II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Air

Air merupakan bahan esensial bagi kehidupan organisme. Oleh karena itu, air selalu penuh dengan benda-benda hidup. Manfaat air di dalam tubuh manusia antara lain untuk melarutkan berbagai jenis zat yang diperlukan tubuh, mempertahankan suhu tubuh dengan cara penguapan keringat, untuk transportasi zat-zat makanan dalam tubuh semuanya dalam bentuk larutan dengan pelarut air.

Sumber air bersih untuk kebutuhan hidup sehari-hari secara umum harus memenuhi standar kuantitas dan kualitas.

a. Ditinjau dari segi kuantitas air

Ditinjau dari segi kuantitasnya, kebutuhan air rumah tangga menurut Karsidi (2000) adalah:

1. Kebutuhan air untuk minum dan mengolah makanan 5 liter/ orang per hari.
2. Kebutuhan air untuk mandi dan membersihkan dirinya 25-30 liter/ orang per hari.
3. Kebutuhan air untuk mencuci pakaian dan peralatan 25-30 liter/ orang per hari. Kebutuhan air untuk menunjang pengoperasian dan pemeliharaan fasilitas sanitasi atau pembuangan kotoran 4-6 liter/ orang per hari, sehingga total pemakaian perorang adalah 60-70 liter/ hari di kota.

b. Ditinjau dari segi kualitas air

Menurut peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 416/ Menkes/Per/IX/1990, air bersih adalah air yang digunakan untuk keperluan sehari-hari yang kualitasnya memenuhi syarat kesehatan dan dapat diminum setelah dimasak (Pitojo dan Purwantoyo, 2003). Air bersih diperoleh dari sumber mata air yaitu air tanah, sumur, air tanah dangkal, sumur artetis atau air tanah dalam.

Kualitas air bersih apabila ditinjau berdasarkan kandungan bakterinya menurut SK. Dirjen PPM dan PLP No. 1/PO.03.04.PA.91 dan SK JUKLAK PKA Tahun 2000/2001, dapat dibedakan ke dalam lima kategori sebagai berikut:

1. Air bersih kelas A ketegori baik mengandung total *Coliform* kurang dari 50 bakteri.
2. Air bersih kelas B kategori kurang baik mengandung *Coliform* 51-100 bakteri.
3. Air bersih kelas C kategori jelek mengandung *Coliform* 101-1000 bakteri.
4. Air bersih kelas D kategori amat jelek mengandung *Coliform* 1001-2400 bakteri.
5. Air bersih kelas E kategori sangat amat jelek mengandung *Coliform* lebih 2400 bakteri (Effendi, 2003).

Air yang berkualitas baik harus memenuhi persyaratan fisik seperti berikut (Slamet, 2002).

1. Jernih atau tidak keruh (kekeruhan)

   Air yang keruh disebabkan oleh adanya butiran-butiran koloid dari bahan tanah liat. Semakin banyak kandungan koloid maka air semakin keruh.

2. Tidak berwarna (warna)

   Air untuk keperluan rumah tangga harus jernih. Air yang berwarna berarti mengandung bahan-bahan lain yang berbahaya bagi kesehatan.

3. Rasa

   Secara fisika, air bisa dirasakan oleh lidah. Air yang terasa asam, manis, pahit, atau asin menunjukkan bahwa kualitas air tersebut tidak baik. Rasa asin disebabkan adanya garam-garam tertentu yang larut dalam air, sedangkan rasa asam diakibatkan adanya asam organik maupun asam anorganik.

4. Tidak berbau

   Air yang baik memiliki ciri-ciri tidak berbau bila dicium dari jauh maupun dari dekat. Air yang berbau busuk mengandung bahan-bahan organik yang sedang mengalami dekomposisi (penguraian) oleh mikroorganisme air.

5. Temperatur normal (suhu)

   Air yang baik harus memiliki temperatur sama dengan tempertur udara (20 ºC sampai dengan 60 ºC). Air yang secara mencolok mempunyai temperatur di atas atau di bawah temperatur udara berarti mengandung zat-zat tertentu (misalnya fenol yang terlarut di dalam air cukup banyak) atau terjadi proses tertentu (proses dekomposisi bahan organik oleh mikroorganisme yang menghasilkan energi) yang mengeluarkan atau menyerap energi dalam air.

Kualitas air juga tergolong baik bila memenuhi persyaratan kimia berikut ini (Kusnaedi, 2004):

1. pH netral

   Derajat keasaman air harus netral, tidak boleh bersifat asam maupun basa. Air yang mempunyai pH rendah akan bersifat asam, sedangkan pH tinggi akan

bersifat basa. Air yang murni mempunyai pH = 7, pH di bawah 7 akan bersifat asam sedangkan pH di atas 7 akan bersifat basa.

2. Tidak mengandung bahan kimia beracun

   Air yang berkualitas baik tidak mengandung bahan kimia beracun seperti sianida, sulfida, fenolik.

