemaran udara relatif.

No.	Teknik	Penjelasan teknik	Tujuan pengukuran	Media pengumpulan, atau permukaan	Kecepatan pengumpulan (L/menit)	Alat bantu yang diperlukan	Hal yang diperhatikan
			dan cendawan lainnya				
6.6	Presipitasi panas (<i>thermal precipitation</i>)	Udara dialirkan dengan cara pemanasan secara bertahap. Partikel-partikel ditolak oleh permukaan panas dan akan mendarat di permukaan dingin.	Pengukuran ukuran	Gelas penutup. Jaringan mikroskop elektron.	0,003 – 0,4	Diperlukan	Penentuan ukuran partikel melalui pengamatan langsung. Tidak digunakan secara rutin karena penilaian yang rumit dan memerlukan waktu yang panjang.

1.4.2 Contoh air

Pemeriksaan contoh-contoh air bertujuan untuk melacak keberadaan patogen-patogen penyebab penyakit berperantara air (*waterborne diseases*). Sejumlah patogen yang berada di air dapat menyebabkan sakit baik pada manusia maupun hewan. beberapa patogen yang telah dikenali diantaranya bakteri (seperti *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* dan), virus (seperti virus Norwalk, rotavirus), dan protozoa (seperti *Entamoeba* sp., *Giardia* sp., dan *Cryptosporidium* sp.).

Pemeriksaan contoh air tidak hanya melacak patogen, tetapi juga dilakukan untuk tujuan penjaminan mutu air. Di beberapa tempat, khususnya tempat fasilitas kesehatan dan industri makanan, pemantauan mutu air mutlak dilakukan. Contoh air merupakan contoh yang bersifat dinamik pada suhu ambien. Perubahan jumlah dan jenis jasad renik di dalam contoh air dapat terjadi selama dalam perjalanan pengiriman contoh air ke laboratorium pemeriksaan. Oleh karena itu, contoh air harus segera dilakukan pemeriksaan di laboratorium. Contoh air harus disimpan dalam suhu dingin selama perjalanan. Jika suhu ambien di bawah 22 °C, contoh harus dikirim ke laboratorium dalam waktu 24 jam. Ketika suhu yang lebih tinggi, contoh harus disimpan di lemari pendingin (bersuhu 4–8 °C) hingga dapat dikirim ke laboratorium dalam penyimpanan menggunakan es (WHO, 2012).

Air kucuran pertama dari keran air harus dibuang ketika akan memeriksa contoh air keran. Barulah kucuran berikutnya dapat ditampung untuk diperiksa. Jika meragukan kebersihan keran air yang akan diambil contoh airnya, dapat dibersihkan terlebih dahulu menggunakan sodium hipoklorit 500-600 ppm (1:100 v/v).

Kadang kala air hasil pengolahan dapat “merusak” sel jasad renik yang ada di dalam contoh air. Hal ini disebabkan oleh penggunaan bahan kimia pengolah air agar air dapat digunakan dengan sehat. Penafsiran hasil pemeriksaan bisa rancu karena mungkin saja akan diperoleh hasil positif, atau negatif palsu. Bahan penetral halogen, atau bahan pengikat (*chelating agent*) dapat digunakan untuk mengurangi dampak kerusakan sel jasad renik di dalam contoh air tersebut. Perlakuan pemeriksaan contoh air jenis ini harus mampu mengembalikan keadaan sel jasad renik. Perlakuan yang dapat diberikan diantaranya menggunakan media pepton, atau media R2A. penggunaan media Blood Agar (BA), atau Tryptic Soy Agar (TSA) biasanya justru menghambat pertumbuhan sel jasad renik yang rusak sehingga sebaiknya tidak digunakan.

Cawan aerobik, atau heterotropik dapat digunakan untuk memeriksa jasad-jasad renik di dalam contoh air secara kualitatif dan/atau kuantitatif. Kertas aring dapat juga digunakan baik untuk jumlah contoh air yang sedikit maupun dalam jumlah banyak. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan di atas permukaan media penumbuh padat dan diinkubasi hingga terlihat adanya pertumbuhan jasad renik di atas permukaan kertas saring.

1.4.3 Pengambilan contoh di permukaan

Pengambilan contoh permukaan merupakan salah satu pemeriksaan rutin dalam pelaksanaan surveilans. Kegiatan surveilans biasanya dilakukan dalam pengamatan penyakit-penyakit yang berkaitan dengan fasilitas, atau peralatan di rumah sakit (penyakit nosokomial, *nosocomial disease*) (Boothe, G. 2022).

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan ketika melakukan pengambilan contoh permukaan, diantaranya

- keterangan dari sejumlah sumber pustaka mengenai patogen yang akan diperiksa;
- tempat permukaan yang akan dijadikan contoh;
- teknik pengambilan contoh dan peralatan yang sesuai untuk pengambilan contoh;
- pengulangan pengambilan contoh yang diperlukan dan contoh pengendali yang diperlukan untuk perbandingan hasil yang akan diperoleh;
- parameter yang akan diperiksa baik yang bersifat kualitatif maupun kuantitatif;
- perkiraan maksimum jumlah jasad renik dan tipe jasad renik yang mungkin akan diperoleh dan diperbolehkan;
- jika diperlukan, mengantisipasi tindakan perbaikan untuk meningkatkan mutu hasil pemeriksaan

(Fu *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2022)

Pemeriksaan contoh permukaan, terutama dalam kegiatan surveilans penyakit nosokomial, dapat digunakan untuk menentukan

- a) area lingkungan yang memiliki potensi sebagai tempat keberadaan patogen;
- b) daya tahan patogen di permukaan;
- c) sumber pencemaran lingkungan

(Ming-Ju Wu *et al.*, 2011)

Hasil pemeriksaan contoh permukaan dipengaruhi oleh teknik pengambilan dan pemeriksaan yang sesuai. Sejumlah media umum/non selektif dan kaya nutrisi seperti TSA dan brain heart infusion (BHI) dapat digunakan untuk memeriksa jumlah jasad renik dalam contoh permukaan yang diperiksa. Beberapa media selektif pun dapat digunakan untuk mengisolasi patogen-patogen khusus, seperti MacConkey Agar (MCA) yang digunakan untuk mengisolasi bakteri-bakteri negatif Gram, *Cetrimide*

Agar untuk mengisolasi *Pseudomonas aeruginosa*; dan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), dan Malt Extract Agar (MEA) untuk mengisolasi kapang dan khamir.

Pengambilan contoh permukaan yang efektif membutuhkan kelembapan permukaan. Oleh karena itu, pengambilan contoh permukaan biasanya menggunakan pengusap, penghapus, dan spons yang dibasahkan. Juga, menggunakan permukaan agar dan penyaring membran. Penggunaan bahan kimia penetral digunakan untuk menghilangkan pencemar, atau residu disinfektan.

Beberapa bahan kimia penetral dan teknik yang digunakan dalam pengambilan contoh permukaan disajikan dalam Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Contoh pelarut yang digunakan dalam pengambilan contoh permukaan (Boothe, G. 2022)

Larutan	Kadar di dalam air
Ringer	25%
Air pepton	0,1% -1,0%
Air pepton berpenyangga	0,067 M fosfat, 0,43% NaCl, 0,1% pepton
Garam berpenyangga fosfat	0,02 M fosfat, 0,9% NaCl
Sodium klorida (NaCl)	0m25% - 0,9%
Calgon Ringer (larutan yang digunakan untuk menghancurkan kalsium alginat)	25%

Tabel 3. Teknik pengambilan contoh permukaan lingkungan

Teknik	Bentuk permukaan	Bentuk pengujian	Catatan kerja	Titik-titik penafsiran	Keperluan acuan
Contoh/cuci (usapan yang dibasahi/cuci)	Permukaan yang tidak menyerap, sudut, celah, peralatan	Pengenceran; pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif	Pemeriksaan terhadap beberapa area, atau peralatan dengan usapan yang berbeda	Hasil dilaporkan per luasan area, atau per titik contoh	Diperlukan: industri makanan. Tidak Diperlukan: fasilitas kesehatan
Contoh/cuci (spons yang dibasahi/cuci)	Area yang luas dan permukaan rumah (lantai, dinding, dan sebagainya)	Pengenceran; pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif	Gosok kuat spons ke permukaan	Hasil dilaporkan dalam ukuran area	Diperlukan: industri makanan. Tidak Diperlukan: fasilitas kesehatan
Contoh/cuci (penyapuyang dibasahi/cuci)	Area yang luas dan permukaan rumah (lantai, dinding, dan sebagainya)	Pengenceran; pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif	Gunakan penyapu suci hama	Hasil di laporkan dalam ukuran area	Diperlukan: industri makanan. Tidak Diperlukan: fasilitas kesehatan
Pencelupan langsung	Barang-barang kecil yang dapat dicelupkan langsung	Pengenceran; pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif	Gunakan penyaring membran jika pencucian cukup banyak dan perlu mendapat perhatian jika kandungan jasad reniknya rendah	Hasil dilaporkan per barang	Tidak diperlukan
Penahan	Permukaan bagian dalam dari kotak, tabung, dan otol	Pengenceran; pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif	Gunakan penyaring membran jika pencucian cukup banyak dan perlu mendapat perhatian jika kandungan jasad reniknya rendah	Nilai bentuk dan jumlah jasad renik	Diperlukan: industri makanan yang diterapkan pada kemasan sebelum diisi.
RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact)	Permukaan datar yang telah dibersihkan dan tidak menyerap; tidak cocok untuk permukaan yang tidak rata	Pemeriksaan langsung	Pertumbuhan berlebihan jika permukaan tercemar berat; gunakan penetral jika di permukaan diduga tertinggal disinfektan	Menyediakan hasil langsung dan kuantitatif; gunakan minimum 15 cawan per rata-rata kamar rumah sakit	Tidak diperlukan

1.5 Kepustakaan

- Boothe, G. 2022. Environmental Sampling for Infection Control at Health Care Facilities. Occupational Health and Safety. Tersedia pada <https://ohsonline.com/Articles/2022/09/01/Environmental-Sampling-for-Infection-Control.aspx#:~:text=Surface%20samples%20can%20be%20used,laboratory%20to%20identify%20viable%20microorganisms> [Disitasi 14 Desember 2023]
- Miller, JM., Astles, R., Baszler, T., Chapin, K., Carey, R., Garcia, L., Gray, L., Larone, D., Pentella, M., Pollock, A., Shairo, DS., Weirich, E., Wiedbrauk, D. 2012. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories: Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel. *Centers for Disease Control and Prevention: Morbidity and Mortality Weekly Report*, Supp. 61. Tersedia pada <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm> [Disitasi 15 Desember 2023]
- Ming-Ju Wu, Yun-Shu Feng, Wen-Pei Sung, Surampalli, RY. 2011. Quantification and Analysis of Airborne Bacterial Characteristics in a Nursing Care Institution, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 61:7, 732-739, DOI: 10.3155/1047-3289.61.7.732
- Fu Shaw, L., Chen, IH., Chen, CS., Wu, HH., Lai, LS., Chen, YY., Wang, FD. 2018. Factors influencing microbial colonies in the air of operating rooms. *BMC Infect Dis* 18, 4 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2928-1>
- Rose, LJ., Houston, H., Martinez-Smith, M., Lyons, AK., Whitworth, C., Reddy, SC., Noble-Wang, J. 2022. Factors influencing environmental sampling recovery of healthcare pathogens from non-porous surfaces with cellulose sponges. *PLoS ONE* 17(1): e0261588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261588>
- Sanders, E. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *J. Visualized Experiments (JoVE)*: 1-13. DO - 10.3791/2754
- Sehulster, L., and Chinn, RYW. 2003. Environment Sampling. *In*. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tersedia pada <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/environmental/authors.html>. [Disitasi 14 Desember 2023]
- [WHO] World Health Organization. 2012. Annex 3 Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results. *In*. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Tersedia pada <https://www.who.int/publications/who-guidelines>. [Disitasi 14 Desember 2023]

Percobaan 2

MEMBUAT KURVA PERTUMBUHAN BAKTERI

2.1 Tujuan

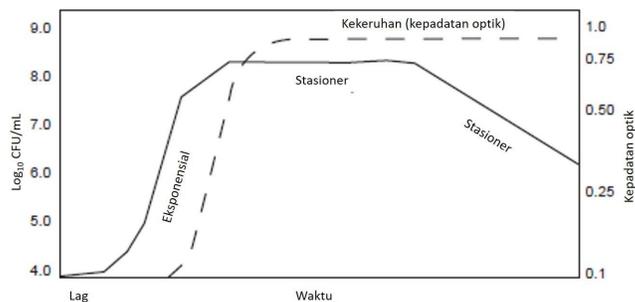
Membuat kurva pertumbuhan bakteri menggunakan teknik pengenceran dan pembiakan bakteri.

2.2 Teori

Teknik pengenceran dan pembiakan bakteri merupakan teknik dasar ketika mengisolasi dan mengenali bakteri yang diteliti. Kedua teknik tersebut juga digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri. Kurva ini memperlihatkan jumlah sel bakteri yang mengalami perkembang-biakan dalam fungsi waktu sehingga dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah sel bakteri untuk keperluan satu pengujian.

Jumlah sel bakteri dalam kurva pertumbuhan diwakilkan dalam koloni-koloni bakteri yang tumbuh di atas permukaan agar biakan padat. Walaupun, diketahui bahwa dalam satu koloni terdapat sejumlah besar sel bakteri pembentuk koloni. Oleh karena itu, satuan yang digunakan adalah unit pembentuk koloni (*colony forming unit*, CFU).

Penghitungan jumlah sel bakteri dapat juga menggunakan media kaldu. Pengamatan dilakukan berdasarkan kekeruhan media kaldu yang dibiakkan sel bakteri yang akan dihitung. Derajat kekeruhan media diukur menggunakan alat spektrometer. Sebelum mengukur kekeruhan media, biasanya dilakukan terlebih kekeruhan satu suspensi dalam beberapa pengenceran suspensi tersebut. Sekurang-kurangnya diperlukan lima pengenceran suspensi yang akan diukur menggunakan spektrometer. Angka yang diperoleh digunakan untuk membuat kurna normal (Gambar 2). Jadi, kurva pertumbuhan yang menggunakan media kaldu akan dihitung dengan bantuan kurna normal tersebut. Pertumbuhan bakteri



Gambar 2 Contoh Kurva pertumbuhan jasad renik (Peper dan Gerba, 2004, dengan penyesuaian)

dalam media cair akan terus terjadi sampai nutrisi dalam media menjadi terbatas, atau terjadi penumpukan limbah hasil metabolisme sel bakteri

yang menghambat pertumbuhan (Sanders, 2012). Dalam Grafik Gambar 1 terlihat bahwa pertumbuhan bakteri berada dalam empat fase, yakni

- | | |
|--------|---|
| Fase 1 | Pertumbuhan sel bakteri berjalan lambat karena sel sedang mengalami penyesuaian fisiologik terhadap keadaan media biakan, seperti penyesuaian terhadap nutrisi yang ada di dalam media tumbuh; atau sedang terjadi pengenceran eksoenzim karena kepadatan sel awal yang masih rendah; |
| Fase 2 | Sel bakteri telah melakukan pertumbuhan yang optimal dengan jumlah sel berlipat ganda dalam selang waktu pendek yang dikenal sebagai waktu pembangkitan rata-rata; |
| Fase 3 | Nutrisi yang semakin terbatas menyebabkan pembelahan sel dan kematian sel saling mengimbangi sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah sel; |
| Fase 4 | Tingkat kematian sel melebihi tingkat pertumbuhan yang mengakibatkan hilangnya sel-sel yang hidup. |

2.3 Tata kerja

2.3.1 Bahan-bahan

- Biakan *E. coli*
- Media kaldu Trypticase Soy
- Gelas flask 50 ml
- Pipet (mikro)

2.3.2 Kegiatan sebelum percobaan

Kegiatan dimulai sejak dua hari sebelum percobaan.

Dua hari sebelum percobaan

isolat *E. coli* dibiakkan ke 50 ml media kaldu Trypticase Soy Broth (TSB). Media tersebut dinkubasi pada suhu 27 °C selama 24 jam. Kandungan sel bakteri di dalam media ini akan mencapai sebesar 10^9 CFU/ml.

Satu hari sebelum percobaan

Sebanyak 100 ml biakan yang telah disiapkan sebelumnya dibiakkan dalam 250 ml TSB (dalam gelas labu 500 ml). Suspensi diaduk merata. Sebanyak lima mililiter diambil dari suspensi besar, disimpan dalam gelas tabung yang sesuai, dan segera disimpan dalam lemari pendingin. Suspensi ini adalah $T = 0$ dan akan menghasilkan jumlah sel sekitar 5×10^5 CFU/ml. Gelas labu *E. coli* disimpan dalam inkubator pengocokan bersuhu 37 °C. Sebanyak lima mililiter biakan yang sama dikeluarkan, disimpan dalam gelas tabung dan segera disimpan dalam lemari pendingin. Kegiatan ini berulang setiap satu jam hingga delapan jam. Setiap suspensi dalam tabung gelas yang diperoleh disimpan dalam suhu empat derajat Celcius. Suspensi

biakan-biakan tersebut dianggap sebagai T_0 (waktu ke-0 jam) hingga T_8 (waktu ke-8 jam).

Percobaan dilakukan dalam dua tahap.

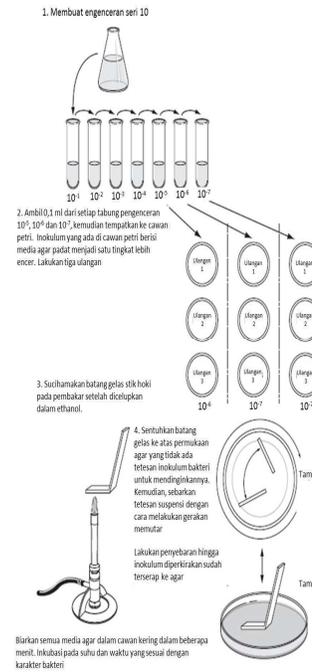
2.3.3 Percobaan tahap pertama

2.3.3.1 Bahan-bahan

- satu mililiter suspensi *E. coli* dalam media kaldu TSB;
- 0,9 ml air pengencer suci hama dalam tabung;
- tabung reaksi;
- pipet (mikro);
- cawan Petri berisi Trypticase Soy Agar;
- es;
- batang gelas berbentuk stik hoki;
- vortex;
- pembakar (gas);
- etil alkohol untuk pensuci-hamaan dengan pembakaran.

2.3.3.2 Tata kerja

- (1) Serangkaian tabung reaksi disiapkan untuk menyiapkan pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-7} dari biakan *E. coli* yang sudah disiapkan sebelumnya. Sebanyak 900 ml cairan NaCl 0,95 (b/v) diisikan ke masing-masing tabung reaksi. Seri pengenceran diperlukan untuk setiap biakan *E. coli* (T_0 hingga T_8).
- (2) Pengenceran dimulai dengan menambahkan 100 ml *E. coli* dari tabung berlabel T_0 yang merupakan awal biakan *E. coli* ke dalam tabung A. Tabung A merupakan pengenceran 10^{-1} dari T_0 .
- (3) Suspensi diaduk menggunakan vortex selama lima detik.
- (4) Sebanyak 100 ml diambil dari Tabung A dan ditambahkan ke tabung pengenceran berikutnya (Tabung B). Tabung B adalah pengenceran 10^{-2} dari T_0 . Ulangi seterusnya hingga rangkaian pengenceran mendapatkan tabung pengenceran 10^{-8} seperti yang digambarkan dalam Gambar 3.
- (5) Pengenceran diulangi kembali untuk T_1 sampai T_8 .
- (6) Cawan disiapkan sesuai dengan pengenceran seperti yang disajikan dalam Tabel 4.
- (7) Gunakan tiga cawan sebagai pengulangan untuk setiap pengenceran.



Gambar 3. Cara pembuatan pengenceran seri desimal (Peper dan Gerba, 2004, dengan penyesuaian)

- (8) Sebanyak 100 ml dari masing-masing ketiga tabung ditempatkan ke tengah cawan agar (Gambar 3).
- (9) Tetesan segera disebarkan merata ke seluruh permukaan agar menggunakan batang kaca berbentuk stik hoki yang sudah disuci-hamakan menggunakan api bunsen.
- (10) Ulangi untuk seluruh titik biakan T_0 hingga T_8 terlaksana.
- (11) Biarkan tetesan mengering. Setelah mengering, inkubasi semua cawan dalam posisi terbalik pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.
- (12) Setelah masa inkubasi dicapai, koloni yang tumbuh dapat dihitung, atau seluruh cawan disimpan di lemari pendingin sampai periode kegiatan berikutnya.

2.3.4 Percobaan tahap kedua

- (1) Periksa cawan yang telah tercapai masa inkubasinya untuk mengetahui keseragaman koloni dan kurangnya pencemaran yang terjadi pada permukaan agar dalam cawan yang diinkubasi seperti yang diperlihatkan dam Gambar 3.

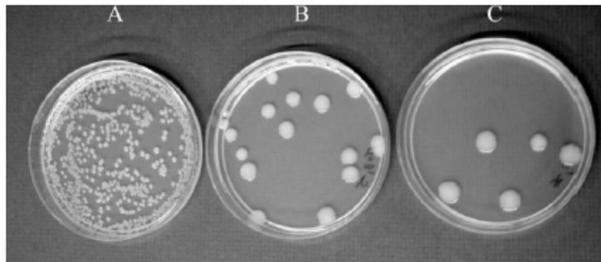
Tabel 4. Pengenceran dari titik waktu biakan *E. coli* yang akan ditempatkan dalam cawan

Biakan <i>E. coli</i>	Pengenceran yang akan ditempatkan dalam cawan		
T ₀	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
T ₁	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
T ₂	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
T ₃	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
T ₄	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
T ₅	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
T ₆	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
T ₇	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
T ₈	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶

- (2) Hitung cawan kultur (T₀ sampai T₈) triplo pada setiap pengenceran yang terdapat pertumbuhan koloni yang diperkirakan dalam kisaran antara 30 dan 300 koloni.
- (3) Hitung jumlah sel per ml biakan asli pada biakan T₀ sampai T₈. Misalnya jumlah koloni hasil pengenceran 10⁻⁴ adalah 30, 28, dan 32 koloni. Penghitungan jumlah koloni dapat dilakukan menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah koloni per ml} = \frac{\text{Jumlah koloni yang tumbuh dalam satu cawan} \times \text{tingkat pengenceran}}{\text{Jumlah suspensi yang diteteskan ke permukaan agar}}$$

- (4) Dari Rumus di atas, rerata jumlah koloni = 30 koloni
- (5) Buat grafik dua dimensi (X-Y) dan tempatkan log¹⁰ CFU/ml semua jumlah bakteri pada titik pada Garis Y (vertikal) *versus* waktu (jam) pada Garis X (horisontal). Tempatkan semua data jumlah koloni masing-masing titik waktu (T₀ hingga T₈).
- (6) Dari grafik yang dibuat, tentukan fase pertumbuhan eksponensial yang dibuat oleh bakteri *E. coli*. Dengan menggunakan dua titik waktu dalam fase pertumbuhan eksponensial dan jumlah sel yang sesuai, hitung rerata waktu perbanyak sel yang optimum (*generation time rate*).



Gambar 4. Contoh rangkaian pengenceran *E. coli* dari tiga pengenceran yang ditempatkan pada permukaan agar dalam cawan. Penambahan pengenceran dilakukan dari cawan di kiri ke kanan. Cawan A yang dapat dihitung karena terdapat pertumbuhan koloni dengan jumlah diperkirakan dalam kisaran 30-300 koloni (Peper dan Gerba, 2004, dengan penyesuaian)

2.3.5 Cara menghitung rerata waktu perbanyakan sel yang optimum

Setelah melakukan pengenceran dan membiakkannya ke media agar padat diperoleh data: awal pertumbuhan eksponensial yang ditunjuk di sini sebagai waktu t (jam ke-) = 0 jumlah awal sel bakteri adalah 1000 CFU/ml. Pada waktu t (jam ke-) = 6 jumlah sel bakteri adalah 16.000 CFU/ml.

Perhatikan rumus:

$$X = 2^n X_0$$

untuk:

X_0 = jumlah sel awal = 1.000 CFU/ml

X = jumlah sel setelah waktu ke t = 16.000 CFU/ml

n = jumlah perbanyakan

$$16.000 = 2^n \times 1.000$$

$$2^n = 16$$

$$n \log 2 = \log 16$$

$$n \log 2 = \log 2^4$$

$$n \log 2 = 4 \log 2$$

$$n (0,3010) = 4 (0,3010)$$

$$n (0,3010) = 1,2040$$

$$n = 1,2040 / 0,3010 = 4 \text{ (4 perbanyakan dalam 6 jam)}$$

$$\text{Rerata waktu perbanyakan sel} = 6/4 = 1,5 \text{ jam}$$

2.4 Kepustakaan

Peper, IL., and Gerba, CP. 2004. *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 226 p.

Sanders, E. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *J. Visualized Experiments (JoVE)*: 1-13. DOI: 10.3791/2754

Percobaan 3

PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGIK MUTU UDARA

3.1 Tujuan

- 3.1.1 Mengumpulkan sampel bioaerosol menggunakan gelas *impinger* dan peralatan penyaringan
- 3.1.2 Memeriksa sampel dengan cara cawan dan filtras
- 3.1.3 Menghitung kandungan bakteri dan cendawan dalam ruangan

3.2 Teori

Aerobiologi merupakan kegiatan penelitian yang berkaitan dengan aerosolisasi, perpindahan udara, dan pengendapan bahan biologik. Pengumpulan partikel-partikel biologik udara disebut bioaerosol. Bioaerosol dihasilkan oleh berbagai macam proses alami dan ada juga yang buatan manusia, seperti batuk, bersin, percikan, angin, alat pendingin, ventilasi, dan sebagainya.

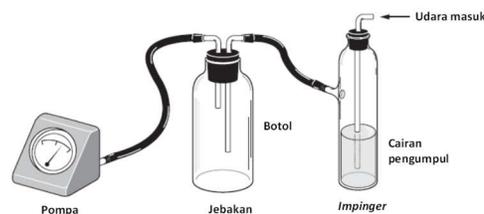
Legionella pneumophila, *Mycobacterium tuberculosis*, dan beberapa virus patogen diketahui ditularkan melalui aerosol. Asma, pneumonitis alergik, dan penyakit pernapasan lainnya juga terkait dengan paparan bioaerosol.

Kerusakan bahan bangunan, bau tak sedap, dan bentuk lain yang mengganggu kesehatan manusia dapat berhubungan dengan pencemaran jasad renik lingkungan dalam ruangan, seperti tempat tinggal, kantor, sekolah, fasilitas kesehatan, fasilitas pertanian yang tertutup (lumbung dan area penyimpanan tanaman), fasilitas industri, dan fasilitas daur ulang (Stetzenbach, 2003).

Suhu dan kelembapan relatif adalah dua faktor terpenting yang mempengaruhi kelangsungan hidup jasad renik di udara. Kelembapan relatif yang lebih tinggi dan suhu yang lebih rendah merupakan keadaan yang disukai virus, bakteri dan cendawan untuk berkembang di dalam ruangan.

Ada tiga cara yang dapat digunakan untuk mengukur keberadaan jasad renik dalam udara, yakni

- (i) Penumbukan dalam cairan (*impingement*), dengan cara menjebak partikel di udara ke dalam matriks cair
Satu *impinger* cair yang umum digunakan adalah AGI-30 (ACE Glass, Vineland, NJ) seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 5. AGI-30

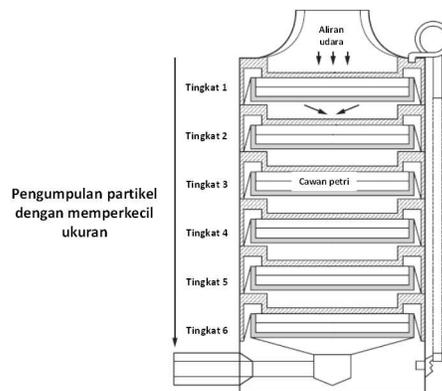


Gambar 5 Peralatan *Impinger* cair untuk menangkap aerosol biologik (Peper dan Gerba 2004, dengan penyesuaian)

bekerja dengan cara menarik udara melalui saluran masuk dan partikel udara yang masuk akan terperangkap dalam cairan. AGI-30 biasanya bekerja dengan kecepatan aliran sebesar 12,5 liter per menit. Pengumpulan dapat dilakukan sebanyak 20 ml, dan waktu pengambilan sampel sekitar 20 menit. Penarikan udara yang lama harus dihindari karena mengakibatkan penguapan cairan di *impinger* dan kematian jasad renik dalam cairan.

- (ii) *Impaction*, dengan cara memaksa partikel udara mengendap pada permukaan padatan

Cara *impaction* bekerja dengan cara memisahkan partikel udara berdasarkan inersia partikel untuk memaksa menempatkan partikel ke permukaan padat, atau semi-padat. Permukaan yang digunakan untuk mengumpulkan biasanya media agar. Saat ini ada pengumpul sampel enam tingkat Anderson (Anderson Instruments Inc., Smyra, GA) yang terdiri dari enam tingkat dengan diameter mulut (*nozzle*) yang berkurang sehingga setiap tahapan berikutnya mengumpulkan partikel yang semakin kecil seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 6.



Gambar 6 Penangkap partikel udara enam tingkat Anderson (Peper dan Gerba 2004, dengan penyesuaian)

- (iii) Penyaringan, dengan menjebak partikel udara berdasarkan ukurannya
 Cara penyaringan biasanya digunakan untuk pengumpulan spora-spora cendawan dan bakteri karena tahan terhadap kekeringan. Membran penyaring yang digunakan untuk pengambilan sampel biasanya disediakan dalam bentuk kertas penyaring cakram dengan diameter 37 atau 47 mm.

Cara lain yang umum dilakukan adalah cara gaya berat (*gravitas*). Cara ini dilakukan dengan cara memaparkan permukaan media agar ke lingkungan dan jasad renik di udara akan jatuh ke permukaan media agar. Cara ini bersifat non-kuantitatif. Masih banyak digunakan karena murah dan mudah dilakukan.

3.3 Tata Kerja

3.3.1 Bahan dan Peralatan

Kebutuhan bahan dan peralatan untuk praktikum dengan Topik ini disajikan dalam Tabel 1 di bawah ini.

3.3.2 Pengambilan dan pemeriksaan contoh udara menggunakan *impingment*

- (1) Siapkan peralatan *impinger* seperti dalam Gambar 7.
- (2) Tambahkan 20 mL pepton 0,1% ke tabung *impinger* yang diikuti dengan penambahan 0,1 mL larutan anti-busa (Sigma).
- (3) Nyalakan pompa hampa udara (vakum) selama 10 menit.
- (4) Menggunakan pipet 1 ml, ambil 0,5 mL cairan dari tabung *impinger* dan teteskan masing-masing 0,1 mL ke atas permukaan agar baik NA, atau TSA dan sebarkan larutan sampel menggunakan cara goresan untuk mendapatkan koloni bakteri yang terpisah. Teteskan 0,1 mL yang lain lagi ke atas permukaan agar Sabouraud Agar Dekstrosa. Sebarkan larutan sampel menggunakan cara goresan untuk mendapatkan koloni kapang/khamir yang terpisah
- (5) Menggunakan pipet 10 ml, ambil 6 mL cairan dari tabung *impinger* dan tuangkan sebanyak 5 mL ke penyaring membran 0,45 mm yang terpasang dalam alat seperti yang disajikan dalam Gambar 7. Setelah semua cairan turun, tempatkan penyaring di atas permukaan media agar NA, atau TSA. Ulangi cara yang sama, tetapi tempatkan penyaring di atas permukaan media agar Sabouraud dextrose.

Tabel 5 Daftar bahan dan peralatan

Bahan	Satuan	Jumlah
Gelas <i>Impinger</i> lengkap	Paket	1
Kaset pemantau udara 37 mm	Paket	1
Larutan pepton 0,2%	20 ml	1
Erlenmeyer flask 500-ml	Unit	1
Erlenmeyer flask 1000-ml	Unit	1
Karet atau tabung plastik untuk menghubungkan impinger dan kaset ke sumber hampa udara	Unit	1
Pompa hampa udara, atau sumber hampa udara	Unit	1
Silinder/tabung berskala 100-ml	Unit	1
Tabung pengencer berisi air pepton 0,1%, atau <i>phosphate buffer saline</i> (PBS)	Unit	1
Pipet 1-ml	Batang	2
Pipet 10-ml	Batang	1
Penyaring membran berdiameter 47 mm berpori 0,45 μ suci hama	Lembar	4
Penyaring membran berdiameter 37 mm berpori 0,45 μ suci hama	Lembar	2
Unit penyaring	Unit	1
Tang penjepit	Unit	1
<i>Gas burner</i>	Unit	1
Karet penghisap pipet	Unit	1
Pengaduk vortex	Unit	1
Media Nutrient Agar (NA), atau Trypticase Soy Agar (TSA)	Cawan	9
Media Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Cawan	9

- (6) Inkubasi seluruh media NA, atau TSA yang digunakan pada suhu 35-37 °C selama 24-48 jam. Sedangkan media SDA yang digunakan diinkubasi pada suhu 25-27 °C (suhu ruang) dan 35-37 °C selama dua sampai tujuh hari, tergantung pertumbuhan koloni kapang dan khamir.
- (7) Setelah masa inkubasi dicapai, catat karakter dasar pertumbuhan koloni bakteri. Hitung jumlah koloni bakteri dalam satu cawan.
- (8) Setelah masa inkubasi dicapai, catat karakter tekstur dan topografi koloni kapang dan khamir. Tentukan genus dan/atau spesies mereka. Hitung jumlah koloni kapang dan khamir secara terpisah dalam satu cawan.

3.3.3 Pengambilan contoh udara dengan cara gravitasi

- (1) Letakkan tiga cawan berisi media NA/TSA, dan tiga media SDA dalam satu ruangan yang dipilih. Letakkan media-media tersebut pada titik-titik yang telah ditentukan dan dianggap mewakili ruangan. (Jika diperlukan, jumlah media dapat ditambah)
- (2) Buka tutup cawan dan biarkan mereka dalam keadaan terbuka selama 30 – 60 menit.

- (3) Setelah waktu tercapai, letakkan kembali tutup cawan. Inkubasi media NA, atau TSA yang digunakan pada suhu 35-37 °C selama 24-48 jam, dan media SDA yang digunakan diinkubasi pada suhu 25-27 °C (suhu ruang) dan 35-37 °C selama dua sampai tujuh hari, tergantung pertumbuhan koloni kapang dan khamir.



Gambar 7 Penggunaan penyaring membran (Peper dan Gerba 2004)

- (4) Setelah masa inkubasi dicapai, catat karakter dasar pertumbuhan koloni bakteri. Hitung jumlah koloni bakteri dalam satu cawan.
- (5) Setelah masa inkubasi dicapai, catat karakter tekstur dan topografi koloni kapang dan khamir. Tentukan genus dan/atau spesies mereka. Hitung jumlah koloni kapang dan khamir secara terpisah dalam satu cawan.

3.3.4 Perhitungan

Hitung jumlah bakteri, kapang dan khamir per meter³. Pembatasan peralatan AGI-30 dilakukan terhadap lubang di ujung tabung kaca yang terendam ke dalam cairan pengumpul, membatasi jumlah udara yang melewati cairan hingga 12,5 liter per menit. Kandungan jasad renik dilaporkan sebagai "angka per meter³ udara", yang dihitung menggunakan rumus berikut:

[A] Volume udara (L) = waktu pengambilan contoh (menit) x 12,5
L/menit

[B] Jumlah jasad renik yang terkumpul di gelas *impinger* = Jumlah jasad renik yang diperiksa (CFU/ml) x jumlah media yang tertinggal di gelas *impinger* setelah pompa vakum dimatikan

[C] Jumlah jasad renik per L udara (CFU) = jumlah jasad renik yang terkumpul di gelas *impinger* / volume udara

3.4 Tulis laporan hasil menggunakan bentuk yang sudah ditentukan.

3.5 Pustaka

Peper, IL., and Gerba, CP. 2004. *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 226 p.

Stetzenbach, LD. 2003. Introduction to Aerobiology. *In: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, CJ., Crawford, RL., Knudsen, GR., McInerney, MJ., and Stetzenbach, LD. Eds., pp. 801–813. ASM Press. Washington, DC.

LAPORAN PERCOBAAN #3

3.1 Jatidiri Kelompok

- 3.3.1Kelompok :
- 3.3.2Anggota kelompok : 3.1.2.1
- 3.1.2.2
- 3.1.2.3
- 3.1.2.4

3.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

3.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 3.3.1 Apa keterbatasan metode yang berbeda untuk melacak jasad renik di udara?
- 3.3.2 Mengapa Anda tidak mengumpulkan sampel udara selama lebih dari 20 menit dengan AGI-30?
- 3.3.3 Mengapa kapang dan khamir menjadi perhatian di udara?
- 3.3.4 Mengapa spora bakteri, kapang dan khamir lebih mungkin dilacak dengan cara penyaringan dibandingkan sel bakteri vegetatif?
- 3.3.5 Jenis lingkungan apa yang Anda harapkan memiliki kandungan bakteri yang tinggi di udara? Bagaimana dengan kandungan rendah?
- 3.3.6 Bagaimana pengaruh kelembapan relatif terhadap kelangsungan hidup jasad renik di udara?

3.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh

Percobaan 4

MELACAK JASAD RENIK DI PERAIRAN (Cara Angka Paling Mungkin, *Most Probable Number* - MPN)

4.1 Tujuan

Melacak dan menduga kandungan bakteri bentuk koli (*coliform bacteria*) di dalam contoh air menggunakan Cara Angka Paling Mungkin (*most probable number*– MPN).

4.2 Teori

Perairan merupakan salah satu wahana jasad renik untuk menyebar di alam ini. Baik jasad renik yang tidak patogen maupun jasad renik yang patogen. jasad renik yang ada di permukaan bumi ini biasanya akan menuju ke lingkungan perairan karena adanya aliran permukaan. Misalnya, karena air hujan. Jasad-jasad renik patogen yang berasal dari saluran pencernaan inang, manusia dan hewan, pasti akan berada di lingkungan perairan karena proses pengeluaran urin dan tinja/manur akan menuju ke lingkungan perairan.

Pemeriksaan rutin mutu air biasanya menggunakan beberapa jenis jasad renik sebagai jasad renik petunjuk (*indicator microbes*) yang memiliki habitat di saluran pencernaan. Biasanya mereka merupakan jasad-jasad renik yang tidak patogen. seperti *Escherichia coli* dan *Streptococcus faecalis*. Kedua spesies ini selalu ditemukan di usus dan biasanya tidak ada di tanah, atau air; Oleh karena itu, ketika kedua spesies tersebut ternyata terdapat di dalam air, dapat dianggap bahwa air tersebut telah tercemar dengan feses.

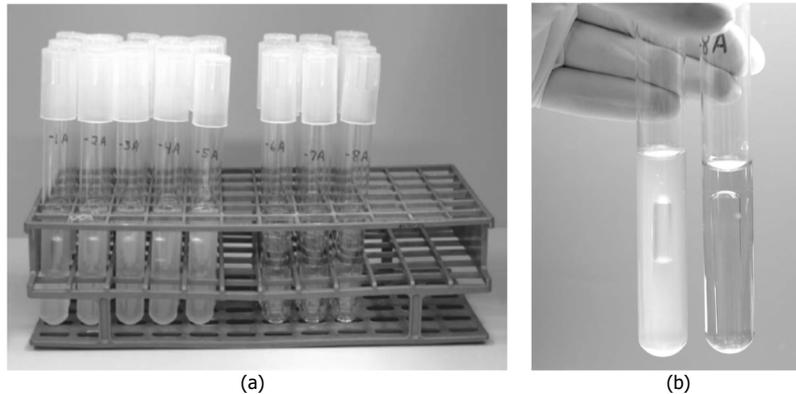
Bakteri bentuk koli (*coliform*), yang *E. coli* merupakan salah satu anggotanya, sering dikaitkan dengan jasad renik patogen enterik dan telah terbukti dapat dijadikan petunjuk berguna adanya pencemaran tinja. Bakteri bentuk koli dikeluarkan dari tubuh manusia dan hewan dalam jumlah besar melalui tinja. Dalam air yang tercemar, bakteri bentuk koli ditemukan dalam kepadatan yang kira-kira sebanding dengan tingkat pencemaran tinja. Bakteri bentuk koli diperoleh, jasad renik lain yang memiliki habitat yang sama dapat dianggap ada dalam contoh air yang sama.

Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 32 Tahun 2017 tentang Standar Baku Mutu Kesehatan Lingkungan dan Persyaratan Kesehatan Air untuk Keperluan Higiene Sanitasi, Kolam Renang, Solus Per Aqua, dan Pemandian Umum menyatakan bahwa kandungan bakteri bentuk koli dan *E. coli* dalam air baku mutu kesehatan lingkungan media air untuk keperluan higiene dan sanitasi masing-masing maksimum 50 CFU/100 mL dan 0 (nihil) CFU/100 ml. Namun, mereka kurang peka dibandingkan virus dan kista protozoa terhadap faktor lingkungan, yaitu pH dan suhu; dan desinfeksi.

Kelompok bakteri bentuk koli mencakup semua bakteri aerob dan fakultatif anaerob, negatif Gram, tidak membentuk spora, berbentuk batang yang memfermentasi laktosa dan menghasilkan gas dalam media biakan setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35 °C. Bakteri bentuk koli terdiri dari spesies *E. coli*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., dan *Klebsiella* sp.

Uji MPN dan uji penyaringan menggunakan membran merupakan cara yang paling umum digunakan untuk melacak bakteri bentuk koli dalam air, terutama jika diduga

kandungan bakteri tidak banyak di dalam contoh air yang diperiksa. Cara penyaringan menggunakan membran tidak dapat digunakan untuk contoh air yang air keruh karena akan menyumbat membran.



Gambar 8 Uji MPN. Perangkat tabung (a) dan tabung uji yang memperlihatkan hasil positif (kiri, b) (Peper and Gerba 2004)

Ada dua cara uji MPN yang umum digunakan, yakni uji menggunakan tiga tabung, dan uji menggunakan lima tabung. Uji MPN untuk bentuk koli terdiri dari tiga langkah, uji pendugaan (*presumptive test*), uji konfirmasi (*confirmation test*), dan uji tuntas (*complete test*). Uji pendugaan menggunakan satu set tabung kaldu laktosa lauril sulfat triptosa (LST) yang diimbui contoh air dan diinkubasi [Gambar 8(a)]. Lauril sulfat adalah deterjen aktif permukaan yang menghambat pertumbuhan bakteri positif Gram sekaligus mendorong pertumbuhan bakteri bentuk koli. Bakteri bentuk koli menggunakan oksigen yang ada dalam kaldu dan kemudian memfermentasi laktosa yang akan menghasilkan asam dan gas dalam kondisi anaerobik. Hasil positif dilihat dengan pembentukan gas dalam tabung Durham terbalik selama diinkubasi 24 - 48 jam [Gambar 8(b)].

Hasil yang memperlihatkan adanya fermentasi laktosa yang tidak menghasilkan gas di dalam air tidak berarti di contoh air tersebut tidak ada bakteri bentuk koli. Tidak berarti dianggap aman. Pembentukan gas juga dilakukan oleh non bakteri bentuk koli, seperti *Clostridium perfringens* yang merupakan bakteri positif Gram.

Oleh karena itu, meneruskan uji pendugaan dengan menginokulasi sedikit dari media LST yang memberikan hasil positif ke media seperti agar Levine's eosin methylene blue (EMB), agar Endo, atau kaldu Brilliant Green Lactose Bile (BGLB). Agar EMB Levine mengandung metilen biru yang menghambat bakteri-bakteri positif Gram. Fermentor laktosa negatif Gram (bentuk koli) yang tumbuh pada media ini akan menghasilkan "koloni berinti" (pusat gelap). Koloni *E. coli* dan *Enterobacter aerogenes* dapat dibedakan berdasarkan ukuran dan adanya kilap logam kehijauan. Koloni *E. coli* berukuran kecil dan memiliki kilau metalik, sedangkan koloni *E. aerogenes* biasanya tidak memiliki kilauan dan ukuran koloninya lebih besar.

Endo Agar mengandung penanda fuschsin sulfit yang membuat pengenalan fermentor laktosa relatif mudah. Koloni bakteri bentuk koli dan media sekitarnya tampak merah di atas Endo Agar. Koloni yang tidak memfermentasi laktosa tidak berwarna dan tidak mempengaruhi warna media.

Hijau brillian dalam kaldu BGLB adalah pewarna yang terkait dengan kristal violet. Empedu sapi menghambat pertumbuhan bakteri positif Gram. Pembentukan gas dalam 24, atau 48 jam memastikan hasil dari langkah penduga sebelumnya.

Jumlah koliform per 100 mL air dihitung berdasarkan jumlah tabung positif dan negatif dalam pengujian dengan mengacu pada Tabel 6 untuk cara MPN 3 tabung. Hasil dilaporkan sebagai angka paling mungkin (APM) bentuk koli per 100 mL air. Jika dikehendaki, jasad renik harus diisolasi dan diwarnai. Tabung BGLB positif digoreskan pada agar eosin-methylene blue (EMB). Kedua pewarna, eosin dan methylene blue, juga menghambat pertumbuhan bakteri positif Gram. Koloni yang khas dibiakkan pada Nutrient Agar (NA) miring dan diinokulasi ke dalam kaldu LST. Jika terbentuk gas dalam masa inkubasi 24 atau 48 jam, dilakukan pewarnaan Gram

Tabel 6 Tabel MPN 3 tabung pengenceran (Peper and Gerba 2004 dengan penyesuaian)

Jumlah tabung positif dalam pengenceran				Jumlah tabung positif dalam pengenceran			
10 ml	1 ml	0,1 ml	MPN / 100 ml	10 ml	1 ml	0,1 ml	MPN / 100 ml
0	0	0	<3	2	0	0	9.1
0	1	0	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	—	—	—	—

dilakukan menggunakan koloni bakteri dari NA miring. Hasil positif jika diperoleh sel-sel bakteri dengan negatif Gram dan tidak ada berspora. Uji biokimiawi menggunakan indol, methyl merah, voges-proskauer, sitrat (IMViC) dapat dilakukan koloni yang akan dikenali (Tabel 7 dan 8).

Tabel 7 Tabel MPN 5 tabung positif (Feng *et al.* 2022)

Tabung positif	Nilai MPN/100 ml	Batas kepercayaan 95%		Tabung positif	Nilai MPN/100 ml	Batas kepercayaan 95%	
		Bawah	Atas			Bawah	Atas
0-0-0	<2	—	—	4-2-0	22	9.0	56
0-0-1	2	1.0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1.0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1.0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1.0	11	5-0-0	23	9.0	86
1-0-1	4	1.0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2.0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1.0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2.0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2.0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3.0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5.0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3.0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4.0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6.0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7.0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5.0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7.0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7.0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9.0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1600	600	5300
				5-5-5	≥1600	—	—

4.3 Tata Kerja

4.3.1 Bahan dan Alat

Contoh air (lebih dari 100 ml)

3 tabung uji dengan tabung Durham (di dalam) berisi kaldu LST lactose kadar ganda (*double strength*, (DSL))

6 tabung uji dengan tabung Durham (di dalam) berisi kaldu LST lactose kadar tunggal (*single strength*, SSLB)

- 1 pipet 10 ml
- 1 pipet 1 ml
- 1 penghisap pipet
- 1 inkubator

4.3.2 Uji pendugaan

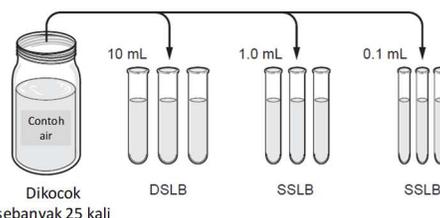
Siapkan tiga tabung DSLB dan enam tabung SSLB seperti dalam Gambar 9.

Beri label pada masing-masing tabung sesuai dengan jumlah air yang akan ditambahkan: masing-masing 10 ml, 1,0 ml, dan 0,1 ml.

Tabel 8 Uji biokimiawi indol, methyl merah, Voges-Proskauer, dan sitrat (IMVIC) dan bakteri negatif Gram yang dikenali

I	MR	VP	C	Bakteri
+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
-	-	+	+	<i>Enterobacter aerogenes</i>
-	-	+	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
-	-/+	-	+	<i>Klebsiella pneumonia</i>
+	-	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
-	+	-	+	<i>Citrobacter freundii</i>
H ₂ S				
+	+	-	+	<i>Proteus vulgaris</i>
-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
+	+	-	-	<i>Morganella morganii</i>

4.3.2.1 Homogenkan contoh air dengan cara dikocok sebanyak 25 kali.



Gambar 9 Penambahan contoh air ke tabung MPN

4.3.2.2 Pindahkan masing-masing sebanyak 10 mL contoh air ke tiga tabung uji berisi DSLB.

4.3.2.3 Pindahkan masing-masing sebanyak 1 mL contoh air ke tiga tabung uji berisi SSLB dan sebanyak 0,1 mL contoh air ke tiga tabung uji terakhir berisi SSLB.

4.3.2.4 Inkubasi seluruh tabung pada suhu 35 °C selama 24 – 48 jam

4.3.2.5 Amati keberadaan gas pada tabung Durham setelah masa inkubasi tercapai. Catat jumlah tabung yang terdapat gas.

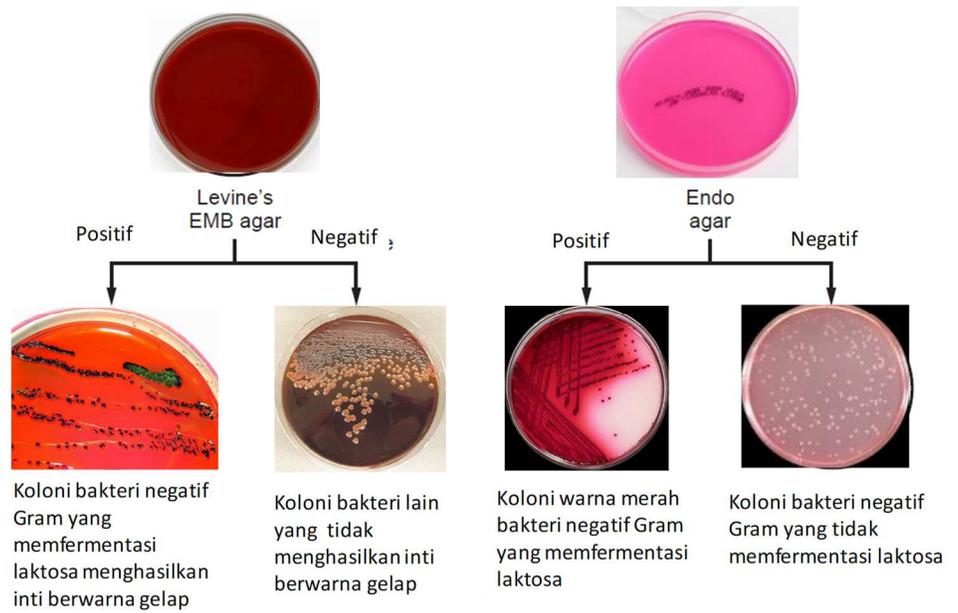
4.3.3 Uji kepastian

Pilih salah satu tabung MPN positif yang diperlihatkan dengan adanya gas yang terperangkap di tabung Durham. Kocok perlahan. Ambil sedikit cairan dari tabung menggunakan ose dan goreskan ke media padat Levine's EMB Agar dan Endo Agar (Gambar 10). Inkubasi pada suhu 35 °C selama 24 – 48 jam. Amati pertumbuhan koloni setelah waktu inkubasi tercapai dengan ciri koloni seperti dalam Gambar 10.

4.4 Pustaka

Feng, P., Weagant, SD., Grant, MA., Burkhardt, W. 2022. BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Jinneman, K. (Chairman). *Bacteriological Analytical Manual*. [Internet] Tersedia pada <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria> [Disitasi pada 06 November 2022]

Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 32 Tahun 2017 tentang Standar Baku Mutu Kesehatan Lingkungan dan Persyaratan Kesehatan Air untuk Keperluan Higiene Sanitasi, Kolam Renang, Solus Per Aqua, dan Pemandian Umum



Gambar 10 Inokulasi ke atas media EMBA dan ENDO AGAR dan tampilan bakteri

LAPORAN PERCOBAAN #4

4.1 Jatidiri Kelompok

- 4.3.1Kelompok :
- 4.3.2Anggota kelompok : 4.1.2.1
- 4.1.2.2.....
- 4.1.2.3.....
- 4.1.2.4.....