3. Tidak mengandung ion-ion logam

   Air yang berkualitas baik tidak mengandung garam atau ion logam seperti Fe, Mg, Ca, K, Hg, Zn, Mn, Cl, Cr, dan lain-lain.

4. Kesadahan rendah

   Tingginya kesadahan berhubungan dengan garam-garam yang terlarut di dalam air terutama garam Ca dan Mg.

5. Tidak mengandung bahan organik

   Kandungan bahan organik dalam air yang melebihi ambang batas dapat terurai menjadi zat-zat yang berbahaya bagi kesehatan. Bahan-bahan organik itu seperti NH_4^+, H_2S, SO_4^{2-} dan NO_3^-.

Selain persyaratan fisik dan kimia, kualitas air bersih juga harus memiliki persyaratan mikrobiologis. Pada umumnya uji mikrobiologis yang harus dipenuhi oleh air adalah sebagai berikut (Notoadmojo, 2003):

1. Tidak mengandung bakteri patogen, misalnya bakteri golongan coli, *Shigella dysenteriae, Salmonella typhi, Salmonella parathypi, Vibrio colerae*. Bakteri-bakteri ini mudah tersebar melalui air *(transmitted by water)*.
2. Tidak mengandung bakteri non-patogen, seperti *Actinomycetes, Ciadocera, Fecal streptococci, Iron*.

Salah satu sumber air yang sering dimanfaatkan oleh manusia adalah air sumur atau air sumur bor. Biasanya air sumur atau air sumur bor yang digunakan memiliki lokasi yang berdekatan dengan sumber pencemaran seperti tempat pembuangan feses dan tempat pembuangan sampah sehingga ada kemungkinan air sumur atau air sumur bor tercemar oleh bakteri. Laboratorium Biomassa Universitas Lampung merupakan salah satu laboratorium yang sering digunakan baik mahasiswa maupun dosen dalam penelitian. Penggunaan zat -zat kimia dalam penelitian juga akan mempengaruhi lingkungan sekitar laboratorium. Selain menggunakan zat-zat kimia, penelitian di Laboratorium Biomassa juga banyak menggunakan mikroorganisme, khususnya bakteri golongan *Escherichia coli*. Sumber air yang terdapat di Laboratorium Biomassa berasal dari air sumur bor. Dengan adanya aktivitas makhluk hidup di dalam Laboratorium Biomassa, dapat diperkirakan sumber air di laboratorium juga tercemar oleh bakteri. Jenis bakteri yang biasanya terdapat di air sumur atau air sumur bor adalah bakteri *Escherichia coli*.

B. Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini termasuk ke dalam domain prokariot dan berukuran sangat kecil (mikroskopik), serta memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat di bidang pangan, pengobatan, dan industri. Struktur sel bakteri relatif sederhana dan tidak memiliki nukleus/inti sel.

Hal inilah yang menjadi dasar perbedaan antara sel prokariot dengan sel eukariot yang lebih kompleks.

1. Bakteri *Coliform*

Coliform merupakan suatu kelompok bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi yang tidak baik terhadap air, makanan, dan produk-produk susu. Kelompok bakteri *Coliform* dicirikan sebagai bakteri berbentuk batang, gram negatif, tidak membentuk spora, aerobik dan anaerobik fakultatif yang dapat memfermentasi laktosa menghasilkan asam dan gas dalam waktu 48 jam pada suhu 35 ^{o}C.

Bakteri *Coliform* dapat dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu:

1. *Coliform* fekal adalah bakteri indikator adanya pencemaran bakteri patogen. Penentuan *Coliform* fekal menjadi indikator pencemaran dikarenakan jumlah koloninya pasti berkorelasi positif dengan keberadaan bakteri patogen. Contoh bakteri *Coliform* fekal adalah *Escherichia coli* yang berasal dari kotoran hewan atau manusia (Dwee, 2010).
2. *Coliform* non-fekal misalnya *Enterobacter aerogenes* yang bukan berasal dari kotoran manusia tetapi mungkin berasal dari hewan atau tanam-tanaman yang telah mati.

Semakin tinggi tingkat kontaminasi bakteri *Coliform,* semakin tinggi pula risiko kehadiran bakteri-bakteri patogen lain yang biasa hidup dalam kotoran manusia dan hewan. Salah satu contoh bakteri patogen yang kemungkinan terdapat dalam air terkontaminasi kotoran manusia atau hewan berdarah panas adalah *Shigella,*

yaitu mikroba penyebab gejala diare, demam, kram perut, dan muntah-muntah (Zuhri, 2009).