4.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

4.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 4.3.1Apa keterbatasan metode yang berbeda untuk melacak jasad renik di udara?
- 4.3.2Tentukan kandungan bakteri bentuk koli per 100 mL dalam contoh air yang diperiksa!
- 4.3.3Mengapa melacak bakteri bentuk koli dulu dibandingkan langsung memeriksa bakteri patogennya?
- 4.3.4Sebutkan dua spesies bakteri bentuk koli yang paling dikenal!
- 4.3.5Jelaskan bakteri bentuk koli?
- 4.3.6Sebutkan empat penyakit yang ditularkan melalui air!
- 4.3.7Genus bakteri apa saja yang termasuk dalam kelompok bakteri bentuk koli?
- 4.3.8Apa warna bakteri bentuk koli yang muncul pada media mEndo Agar?
- 4.3.9Mengapa empedu sapi ditambahkan ke dalam kaldu BGLB?
- 4.3.10 Apa tujuan penggunaan tabung Durham?
- 4.3.11 Berapa batas maksimum keberadaan bakteri bentuk koli dalam bahan baku air untuk air minum di Indonesia? Tuliskan peraturan yang mengatur batas maksimum tersebut!

4.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh

Percobaan 5

MELACAK JASAD RENIK DI PERAIRAN (Melacak Virus Enterik)

5.1 Tujuan

- Memperlihatkan cara memadatkan kadar virus dalam contoh air dan melacak virusnya
- Pengamatan biakan sel untuk melihat *cytopathogenic effect* (CPE) virus

5.2 Teori

Virus bukanlah flora normal di saluran usus. Mereka dikeluarkan dari tubuh hanya oleh seseorang yang terinfeksi. Virus enterik hanya berkembang biak di dalam sel yang hidup dan rentan. Jumlahnya tidak dapat meningkat dalam limbah. Proses alam yang terjadi, seperti pengolahan limbah, pengenceran, inaktivasi alami, dan pengolahan air akan mengurangi jumlah virus.

Virus yang dikeluarkan bersama tinja dari seseorang yang terinfeksi dapat mencemari air. Virus ini sering ditularkan dari orang ke orang melalui jalan *feka-oral*. Virus dapat berada dalam limbah domestik yang dibuang ke air permukaan, atau tanah. Virus enterik dikeluarkan dalam jumlah yang relatif besar bersama tinja, seperti virus polio, virus coxsackie, virus echo, virus adeno, virus reo, virus rota, virus hepatitis A (hepatitis menular), dan virus noro. Mereka diketahui sebagai penyebab penyakit gastroenteritis, ruam kulit, meningitis, miokarditis, infeksi mata, kelumpuhan, demam, dan sebagainya.

Melacak virus di dalam air harus didahului pemulihan virus yang memerlukan tiga langkah umum, yakni (a) mengumpulkan contoh air yang mewakili; (b) pemadatan (*concentrated*) virus dalam contoh air; dan (c) mengenali dan memperkirakan jumlah virus yang dipadatkan. Yang perlu diperhatikan ketika melacak virus dalam contoh air adalah (a) ukuran partikel virus yang kecil (berdiameter sekitar 20–100 nm); (b) rendahnya kandungan virus dalam contoh air, keragaman jumlah, dan jenisvirus; (c) ketidakstabilan virus; (d) berbagai bahan terlarut dan tersuspensi dalam air dan air limbah yang dapat mengganggu kegiatan melacak virus; dan (e) keterbatasan cara mengenali dan menghitung jumlah virus saat ini.

Metode Pemadatan Virus. Keberadaan virus, misalnya virus enterik, dalam air, atau air limbah sangat rendah jumlahnya. Oleh karena itu, cara pemadatan kadar sel virus diperlukan ketika akan melacak keberadaan virus di dalam contoh air, atau air limbah. Ketika melakukan cara pemadatan virus dalam contoh perlu pertimbangkan kemungkinan kepadatan virus, batasan volume cara pemadatan untuk jenis contoh air, dan kemungkinan keberadaan pencemar yang mengganggu (Cashdollar and Wymer 2013; Farkas *et al.* 2018; Forés *et al.* 2022). Volume contoh kurang dari satu liter mungkin cukup untuk pemulihan virus. Akan tetapi, untuk contoh air minum, atau contoh air yang relatif tidak tercemar, mungkin dibutuhkan volume contoh air yang lebih banyak agar dapat memperbesar peluang mendapatkan virus.

Saat ini, cara adsorpsi/elusi yang disarankan American Public Health Association (APHA 2022) masih menjadi cara pilihan untuk pemadatan virus di contoh air. Dasar kerja dari cara tersebut adalah melewati contoh air melalui penyaring (*filter*) yang

akan menangkap virus dan kemudian melepaskan (*elution, desorbing*) virus dari penyaring menggunakan suspensi satu, atau dua liter 1,5% ekstrak daging sapi.

Ada dua jenis penyaringan yang dapat digunakan dan keduanya memiliki kelebihan dan kekurangan. Penyaring elektronegatif telah terbukti memiliki kemampuan yang lebih besar untuk menyerap (*adsorption*) virus di perairan dengan kekeruhan tinggi dan bahan organik. Tetapi, penyaringan dengan penyaring ini memerlukan penambahan $AlCl_3$ dan pengasaman air hingga pH 3,5 agar mendapatkan penyerapan virus yang maksimal ke penyaring. Pelaksanaannya mungkin sedikit rumit karena memerlukan penyesuaian contoh air dengan penambahan $AlCl_3$ sebelum penyaringan dan pH meter. Penyaring elektronegatif yang paling umum digunakan adalah Filterite[®]. Umumnya digunakan sebagai kartrid berlipat (*pleated cartridge*) 10 inci (25,4 cm) dengan ukuran pori-pori 0,22 mm, atau 0,45 mm (Gerba *et al.*, 1978).

Penyaring elektropositif tidak memerlukan penyesuaian contoh air sebelum penyaringan. Tetapi penyaring mungkin akan lebih mudah tersumbat sehingga tidak efektif digunakan untuk air limbah padat dan perairan yang tinggi kadar bahan organiknya. Filter elektropositif tidak dapat digunakan untuk contoh air ber-pH di atas 8,5-9,0. Pra-penyaring dapat juga digunakan untuk meningkatkan kemampuan penangkapan virus tetapi harus dicuci dan diproses dengan cara yang sama seperti penyaring penangkap virus. Virozorb[®] 1 MDS elektropositif dibuat khusus untuk penyerapan virus dari contoh air. Setelah virus dilepaskan dari penyaring, suspensi virus dipekatkan kembali ke volume yang lebih kecil (biasanya 20-30 ml) sebelum diperiksa pada biakan sel (*cell culture*) hewan (Gerba and Betancourt 2019).

Skema tata kerja pemadatan/pemekatan virus dari contoh air ditunjukkan pada Gambar 11.

5.3 Tata kerja

5.3.1 Bahan

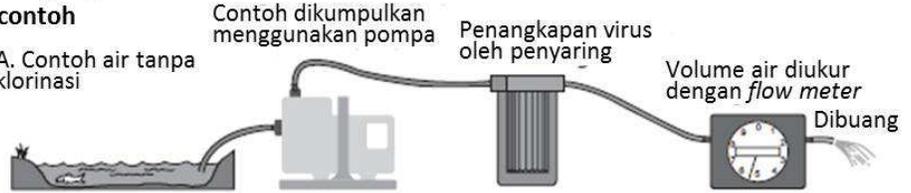
- Peralatan pemekatan virus seperti yang digambarkan pada Gambar 11.
- Biakan sel yang terinfeksi virus polio tipe 1 (LSc—galur vaksin) dalam labu biakan.
- Mikroskop cahaya terbalik

5.3.2 Pengumpulan contoh dan penyaringan

- (1) Hubungkan rumah penyaring langsung ke keran, atau pompa langsung dari fasilitas penampungan air (langkah 1A dan 1B).
- (2) Jika perlu melakukan mendeklorinasi, tambahkan sodium thiosulfat *in-line* (0,4 ml/gal (0,1ml/l) dari larutan 10%) baik dengan bantuan injektor *in-line*, atau pompa pengukur (langkah 1B). Contoh air juga dapat dikumpulkan dalam wadah plastik besar dan dideklorinasi seperti yang dijelaskan untuk penyaring elektronegatif.

1 Pengumpulan contoh

A. Contoh air tanpa klorinasi



B. Contoh air berklorinasi



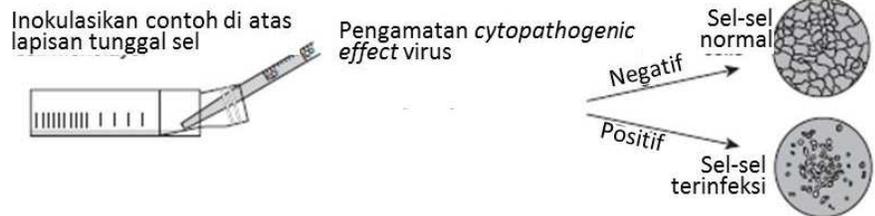
2 Pengelepasan



3 Pemekatan ulang



4 Pemeriksaan di biakan sel



Gambar 11 Tata kerja pemekatan contoh air dan isolasi virus enterik (Peper dan Gerba 2004 – dengan penyesuaian)

(3) Tempatkan penyaring kartrid 1 MDS di dalam rumahnya,

kencangkan dan sambungkan semua tabung. Pengukur aliran harus ditempatkan setelah penyaring. Pra-penyaring Filterite® dapat digunakan jika perlu (ukuran pori-pori tiga milimeter) dan dihubungkan sebelum penyaring penangkap virus.

- (4) Pompa dijalankan dengan laju aliran antara 5-10 gal/menit (19-38 l/menit).
- (5) Setelah memperoleh volume yang diinginkan, segera tempatkan penyaring pada suhu empat derajat Celcius, atau di atas es. Contoh segera dikirim ke laboratorium untuk diperiksa. Pelepasan virus dari penyaring dapat juga dilakukan di lapangan. Berbeda dengan penyaring elektronegatif yang contoh airnya harus dikirim dalam keadaan beku, penyaring elektropositif dapat disimpan pada suhu empat derajat Celcius dan dapat disimpan hingga tiga hari sebelum melepaskan virus yang tertangkap (Sobsey dan Glass, 1980).

5.3.3 Penanganan peralatan dan disinfeksi

- (1) Sebelum digunakan, botol-botol yang digunakan untuk pengumpulan contoh air, dan/atau peralatan plastik lainnya harus disuci-hamakan menggunakan otoklaf.
- (2) Peralatan yang tidak dapat disuci-hamakan menggunakan otoklaf, seperti selang, rumah penyaring, meteran air, dan pompa dibersihkan menggunakan cairan klorin bebas dengan kadar 10 mg/l selama 30 menit. *Probe* pH didisinfeksi dengan cara merendamnya dalam HCl 1 M selama 10 menit.
- (3) Setelah pengambilan contoh, semua peralatan harus didisinfeksi menggunakan klorin dengan kadar 10–15 mg/l (dalam bentuk NaOCl) selama 30 menit dan kemudian dideklorinasi dengan penambahan natrium tiosulfat yang cukup untuk menetralkan sisa klorin bebas.
- (4) Pengukur aliran harus ditempatkan di bagian hilir rumah filter.

5.3.4 Penyaring dan pengiriman hasil penyaringan

- (1) Penyaring dapat dibiarkan di tempat penyaring, atau dapat ditempatkan dalam kantong plastik yang dapat ditutup kembali ketika dikirim ke tempat pengambilan contoh. Penyaring elektropositif (1 MDS Virozorb®) harus dikirim dalam suhu empat derajat Celcius untuk mencegah kematian virus yang signifikan. Penyaring elektropositif harus dicuci dalam 48-72 jam setelah pengumpulan (Sobsey dan Glass, 1980).
- (2) Cairan hasil penyaringan dapat dikirim, atau disimpan dalam es pada suhu empat derajat Celcius sampai diterima oleh laboratorium. Cairan tersebut harus disimpan tidak lebih dari 72 jam pada suhu ini sebelum dibekukan dan disimpan pada suhu minus satu derajat Celcius, atau lebih rendah. Contoh dapat

dibekukan dan dikirim dalam es kering. Contoh beku dapat disimpan tanpa batas waktu penyimpanan.

5.3.5 Cairan hasil penyaringan

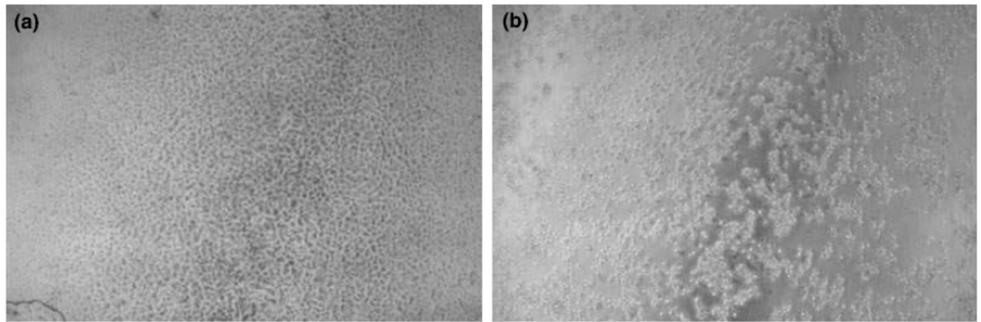
- (1) Air sisa dikeluarkan dari penyaring saat berada di dalam dudukannya.
- (2) Satu liter media ekstrak daging sapi 1,5%, dengan glisin 0,05 M pada pH 9,5 ditambahkan ke penahan penyaring dan membiarkan media tersebut melewati penyaring menggunakan tekanan udara (Langkah 2, Gambar 11).
- (3) Cairan yang lepas dari penyaring segera diatur ke pH netral dengan penambahan HCl 1M. Nilai pH cairan tersebut harus disesuaikan segera setelah proses pengeluaran cairan untuk mencegah matinya virus (jika ada) karena pH cairan yang tinggi.

5.3.6 Pematatan ulang cairan dari penyaring dan klarifikasi

- (1) Sebanyak satu liter cairan dari penyaring dipadatkan kembali dengan cara pengendapan protein dan virus dengan asam dan dilanjutkan dengan tahapan sentrifugasi (Langkah 3, Gambar 10).
- (2) Pelet hasil sentrifugasi disuspensikan kembali dengan menambahkan 20-30 mL larutan penyangga (*buffer*) pada pH 8-10.
- (3) Sel-sel bakteri dihilangkan dengan melakukan sentrifugasi pada kecepatan rendah dan jika perlu ditambahkan antibiotika.
- (4) Nilai pH akhir contoh berada di pH netral.

5.3.7 Pemeriksaan cairan dari penyaring pada biakan sel

- (1) *Cell line* baku yang digunakan untuk memeriksa contoh lingkungan untuk virus enteric adalah *cell line* ginjal *buffalo green monkey* (BGM). Sel ditumbuhkan menjadi lapisan tunggal (*monolayer cells*) yang menyatu dalam labu plastik (Langkah 4, Gambar 11) (Goldstein dan Guskey 1982; Lee *et al.* 2004).
- (2) Sel yang sudah diinokulasi cairan yang diperiksa diamati selama 14 hari untuk melihat adanya kerusakan sel (*cytopathogenic effect*, CPE) yang disebabkan oleh virus (Gambar 12). Setiap labu positif dipastikan kembali dengan cara memasukkannya kembali ke sel segar dan memperhatikan kembali terbentuknya CPE berikutnya. Setidaknya setengah dari contoh yang dipadatkan ulang harus diuji.



Gambar 12 Efek sitopatogenik (CPE): Lapisan tunggal Buffalo Green Monkey Cell sebelum diinfeksi (a) dan efek sitopatogenik khas yang disebabkan oleh enterovirus (b) (Carducci *et al.* 2002 dengan penyesuaian)

- (3) Virus enterik biasanya dihitung menggunakan metode angka paling mungkin (*most probable number*, MPN) yang mirip dengan pemeriksaan bakteri bentuk koli, atau dengan metode unit pembentuk plak (*plaque forming unit*, PFU). Dengan metode PFU, sel lapisan tunggal ditutupi dengan agar-agar. Kemudian, sel lapisan tunggal yang hidup akan terwarnai dengan pewarna yang diberikan. Sel yang mati menghasilkan zona bening, atau plak di lapisan tunggal (Montazeri *et al.* 2015).

5.3.8 Pemeriksaan biakan sel

Setiap pelaksana akan memeriksa biakan sel yang telah terinfeksi oleh virus polio tipe 1 LSc (galur vaksin) di bawah mikroskop cahaya terbalik. Bandingkan sel lapisan tunggal yang terinfeksi dengan sel lapisan tunggal yang tidak terinfeksi. Catat pengamatan Anda.

5.4 Pustaka

- APHA. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th edition. American Public Health Association. Washington, DC. [Internet] Tersedia pada https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/technical-documents/white-papers/apha-water-testing-standard-methods-introduction-white-paper.pdf Disitasi pada 26 November 2022.
- Carducci, A., Cantiani, L., Moscatelli, R., Casini, B., Rovini, E., Mazzoni, F., Giuntini, A., and Verani, M. 2002. Interference between enterovirus and reovirus as a limiting factor in environmental virus detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34: 110–113. [Internet] Tersedia pada https://www.academia.edu/13973050/Interference_between_enterovirus_and_reovirus_as_a_limiting_factor_in_environmental_virus_detection [Disitasi pada 28 November 2022]
- Cashdollar, JL., and Wymer, L. 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J. Appl. Microbiol.*, 115(1): 1-11. doi: 10.1111/jam.12143.

- Farkas, K., McDonald, JE., Malham, SK., and Jones, DL. 2018. Two-step concentration of complex water samples for the detection of viruses. *Methods Protoc.*, 1: x. <https://doi.org/10.1101/386060>
- Forés, E., Rusiñol, M., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Calvo, M., and Bofill-Mas, S. 2022. Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples. *Sci. Total Environ.*, 829(154431): 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154431>
- Gerba, CP., and Betancourt, WQ. 2019. Assessing the Occurrence of Waterborne Viruses in Reuse Systems: Analytical Limits and Needs. *Pathogens*, 8(3): 107. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030107>
- Gerba, CP., Farrah, SR., Goyal, SM., Wallis, C., and Melnick, JL. 1978. Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35(3): 540–548. doi: [10.1128/aem.35.3.540-548.1978](https://doi.org/10.1128/aem.35.3.540-548.1978)
- Goldstein, G., and Guskey, LE. 1982. Development of a shaker culture of Buffalo green monkey kidney cells: potential use for detection of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(2): 317-20. doi: [10.1128/aem.44.2.317-320.1982](https://doi.org/10.1128/aem.44.2.317-320.1982)
- Lee, C., Lee, SH., Han, E., Kim, SJ. 2004. Use of cell culture-PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(11): 6695-705. doi: [10.1128/AEM.70.11.6695-6705.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6695-6705.2004)
- Montazeri, N., Goettert, D., Achberger, EC., Johnson, CN., Prinyawiwatkul, W., and Janes, ME. 2015. Pathogenic enteric viruses and microbial indicators during secondary treatment of municipal wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 6436–6445. doi:[10.1128/AEM.01218-15](https://doi.org/10.1128/AEM.01218-15).
- Peper, IL., and Gerba, CP. 2004. *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 226 p.
- Sobsey, MD., and Glass, JS. 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent penyarings. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(2): 201–210. doi: [10.1128/aem.40.2.201-210.1980](https://doi.org/10.1128/aem.40.2.201-210.1980)

LAPORAN PERCOBAAN #5

5.1 Jatidiri Kelompok

5.3.1 Kelompok :

5.3.2 Anggota kelompok : 5.1.2.1

5.1.2.2

5.1.2.3

5.1.2.4

5.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

5.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

5.3.1 Jenis penyakit apa yang disebabkan oleh virus enterik?

5.3.2 Mengapa dinilai penting untuk melacak sejumlah kecil virus enterik dalam volume air yang besar?

5.3.3 Mengapa virus terserap ke filter elektropositif?

5.3.4 Jelaskan mengenai efek sitopatogenik (*cytopathogenic effect*, CPE)!

5.3.5 Jelaskan mengenai virus enteric!

5.3.6 Mengapa ekstrak daging sapi digunakan untuk memadatkan virus dari air?

5.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh

Percobaan 6

MELACAK BAKTERI BENTUK KOLI PADA AIR, MAKANAN DAN PERMUKAAN MENGGUNAKAN CARA RODAC DAN PETRIFILM™

6.1 Tujuan

Untuk menentukan kadar bakteri pada permukaan menggunakan media yang diikat dengan media film.

6.2 Teori

Ada beberapa cara yang dapat digunakan untuk melacak bakteri di lingkungan, seperti di air, makanan, dan permukaan. Melacak bakteri di permukaan sangat penting jika dikaitkan dengan upaya memantau kebersihan peralatan secara mikrobiologik di area rumah sakit untuk menghindari kemunculan penyakit-penyakit nosokomial (*nosocomial diseases*). Juga, dalam upaya untuk memantau kebersihan (*sanitation*) peralatan yang digunakan dalam proses menghasilkan barang-barang pangan/makanan. Cara berbasis pembiakan biasanya digunakan untuk melacak jasad renik, kebanyakan melacak bakteri, di lingkungan. Keberadaan sel-sel bakteri di udara dapat dilacak menggunakan cawan petri statis yang diletakkan di permukaan lantai (Lu *et al.* 1983; Black 2020; Daneau *et al.* 2016). Cara apus (*swab*) menggunakan kapas bergagang suci hama yang dibasahi dengan penyangga garam (*saline buffer*), atau media kaldu dapat digunakan pada permukaan.

Cara *Replicate Organism Detection and Counting* (RODAC) sering digunakan untuk melacak sel-sel bakteri yang ada di permukaan. Cara ini dapat dilakukannya memerlukan langkah-langkah penghilangan pencemar yang dapat menurunkan kepekaan pelacakan (Hacek *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2009; Smith *et al.* 2013; Perez *et al.* 2018; IACUC 2022). Penggunaan media selektif dimungkinkan ketika menggunakan cara ini untuk melacak bakteri-bakteri yang tumbuh lambat. Tingkat pemulihan RODAC untuk bakteri sangat beragam. Misalnya, untuk *Listeria monocytogenes* tingkat pemulihannya hanya 4,15%, untuk *Clostridium* sp. berkisar antara 0,3% - 45,8% dan tergantung pada media yang digunakan (Buggy *et al.* 1983; Gomez *et al.* 2012; Daneau *et al.* 2016; Katzenberger *et al.* 2021; Rose *et al.* 2022).

Cara lain yang sering digunakan untuk tujuan yang sama adalah penggunaan Petrifilm™. Petrifilm™ adalah media kering (terhidrasi) yang terikat pada kertas berlapis polietilen yang dicetak dengan kisi-kisi yang dapat digunakan untuk memantau mutu mikrobiologik permukaan. Pelat Petrifilm™ juga dapat digunakan untuk permukaan contoh, atau satu mililiter volume susu, air, atau cairan lainnya. Penggunaan pelat Petrifilm™ sangat menghemat karena tidak memerlukan persiapan media dan dapat disimpan dalam waktu lama sebelum digunakan.

6.3 Tata kerja

6.3.1 Bahan

- Trypticase Soy Agar
- Lechitin

- Polysorbate 80
- Petrifilm™ coliform count plates
- 2 pipet 1-ml
- Penghisap pipet
- Nutrient broth 2 ml, atau peptone water 0,1% (w/v)

6.3.2 Tahapan cara RODAC

- (1) Pelat RODAC mengandung Trypticase Soy Agar yang disiapkan dengan Lechitin dan Polysorbate 80.
- (2) Pelat RODAC harus didinginkan pada saat diterima dan disimpan terbalik.
- (3) Buka tutupnya dan sentuhkan dengan lembut ke permukaan area/peralatan yang akan diperiksa.
- (4) Ganti penutup dengan cepat untuk menghindari pencemaran udara yang dapat mempengaruhi hasil pelat RODAC.
- (5) Tutupnya harus ditempel dan beri penamaan di bagian bawah pelat sesuai dengan titik pengambilan contoh.
- (6) Area permukaan yang akan diperiksa sebaiknya dibersihkan, didisinfeksi, dan dikeringkan sebelum menyentuh pelat RODAC ke permukaan tersebut.
- (7) Untuk permukaan yang tidak rata, kapas bergagang suci hama yang telah dibasahi dengan air suci hama diusapkan di atas permukaan tersebut. Kapas usapan tersebut digosokkan dengan lembut ke permukaan pelat RODAC.
- (8) Penempelan media RODAC, atau usapan kapas harus dilakukan dalam waktu dua jam setelah pembersihan dan disinfeksi.
- (9) Satu pelat RODAC dapat digunakan sebagai pengendali (kontrol) positif dengan cara menempelkan ke permukaan yang kotor, seperti lantai, sebelum dibersihkan dan didisinfeksi. Pelat ini seharusnya akan ditumbuhi bakteri, kapang, atau khamir.
- (10) Pelat RODAC harus dibawa ke laboratorium dan diinkubasi pada hari yang sama. Pelat RODAC harus didinginkan selama perjalanan menuju laboratorium. Pelat RODAC akan diinkubasi pada suhu 35 °Celsius selama 24 dan 48 jam.
- (11) Pengamatan dan penghitungan koloni yang tumbuh di pelat RODAC harus dilakukan setelah masa inkubasi selama 24 dan 48 jam selesai.
- (12) Hasil pengamatan akan dibuat dalam penafsiran sebagai berikut:
 - 0-5 koloni: Tidak ada, atau sangat sedikit koloni (dianggap sangat baik)

- 6-15 koloni: Sedikit (dianggap baik)
- 16-30 koloni: Sedang (batas dapat diterima)
- 31-50 koloni: Nyata (buruk)
- >50 koloni: Berat (tidak dapat diterima)
- TNTC : *Too numerous to count*. Terlalu banyak untuk dihitung (tidak dapat diterima)

Kemajuan disinfeksi dapat dipantau dengan cara ini di setiap fasilitas yang membutuhkan pengujian setidaknya dua kali setahun, atau adanya pertimbangan lain.

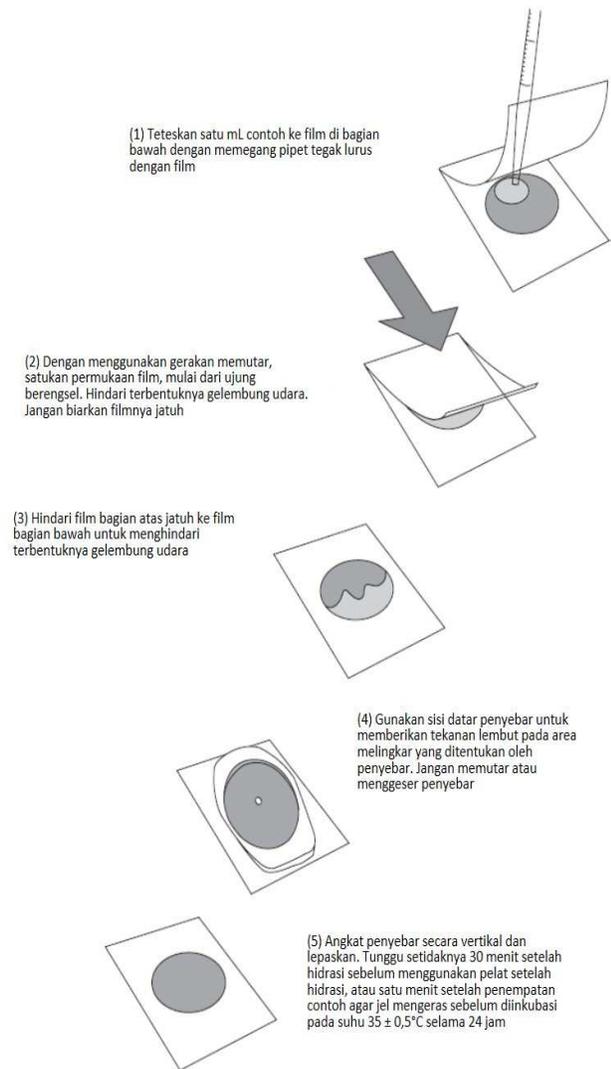
6.3.3 Tahapan cara Petrifilm™

Mempersiapkan PetriFilm™

- (1) Tempatkan pelat Petrifilm™ pada permukaan yang rata.
- (2) Angkat lapisan atas dan keluarkan satu mililiter kaldu nutrisi suci hama, atau pepton 0,1% ke tengah film bawah (Langkah 1, Gambar 13).
- (3) Pasang lapisan atas ke bawah pada cairan menggunakan gerakan memutar agar tidak membentuk gelembung udara (Langkah 2 dan 3, Gambar 13).
- (4) Sebarkan pengencer dengan tekanan ke bawah di bagian tengah penyebar plastik (sisi tersembunyi di bawah). Jangan geser penyebar melintasi film (Langkah 4, Gambar 13).
- (5) Lepaskan penyebar menggunakan gerakan vertikal (Langkah 5, Gambar 13) dan biarkan pelat tidak terganggu selama satu menit untuk memadatkan jel.
- (6) Biarkan minimal 30 menit agar jel benar-benar mengeras sebelum menggunakan pelat untuk pengambilan contoh permukaan.

Pengambilan contoh permukaan

- (1) Angkat lapisan atas pelat Petrifilm™ yang telah dihidrasi sebelumnya (jel akan menempel pada lapisan atas).
- (2) Tempatkan jel dan lapisan atas pada permukaan yang akan diperiksa.
- (3) Gosokkan jari Anda dengan kuat ke seluruh sisi film dari area jel untuk memastikan sentuhan yang baik dengan permukaan.
- (4) Angkat film dari permukaan dan satukan kembali lembaran atas dan bawah Petrifilm™.



Gambar 12 Persiapan cara menggunakan PetriFilm™ (Peper dan Gerba 2004, dengan penyesuaian)

- (5) Inkubasi pelat dalam posisi horizontal dengan sisi bening menghadap ke atas pada suhu $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ selama 24 jam.

Pemeriksaan air dan makanan

- (6) Letakkan Petrifilm™ pada permukaan yang rata. Angkat film atas.

- (7) Dengan pipet yang posisinya tegak lurus terhadap Petrifilm™, keluarkan satu mililiter cairan contoh ke bagian tengah lapisan bawah (Langkah 1, Gambar 13).
- (8) Dengan gerakan memutar, turunkan lapisan atas secara perlahan dan upayakan membentuk udara di cairan contoh di bawahnya. Jangan biarkan film atas jatuh (Langkah 2 dan 3, Gambar 13).
- (9) Dengan sisi datar menghadap ke bawah, tempatkan penyebar pada film atas di atas inokulum (Langkah 4, Gambar 13). Berikan tekanan lembut pada penyebar untuk meratakankan inokulum ke area melingkar yang ditentukan oleh penyebar. Jangan memelintir atau menggeser penyebar.
- (10) Angkat penyebar menggunakan gerakan vertikal. Tunggu satu menit agar jel mengeras (Langkah 5, Gambar 13).
- (11) Inkubasi pada suhu $35 \pm 0,5$ °C selama 24 jam.

6.3.4 Pengamatan hasil

- (1) Contoh permukaan

Keluarkan cawan dari inkubator dan catat jumlah bentuk koli dan *Escherichia coli*. Petunjuk yang terkandung dalam Petrifilm™ bereaksi dengan β -glukuronidase yang dihasilkan oleh *E. coli* membentuk endapan biru pada medium. Semua koloni biru (tanpa memperhatikan gas yang dihasilkan) dihitung sebagai *E. coli*. Bakteri bentuk koli memfermentasi laktosa dalam medium untuk menghasilkan gas yang terperangkap di antara lapisan tipis pelat. Semua koloni yang menghasilkan gelembung gas (gelembung berukuran kurang dari satu diameter koloni dari koloni) dihitung sebagai bentuk koli. Koloni merah tanpa gelembung gas adalah bakteri negatif Gram lainnya.

- (2) Contoh air, atau makanan

Keluarkan pelat dari inkubator dan catat hasilnya seperti pengamatan hasil pada pemeriksaan permukaan. Jumlah bakteri *E. coli*, atau bentuk koli adalah jumlah yang ada dalam satu mililiter contoh yang diperiksa

6.4 Pustaka

- Black, WD. 2020. A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia. *PLoS One*, 15(12): e0238901. doi: 10.1371/journal.pone.0238901.
- Buggy, BP., Wilson, KH., Fekety, R. 1983. Comparison of methods for recovery of *Clostridium difficile* from an environmental surface. *J. Clin. Microbiol.*, 18(2): 348-52. doi: 10.1128/jcm.18.2.348-352.1983.
- Daneau, G., Nduwamahoro, E., Fissette, K., Rüdelsheim, P., van Soolingen, D., de Jong, BC., Rigouts, L. 2016. Use of RODAC plates to measure containment of *Mycobacterium tuberculosis* in a Class IIB biosafety cabinet during routine

operations. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2016: 148 – 154.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.01.003>

Gomez, D., Arino, A., Carraminana, J.J., Rota, C., and Yangüela, J. 2012. Comparison of sampling procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from stainless steel food contact surfaces, *J. Food Prot.*, 75: 1077–1082. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-421

Hacek, DM., Trick, WE., Collins, SM., Noskin, GA., Peterson, LR. 2000. Comparison of the RODAC imprint method to selective enrichment broth for recovery of vancomycin-resistant enterococci and drug-resistant Enterobacteriaceae from environmental surfaces, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4646–4648. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.12.4646-4648.2000>

[IACUC] The Institutional Animal Care and Use Committee. 2022. IACUC Guideline: Microbiological Monitoring (RODAC Plate). [Internet] Tersedia pada <https://www.purdue.edu/research/oevprp/regulatory-affairs/animal-research/docs/policies/Microbiological%20Monitoring%20-%20RODAC.pdf> [Disitasi pada 13 Desember 2022]

Katzenberger, RH., Rösel, A., Vonberg, RP. 2021. Bacterial survival on inanimate surfaces: a field study. *BMC Res Notes*, 14: 97. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05492-0>

Lu, A., Alto, LJ., Prusia, MG. 1983. Reliability of the Settling-Plate method in Monitoring Laminar-Airflow Benches. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 40(2): 271–273, <https://doi.org/10.1093/ajhp/40.2.271>

Peper, IL., and Gerba, CP. 2004. *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 226 p.

Perez, P., Holloway, J., Ehrenfeld, L., Cohen, S., Cunningham, L., Miley, GB., Hollenbeck, BL. 2018. Door openings in the operating room are associated with increased environmental contamination. *Am. J. Infect. Cont.*, 46: 954–956. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.03.005>

Pinto, F., Hiom, S., Girdlestone, S., Maillard, J-Y. 2009. Evaluation of the effectiveness of commercially available contact plates for monitoring microbial environments. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48: 379–382. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02534.x

Rose, LJ., Houston, H., Martinez-Smith, M., Lyons, AK., Whitworth, C., Noble-Wang, J. 2022. Factors influencing environmental sampling recovery of healthcare pathogens from non-porous surfaces with cellulose sponges. *PLoS ONE*, 17(1): e0261588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261588>

Sandle, T. 2020. Study of contact plates recovery from pharmaceutical cleanroom surfaces across three-time ranges. *Eur. J. Parent. Pharmaceut. Sci.*, 25: 1–10. DOI: 10.37521/ejpps25301.

Smith, E., Raphael, I., Maltenfort, M., Honsawek, S., Dolan, K., Younkins, E. 2013. The Effect of Laminar Air Flow and Door Openings on Operating Room Contamination. *J. Arthroplasty*, 28. DOI: 10.1016/j.arth.2013.06.012.

LAPORAN PERCOBAAN #6

6.1 Jatidiri Kelompok

6.1.1Kelompok :

6.1.2Anggota kelompok : 6.1.2.1

6.1.2.2

6.1.2.3

6.1.2.4

6.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

6.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

6.3.1 Mengapa dianggap penting untuk menguji permukaan untuk melihat keberadaan bakteri?

6.3.2 Apa kemungkinan sumber *E. coli* di permukaan?

6.3.3 Apa yang menghasilkan koloni *E. coli* berwarna biru pada Petrifilm™?

6.4 Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh!

Percobaan 7

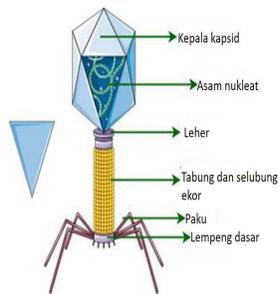
MELACAK JASAD RENIK DI PERAIRAN (Melacak Bakteriofaga/Faga)

7.1 Tujuan

Melacak keberadaan bakteriofaga/faga *E. coli* dari lingkungan perairan

7.2 Teori

Bakteriofaga, juga dikenal sebagai faga, adalah virus yang menginfeksi dan memperbanyak selnya (*replication*) dalam sel bakteri. Mereka ada di mana-mana di lingkungan dan jumlahnya dianggap paling melimpah di bumi. Mereka sangat beragam dalam ukuran, morfologi, dan organisasi genom (Hatfull and Hendrix 2011; Doore and Fane 2016; Simmonds and Aiewsakun 2018). Bahan genetik faga semuanya terdiri dari genom asam nukleat yang terbungkus dalam cangkang protein kapsid yang dikodekan faga, yang melindungi bahan genetik dan memperlancar pengirimannya ke sel inang berikutnya. Gambaran faga dapat dilihat



Gambar 14 Skematik bakteriofag (GFG 2022 dengan penyesuaian)

lebih lengkap menggunakan mikroskop elektron, beberapa di antaranya tampak memiliki "kepala", "kaki", dan "ekor" (Gambar 14). Partikel virus, atau virion, adalah inti asam nukleat yang dikelilingi oleh selubung protein, atau kapsid yang tersusun dari subunit protein atau kapsomer. Pada beberapa virus yang lebih rumit, nukleokapsid dikelilingi oleh selubung tambahan dan beberapa memiliki pelengkap atau ekor permukaan berbentuk seperti paku. Faga tidak bergerak dan bergantung pada gerakan Brown untuk mencapai sel sasarannya (Kasman dan Porter 2022).

Seperti halnya virus, faga sangat khusus spesies terhadap inangnya dan biasanya hanya menginfeksi satu spesies bakteri, atau bahkan

galur tertentu dalam satu spesies. Setelah faga menempel pada inang yang rentan, mereka akan memilih salah satu dari dua cara memperbanyak sel: *litik*, atau *lisogenik*. Faga menempel pada bakteri inang yang rentan ketika melakukan cara litik, memasukkan genomnya ke dalam sitoplasma sel inang, dan menggunakan ribosom inang untuk membuat proteinnya. Sumber daya sel inang dengan cepat diubah menjadi genom virus dan protein kapsid, yang berkumpul menjadi banyak salinan dari faga asli. Ketika sel inang mati, sel tersebut melepaskan faga baru yang akhirnya akan menginfeksi sel inang lainnya.

Dengan cara lisogenik, faga tetap membutuhkan penempelan selnya ke bakteri inang yang rentan dan memasukkan genomnya ke dalam sitoplasma sel inang. Namun, genom faga disisipkan ke kromosom sel bakteri, atau dipertahankan sebagai elemen episom yang diperbanyak dan diteruskan ke sel bakteri anak tanpa membunuhnya. Genom faga yang disisipkan disebut profaga, dan bakteri yang mengandungnya disebut lisogen. Profagae dapat mengubah kembali ke siklus perbanyakannya litik dan membunuh inangnya. Paling sering sebagai tanggapan terhadap perubahan kondisi lingkungan (Simmonds and Aiewsakun 2018).

Virus yang menginfeksi bakteri bentuk kuli disebut kolifaga (*coliphage*). Faga bakteri bentuk kuli ditemukan di tempat bakteri bentuk kuli ditemukan. Beberapa kolifaga mungkin memiliki struktur rumpil yang terdiri dari kepala (kapsid), yang mengandung inti asam nukleat, ekor, dan serat ekor, yang membantu faga menempel pada bakteri inang (misalnya faga T, lihat Gambar 13). Faga lain hanya terdiri dari kapsid dan asam nukleat dan menempel pada pilus kelamin bakteri jantan (faga khusus jantan, misalnya, faga MS-2).

Ada banyak peluang menggunakan faga sebagai petunjuk mutu lingkungan (Tabel 9). Penggunaan faga sebagai petunjuk keberadaan dan perilaku bakteri enterik dan virus hewan selalu menarik karena kemudahan melacak berbiaya rendah yang terkait dengan uji faga.

Tabel 9 Pemanfaatan fag untuk petunjuk mutu lingkungan

Melacak bakteri induk, misalnya bakteri <i>Escherichia coli</i>	Melacak faga virus enterik pada contoh lingkungan cukup memerlukan waktu 24 jam dibandingkan dengan berhari-hari, atau berminggu-minggu.
Efisiensi pengolahan air dan limbah cair	
Melacak keberadaan virus enterik di lingkungan	
Pergerakan air pada air permukaan dan air tanah	
Feses	
Limbah rumah tangga	Kolofaga dalam contoh air diperiksa dengan penambahan contoh air pada agar lunak, atau
Patogen	

Melacak faga virus enterik pada contoh lingkungan cukup memerlukan waktu 24 jam dibandingkan dengan berhari-hari, atau berminggu-minggu.

Kolofaga dalam contoh air diperiksa dengan penambahan contoh air pada agar lunak, atau

lapisan atas bersama dengan biakan *E. coli* dalam fase pertumbuhan logaritma. Faga menempel pada sel bakteri dan melisis bakteri. Bakteri menghasilkan koloni pertumbuhan kecuali di area tempat faga telah tumbuh dan melisis bakteri. Area bening yang dihasilkan dikenal sebagai plak. Hamparan agar lunak digunakan untuk meningkatkan penyebaran fisik virus di antara sel bakteri.

Penggunaan bakteri inang dalam fase pertumbuhan logaritma bertujuan untuk mendapatkan pembentukan plak yang optimal. Juga, untuk memastikan bahwa semua faga menempel pada bakteri hidup dan dapat memperbanyak sel. Biasanya, biakan yang diinkubasi sehari sebelum pengujian diinkubasi ulang selama 2-3 jam dalam penangas air bergoyang pada suhu 35 – 37 °C sebelum digunakan.

7.3 Tata kerja

7.3.1 Bahan dan alat

- (1) Siapkan 1,0 mL contoh limbah cair yang dipastikan tidak mendapatkan disinfektan, atau contoh air yang mengandung kolifaga;
- (2) Biakan *E. coli* yang diinkubasi selama 3–4 jam dalam media Nutrient Broth sebelum pelaksanaan pemeriksaan;
- (3) Dua tabung reaksi yang berisi sembilan mililiter 2 Tris-buffered saline (Tris buffer, atau larutan garam penyangga lainnya);
- (4) Empat tabung yang masing-masing berisi tiga mililiter agar lunak (Nutrient Agar, atau Trypticase Soy 0,7%);
- (5) Empat cawan petri yang berisi agar (10–12 ml) Nutrient Agar, atau Trypticase Soy
- (6) 6 batang pipet 1-ml
- (7) Penghisap pipet
- (8) Penangas air 45–48 °C
- (9) Tisu kertas (lebar)
- (10) inkubator

7.3.2 Tahapan kerja mengisolasi faga

Tahapan kerja mengikuti Wally *et al.* (2021) yang disesuaikan sesuai kebutuhan.

- (1) Contoh limbah, atau air yang diperkirakan mengandung kolifaga disiapkan oleh praktikan sesuai arahan dari instruktur.
- (2) Contoh diencerkan 1 : 10 dan 1 : 100 dengan membuat pengenceran desimal dalam penyangga (buffer) Tris dengan cara memindahkan sebanyak 1,0 mL ke dalam sembilan mililiter penyangga Tris.
- (3) Lelehkan empat tabung agar lunak (agar 0,7% per tabung 3-ml) dengan menempatkannya dalam penangas air, atau otoklaf. Agar-agar ditempatkan dalam penangas air pada suhu 45-48 °C dan dibiarkan selama 15 menit agar suhu agar-agar menyesuaikan ke 45 °C.
- (4) Ke dalam tabung pertama ditambahkan satu mililiter biakan *E. coli* dalam kaldu fase logaritma dan satu mililiter contoh murni. Keluarkan tabung dari penangas air dan goyang perlahan di antara kedua tangan Anda untuk mencampur suspensi selama 2–3 detik. Keringkan air dari tabung dengan tisu kertas dan tuangkan agar-agar di atas cawan Petri yang berisi agar-agar bagian bawah. Putar cawan dengan cepat untuk menyebarkan agar bagian atas. Pastikan agar menutupi seluruh permukaan.
- (5) Ulangi Tahap 4 menggunakan satu mililiter biakan bakteri dan satu mililiter setiap pengenceran faga. Lihat Gambar 15.

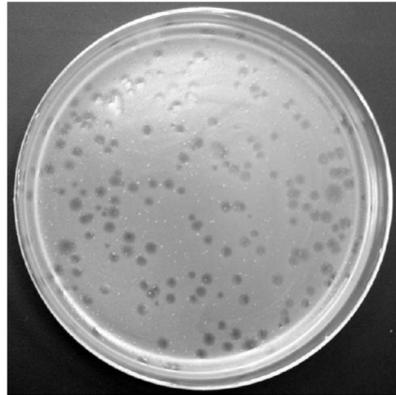


Gambar 14 Tahap kerja mengisolasi faga (Peper dan Gerba 2004, dengan penyesuaian)

- (6) Setelah agar memadat, inkubasi cawan pada suhu 37 °C selama 24 jam dalam posisi dibalik. Upayakan tidak ada tetesan uap air yang

jatuh di permukaan biakan, terutama pada plak karena akan menyebabkan penyebaran plak ke seluruh permukaan agar.

- (7) Hitung jumlah plak pada setiap pengenceran (Gambar 16) dan hitung kadar faga dalam contoh Anda.
- (8) Catat setiap perbedaan besar dalam ukuran atau tampilan plak.
- (9) Plak yang terbentuk dicongkel menggunakan öse suci hama dan dimasukkan ke tabung sentrifus yang berisi satu mililiter larutan PBS.



Gambar 16 Plak fag yang tumbuh di atas permukaan agar

(10) Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 3000 *rpm* selama 10 menit. Supernatan diambil dan disimpan dalam tabung dan ditambahkan sebanyak satu tetes klorofom per satu mililiter PBS.

(11) Tabung disimpan pada suhu empat derajat Celcius (Damayanti *et al.* 2016).

3.3 Tahapan uji bercak (*spot test*)

Uji bercak dilakukan untuk mengetahui kisaran inang faga yang telah diperoleh dengan cara pelapisan uji plak (Jatmiko *et al.*, 2018).

(1) Pengenceran faga dilakukan desimal terhadap

suspensi biakan *E. coli*.

- (2) Bakteri ditumbuhkan ke dalam 10 mL TSB cair kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C.
- (3) Sebanyak 500 µl biakan bakteri tersebut ditambahkan ke dalam media agar lunak Lysogeny Broth (LB) bersuhu sekitar 45 °C. Kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks dan selanjutnya dituang ke dalam cawan dan diikuti dengan penambahan 10 µl suspensi yang mengandung faga menggunakan pipet mikro dengan cara ditetaskan diatas agar lunak LB yang sudah mengering dan memadat.
- (4) Media didiamkan hingga kering dan memadat kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 6-24 jam.

7.4 Pustaka

Damayanti R, Jannah SN, Wijanarka, Wijanarka, Rahaju SH. 2016. Isolasi faga *Salmonella* spp. dari biofilm pada sistem air minum isi ulang. *Jurnal Akademika Biologi*. 5(2):59-67.

- Doore, SM., and Fane, BA. 2016. The microviridae: Diversity, assembly, and experimental evolution. *Virology*, 491: 45-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.020> 0042-6822
- [GFG] geeksforgeeks.org. 2022. Bacteriophage – Definition, Structure, Life Cycle, Importance. [Internet] Tersedia pada <https://www.geeksforgeeks.org/bacteriophage-definition-structure-life-cycle-importance/> [Disitasi pada 06 Desember 2022]
- Hatfull, GF., and Hendrix, RW. 2011. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol.*, 1(4): 298-303. doi: [10.1016/j.coviro.2011.06.009](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009)
- Jatmiko, YD., Purwanto, AP, dan Ardyati, T. 2018. Uji aktivitas bakteriofage litik dari limbah rumah tangga terhadap *Salmonella typhi*. *Jurnal Biodjati*. 3(2): 134-147. doi:10.15575/biodjati.v3i2.3471.
- Kasman, LM., and Porter, LD. 2022. Bacteriophages. [Internet] Tersedia pada <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/> [Disitasi pada 02 Desember 2022]
- Peper, IL., and Gerba, CP. 2004. *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 226 p.
- Simmonds, P., and Aiewsakun, P. 2018. Virus classification - where do you draw the line? *Arch Virol.*, 163(8): 2037-2046. doi: [10.1007/s00705-018-3938-z](https://doi.org/10.1007/s00705-018-3938-z)
- WALLY, AD., PRIBADI, ES., SETYANINGSIH, S. 2021. *Escherichia coli* specific bacteriophage isolated from various water sources in Central Bogor, Bogor City as an alternative antibiotic. *Jurnal Biologi Udayana*, 25(2): 183-188. Available at: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/view/67413>. Date accessed: 25 apr. 2022. doi: <https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2021.v25.i02.p10>.

LAPORAN PERCOBAAN #7

7.1 Jatidiri Kelompok

7.3.1 Kelompok :

7.3.2 Anggota kelompok : 7.1.2.1

7.1.2.2

7.1.2.3

7.1.2.4

7.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

7.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

7.3.1 Faktor apa saja yang mungkin menentukan ukuran plak?

7.3.2 Mengapa harus menggunakan biakan bakteri dalam fase pertumbuhan logaritma untuk pengujian ini?

7.3.3 Apa saja sumber kolifaga di lingkungan?

7.3.4 Mengapa kolifaga merupakan petunjuk potensial?

7.3.5 Bagaimana plak dihasilkan di koloni bakteri?

7.3.6 Jelaskan mengenai siklus dalam faga?

7.3.7 Galur lisogenik dikenal sebagai apa?

7.3.8 Tersusun dari apa genom bakteriofaga?

7.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh

Percobaan 8

PEMERIKSAAN JASAD RENIK DI TANAH MENGGUNAKAN CARA PAPAN GELAS SENTUH

8.1 Tujuan

Pengamatan jasad renik tanah secara mikrobiologik.

8.2 Teori

Tanah adalah bagian rapuh dari belahan bumi yang terbentuk karena faktor fisika dan kimia yang berbeda. Tekstur tanah berbeda tergantung dari kandungan batu, pasir dan debu-debunya. Persentase kandungan penyusunnya tersebut berpengaruh secara aktif terhadap keberadaan dan kelangsungan hidup jasad renik di tanah.

Jasad renik membutuhkan jumlah air dalam sel (air aktif, *water activity - a_w*) untuk melanjutkan kegiatan biologik dalam sel. Penyebaran dan kerapatan jasad reniknya akan tinggi pada tanah yang berat dibandingkan pada tanah yang ringan. Kandungan senyawa organik dan anorganik dalam tanah juga menjadi salah satu faktor utama yang mempengaruhi keberadaan dan kelangsungan hidup jasad-jasad renik tanah tersebut. Faktor-faktor yang mempengaruhi jenis dan penyebaran jasad renik di dalam tanah, diantaranya

- a. jenis tanah. Jenis, jumlah dan bentuk jasad renik tentu akan berbeda sesuai dengan susunan tanah. Tanah yang berat akan lebih kaya jasad renik dibanding tanah berpasir;
- b. cahaya. Sebagian besar jasad renik tanah lebih suka menghindari cahaya, kecuali alga yang lebih suka hidup di permukaan tanah, atau di dekatnya;
- c. sumber oksigen. Sebagian besar jasad renik tanah bersifat aerob yang mutlak membutuhkan oksigen. Tetapi, ada beberapa juga yang bersifat anaerob yang mutlak tidak membutuhkan oksigen. Tipe lain adalah fakultatif yang dapat tumbuh dengan ada, atau tidak adanya oksigen;
- d. kelembapan.
- e. suhu. Sebagian besar jasad renik tanah dapat hidup di semua jenis tanah. Namun, ada juga yang menyukai suhu rendah atau sedang. Ada juga jasad renik yang bisa hidup pada tanah dengan suhu tinggi dan kaya bahan organik;
- f. keasaman. Sebagian besar jasad renik tanah lebih menyukai pH netral walaupun ada beberapa diantaranya yang lebih suka hidup di tanah yang asam, atau basa;
- g. jenis dan banyaknya nutrisi. Jasad renik tanah bersifat parasit, predator, atau oportunistik.

Jenis-jenis jasad renik tanah dan sebarannya di dalam tanah:

1. Protista. Protista adalah jasad renik tanah yang primitif ditandai dengan evolusi yang buruk. Mereka berperan dalam perubahan biokimiawi yang memecah bahan organik menjadi logam aslinya.
2. Virus. Menyebar di dalam tanah, tetapi daya hidupnya (*viability*) dengan cepat menghilang karena tidak adanya inang di dalam tanah yang penting bagi kehidupannya.

3. Prokariota: Inti jasad renik kelompok ini tidak dikelilingi oleh membran inti, termasuk di dalam kelompok ini adalah bakteri. Perbanyakkan sel dilakukan dengan cara pembelahan sederhana (*binary fission*). Bentuk sel-selnya bisa berbentuk bulat (*coccus*), batang (*bacil*), atau spiral. Susunan sel bersifat menyendiri (*soliter*), atau berkelompok (*staphylo*), dan membentuk koloni.
4. Eukaryota: Inti sel berada di dalam membran inti. Bentuk sel bisa seragam (*unicellular*), atau sel beragam (*multicellular*). Penyebaran di dalam tanah sangat luas. Yang termasuk kelompok ini adalah kapang, khamir, alga dan protozoa.
5. Microphona. Jasad renik yang kecil dan termasuk primitif. Yang berada dalam kelompok ini diantaranya nematoda dan cacing pipih. Kebanyakan dari mereka bergantung pada jasad renik lain untuk mendapatkan nutrisi.

Kemampuan untuk melihat jasad renik tanah secara *in situ* sangat penting untuk meningkatkan pemahaman mengenai hubungan timbal balik antara jasad renik tanah dan partikel tanah. Salah satu cara untuk melihat keberadaan jasad renik di tanah telah dikembangkan pada tahun 1936. Cara ini diberi nama cara *slide sentuh* (*contact slide*), atau cara *slide terkubur* (*buried-slide technique*) (Rossi *et al.* 1936). Cara sederhana memeriksa secara kualitatif hubungan spasial antar jasad renik tanah. Cara ini dapat melihat beberapa bentuk bakteri, actinomycetes, kapang dan khamir melalui penggunaan mikroskop (Maier *et al.*, 2000).

Cara ini dilakukan dengan cara mengubur *slide* kaca di dalam tanah untuk jangka waktu tertentu. Penambahan nutrisi, seperti glukosa sebagai sumber karbon dan amonium nitrat sebagai sumber nitrogen, akan mendorong perbanyakkan cepat sel-sel jasad renik heterotrofik. Setelah mengeluarkan *slide* dari dalam tanah, *slide* difiksasi dengan asam asetat dan diwarnai untuk memberikan kontras agar jasad renik dapat dilihat menggunakan mikroskop. Melalui mikroskop, bakteri tanah, aktinomisetes, kapang, dan khamir dapat terlihat tumbuh pada partikel tanah, dalam koloni murni pada *slide*, dan dalam penjajaran satu sama lain. Seringkali sel bakteri melapisi hifa kapang/khamir. Pembentukan spora oleh actinomycetes, kapang, atau khamir juga dapat diamati.

8.3 Tata kerja

8.3.1 Tahap Pertama

8.3.1.1 Bahan dan alat

- Gelas *beaker*-500 mL untuk 300 g masing-masing dua contoh tanah
- Glukosa (secukupnya)
- 250 mg NH₄NO₃
- 2 cangkir polistiren-250 mL untuk masing-masing contoh tanah
- Kertas label dan pena
- Plastik pembungkus (*plastic wrap*)
- 3 Gelas objek untuk masing-masing contoh tanah
- Pita karet
- Kertas timbangan
- Air deionisasi dalam botol pencuci
- Timbangan analitik (± 0.01 g)
- Silinder berskala

8.3.1.2 Langkah kerja

- (1) Timbang 150 g dari setiap contoh tanah ke dalam dua gelas piala (*beaker*). Beri label satu gelas piala sebagai "PERLAKUAN" dan yang lainnya sebagai "PENGENDALI". Gunakan contoh tanah seberat 100 g yang mengandung bahan organik tinggi, karena kurang padat dibandingkan tanah mineral.
- (2) Hitung angka kelembapan contoh tanah. Ukur air suling sebanyak yang disesuaikan dengan angka kelembapan tanah dengan gelas ukur dan tambahkan ke masing-masing dua vial. Beri label satu vial dengan "PERLAKUAN" dan "PENGENDALI" untuk vial yang lainnya.
- (3) Tambah glukosa 1% (b/b tanah) dan 200 mg NH_4NO_3 ke dalam vial perlakuan. Aduk merata untuk menghilangkan endapan. Vial PENGENDALI tidak ditambah apapun.
- (4) Campurkan isi vial PERLAKUAN dan PENGENDALI ke dalam masing-masing gelas piala contoh tanah dalam dalam jumlah kecil, dan campur menggunakan spatula setelah terjadi penambahan kelembapan. Hindari pencampuran untuk tanah lempung bertekstur berat karena akan "mengenang" tanah.
- (5) Siapkan dua gelas objek untuk setiap gelas piala contoh tanah. Akan ada dua gelas objek untuk setiap gelas piala. Benamkan setiap gelas objek secara vertikal ke dalam gelas piala masing-masing. Sisakan kira-kira dua sentimeter dari setiap gelas objek yang menonjol di atas permukaan tanah (lihat Gambar 17). Lakukan pembenaman gelas objek dengan baik untuk



Gambar 17 Pembenaman gelas objek pada contoh tanah dalam gelas piala (Peper dan Gerba 2004 dengan penyesuaian)

menghindari gelas objek pecah.

- (6) Tutupi gelas piala dengan plastik penutup/pembungkus (*wrapping plastic*) dan kencangkan dengan karet gelang. Tusuk penutup/pembungkus beberapa kali dengan tusuk gigi untuk memungkinkan udara masuk dan mencegah penguapan air yang berlebihan. Timbang setiap gelas piala. Inkubasi gelas

piala berisi tanah pada suhu kamar (25-30 °C) selama satu minggu.

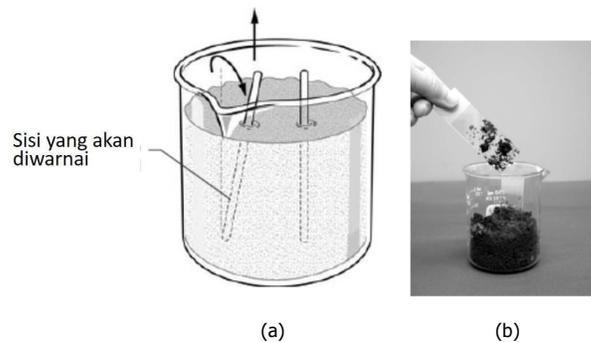
8.3.2 Tahap Kedua

8.3.2.1 Bahan dan alat

- Gelas berisi tanah yang diinkubasi pada Tahap I
- Asam asetat 40% (v/v)
- Pewarna Rose Bengal phenolic
- Rak dan baki pewarnaan
- Kaca mata pelindung (*protective goggles*)
- Mikroskop
- Minyak immersi
- Kertas tisu besar (*paper towels*)

8.3.2.2 Langkah kerja

- (1) Timbang kembali gelas berisi tanah dan hitung kelembapan tanah pada saat pemindahan gelas objek.
- (2) Keluarkan kedua gelas objek dari masing-masing tanah setelah diinkubasi selama tujuh hari dengan menekan setiap gelas



Gambar 18 Cara menekan dan mencabut gelas objek yang akan diwarnai (a) dan hasil pencabutan yang diharapkan (b) (Peper dan Gerba 2004 dengan penyesuaian)

objek ke posisi miring (Gambar 18a) dan tarik sedemikian rupa sehingga bagian atas gelas objek tidak terganggu (Gambar 18b). Tandai dan kenali sisi yang akan diwarnai.

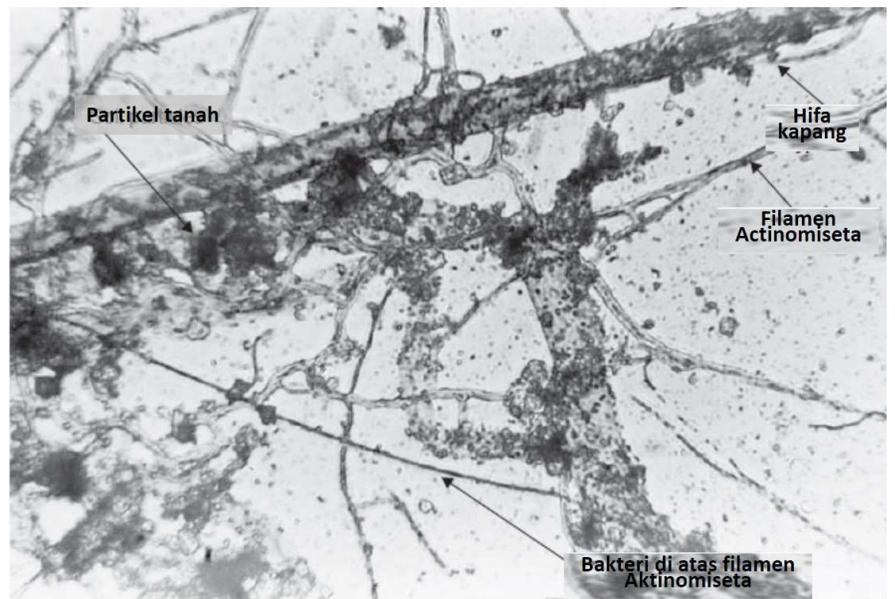
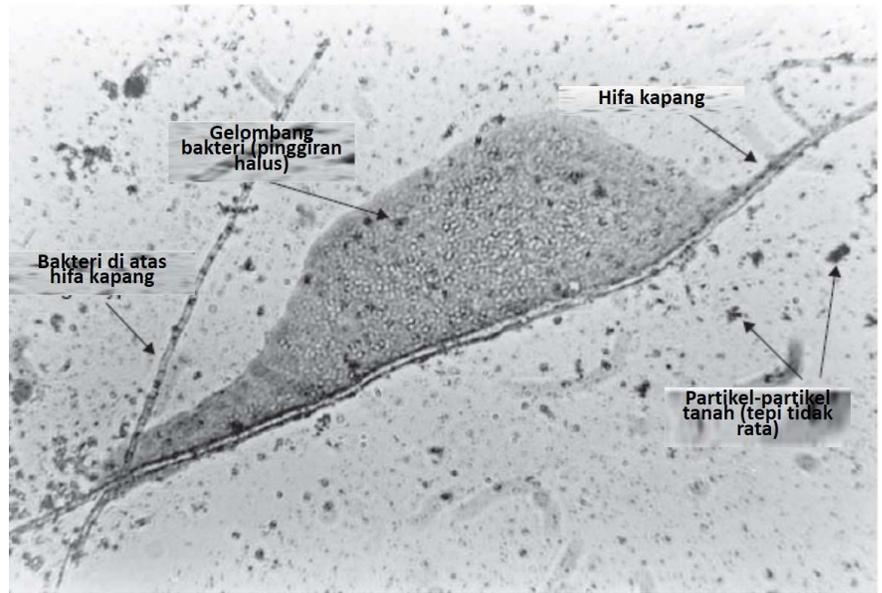
- (3) Ketuk gelas objek dengan lembut di bagian permukaan atas meja kerja yang dialasi dengan kertas pembersih (*paper towel*) untuk menghilangkan partikel tanah yang besar dari permukaan gelas objek. Bersihkan permukaan bawah dengan kertas pembersih basah dan keringkan gelas objek pada suhu kamar.

- (4) Sambil mengenakan kaca mata pelindung, rendam kaca objek dalam asam asetat 40% (v/v) selama 1–3 menit di dalam lemari asam (*fume hood*) dengan memegang kaca objek menggunakan penjepit.
- (5) Cuci kelebihan asam di bawah aliran air yang lembut menggunakan botol pencuci. Tutupi permukaan dengan pewarna Rose Bengal fenolik dari botol penetes. Kegiatan mewarnai harus dilakukan di atas rak pewarnaan di atas wadah/baskom untuk menampung kelebihan larutan pewarna. Berhati-hatilah untuk tidak mencuci dengan kekuatan sedemikian rupa yang menyebabkan sel-sel jasad renik lepas dari permukaan gelas objek.
- (6) Warnai selama 5–10 menit, dan hindari kaca objek menjadi kering. Tambahkan lebih banyak larutan pewarna sesuai kebutuhan.
- (7) Cuci gelas objek dengan lembut untuk menghilangkan larutan pewarna berlebih. Keringkan dan amati gelas objek secara mikroskopik menggunakan pembesaran objektif tinggi (100x) dan minyak imersi. Untuk membantu pengamatan, bandingkan dengan Gambar 19.

8.4 Pustaka

Maier, RM., Pepper, IL., and Gerba, CP. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego.

Rossi, G., Riccardo, S., Gesue, G., Stanganelli, M., and Wang, TK. 1936. Direct microscopic and bacteriological investigations of the soil. *Soil Science*, **41**, 52–66.



Gambar 19 Panduan pengamatan jasad renik yang tertangkap di gelas objek

LAPORAN PERCOBAAN #8

8.1 Jatidiri Kelompok

- 8.3.1 Kelompok :
- 8.3.2 Anggota kelompok : 8.1.2.1
- 8.1.2.2
- 8.1.2.3
- 8.1.2.4

8.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

8.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 8.3.1 Jelaskan gambaran ukuran dan bentuk sel bakteri, filamen dan spora jamur dan aktinomisetes!
- 8.3.2 Jelaskan perbedaan kualitatif populasi jasad renik tanah yang ditambah glukosa dan NH_4NO_3 dan yang tidak!
- 8.3.3 Apakah ada perbedaan kuantitatif kepadatan populasi jasad renik antara tanah yang ditambah glukosa dan NH_4NO_3 dan yang tidak?
- 8.3.4 Jelaskan perbedaan kapang/khamir dan actinomycetes?
- 8.3.5 Apakah ada persaingan ruang di tanah untuk perkembang-biakan antar jasad renik?
- 8.3.6 Faktor-faktor apa saja yang menjadi pembatas bagi pertumbuhan dan kegiatan jasad renik di dalam tanah?

8.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh

Percobaan 9

JASAD RENIK TANAH: BAKTERI, KAPANG, KHAMIR, DAN AKTINOMISETA

9.1 Tujuan

Untuk menghitung populasi, mengisolasi, mengamati, dan mengukur bakteri, kapang, khamir, dan aktinomisetata tanah, dan juga untuk menguji ketahanan bakteri terpilih terhadap antibiotika

9.2 Teori

Bakteri tanah memiliki peran besar dalam tanaman yang dihasilkan. Fungsi utama bakteri tanah adalah (1) menyediakan unsur hara bagi tanaman; (2) merangsang pertumbuhan tanaman, misalnya melalui hormon tanaman yang dihasilkannya; (3) mengendalikan, atau menghambat patogen tanaman; (4) memperbaiki struktur tanah; dan (5) bioakumulasi, atau pencucian jasad renik anorganik (Rawling 2005; Seifelnassr dan Abouzeid 2013; Das dan Gosh 2022). Saat ini, bakteri tanah juga telah digunakan untuk mineralisasi pencemar organik, yaitu bioremediasi tanah tercemar (Ahemad 2019; Oubohssaine *et al.* 2022; Suryatmana *et al.* 2022). Hubungan tanaman-jasad renik di rizosfer memainkan peran penting dalam perubahan, mobilisasi, pelarutan, dan sebagainya, nutrisi dari kumpulan nutrisi yang terbatas, dan penyerapan nutrisi penting oleh tanaman untuk mewujudkan genetik penuh mereka.

Jasad-jasad renik yang ada di tanah juga berperan sebagai penyebab penyakit pada manusia dan hewan, misalnya anthrax, dermatofita, dan sebagainya. Vektor pembawa jasad renik patogen banyak terdapat di tanah (Steffan *et al.* 2020). Permasalahan jasad-jasad renik yang tahan terhadap antijasad renik (*antimicrobial resistance*, AMR) menjadi masalah paling serius yang mempengaruhi kesehatan manusia dan hewan. Lingkungan menjadi faktor penting penyebaran AMR (CDC 2018; Collignon *et al.* 2018; Graham *et al.* 2019; Osbiston *et al.* 2020). Walaupun di sebagian besar negara maju, seperti Uni Eropa, penggunaan antibiotika sebagai pemacu (promotor) pertumbuhan (*antibiotic growth promoters*, AGP) telah dilarang, tidak demikian yang terjadi di Indonesia. AGP masih belum dapat dihilangkan dalam industri pakan ternak unggas. Secara global, penggunaan antibiotika dalam pertanian masih menjadi faktor utama pelepasannya dalam jumlah besar ke ekosistem lokal (Palma *et al.* 2020; Lees *et al.* 2021). Sejumlah kegiatan bidang pertanian, seperti pembangunan irigasi air limbah kota (Szczebanowski *et al.* 2009), penggunaan biosolid (Topp *et al.* 2008) dan penggunaan pupuk kandang (Zhang *et al.* 2016) di tanah pertanian, dapat berkontribusi pada penyebaran bakteri resisten antibiotik (*antibiotic resistance bacteria*, ARB) dan gen resistensi antibiotika (*antibiotic resistance genes*, ARG) di tanah. Penggunaan antibiotika untuk pencegahan dan terapi dalam peternakan telah terbukti mendorong terjadinya peningkatan AMR melalui penyimpanan kotoran dan penggunaan padatan kotoran, atau air limbah sebagai pupuk tanah (Chantziaras *et al.* 2014; Wolters *et al.* 2015; Palma *et al.* 2020; Pokharel *et al.* 2020; Kompouris *et al.* 2021; Hembach *et al.* 2022; Ting *et al.* 2021). Penggunaan antibiotika dalam jumlah besar dalam industri peternakan menyebabkan meningkatnya prevalensi ARB dan ARG. (Manyi-Loh *et al.* 2018; Kraemer *et al.* 2019; He *et al.* 2020; Sabri *et al.* 2020; Zalewska *et al.* 2021; Stanton *et al.* 2022). AMR mungkin saja merupakan fenomena alam yang terjadi

sebelum antibiotika digunakan untuk penggunaan klinis (Annunziato 2019; Dhingra *et al.* 2020; Uddin *et al.* 2021; Grenni 2022). Penggunaan AGP memicu pelepasan gen-gen yang tahan terhadap antibiotika (ARG) ke lingkungan. Pelepasan ARG dan ARG sudah dianggap sebagai pencemar lingkungan yang dapat terjadi melalui penggunaan pupuk kandang. Sumber utama pencemaran ARG adalah feses dan kotoran hewan (Yang *et al.* 2014; Xie *et al.* 2019; Caracciolo *et al.* 2020; Checcucci *et al.* 2020; Gu *et al.* 2020; He *et al.* 2020; Ondon *et al.* 2021; Yue *et al.* 2021; Li *et al.* 2022; Wang *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2022).

9.3 Tata kerja

9.3.1 Penyiapan contoh tanah

9.3.1.1 Bahan dan alat

- 25 g contoh tanah dari berbagai tipe/tempat (satu krlo, dua jenis tanah)
- Timbangan ($\pm 0,01$ g)
- Piring timbangan
- Air suling
- Plastik penutup (*wrapping plastic*)
- Karet (gelang)
- Pena
- Perangkat bedah

9.3.1.2 Tahap kerja

- (1) Timbang contoh tanah seberat 25 g dari setiap tanah dan tempatkan ke dalam gelas plastik berlabel. Tambahkan air suling (deionisasi) agar memiliki kadar air yang dapat mendorong pertumbuhan jasad renik tanah. Tutup gelas contoh dengan bungkus plastik untuk mengurangi kehilangan kelembapan, dan kencangkan dengan karet gelang. Buat beberapa lubang kecil menggunakan alat tusuk untuk menjaga suasana aerob tanpa kehilangan kelembapan yang berlebihan.
- (2) Timbang contoh tanah dalam gelas dengan bungkus plastik dan karet gelang dan catat bobotnya. Inkubasi contoh tanah pada suhu kamar selama satu minggu.

9.3.2 Menghitung dan mengisolasi jasad renik tanah

Ada dua cara yang dapat digunakan untuk menghitung dan mengisolasi jasad renik tanah, yakni (i) cara pelat sebar dan (ii) cara tuang

9.3.2.1 Cara penyebaran

Cara pelat sebar dilakukan dengan penyebaran contoh yang diencerkan secara desimal merata di atas pelat agar. Cara ini menghasilkan koloni yang terbentuk di permukaan agar dan dihitung.

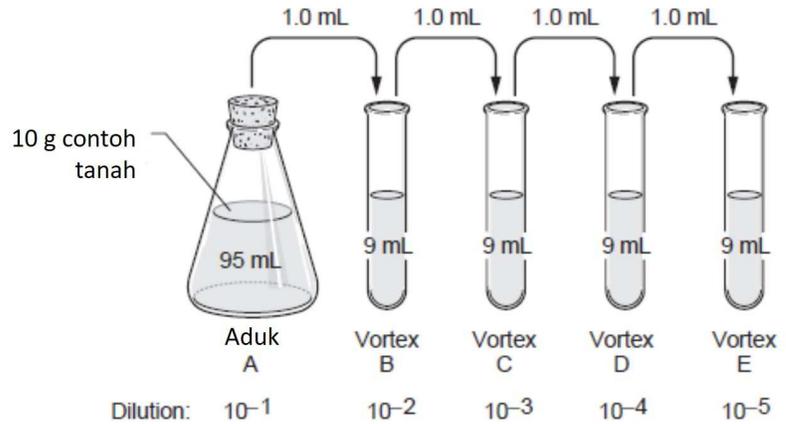
9.3.2.1.1 Bahan dan alat

- Nutrient Agar, untuk menghitung dan mengisolasi bakteri
- Sabouraud Dextrose Agar, untuk menghitung dan mengisolasi kapang dan khamir
- Media gliserol-kasein, untuk menghitung Actinomycetes. Actinomycetes yang diisolasi dalam cawan dicirikan dalam bentuk kering dan berdebu atau berkapur. Koloni juga ditandai dengan bau khas yang mirip dengan bau tanah setelah hujan
- Air pepton, NaCl 0,9%, air suling
- Tabung Erlenmeyer
- Tabung reaksi – 15 ml
- Gabus penutup
- Timbangan (± 0.01 g)
- 9 peptone-yeast agar per jenis tanah
- 9 glycerol-casein agar yang diimbuhi sikloheksimida per jenis tanah
- 10 pipet-1 ml suci hama untuk masing-masing jenis tanah
- Karet penghisap pipet
- Rak tabung uji
- Batang gelas bentuk huruf L
- Alkohol ethyl
- Vortex
- Pembakar bunsen

9.3.2.1.2 Tahap kerja

- (1) Timbang kembali masing-masing contoh tanah termasuk penutup plastik pembungkusnya, untuk memungkinkan perhitungan kadar air tanah pada saat pelapisan.

- (2) Siapkan seri pengenceran desimal dari masing-masing tanah. Satu seri pengenceran desimal disajikan dalam Gambar 20. Media pengenceran



Gambar 20 Cara pengenceran desimal

yang digunakan adalah air pepton, NaCl 0,9%, atau air suling.

- (3) Untuk setiap contoh tanah, timbang 10 g contoh tanah dan campurkan ke 95 mL pengencer dalam tabung Erlenmyer. Kocok suspensi dengan baik.
- (4) Sebelum contoh mengendap ke dasar tabung, ambil 1 mililiter suspensi dengan pipet suci hama dan campurkan ke 9 ml pengencer dalam tabung reaksi. Aduk hingga homogen menggunakan vortex.
- (5) Ulangi langkah sebelumnya tiga kali, setiap kali dengan blanko air 9 ml baru dan pipet suci hama. Jumlah pengenceran yang diinginkan adalah sampai menghasilkan pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, dan 10⁻⁵ g tanah per mL (tabung A sampai E).

Untuk bakteri, kapang, dan khamir

- (6) Siapkan tiga cawan petri berisi Nutrient Agar dan tiga cawan petri berisi Sabouraud Dextrose Agar untuk setiap pengenceran 10⁻³, 10⁻⁴, dan 10⁻⁵, sebagai berikut.
- (7) Setelah dihomogenkan menggunakan vorteks, ambil masing-masing 0,1 ml setiap pengenceran

(ini akan meningkatkan pengenceran efektif Anda sepuluh kali lipat) dan teteskan habis pada satu titik ke masing-masing agar terpisah. (Jangan terlalu lama sejak meneteskan contoh ke atas permukaan agar ke tahap berikutnya karena menyebabkan terlalu banyak cairan terserap ke dalam agar di satu titik).

- (8) Siapkan batang gelas berbentuk huruf L. Celupkan batang gelas ke dalam ethanol dan bakar menggunakan pembakar Bunsen selama waktu yang diperkirakan ethanol di batang gelas habis.
- (9) Pindahkan batang gelas dari nyala api dan diamkan sejenak di dekat cawan hingga batang gelas dinilai dingin. Sentuhkan batang gelas penyebar ke atas permukaan agar jauh dari titik contoh untuk meyakinkan bahwa batang gelas sudah dingin. Sebarkan tetesan contoh ke seluruh permukaan agar sampai semua sisa cairan bebas hilang (permukaan akan menjadi agak lengket).
- (10) Tempatkan kembali tutupnya. Panaskan kembali batang gelas penyebar dan ulangi pada cawan-cawan petri berikutnya. Upayakan bekerja dengan cepat untuk mengurangi pencemaran permukaan agar oleh jasad-jasad renik yang terbawa udara.
- (11) Inkubasi cawan dengan posisi terbalik pada suhu ruang selama satu minggu.
- (12) Setelah masa inkubasi dicapai, periksa semua cawan petri bakteri, kapang dan khamir dengan hati-hati! Perhatikan perbedaan ukuran dan bentuk koloni!
- (13) Hitung jumlah total koloni bakteri (*colony forming unit*, CFU) untuk setiap cawan! Cara menghitung dapat dirujuk dari contoh di bawah. Hitung angka rerata total untuk setiap pengenceran! Hitung koloni pada cawan yang diperkirakan ada 30-300 koloni bakteri per cawan dan 25-200 koloni kapang/khamir per cawan!
- (14) Hitung rerata CFU per gram contoh tanah kering untuk setiap jenis contoh tanah! Juga, hitung simpangan baku (*standard deviation*) dan koefisien keragamannya!

Untuk aktinomiset

- (15) Gunakan pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} dari atas. Sebarkan 0,1 mL contoh tanah yang telah dihomogenkan menggunakan vortex pada pelat

gliserol-kasein. Lakukan tiga ulangan untuk setiap pengenceran.

- (16) Inkubasi cawan dalam posisi terbalik pada suhu kamar selama dua minggu.
- (17) Periksa semua cawan aktinomiseta dengan hati-hati setelah masa inkubasi dicapai! Perhatikan perbedaan ukuran dan bentuk koloni!

PERHITUNGAN PENGECERAN DAN HASIL BIAKAN

10 g contoh tanah dengan kelembapan 20% pada berat kering dianalisis untuk menghitung bakteri yang tumbuh melalui cara pengenceran dan pembiakan. Pengenceran dibuatkan dengan cara:

10 g tanah → 95 ml larutan pengencer (Larutan A) 10^{-1} (berat/volume)

1 mL Larutan A → 9 mL larutan garam (Larutan B) 10^{-2} (volume/volume)

1 mL Larutan B → 9 mL larutan garam (Larutan C) 10^{-3} (volume/volume)

1 mL Larutan C → 9 mL larutan garam (Larutan D) 10^{-4} (volume/volume)

1 mL Larutan D → 9 mL larutan garam (Larutan E) 10^{-5} (volume/volume)

1 mL Larutan E dimasukkan ke media yang sesuai. Misalnya didapati pertumbuhan 200 koloni pada tabung pengenceran 10^{-5} . Angka CFU dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\begin{aligned}\text{Angka CFU} &= \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \times \text{Jumlah koloni} \\ &= \frac{1}{10^{-5}} \times 200 \text{CFU/g tanah basah} \\ &= 2,00 \times 10^7 \text{CFU/g tanah basah}\end{aligned}$$

Tapi, untuk 10 g tanah basah,

$$\text{Kandungan kelembapan} = \frac{\text{berat basah} - \text{berat kering (D)}}{\text{berat kering (D)}}$$

Karena,

$$0,20 = \frac{10 - D}{D} \quad \text{dan}$$

$$D = 8,33 \text{ g}$$

$$\text{Nilai CFU per g tanah kering} = 2,00 \times 10^7 \times \frac{1}{8,33} = 2,4 \times 10^7$$

(18) Hitung jumlah total koloni aktinomiset (CFU) untuk setiap cawan, tanpa menghitung koloni yang diduga koloni bakteri! Hitung rerata total untuk setiap pengenceran! Cawan yang dihitung adalah cawan dengan pertumbuhan 30-300 koloni per cawan.

(19) Hitung rerata CFU aktinomiset per gram contoh tanah kering untuk setiap jenis contoh tanah! Juga,

hitung simpangan baku (*standard deviation*) dan koefisien keragamannya!

Rerata contoh dapat dihitung menggunakan rumus

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

\bar{y} = rerata contoh

i = indeks

y_i = data ke- i

n = banyaknya data dalam perhitungan

Rumus untuk menghitung simpangan baku (*standard deviation*) data

$$s_y = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

s_y = simpangan baku contoh

i = indeks

\bar{y} = rerata contoh

y_i = data ke- i

n = banyaknya data dalam perhitungan

Rumus menghitung koefisien keragaman

$$CV = \frac{s_y}{\bar{y}} \times 100$$

CV = koefisien keragaman

s_y = simpangan baku contoh

\bar{y} = rerata contoh

9.3.2.2 Cara tuang

Cara ini dilakukan dengan menempatkan satu milliliter suspensi contoh tanah yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam cawan petri suci hama. Kemudian agar-agar yang masih dalam bentuk cair dan siap beku dituangkan dan dicampur dengan contoh. Cara ini menghasilkan koloni yang terbentuk di seluruh permukaan agar dan juga di dalam agar.

9.3.2.2.1 Bahan dan alat

- Nutrient Agar, untuk menghitung dan mengisolasi bakteri
- Sabouraud Dextrose Agar, untuk menghitung dan mengisolasi kapang dan khamir
- Media gliserol-kasein, untuk menghitung Actinomycetes. Actinomycetes yang diisolasi dalam cawan dicirikan dalam bentuk kering dan berdebu atau berkapur. Koloni juga ditandai dengan bau khas yang mirip dengan bau tanah setelah hujan
- 9 peptone-yeast agar per jenis tanah
- 9 glycerol-casein agar yang diimbuhi sikloheksimida per jenis tanah
- 10 pipet-1 mL suci hama untuk masing-masing jenis tanah
- Karet penghisap pipet
- Pembakar bunsen

9.3.2.2.2 Tahap kerja

- (1) Masukkan media agar-agar ke dalam penangas air dengan suhu 45 °C untuk dicairkan!
- (2) Pindahkan 1 mL dari pengenceran desimal terakhir ke cawan petri suci hama.
- (3) Ambil agar-agar dari penangas air dan tuang agar-agar ke cawan petri yang telah berisi suspensi contoh tanah. Lakukan perataan suspensi contoh tanah dengan menggerakkan cawan berisi media dan suspensi contoh tanah dengan gerakan angka 8.
- (4) Jika perataan dinilai cukup, biarkan cawan petri untuk memadatkan agar.
- (5) Inkubasi cawan pada suhu 37 °C selama 24 jam.

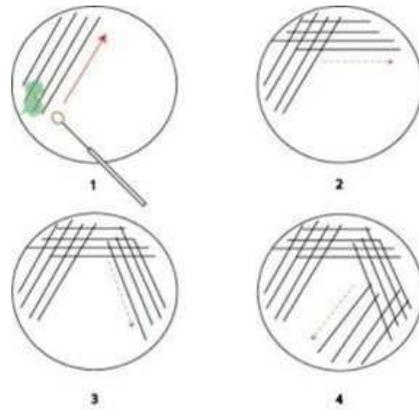
9.3.2.3 Isolasi biakan murni

9.3.2.3.1 Bahan dan alat

- Cawan petri
- Tabung uji-15 ml
- Öse
- Pembakar Bunsen
- Inkubator
- Vortex
- Mikroskop
- Rak dan baki pewarnaan
- Perangkat pewarnaan Gram
- NaCl 0,9%, air suling, atau air pepton
- Nutrient Agar

9.3.2.3.2 Tahap kerja

- (1) Pilih lima koloni bakteri yang terpisah dari salah satu cawan, terutama dari pengenceran tertinggi (10^{-5}) dari masing-masing contoh tanah! Pastikan koloni yang dipilih adalah koloni berbeda yang dilihat dari ciri koloni.
- (2) Pindahkan sedikit koloni terpisah ke agar miring Nutrient Agar menggunakan ose secara aseptik.
- (3) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- (4) Jika tidak menemukan koloni yang terpisah, atau mendapatkan koloni yang menumpuk, ambil sedikit dari koloni tersebut menggunakan ose secara aseptik dan masukkan ke tabung uji suci hama yang berisi NaCl 0,9%, air suling, atau air pepton untuk dijadikan suspensi bakteri.
- (5) Aduk secara merata menggunakan vortex.
- (6) Sebelum terbentuk endapan, ambil sedikit bagian suspensi bakteri menggunakan ose secara aseptik dan goreskan ke media agar datar Nutrient Agar mengikuti cara yang disajikan dalam Gambar 21.



Gambar 21 Cara penggoresan untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Ose harus dipanaskan/disuci-hamakan di setiap tahapan sebelum melakukan tahap goresan berikutnya (CSIRO 2022)

- (7) Inkubasi cawan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- (8) Setelah masa inkubasi dicapai, catat ciri-ciri koloni yang tumbuh.

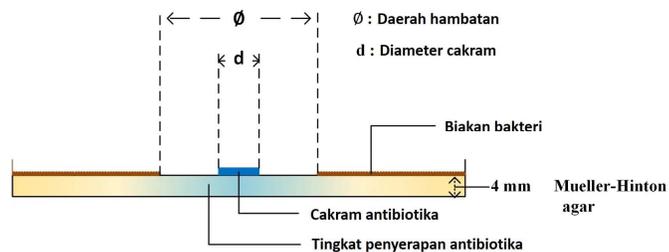
- (9) Lakukan pewarnaan Gram untuk setiap koloni bakteri yang tumbuh dengan tata kerja pewarnaan di bawah

Perwarnaan Gram

1. Siapkan gelas objek yang bersih dan bebas lemak.
2. Buat apusan suspensi pada kaca objek bersih menggunakan satu ose penuh suspensi.
3. Keringkan diudara dan terakhir menggunakan pemanas bunsen
4. Teteskan pewarna kristal violet sehingga apusan tertutup zat warna dan biarkan selama sekitar satu menit. Bilas dengan air.
5. Teteskan pewarna garam yodium selama 1 menit dan cuci dengan air.
6. Kemudian cuci dengan alkohol 95%, atau aseton selama sekitar 10-20 detik dan bilas dengan air.
7. Teteskan pewarna safranin selama sekitar 1 menit dan cuci dengan air.
8. Keringkan diudara, atau menggunakan kertas penyerap (jangan menggunakan kertas pembersih untuk menghindari bagian tisu melekat ke apusan)
9. Amati menggunakan mikroskop pada pembesaran 100x dan minyak emersi.

9.3.2.4 Uji antibiogram/Uji kepekaan terhadap antibiotika

Inokulum bakteri yang disesuaikan dengan suspensi baku (menggunakan suspensi 0,5 McFarland) dioleskan ke permukaan cawan agar Mueller-Hinton (MH). Cakram antibiotika komersil, atau cakram kertas saring yang diresapi dengan antijasad renik ditempatkan pada koloni di permukaan agar seperti yang



Gambar 22 Skema uji antibiogram/uji kepekaan terhadap antibiotika

diperlihatkan dalam Gambar 22 dan 23. Setelah inkubasi semalaman, diameter zona hambatan diukur di sekeliling masing-masing cakram. Dengan mengacu pada tabel acuan dari Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), atau European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), akan diperoleh hasil kualitatif peka (*sensitive*, S), menengah (*intermediate*, I), atau tahan (*resistant*, R). Gambaran hasil disajikan dalam Gambar 24. Cara kerja yang disampaikan adalah cara Kirby-Bauer *disc diffusion test*

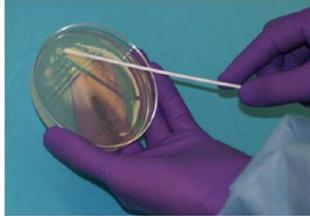
9.3.2.4.1 Bahan dan alat

- Cawan petri
- Batang gelas berbentuk huruf L
- Pinset
- Pemanas Bunsen
- Cakram antibiotika
- Penggaris
- Media Mueller-Hinton Agar
- NaCl 0,9%
- Suspensi McFarland 0,5 (yang diperkirakan mengandung 10^8 sel bakterin)

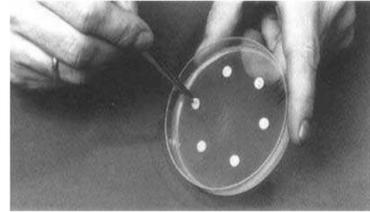
9.3.2.4.2 Tahap kerja

- (1) Siapkan media Mueller-Hinton Agar dan simpan di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 15 menit hingga dipastikan permukaan media dalam keadaan kering.
- (2) Gunakan öse untuk mengambil sedikit koloni lima bakteri terpilih secara bergantian dan masukkan ke dalam tabung uji yang berisi 2 mL NaCl 0,9% sebagai suspensi bakteri.
- (3) Aduk merata suspensi menggunakan vortex. Bandingkan kekeruhannya terhadap suspensi McFarland 0,5. Samakan kekeruhannya antara suspensi bakteri dan McFarland 0,5.
- (4) Dalam waktu tidak lebih dari 15 menit setelah penyesuaian kekeruhan dengan suspensi McFarland 0,5, celupkan kapas bergagang suci hama ke dalam suspensi bakteri dan apuskan secara merata ke seluruh permukaan media Mueller-Hinton Agar dalam cawa petri seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 23(a).

- (5) Letakkan beberapa cakram antibiotika komersil, atau cakram yang dicelupkan dalam suspensi antibiotika terukur seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 23(b). Penempatan cakram paling banyak enam cakram.



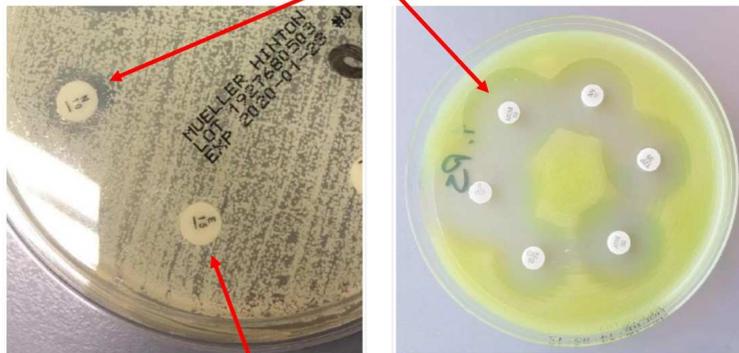
(a)



(b)

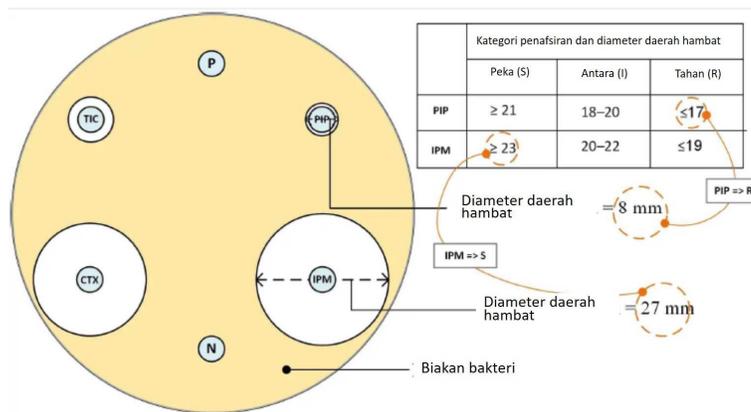
Gambar 23 Apusan kapas bergagang yang telah dicelupkan ke suspensi bakteri ke atas permukaan media (a) dan penempatan cakram antibiotika di atas permukaan media (b) (Hudzicki 2009; microbiologie-clinique.com. 2022)

Cakram dengan daerah hambatan

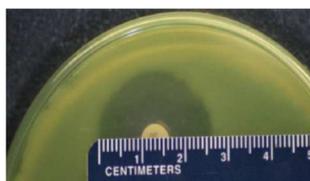


Cakram yang tidak menghasilkan daerah hambatan

(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 24 Contoh Hasil uji antibiogram (Hudzicki 2009; microbiologie-clinique.com. 2022)

(6) Inkubasi cawan pada suhu 37 °C selama 16-18 jam.

- (7) Setelah masa inkubasi dicapai, lakukan pengamatan adanya daerah hambat pertumbuhan bakteri di sekitar cakram antibiotika seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 24(a).
- (8) Ukur diameter daerah hambat menggunakan penggaris dan bandingkan hasilnya dengan daerah hambat baku dari Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Penafsiran dan cara pengukuran daerah hambat diperlihatkan dalam Gambar 24(b-d).

9.4 Pustaka

- Ahemad, M. 2019. Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. *Arab. J. Chem.*, 12(7): 1365-1377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.020>
- Annunziato, G. 2019. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. *Int J Mol Sci*, 20(23): 5844. doi:10.3390/ijms20235844
- Caracciolo, AB., Visca, A., Massini, G., Patrolecco, L., Miritana, VM., Grenni, P. 2020. Environmental Fate of Antibiotics and Resistance Genes in Livestock Waste and Digestate from Biogas Plants. *Environ Sci, Pollut Res Management*, 2020(01). DOI: 10.37722/ESPRAM.20201
- [CDC] US Centers for Disease Control and Prevention. 2018. *Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges*. [Internet] Tersedia pada <https://wellcome.ac.uk/sites/default/files/antimicrobial-resistance-environment-report.pdf> [Disitasi pada 27 Desember 2022]
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B, Dewulf, J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries, *J Antimicrob Chem*, 69(3): 827–834. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt443>
- Checucci, A., Trevisi, P., Luise, D., Modesto, M., Blasioli, S., Braschi, I., Mattarelli, P. 2020. Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. *Front. Microbiol*, 11: 1416. doi: 10.3389/fmicb.2020.01416
- Collignon, P., Beggs, JJ., Walsh, TR., Gandra, S., Laxminarayan, R. 2018. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet Health*, 2(9): e398-e405. doi:10.1016/S2542-5196(18)30186-4
- [CSIRO] The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. 2022. ANACC Methods and Materials: Streak plating. [Internet] Tersedia pada <https://research.csiro.au/anaccmethods/culture-handling/microbial-isolation-techniques/streak-plating-2/> [Disitasi pada 29 Desember 2022]

- Das, AP., Ghosh, S. 2022. Role of Microorganisms in Extenuation of Mining and Industrial Wastes. *Geomicrobiology J.*, 39: 3-5. 173-175, DOI: 10.1080/01490451.2022.2038953
- Dhingra, S., Rahman, NAA., Peile, E., Rahman, M., Sartelli, M., Hassali, MA., Islam, T., Islam, S., Haque, M. 2020. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Front. Public Health*, 8: 535668. doi: 10.3389/fpubh.2020.535668
- Graham, DW., Giesen, MJ., Bunce, JT. 2019. Strategic Approach for Prioritising Local and Regional Sanitation Interventions for Reducing Global Antibiotic Resistance. *Water*, 11(1):27. <https://doi.org/10.3390/w11010027>
- Grenni, P. 2022. Antimicrobial Resistance in Rivers: A Review of the Genes Detected and New Challenges. *Environ Toxicol Chem*, 41: 687-714. <https://doi.org/10.1002/etc.5289>
- Gu, Y., Shen, S., Han, B., Tian, X., Yang, F., Zhang, K. 2020. Family livestock waste: An ignored pollutant resource of antibiotic resistance genes. *Ecotoxicol Environ Safety*, 197: 110567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110567>.
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., Alvarez, PJJ. 2020. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water*, 3: 4. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>
- Hembach, N., Bierbaum, G., Schreiber, C., Schwartz, T. 2022. Facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes in swine livestock manure and clinical wastewater: A molecular biology comparison. *Environ. Pollut.*, 313:120128. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120128>
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer disc diffusion susceptibility test protocol. [Internet] Tersedia pada <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf> [Disitasi pada 30 Desember 2022]
- Kampouris, ID., Klümper, U., Agrawal, S., Orschler, L., Cacace, D., Kunze, S., Berendonk, TU. 2021. Treated wastewater irrigation promotes the spread of antibiotic resistance into subsoil pore-water. *Environ Int*, 146: 106190. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106190>
- Kraemer, SA., Ramachandran, A., Perron, GG. 2019. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*, 7(6): 180. doi:10.3390/microorganisms7060180
- Lees, P., Pelligand, L., Giraud, E., Toutain, PL. 2021. A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. *J Vet Pharmacol Therap*, 44(2): 137-171. DOI: 10.1111/jvp.12895
- Li, Z., Chen, C., Zhang, K., Zhang, Z., Zhao, R., Han, B. Yang, F., Ding, Y. 2022. Response of Antibiotic Resistance Genes and Related Microorganisms to Arsenic during Vermicomposting of Cow Dung. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19: 14475. <https://doi.org/10.3390/ijerph192114475>

- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., Okoh, A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 23(4): 795. doi:10.3390/molecules23040795
- microbiologie-clinique.com. 2022. Kirby-Bauer disc diffusion susceptibility test. [Internet] Tersedia pada <https://microbiologie-clinique.com/antibiotic-susceptibility-testing.html> [Disitasi pada 30 Desember 2022]
- Ondon, BS., Li, S., Zhou, Q., Li, F. 2021. Sources of Antibiotic Resistant Bacteria (ARB) and Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in the Soil: A Review of the Spreading Mechanism and Human Health Risks. *Rev Environ Contam Toxicol*, 256: 121–153. https://doi.org/10.1007/398_2020_60
- Osbiston, K., Oxbrough, A., Fernández-Martínez, LT. 2020. Antibiotic resistance levels in soils from urban and rural land uses in Great Britain. *Access Microbiol*, 3(1): acmi000181. doi:10.1099/acmi.0.000181
- Oubohssaine, M.; Sbabou, L.; Aurag, J. 2022. Native Heavy Metal-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria Improves *Sulla spinosissima* (L.) Growth in Post-Mining Contaminated Soils. *Microorganisms*, 10: 838. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050838>
- Palma, E., Tilocca, B., Roncada, P. 2020. Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914>
- Palma, E., Tilocca, B., Roncada, P. 2020. Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. *Int J Mol Sci*, 21(6): 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914>
- Pokharel, S., Shrestha, P., Adhikari, B. 2020. Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement 'One Health' approach. *Antimicrob Resist Infect Control*, 9: 181. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00847-x>
- Rawlings, DE. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact*, 4: 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-13>
- Sabri, NA., Schmitt, H., der Zaan, BV., Gerritsen, HW., Zuidema, T., Rijnaarts, HHM., Langenhoff, AAM. 2020. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *J Environ Chem Eng*, 8(1): 102245. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>
- Seifelnassr, AAS., Abouzeid, A-ZM. 2013. Exploitation of Bacterial Activities in Mineral Industry and Environmental Preservation: An Overview. *J. Mining*, 2013: 507168. <https://doi.org/10.1155/2013/507168>
- Stanton, IC., Bethel, A., Leonard, AFC., Gaze, WH., Garside, R. 2022. Existing evidence on antibiotic resistance exposure and transmission to humans from the environment: a systematic map. *Environ Evid* 11: 8. <https://doi.org/10.1186/s13750-022-00262-2>

- Steffan, J.J., Derby, J.A., Brevik, E.C. 2020. Soil pathogens that may potentially cause pandemics, including severe acute respiratory syndrome (SARS) coronaviruses. *Curr Opin Environ Sci Health*, 17: 35-40. doi:10.1016/j.coesh.2020.08.005
- Suryatmana, P., Setiawati, M., Herdiyantoro, D., Fitriatin, B., Kamaluddin, N. 2022. Characterization and Potential of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Isolates Capacity Correlating with Their Hydrocarbon Biodegradation Capability. *AGRIVITA*, 44(3): 559-574. doi:<https://doi.org/10.17503/agrivita.v41i0.3773>
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K-H., Guetzkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlueter, A. 2009. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*, 155: 2306-2319. <https://pub.uni-bielefeld.de/record/1591546>
- Ting, S., Pereira, A., Alves, AdJ., Fernandes, S., Soares, CdC., Soares, FJ., Henrique, OdC., Davis, S., Yan, J., Francis, JR., Barnes, TS., Jong, JBdC. 2021. Antimicrobial Use in Animals in Timor-Leste Based on Veterinary Antimicrobial Imports between 2016 and 2019. *Antibiotics* 10: 426. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040426>
- Topp, E., Monteiro, SC., Beck, A., Coelho, BB., Boxall, AB., Duenk, PW., Kleywegt, S., Lapen, DR., Payne, M., Sabourin, L., Li, H., Metcalfe, CD. 2008. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. *Scie Tot Environ*, 396(1): 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.011>
- Uddin, TM., Chakraborty, AJ., Khusro, A., Zidan, BMRM., Mitra, S., Emran, Tb., Dhama, K., Ripon, MKH., Gajdács, M, Sahibzada, MUK., Hossain, MJ., Koirala, N. 2021. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Publ Health*, 14(12): 1750-1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.
- Wang, Y., Shetty, BD., Kuppu, S., Pandey, PK. 2022. Animal waste antibiotic residues and resistance genes: A review. *Open Agriculture*, 7(1): 688-710. <https://doi.org/10.1515/opag-2022-0129>
- Wolters, B., Kyselková, M., Krögerrecklenfort, E., Kreuzig, R., Smalla, K. 2015. Transferable antibiotic resistance plasmids from biogas plant digestates often belong to the IncP-1ε subgroup. *Front Microbiol*, 5: 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00765
- Xie, S., Wu, N., Tian, J., Liu, X., Wu, S., Mo, Q., Lu, S. 2019. Review on the removal of antibiotic resistance genes from livestock manure by composting. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 237: 052010. doi:10.1088/1755-1315/237/5/052010
- Yang, Q., Ren, S., Niu, T., Guo, Y., Qi, S., Han, X., Liu, D., Pan, F. 2014. Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables. *Environ Sci Pollut Res*, 21(2) 1231-1241. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1994-1>

- Yue, Z., Zhang, J., Zhou, Z., Ding, C., Wan, L., Liu, J., Chen, L., Wang, X. 2021. Pollution characteristics of livestock faeces and the key driver of the spread of antibiotic resistance genes. *J Hazard Materials*, 409: 124957. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124957>.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., Popowska, M. 2021. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. *Front. Microbiol.* 12: 610656. doi: 10.3389/fmicb.2021.610656
- Zhang, Y., Li, K., Wu, Y., Liu, Y., Wu, R., Zhong, Y., Xiao, S., Mao, H., Li, G., Wang, Y., Li, W. 2022. Distribution and correlation between antibiotic resistance genes and host-associated markers before and after swine fever in the longjiang watershed. *Environ Pollut*, 313: 120101. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120101>.
- Zhang, H., Luo, Y., Wu, L. Huang, Y., Christie, P. 2015. Residues and potential ecological risks of veterinary antibiotics in manures and composts associated with protected vegetable farming. *Environ Sci Pollut Res*, 22: 5908–5918. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3731-9>

LAPORAN PERCOBAAN #9

9.1 Jatidiri Kelompok

- 9.3.1 Kelompok :
- 9.3.2 Anggota kelompok : 9.1.2.1
- 9.1.2.2
- 9.1.2.3
- 9.1.2.4

9.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

9.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 9.3.1 Jelaskan perbedaan ukuran dan bentuk koloni bakteri!
- 9.3.2 Hitung jumlah rata-rata CFU bakteri total per gram tanah kering untuk setiap jenis tanah Anda! Hitung simpangan baku (*standard deviation*) untuk setiap rerata contoh dan koefisien keragamannya (*coefficient of variation*)!
- 9.3.3 Jika tumbuh, jelaskan perbedaan ukuran dan bentuk koloni aktinomisetes!
- 9.3.4 Hitung jumlah rata-rata CFU aktinomisetes total per gram tanah kering untuk setiap jenis tanah Anda! Hitung simpangan baku (*standard deviation*) untuk setiap rerata contoh dan koefisien keragamannya (*coefficient of variation*)!
- 9.3.5 Amati goresan koloni Anda dan catat keseragaman bentuk dan ukuran! Catat adanya pencemar dan tunjukkan dalam laporan Anda apakah Anda merasa isolat Anda murni, atau berdasarkan morfologi koloni!
- 9.3.6 Gambarkan hasil pewarnaan Gram setiap koloni bakteri yang Andai warnai!
- 9.3.7 Laporkan diameter zona hambat setiap cakram antibiotika dan koloni bakteri yang Anda periksa!
- 9.3.8 Lakukan pembahasan efektivitas masing-masing antibiotika pada setiap jenis bakteri! Perlu diingat bahwa antibiotika mungkin tidak khas untuk jenis organisme tertentu!

9.3.9 Dalam hal apa actinomycetes berkerabat dekat dengan bakteri?
Apa persamaannya dengan cendawan?

9.3.10 Apa faktor dominan tanah yang mempengaruhi populasi bakteri
dan aktinomisetes di dalam tanah?

9.3.11 Lakukan pembahasan mengenai pengaruh jenis media yang
digunakan terhadap pembiakan bakteri, aktinomisetes, dan
cendawan yang Anda lakukan!

9.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh

Percobaan 10

JASAD RENIK TANAH: CENDAWAN BERFILAMEN (*FILAMENTOUS FUNGI*)

10.1 Tujuan

Mengisolasi, mengamati dan menghitung cendawan filamentus tanah menggunakan cara pengenceran dan biakan

10.2 Teori

Tanah dan keanekaragaman hayati yang ada di dalamnya berperan penting dalam banyak kegiatan ekosistem (Bardgett dan van der Putten, 2014), nutrisi, kesehatan, dan kesejahteraan manusia (Wall *et al.*, 2015). Biota tanah berperan dalam agregasi tanah. Banyak biota tanah mempengaruhi agregasi tanah (Lehmann *et al.*, 2017) yang salah satunya adalah cendawan berfilamen (*filamentous fungi*). Cendawan menjerat partikel-partikel dan membentuk agregat tanah karena pertumbuhannya yang berserabut sehingga memudahkan makhluk hidup yang mencari makan dan tumbuh melalui tanah. Cendawan membentuk biopolimer luar sel yang dapat bertindak sebagai semen dan perekat permukaan agregat tanah (Daynes *et al.*, 2012) dan enzim pengurai bahan organik yang dapat berfungsi sebagai agen penghancur agregat (Lehmann *et al.* 2020). Cendawan berfilamen juga menghasilkan hidrofobin yang dapat mengubah keterbasahan agregat dan kemungkinan berfungsi sebagai penstabil (Zheng *et al.*, 2016). Saat tumbuh melalui tanah, cendawan juga berhubungan dengan anggota komunitas tanah lainnya, misalnya *Collembola*, yang juga dapat mempengaruhi kemampuan agregasi tanah (Siddiky *et al.* 2012; Samaei *et al.* 2015).

Tanah umumnya mengandung jutaan cendawan per gram sehingga perlu dilakukan pengenceran agar dapat dihitung cendawan yang tumbuh dalam luasan media yang terbatas. Setelah diinokulasi pada beberapa cawan agar ulangan, koloni cendawan yang tumbuh di dalam cawan setelah masa inkubasi pada suhu yang sesuai dicapai akan tumbuh dan dapat diamati secara makroskopis (Gambar 25).

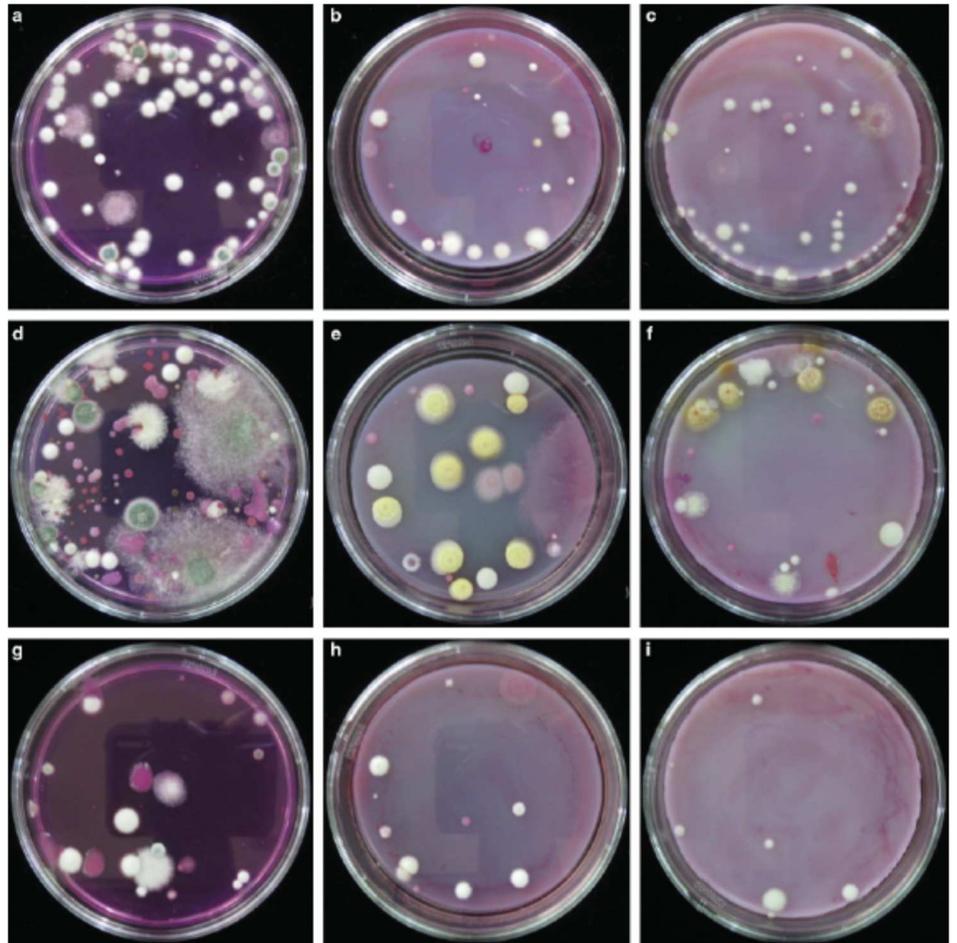
10.3 Tata kerja

10.3.1 Mempersiapkan contoh tanah

10.3.1.1 Bahan dan alat

- Contoh tanah (dua jenis) sebanyak 25 g untuk masing-masing contoh
- Gelas piala (*beaker*) 500 ml
- Air suling
- Pipet-25 ml
- Karet penghisap
- Dua vial plastik
- Karet gelang
- Pastik penutup
- Timbangan ($\pm 0,01$ g)

10.3.1.2 Tahapan kerja



Gambar 25 Pertumbuhan sejumlah kapang yang diisolasi dari tanah setelah dilakukan pengenceran desimal (Nonaka *et al.* 2014)

- (1) Hitung jumlah air suling yang perlu ditambahkan ke dalam 25 g tanah untuk mengubah kadar air tanah ke nilai yang ditentukan! Tambahkan air suling tersebut ke dalam 25 g tanah yang telah ditimbang sebelumnya ke dalam gelas piala (*beaker*) yang telah disediakan.
- (2) Tutup wadah dengan plastik pembungkus dan tusuk plastic beberapa kali dengan tusuk gigi untuk memungkinkan terciptanya keadaan aerob

selama inkubasi. Ikat plastik dengan karet gelang. Timbang contoh tanah dan bungkus. Anda akan memerlukan informasi ini untuk menghitung hilangnya kelembapan dari tanah selama inkubasi pada suhu kamar selama satu minggu.

10.3.2 Penghitungan kandungan cendawan berfilamen dalam contoh tanah

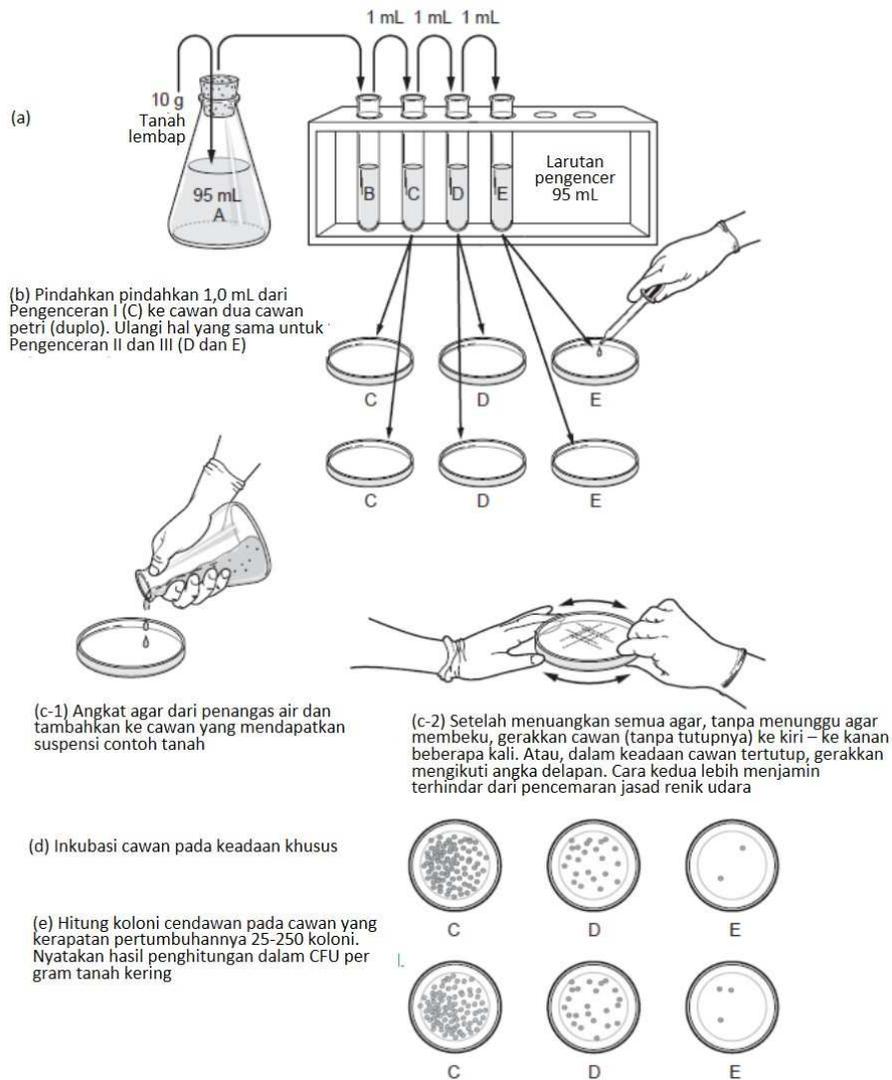
10.3.2.1 Bahan dan alat

- Contoh tanah hasil inkubasi
- Air suling suci hama, 95 mL satu gelas Erlenmeyer per jenis contoh tanah
- Air suling suci hama, 9 mL satu tabung uji 15-mL per jenis contoh tanah
- Rose Bengal Agar 150-mL per jenis contoh
- Larutan streptomisin suci hama untuk ditambahkan ke Agar 30 mg/ml
- 9 cawan petri suci hama per jenis contoh
- 6 pipet-1 mL suci hama per jenis contoh
- Rak tabung uji
- Karet penghisap untuk pipet
- Sarung tangan
- Kertas label
- Timbangan ($\pm 0,01$ g)
- Vortex
- Penangas air ± 45 °C

10.3.2.2 Tahap kerja

- (1) Timbang setiap contoh tanah dengan bungkus dan karet gelang setelah dikeluarkan dari inkubator dan catat beratnya. Penurunan berat badan disebabkan oleh hilangnya kelembapan. Dengan demikian, kelembapan tanah sebenarnya dapat dihitung pada saat dibiakkan pada media. Siapkan seri pengenceran desimal seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 26(a).
- (2) Siapkan dua cawan petri kosong yang suci hama untuk masing-masing pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} (tabung B, C, dan D). Ambil 1,0 mL dari tabung uji setiap pengenceran ke dalam tiga cawan Petri kosong suci hama yang terpisah untuk masing-masing pengenceran tersebut (ada enam cawan untuk setiap jenis contoh tanah) [Gambar 26(b)]. Keluarkan media Rose Bengal-streptomisin Agar dan tuangkan ke cawan petri yang sudah berisi suspensi contoh tanah [Gambar 35(c-1)]. Sebelum media memadat, lakukan gerakan untuk mencampurkan suspensi contoh tanah dan Agar seperti dalam Gambar 26(c-2).

- (3) Inkubasi semua cawan petri pada suhu kamar selama satu minggu.



Gambar 26 Skema tata kerja penghitungan cendawan berfilamen (Peper dan Gerba 2004 – dengan penyesuaian)

- (4) Setelah masa inkubasi dicapai, lakukan penghitungan terhadap semua cawan yang terlihat ditumbuhi koloni cendawan dengan kerapatan 25-250 koloni per cendawan [Gambar 26(e)]. Gunakan rumus perhitungan seperti yang dilakukan dalam Percobaan 8.

10.3.3 Pengenalan cendawan berfilamen

10.3.3.1 Bahan dan alat

- Larutan pewarna lactophenol cotton blue (LPCB)
- Selotip bening (*transparent tape*)
- Perangkat bedah (terutama pisau bedah)
- Penjepit
- Gelas objek
- Minyak imersi
- Mikroskop

10.3.3.2 Tahapan kerja

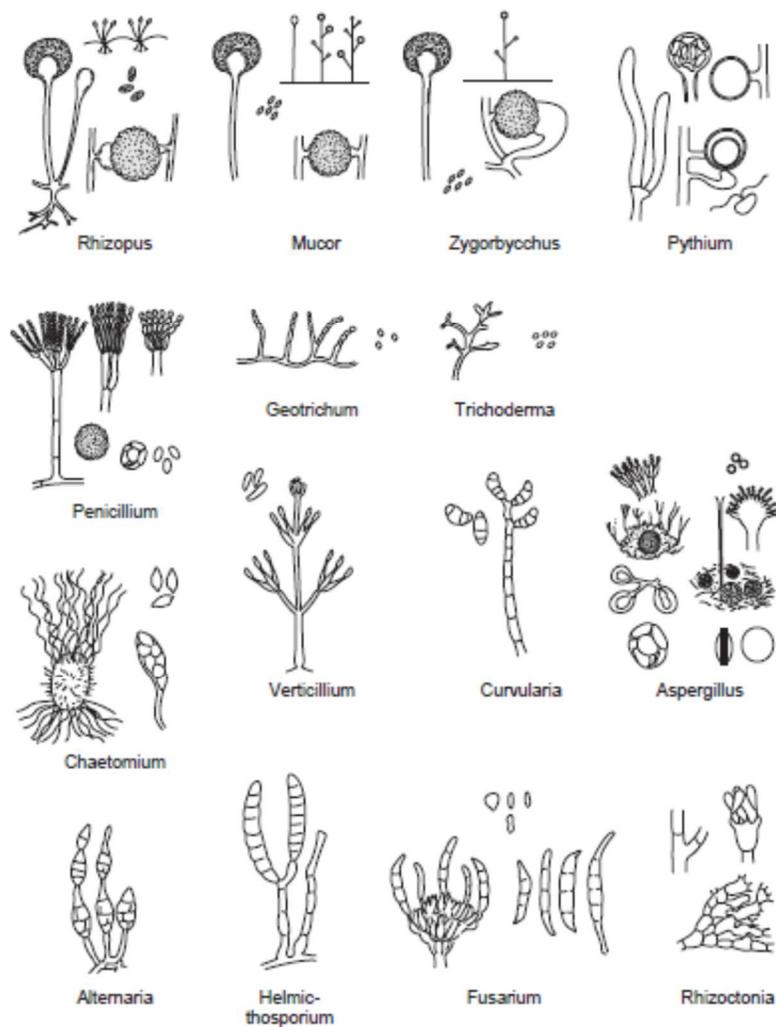
- (1) Pilih cawan petri dari pengenceran tertinggi dari setiap jenis contoh tanah. Pilih tiga koloni yang berbeda dalam satu cawan tersebut. Jika diperlukan, dapat menggunakan koloni dari cawan yang berbeda. Perhatikan dengan baik aspek tekstur dan topografi dari koloni yang tumbuh. Periksa koloni menggunakan mikroskop dengan objektif berdaya rendah (5x, atau 10x).
- (2) Siapkan selotip bening dan lakukan pemeriksaan mikroskopik yang tahapannya sebagai berikut:
 - taruh setetes larutan pewarna LPCB di tengah kaca objek yang bersih;
 - potong selotip bening dengan panjang sekitar 3 sentimeter dari gulungannya. Untuk menghindari pencemaran permukaan perekat, gunakan penjepit saat memegang selotip. Jarum bedah dapat membantu melepaskan selotip dari penjepit;
 - secara berhati-hati, tempelkan sisi perekat selotip ke permukaan koloni cendawan (yang bersporulasi). Cukup ditempelkan dan jangan melakukan penekanan pada pita selotip untuk menghindari massa hifa yang terlalu padat dan spora akan terkumpul;
 - angkat selotip dari permukaan koloni cendawan. Tempelkan sisi perekat menghadap ke bawah ke tetesan cairan pewarna LPCB di atas kaca objek. Gosok selotip dengan lembut menggunakan alat yang halus dan rata untuk

menghindari terbentuknya gelembung udara.

- (3) Lakukan pemeriksaan sel cendawan secara mikroskopik di bawah lensa objektif pembesaran tinggi (100x) menggunakan minyak imersi.
- (4) Kenali tiga genus cendawan yang berbeda menggunakan kunci gambar yang disediakan dalam Gambar 27. Buatlah sketsa struktur sel yang terlihat dalam mikroskop dan ambil foto struktur sel tersebut. Anda dapat mencoba mengenalinya menggunakan kunci mengenali genus cendawan melalui William-Woodward (2001), atau Basicmedical Key (2022). Juga, dapat dilakukan melalui situs <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Identification.html>

10.4 Pustaka

- Bardgett, R., van der Putten, W. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515: 505–511.
<https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Basicmedical Key. 2022. Overview of Fungal Identification Methods and Strategies. [Internet] Tersedia pada <https://basicmedicalkey.com/overview-of-fungal-identification-methods-and-strategies/> [Disitasi pada 05 Januari 2023]
- Daynes, CN., Zhang, N., Saleeba, JA., McGee, PA. 2012. Soil aggregates formed in vitro by saprotrophic Trichocomaceae have transient water-stability. *Soil Biol. Biochem.*, 48: 151-161.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.010>
- Lehmann, A., Zheng, W., Rillig, MC. 2017. Soil biota contributions to soil aggregation. *Nat. Ecol. Evol.*, 1: 1828–1835.
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0344-y>
- Lehmann, A., Zheng, W., Ryo, M., Soutschek, K., Roy, J., Rongstock, R., Maaß, S., Rillig, MC. 2020. Fungal Traits Important for Soil Aggregation. *Front. Microbiol.*, 10:2904. doi: 10.3389/fmicb.2019.02904



Gambar 27 Sketsa struktur sel berfilamen (Peper dan Gerba 2004)

Nonaka, K., Todaka, N., Ōmura, S., Masuma R. 2014. Combination cellulose plate (non-agar solid support) and agar plate method improves isolation of fungi from soil. *J. Antibiot.*, 67: 755–761. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.65>

Samaei, F., Asghari, S., Aliasgharzad, N. 2015. The effects of two arbuscular mycorrhizal fungi on some physical properties of a sandy loam soil and nutrients uptake by spring barley. *J. Soil Environ.*, 1: 1-9. [Internet] Tersedia pada

https://jse.uma.ac.ir/article_383_c3c923addeb761375e4ef6053cf373f1.pdf [Disitasi pada 03 Januari 2023]

Siddiky, MRK., Kohler, J., Cosme, M., Rillig, MC. 2012. Soil biota effects on soil structure: Interactions between arbuscular mycorrhizal fungal mycelium and collembola. *Soil Biol. Biochem.*, 50: 33-39.
DOI:[10.1016/j.soilbio.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.03.001)

Wall, DH., Nielsen, UN., Six, J. 2015. Soil biodiversity and human health. *Nature*, 528(7580): 69–76.
<https://doi.org/10.1038/nature15744>

William-Woodward, J. 2001. Simplified Fungi Identification Key. [Internet] Tersedia pada <https://plantpath.caes.uga.edu/content/dam/caes-subsite/plant-pathology/extension-pdfs/PDL-fungi-key.pdf> [Disitasi pada 05 Januari 2023]

LAPORAN PERCOBAAN #10

10.1 Jatidiri Kelompok

- 10.1.1 Kelompok :
- 10.1.2 Anggota kelompok : 10.1.2.1
- 10.1.2.2
- 10.1.2.3
- 10.1.2.4

10.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

10.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 10.3.1 Mengapa disebut cendawan berfilamen?
- 10.3.2 Buat sketsa dua genus cendawan yang telah Anda identifikasi!
- 10.3.3 Bagaimana pengaruh pH terhadap kelimpahan cendawan dalam tanah? Mengapa?
- 10.3.4 Apakah cendawan cenderung lebih dominan di tanah gurun, atau tanah rumput padang rumput? Mengapa?
- 10.3.5 Apakah ada perbedaan populasi cendawan pada tanah yang berbeda? Jelaskan faktor-faktor yang menyebabkan perbedaan itu!
- 10.3.6 Apakah pengenceran dan pembiakan pada media pertumbuhan merupakan cara yang baik untuk mendapatkan cendawan dalam jumlah mutlak di dalam tanah? Mengapa, atau mengapa tidak?
- 10.3.7 Kenali dua manfaat utama dan dua bahaya utama cendawan tanah!
- 10.3.8 Apa yang dimaksud dengan simpangan baku (*standard deviation*)? Lakukan pembahasan untuk mendapatkan hubungannya untuk mempelajari populasi jasad renik tanah!

10.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh!

Percobaan 11

KEBUTUHAN OKSIGEN SECARA BIOKIMIAWI (*BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND, BOD*)

11.1 Tujuan

Mengukur jumlah bahan organik yang dapat diuraikan secara hayati dalam air limbah

11.2 Teori

Sejumlah oksigen akan digunakan oleh jasad renik untuk menguraikan bahan-bahan organik yang terdapat di dalam limbah cair. Keadaan inilah yang dikenal sebagai kebutuhan oksigen secara biokimiawi (*biochemical oxygen demand*), atau kebutuhan oksigen secara biologik (*biological oxygen demand*). Parameter BOD digunakan untuk mengetahui tingkat pencemaran bahan-bahan organik dalam air limbah seperti yang disajikan dalam Tabel 10. Parameter BOD harus diukur dalam masa lima hari pada suhu 20 °C. Oleh karena itu, seringkali parameter ini dikenal dengan BOD₅.

Tabel 10 Tingkat BOD terhadap mutu air limbah

Tingkat BOD	Mutu air limbah
1 - 2	Sangat Bagus: Tidak banyak kadar bahan organik dalam air yang dipasok
3 - 5	Cukup: Cukup bersih
6 - 9	Jelek: Agak tercemar – Biasanya memperlihatkan keberadaan bahan organik dan jasad renik sedang menguraikannya
100 - lebih	Sangat jelek: Tercemar bahan organik

Sumber: Choudhary (2013)

Permintaan oksigen biokimia (atau biologis) adalah jumlah oksigen terlarut dalam air yang dikonsumsi oleh jasad renik untuk oksidasi biokimia bahan organik dan anorganik.

Jumlah oksigen yang dikonsumsi dapat memberikan gambaran kasar berapa banyak bahan organik yang tersisa di dalam air. Jika jumlah oksigen yang digunakan oleh organisme untuk oksidasi bahan organik menurun setelah pengolahan air limbah, diasumsikan kandungan organiknya juga menurun. Oleh karena itu, BOD adalah ukuran yang berguna dari efektivitas pengolahan air limbah. Pengolahan konvensional menghilangkan hingga 95% BOD dalam air limbah. Nilai BOD juga digunakan untuk menilai dampak pembuangan air limbah terhadap perairan penerima. Misalnya, pembuangan air limbah dengan BOD tinggi dapat menghabiskan oksigen terlarut di perairan penerima, membahayakan ikan dan organisme lain yang sudah ada di perairan penerima.

Total BOD adalah jumlah dari dua jenis BOD: karbon dan nitrogen. Carbonaceous BOD adalah jumlah oksigen yang digunakan oleh populasi campuran jasad renik heterotrofik untuk mengoksidasi senyawa organik. BOD nitrogen adalah jumlah oksigen yang digunakan oleh bakteri autotrofik untuk mengoksidasi NH₄⁺ menjadi nitrat. BOD nitrogen mengganggu pengukuran oksigen permintaan yang terkait dengan konten organik. Oleh karena itu, ketika mengukur BOD karbon, bahan kimia (2-kloro-6-(triklorometil) piridin)

ditambahkan ke dalam air untuk menghambat BOD nitrogen (Delzer dan McKenzie 2003; APHA, 1992; EPA 2023).

Untuk mengukur BOD, sampel air harus mengandung jasad renik dalam jumlah yang cukup untuk menggunakan oksigen terlarut. Air limbah rumah tangga, limbah air limbah yang tidak didesinfeksi dari instalasi pengolahan, dan air permukaan yang menerima pembuangan air limbah harus mengandung jasad renik ini. Sebaliknya, air yang didesinfeksi mungkin tidak mengandung jasad renik dalam jumlah yang cukup. Perairan ini perlu diunggulkan dengan biakan organisme. Pelet yang tersedia secara komersial yang mengandung organisme yang biasa ditemukan dalam air limbah dapat digunakan (APHA, 1998).

11.3 Tata kerja

11.3.1 Bahan dan alat

- Pembangkit udara (*Air compressor*)
- Tabung biuret
- Kaki tabung biuret
- Gelas piala 100 ml
- Gelas Erlenmeyer 100-ml
- Botol BOD 300-ml
- Pipet 5-ml
- Karet penghisap pipet
- pH-meter
- Asam sulfat (H_2SO_4) 1 N
- Asam sulfat (H_2SO_4) jenuh
- Sodium hidroksida (NaOH) 1 N
- Potassium yodida (KI) 10% (w/v)¹
- Sodium sulfat ($NaSO_4$) 0,025 N
- Asam asetat yang diencerkan 50% dengan air suling
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)
- Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)
- Ammonium dichloride (NH_4Cl)
- Sodium yodida (NaI)
- Sodium azida (NaN_3)
- Kalsium karbonat ($CaCO_3$) 27,5% (w/v)
- Magnesium sulfat ($MgSO_4$) 22,5% (w/v)
- Ferric klorida ($FeCl_3$) 0,15% (w/v)
- Sodium tiosulfat ($Na_2S_2O_3$) 0,025 N
- Air suling (*distilled water*)
- Air suling ganda (*double distilled water*)

¹ w/v = weight/volume (berat/volume)

11.3.2 Tahap kerja

11.3.2.1 Netralisasi contoh air

- (1) Ambil 50 ml contoh air yang akan diperiksa dan masukkan ke dalam gelas piala 100-ml.
- (2) Ukur pH contoh air tersebut.
- (3) Tambahkan asam sulfat (H_2SO_4) 1 N secara hati-hati jika pH contoh air berada diatas 7, atau sodium hidroksida (NaOH) 1 N secara hati-hati jika pH contoh air berada dibawah 7. Kisaran pH contoh, setelah penambahan asam sulfat, atau sodium hidroksida harus berada, harus berada pada pH $7,0 \pm 0,2$.
- (4) Catat jumlah asam sulfat, atau sodium hidroksida yang ditambahkan ke 50 ml contoh air. Lakukan perubahan jumlah asam sulfat, atau sodium hidroksida untuk 1.000 ml contoh air. (Misalnya jumlah asam sulfat, atau sodium hidroksida yang ditambahkan ke 50 ml contoh air sebanyak 2,1 ml. Jumlah asam sulfat, atau sodium hidroksida untuk 1.000 ml contoh air sebesar $(2,1 \text{ ml} \times 1.000 \text{ ml})/50 \text{ ml} = 42 \text{ ml}$).

11.3.2.2 Menghilangkan klorin dari contoh air

- (1) Ambil 50 ml contoh air yang akan diperiksa dan masukkan ke dalam gelas Erlenmeyer 100-ml.
- (2) Tambahkan 2,5 ml asam asetat yang telah diencerkan 50% dengan air suling (*distilled water*)
- (3) Tambahkan 2,5 ml potassium yodida (KI) 10% (w/v)
- (4) Tambahkan satu mililiter indikator pati/kanji dan titrasi dengan larutan sodium sulfat (NaSO_4) 0,025 N sampai saat munculnya warna biru. Kemunculan warna biru menandakan titrasi harus dihentikan. Catat jumlah larutan sodium sulfat (NaSO_4) 0,025 N yang ditambahkan..
- (5) Catat jumlah sodium sulfida dan hitung jumlahnya untuk 1.000 ml contoh air seperti yang dilakukan untuk netralisasi di atas.

11.3.2.3 Pembuatan larutan penyangga fosfat (*phosphate buffer solution*, PBS)

Siapkan 8,5 g potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4); 21,75 g dipotassium hydrogen phosphate

(K_2HPO_4); 33,4 g disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$); dan 1,7 ammonium dichloride (NH_4Cl). Campurkan dan larutkan semua bahan tersebut ke dalam 500 ml air suling. Tambahkan Kembali air sulingnya hingga jumlah keseluruhan menjadi 1.000 ml.

11.3.2.4 Menyiapkan reagen alkali-yodida-azida

Siapkan 500 g sodium hidroksida (NaOH) dan 135 g sodium yodida (NaI). Larutkan kedua bahan dalam air suling hingga tercampur sempurna hingga volume mencapai 1.000 ml. Kemudian tambahkan 10 g sodium azida (NaN_3) ke dalam larutan tersebut. Aduk merata larutannya.

11.3.2.5 Menyiapkan air pengencer

- (1) Siapkan lima liter air suling ganda (*double distilled water, bidestilated water*) dalam tempat kaca yang sesuai.
- (2) Berikan udara bertekanan pada air tersebut dalam waktu tidak lebih dari 12 jam.
- (3) Setelah waktu pemberian udara dicapai, biarkan air tersebut selama enam jam pada suhu 20 °C.
- (4) Tambahkan lima mililiter larutan kalsium karbonat ($CaCO_3$) 27,5% (w/v).
- (5) Tambahkan lima mililiter larutan magnesium sulfat ($MgSO_4$) 22,5% (w/v).
- (6) Tambahkan lima mililiter larutan ferric klorida ($FeCl_3$) 0,15% (w/v).
- (7) Tambahkan lima mililiter larutan PBS.
- (8) Aduk larutan hingga semua bahan melarut semua. Diamkan selama dua jam.

11.3.2.6 Menghitung nilai BOD

- (1) Siapkan empat botol BOD. Masukkan masing-masing 10 ml contoh air ke dalam dua botol dan tambahkan dengan air pengencer sebanyak masing-masing 10 ml.
- (2) Dua botol lainnya ditambahkan air pengencer sebanyak masing-masing 10 ml untuk dijadikan botol pengendali.

- (3) Segera tutup rapat semua botol dan dipastikan tidak terbentuk gelembung udara. Tandai botol-botol yang berisi contoh air dan yang hanya berisi air pengencer saja.
- (4) Inkubasi masing-masing satu botol yang berisi contoh air dan yang hanya berisi air pengencer saja pada suhu 20 °C selama lima hari.
- (5) Dua botol yang tersisa segera lakukan pemeriksaan untuk mendapatkan nilai oksigen terlarut (*dissolved oxygen*, DO) menggunakan tahapan kerja di bawah.
- (6) Lakukan analisis DO Kembali untuk dua botol yang diinkubasi setelah masa inkubasi lima hari tercapai.

Catatan

Volume contoh air yang disarankan untuk penghitungan nilai BOD₅ disediakan dalam Tabel 11 di bawah ini.

Tabel 11 Volume contoh air yang diperlukan berdasarkan perkiraan nilai BOD

Kisaran BOD (mg/l)	Volume contoh air (ml)	Air pengencer (ml)
0 – 10	300	0
11 – 30	100	200
31 – 70	50	250
71 – 150	25	275
151 – 310	10	290
311 – 630	5	295
631 – 1270	2	298
1270 – 2500	1	299

Sumber: Choudhary (2013)

11.3.2.7 Penentuan nilai DO

- (1) Tambahkan dua mililiter larutan mangan sulfat (MnSO₄.H₂O) 36,4% menggunakan pipet. Ujung pipet harus dimasukkan ke dalam contoh air (sedikit di bawah permukaan contoh air) untuk menghindari masuknya oksigen ke dalam contoh air.
- (2) Tambahkan dua mililiter larutan alkali-yodida-azida. Biarkan larutan tersebut bekerja di dalam contoh air.
- (3) Setelah terlihat adanya endapan di dasar gelas, tambahkan dua mililiter asam sulfat jenuh (*concentrated*) menggunakan pipet yang ujungnya ditempatkan sedekat mungkin ke permukaan contoh air yang diperiksa. Aduk hingga endapannya larut.

- (4) Ambil sebanyak 203 ml contoh air dari botol BOD dan masukkan ke dalam gelas Erlenmeyer.
- (5) Segera lakukan titrasi menggunakan larutan sodium tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,025 N menggunakan indikator pati/kanji sampai saat munculnya warna biru. Kemunculan warna biru menandakan titrasi harus dihentikan. Catat jumlah sodium tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,025 N yang ditambahkan (*burrete reading*, BR).
- (6) Ulangi tahapan (4) dan (5) yang sama terhadap contoh kendali (botol BOD yang tidak mengandung contoh air).

Perhitungan untuk menentukan nilai BOD dilakukan dengan cara:

Koreksi kendali = BR pada larutan kendali (D_0) - BR pada larutan kendali (D_5)
 BOD_5 (mg/l) = [(BR contoh air pada D_0 - D_5) - koreksi kendali] x faktor pengencer
 Faktor pengencer = volume botol (300 ml)/volume contoh air

untuk:

BR = *burrete reading*
 D_0 = awal, sebelum diinkubasi
 D_5 = lima hari setelah diinkubasi

11.4 Pustaka

[APHA] American Public Health Association. 1992. Standard method for Examination of Water and wastewater. [Internet] Tersedia pada <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/apha.method.9221.1992.pdf> [Disitasi pada 29 Januari 2023]

Choudhary A. 2013. Determination of Biological Oxygen Demand in Waste Water. [Internet] Tersedia pada [https://www.pharmaguideline.com/2013/06/determination-of-biological-oxygen.html#:~:text=Biological%20Oxygen%20Demand%20\(BOD\)%3A&text=Therefore%20it%20is%20used,again%20and%20BOD%20is%20calculated.](https://www.pharmaguideline.com/2013/06/determination-of-biological-oxygen.html#:~:text=Biological%20Oxygen%20Demand%20(BOD)%3A&text=Therefore%20it%20is%20used,again%20and%20BOD%20is%20calculated.) [Disitasi pada 29 Januari 2023]

Delzer, GC., and McKenzie, SW., November 2003, Five-day biochemical oxygen demand: U.S. Geological Survey Techniques of Water-Resources Investigations, book 9, chap. A7 (3d ed.), section 7.0, [Internet] Tersedia pada <http://pubs.water.usgs.gov/twri9A/> [Disitasi pada 29 Januari 2023].

[EPA] United States Environmental Protection Agency. 2012. Dissolved Oxygen and Biochemical Oxygen Demand. [Internet] Tersedia pada

<https://archive.epa.gov/water/archive/web/html/vms52.html> [Disitasi pada 29 Januari 2023]

LAPORAN PERCOBAAN #11

11.1 Jatidiri Kelompok

- 11.1.1 Kelompok :
- 11.1.2 Anggota kelompok : 11.1.2.1
- 11.1.2.2
- 11.1.2.3
- 11.1.2.4

11.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

11.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 11.3.1 Tujuan utama pengolahan limbah adalah untuk mengurangi jumlah karbon yang dapat terurai secara hayati. Mengapa hal ini diperlukan?
- 11.3.2 Mengapa contoh air yang akan dihitung nilai BOD-nya harus bebas dari unsur klorin?
- 11.3.3 Apa itu BOD nitrogen? Apa yang ditambahkan ke contoh air yang diperiksa untuk menghambat BOD nitrogen?
- 11.3.4 Mengapa contoh air yang akan dihitung nilai BOD-nya harus bebas dari senyawa-senyawa organik?
- 11.3.5 Mengapa harus dihindari masuknya oksigen ke dalam contoh air ketika menambahkan larutan mangan sulfat ke dalam contoh air yang akan dihitung nilai DO-nya?
- 11.3.6 Mengapa Anda perlu menetralkan klorin sebelum tes BOD?
- 11.3.7 Mengapa dianggap penting untuk tidak meninggalkan, atau terbentuknya gelembung udara di dalam botol BOD selama inkubasi?

11.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh!

Percobaan 12

NITRIFIKASI DAN DENITRIFIKASI

12.1 Tujuan

Mempelajari peranan jasad renik penting terhadap perubahan senyawa Kelembapannitrogen anorganik di dalam tanah.

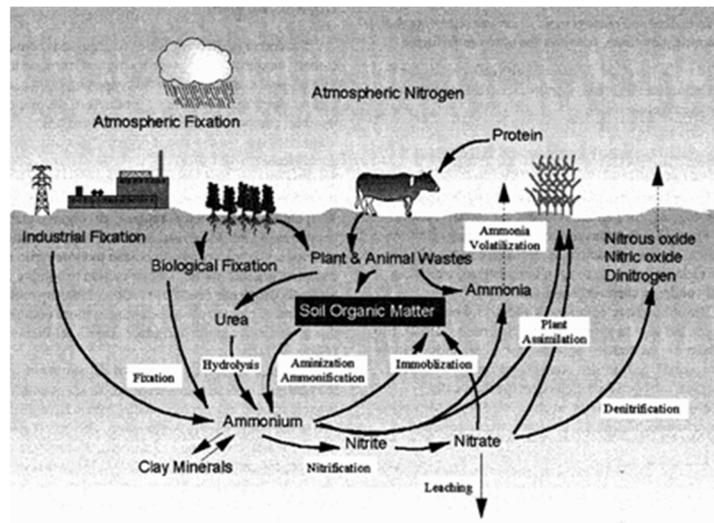
12.2 Teori

Sejumlah senyawa organik, yakni senyawa-senyawa yang mengandung unsur karbon, menyusun fraksi organik nitrogen dalam tanah. Bahan organik tanah berasal dari sisa tanaman dan hewan yang membusuk, senyawa yang relatif stabil dan humus yang tahan dekomposisi. Nitrogen terkumpul dalam berbagai fraksi organik ini dalam tanah.

Pembentukan dan keberadaan bahan organik di dalam tanah berhubungan dengan kelembapan dan suhu jangka panjang. Bahan organik tanah akan berkurang dengan kenaikan suhu rata-rata terjadi dekomposisi bahan organik yang lebih cepat dan larut larut dalam tanah. Bahan organik tanah akan meningkat seiring meningkatnya kelembapan. Bahan organik tanah yang meningkat merangsang pertumbuhan tanaman.

Siklus Nitrogen

Amonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-) adalah bentuk nitrogen anorganik yang terdapat dalam jumlah banyak di dalam tanah. Amonium ada dalam bentuk yang dapat ditukar dan tidak dapat ditukar. Nitrit (NO_2) dan dinitrogen oksida (N_2O) terdapat dalam tanah dalam jumlah yang lebih sedikit. Tanaman



Gambar 28 Siklus nitrogen (Plant and Soil eLibrary 2023)

biasanya menggunakan nitrogen hanya dalam bentuk amonium dan nitrat. Nitrit sebenarnya beracun bagi tanaman. Siklus nitrogen, seperti yang digambarkan dalam Gambar 28, menunjukkan reaksi yang dialami berbagai senyawa nitrogen anorganik di dalam tanah. Siklus nitrogen dimulai dengan nitrogen dalam bentuk stabilnya yang paling sederhana, yakni dinitrogen (N_2), dan kemudian mengikuti melalui proses fiksasi, mineralisasi, nitrifikasi, pelindian, asimilasi tanaman, penguapan amonia, denitrifikasi, dan pengikatan (*immobilization*).

Fiksasi nitrogen

Fiksasi adalah proses mengubah gas dinitrogen menjadi bentuk reaktif secara kimiawi — yang membiarkan nitrogen bergabung dengan unsur lain, seperti oksigen, hidrogen, dan karbon. Bentuk-bentuk ini bergantung pada fiksasi yang terjadi. Petir memperbaiki nitrogen menjadi berbagai oksida yang disimpan oleh hujan dan salju. Biasanya, kurang dari 4,5 kg total nitrogen per 4046.86 m² per tahun. Bakteri dapat mengubah nitrogen menjadi bentuk organik melalui fiksasi. Fiksasi dapat terjadi pada organisme yang hidup bebas atau bersimbiosis dengan legum.

Mineralisasi Nitrogen

Setelah nitrogen diperbaiki, ia mengalami beberapa reaksi kimiawi yang dapat mengubahnya menjadi bentuk organik, atau anorganik yang berbeda. Mineralisasi terjadi di tanah karena jasad renik mengubah nitrogen organik menjadi bentuk anorganik. Langkah pertama mineralisasi disebut aminisasi, yang memperlihatkan jasad renik (terutama heterotrof) memecah protein kompleks menjadi asam amino, amida, dan amina yang lebih sederhana. Jasad renik heterotrofik membutuhkan senyawa organik yang telah dibentuk sebelumnya sebagai sumber karbon dan energi. Jasad renik autotrofik dapat memperoleh energi dari oksidasi unsur, atau senyawa anorganik seperti besi (Fe), belerang (S), amonium, nitrit, atau dari energi radiasi. Mereka mendapatkan karbon dari karbon dioksida (CO_2). Misalnya, urea adalah amida yang ditambahkan langsung ke tanah baik dalam urin hewan atau sebagai pupuk komersial.

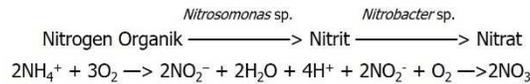
Aminisasi: Protein \longrightarrow R+ $-NH_2$ + R-OH

Amonifikasi adalah langkah kedua mineralisasi yang mengubah gugus amino (NH_2) menjadi amonium. Sekali lagi, jasad renik (terutama autotrofik) melakukan proses ini.

Amonifikasi: $R-NH_2 + H_2O \longrightarrow NH_3 + R-OH$

Nitrifikasi

Kegiatan jasad renik juga bertanggung jawab atas dua langkah nitrifikasi. *Nitrosomonas* sp. (bakteri autotrofik obligat) mengubah amonium menjadi nitrit. Nitrifikasi dapat dihambat oleh nitrapyrin (N-ServeR), atau dicyandiamide (DCD) yang mengganggu fungsi bakteri ini sehingga menghalangi perubahan amonium menjadi nitrat yang dapat larut. Langkah kedua nitrifikasi dilakukan oleh bakteri *Nitrobacter* sp. yang mengubah nitrit menjadi nitrat. Proses kedua ini segera terjadi setelah perubahan amonium menjadi nitrit sehingga kadar nitrit biasanya rendah di dalam tanah.



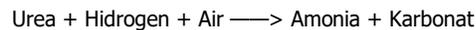
Mineralisasi dan nitrifikasi dipengaruhi oleh sejumlah faktor lingkungan seperti suhu, kelembapan, aerasi, pH, dan lainnya. Nitrifikasi terjadi sangat lambat pada suhu dingin dan berhenti setelah suhu turun di bawah titik beku. Nitrifikasi meningkat dengan meningkatnya suhu hingga kemampuan hidup bakteri berkurang (pada suhu sekitar 95 °F sampai 100 °F) dan nitrifikasi mulai menurun. Kelembapan dan oksigen diperlukan untuk bekerjanya jasad renik, baik dalam proses mineralisasi maupun nitrifikasi. Kelembapan yang berlebihan membatasi ketersediaan oksigen, mengurangi tingkat mineralisasi dan nitrifikasi yang menyebabkan kondisi tanah mengalami keadaan anaerobik. Laju mineralisasi dan nitrifikasi berlangsung paling cepat pada tingkat pH mendekati 7,0 dan menurun saat tanah menjadi terlalu asam, atau basa.

Denitrifikasi

Persediaan nitrat yang terlalu banyak di dalam tanah dapat menyebabkan denitrifikasi – pengubahan nitrat menjadi berbagai bentuk gas nitrogen yang dapat hilang ke atmosfer (nitrit oksida, nitrous oksida, dinitrogen). Denitrifikasi terjadi dalam kondisi anaerob fakultatif ketika bakteri anaerob menggunakan nitrat dalam pernafasannya karena adanya sumber karbon, seperti bahan organik.

Penguapan Amonia

Kehilangan amonia (NH₃) ke atmosfer disebut penguapan amonia. Secara teknis, penguapan amonia berbeda dengan gas yang hilang dari amoniak anhidrat yang digunakan, yang tidak tertahan di dalam tanah. Sebaliknya, penguapan amonia terjadi ketika amonium berada di dalam tanah karena pH, diubah menjadi amonia yang hilang sebagai gas.



Pencucian Nitrogen

Nitrogen harus dalam bentuk yang mudah larut dalam air, bergerak, dan cukup melimpah untuk tersimpan di dalam tanah. Urea dan nitrit tidak ada dalam jumlah yang nyata di dalam tanah walaupun keduanya bersifat sebagai bahan bergerak. Nitrat adalah bentuk nitrogen yang paling rentan terhadap pencucian. Nitrat yang tercuci di bawah daerah akar (empat hingga enam kaki) untuk sebagian besar tanaman agronomi pada akhirnya akan terlindi ke bawah hingga mencapai zona jenuh. Nitrat yang tercuci di bawah akar sedalam 1,2 – 1,8 m tidak dapat dimanfaatkan oleh sebagian besar tanaman kecuali spesies tanaman berakar dalam, seperti alfalfa. Laju pergerakan nitrat ke bawah bergantung pada berbagai faktor, termasuk tekstur tanah, jumlah curah hujan dan aliran air, serta penyerapan air dan nitrat oleh tanaman.

12.3 Tata kerja

12.3.1 Tahap pertama

12.3.2.1 Bahan dan alat

- 400 g tanah segar (akan lebih baik jika tersedia empat tipe tanah)
- empat bejana besar yang cukup menampung 100 g tanah segar
- dua vial plastic untuk masing-masing tanah
- KNO_3
- timbangan analitik
- timbangan meja (ketelitian $\pm 0,01$ g)
- piring timbangan
- spatula pencampur
- air suling (*deionized water*)
- perangkat pemotong
- plastik pembungkus
- pita karet

12.3.2.2 Perlakuan

- (1) Tambahkan 4 x 100 g (berat basah) contoh tanah ke dalam empat wadah. Tambahkan 0,10% KNO_3 (basis berat kering) ke semua tanah. Campur tanah secara merata menggunakan spatula;
- (2) Timbang 2 x 25 g contoh tanah lainnya ke dalam dua wadah tetapi tanpa nitrat;
- (3) Sesuaikan kelembapan tanah hingga nilai pembimbing Anda. Tutupi wadah dengan plastik pembungkus dan buat beberapa lubang agar terjadi pernafasan.
- (4) Catat berat tanah + wadah + bungkus + karet gelang;
- (5) Inkubasi tanah selama satu minggu pada suhu kamar.

12.3.2 Tahap dua

12.3.2.1 Bahan dan alat

- tanah yang diinkubasi pada Tahap Pertama
- timbangan meja (ketelitian $\pm 0,01$ g)
- piring dan kertas timbangan
- enam gelas Erlenmeyer berukuran 125-ml untuk masing-masing contoh tanah
- air suling
- gelas silinder berukuran 25-ml
- satu vial plastik untuk masing-masing contoh tanah

- satu corong penyaring dengan masing-masing kertas penyaring Whatman^{®1} #42
- kaki standar untuk memegang corong penyaring
- satu strip uji nitrat untuk masing-masing gelas
- gelas volumetric dan pipet untuk pengenceran
- pipet gelembung (*bulb*)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- glucose
- spatula pengaduk

12.3.2.2 Kadar nitrat dalam satu pekan (tujuh hari)

- (1) Timbang semua contoh tanah dengan wadah dan catat bobotnya;
- (2) Hitung kelembapan terbaru;
- (3) Sebanyak 10 g contoh tanah dimasukkan ke dalam enam gelas Erlenmeyer berukuran 125-ml (empat contoh tanah yang ditambahi nitrat dan dua contoh tanah yang tanpa nitrat). Berat contoh tanah yang tersisa di dalam wadah dicatat (termasuk penutup dan karet gelang). Satu gelas kosong (tanpa tanah) digunakan sebagai blanko (total 7 labu);
- (4) Sebanyak 25 ml air deionisasi ditambahkan ke setiap gelas Erlenmeyer dan diaduk perlahan selama 30 menit;
- (5) Suspensi contoh tanah disaring menggunakan kertas saring Whatman[®] #42 dan ditampung ke dalam wadah yang bersih dan botol plastik berlabel. Hanya diperlukan beberapa mililiter filtrat;
- (6) Strip uji nitrat dicelupkan ke dalam larutan dan gunakan skala kuantifikasi warna untuk memperkirakan kadar nitrat dalam larutan (ikuti petunjuk penggunaan strip uji). Hal ini memberikan pembacaan NO_3 pada $t =$ tujuh hari. Larutan dapat saja diencerkan agar kadar nitrat berada pada skala kalibrasi;
- (7) Hitung jumlah nitrat yang ada (mg/g tanah) untuk setiap contoh tanah yang disaring. Perhatikan juga apakah ada NO_2 .

12.3.2.3 Penambahan ammonium ke dalam tanah

- (1) Sebanyak 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ditambahkan ke empat contoh tanah (yang sebelumnya ditambah nitrat) berdasarkan berat kering. Jumlah pasti yang ditambahkan dicatat. Contoh tanah diaduk menggunakan spatula hingga campuran merata;

- (2) Masing-masing wadah wadah diberi-tanda dengan salah satu dari berikut ini: "aerobik", "aerobik + glukosa", "anaerob", "anaerob + glukosa";
- (3) Glukosa ditambahkan ke masing-masing dua perlakuan glukosa berdasarkan 0,5% berat kering. Contoh tanah diaduk rata menggunakan spatula;
- (4) Kembalikan kadar air tanah yang berlabel "aerobik" atau "aerobik + glukosa" ke kadar air aslinya (seperti pada awal Tahap Pertama). Contoh tanah tersebut ditutup dengan penutup aslinya dan ditimbang kembali;
- (5) Air suling ditambahkan secukupnya pada contoh tanah yang diberi label "anaerobik" dan "anaerobik + glukosa" untuk menjenuhkan tanah. Air ditambahkan secara perlahan sambil sering diaduk;
- (6) Penutup asli dipasang kembali, dan ditimbang. Penutup kedua dipasang pada contoh tanah yang berlabel anaerobik saja. Jangan membuat lubang apa pun untuk membatasi pergerakan udara ke dalam suspensi sehingga terbentuk keadaan anaerobik. Wadah ditimbang.

12.3.3 Tahap tiga

12.3.3.1 Bahan dan alat

- contoh tanah yang diinkubasi dipekan sebelumnya;
- timbangan meja (ketelitian $\pm 0,01$ g)
- piring dan kertas timbangan
- lima gelas Erlenmeyer berukuran 125-ml untuk masing-masing contoh tanah
- air deionisasi
- gelas silinder ukuran 25-ml
- satu vial plastik untuk masing-masing contoh tanah
- satu corong penyaring untuk masing-masing gelas
- kertas penyaring Whatman® #42
- kaki standar untuk memegang corong
- satu strip uji nitrat untuk masing-masing gelas
- gelas volumetric dan pipet untuk pengenceran
- pipet balon
- spatula pengaduk

12.3.3.2 Pembacaan terakhir

- (1) Setiap wadah ditimbang dan dicatat beratnya. Kadar air tanah yang baru dihitung;
- (2) Sebanyak 10 g contoh tanah dihitung kadar nitrat setiap tanah seperti yang dilakukan pada periode kedua. Jumlah nitrat yang tersisa di tanah dihitung.

12.4 Pustaka

Plant and Soil eLibrary. 2023. Forms of Nitrogen in the Soil. [Internet]
Tersedia pada <https://passel2.unl.edu/view/lesson/3176eba1ba31/2>
[Disitasi pada 06 Februari 2023]

LAPORAN PERCOBAAN #12

12.1 Jatidiri Kelompok

- 12.1.1 Kelompok :
- 12.1.2 Anggota kelompok : 12.1.2.1
- 12.1.2.2
- 12.1.2.3
- 12.1.2.4

12.2 Hasil Pengamatan

Tuliskan hasil pengamatan yang telah dilakukan oleh Kelompok!

12.3 Pembahasan

Lakukan pembahasan terhadap hasil yang sudah diperoleh. Pembahasan diharapkan menjawab pertanyaan-pertanyaan di bawah ini.

- 12.3.1 Laporkan dalam bentuk tabel kadar nitrat dalam tanah sebagai fungsi waktu!
- 12.3.2 Buatlah grafik data yang menunjukkan kadar nitrat dalam tanah sebagai fungsi waktu. Letakkan semua perubahan pada satu grafik (gunakan garis dan/atau simbol yang berbeda untuk setiap perubahan).
- 12.3.3 Apa tujuan pembagian tanah menjadi perlakuan aerobik dan anaerobik? Bagaimana perlakuan ini mempengaruhi proses nitrifikasi dan denitrifikasi? Bakteri apa yang terlibat dalam proses ini?
- 12.3.4 Apa tujuan penambahan glukosa pada setiap perlakuan?
- 12.3.5 Bagaimana nasib penambahan $\text{NH}_4\text{-N}$ pada setiap perlakuan?
- 12.3.6 Apa yang mempengaruhi jumlah nitrat yang tersisa pada: a) perlakuan aerobik dan aerobik + glukosa, b) perlakuan anaerobik dan anaerobik + glukosa?
- 12.3.7 Kenali satu dampak menguntungkan dan satu dampak buruk nitrifikasi!
- 12.3.8 Berikan contoh bakteri denitrifikasi autotrofik yang penting!

12.4 Kesimpulan

Tulis kesimpulan Anda mengenai hasil dan pembahasan yang diperoleh!

INDEKS

- Aerosol 2
 - biologik 2
- Analisis risiko 1
- Antraks 1
 - Bacillus anthracis* 1
- Bioaerosol* 2
- Biosafety* 1
 - Biosafety cabinet* 1
- Biosecurity* 1
- Impingement in liquid* 3, 23
- Impaction on solid surface* 3
- Keamanan hayati 1
- Laboratory-acquired infections* 2
- Laminar flow cabinet* 1
- Mutu udara 3
- Penempatan 3
 - permukaan keras 3
- Pengamanan hayati 1
- Pengendapan 3, 23, 45
 - sedimentasi 3
- Penumbukan 3, 23
 - dalam cairan 3, 23
- Penyaringan 3, 23, 24
 - filtrasi 3