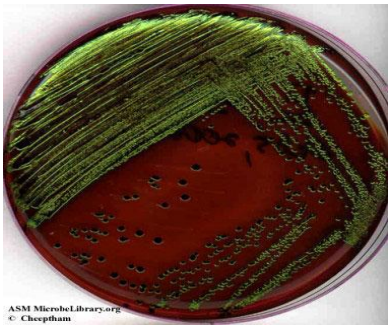
Bakteri *Coliform* biasanya digunakan sebagai organisme indikator. Kriteria paling penting dari organisme indikator adalah mikroba tersebut selalu ada dalam feses manusia sehingga jika terdeteksi dalam air mengindikasikan kontaminasi feses manusia. Organisme indikator juga harus dapat bertahan hidup dalam jangka waktu yang sama dengan patogen (Maulana, 2010).

2. Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah kuman oportunis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri ini bersifat unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus. *Escherichia coli* terdiri dari dua spesies yaitu: *Escherichia coli* dan *Escherichia hermanis* (Irianto, 2007). Banyak strain *Escherichia coli* yang diantaranya tidak berbahaya, terdapat pada saluran gastrointensinal pada manusia atau hewan berdarah panas. Tetapi ada beberapa kategori *Escherichia coli* yang bersifat beracun, dan dapat menyebabkan diare.

Bakteri *Escherichia coli* dalam keadaan normal menghuni saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas, tidak membentuk spora, aerob dan anaerob fakultatif yang memfermentasi laktosa dan mampu menghasilkan asam dan gas dalam waktu 48 jam pada suhu 35 ^{o}C (Pelczar dan Chan, 2006). *Escherichia coli* juga mempunyai sifat motil tak berspora coccobacili pendek, berbentuk menyerupai tongkat dengan ukuran 0,5-1,0 x 4,0 μm, tersusun tunggal atau

berpasangan dan rantai, bentuk koloni putih kelabu gelap rata dengan sisi tepi yang teratur, dalam kaldu turbiditasnya sama dan memproduksi sedimen tebal, pada media biasa diameternya beberapa millimeter. Bakteri ini tergolong bakteri aerob dan anaerob pada suhu 40 °C, pada suhu 60 °C hanya dapat bertahan selama 30 menit, pada umumnya tidak resisten terhadap desinfektan dan pada keadaan yang kering, ada dalam intestinal dan feses manusia sehat dan vertebrata tinggi dan jumlahnya di colon, tumbuh menempel pada media sintetik yang berisi NaCl dan glukosa ditambah vitamin (Ruth, 2009). Adapun gambar koloni *Escherichia coli* dapat disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni bakteri *Escherichia coli* (Pelczar dan Chan, 2006).

Bakteri *Escherichia coli* terdiri atas lima strain yang sifatnya patogen pada manusia dan dapat menyebabkan diare adalah sebagai berikut :

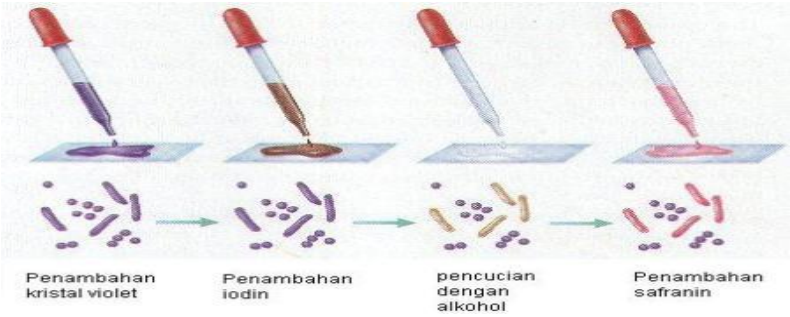
1. *Escherichia coli enteropathogenic* yang menyebabkan diare pada bayi dan anak di negara berkembang dan mekanisme penyakitnya belum jelas.
2. *Escherichia coli enterotoxigenic* yang menyebabkan diare seperti kolera, dengan mekanisme perlekatan kuman pada sel mukosa usus (epitel usus) serta kuman yang mengeluarkan bahan toksin yang mengakibatkan penyakit diare.

3. *Escherichia coli enteroinvasive* yang menyebabkan diare seperti disentri oleh *Shigella* (tinja mengandung darah, mukus), dengan mekanisme kuman dapat menginvasi sel mukosa usus yang mengakibatkan kerusakan sel mukosa dan lapisan mukosa terlepas.
4. *Escherichia coli enterohemoragik* dengan mekanisme kolitis hemoragik, toksinnya bersifat sitotoksik terhadap sel vero dan hela, diare terjadi karena toksin merusak sel endotel pembuluh darah, dan terjadi pendarahan kemudian darah masuk ke usus.
5. *Escherichia coli enteroagregative* yang menyebabkan diare akut dan kronik dalam waktu lebih dari 14 hari terutama di negara sedang berkembang, dengan mekanisme melekatnya kuman pada mukosa intestinal menghasilkan enterotoksin dan sitotoksin sehingga mukosa rusak, mukus keluar, dan terjadi diare.

C. Bakteri Gram Negatif

Coliform dan *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop. Disisi lain, bakteri gram positif akan berwarna ungu (Madigan *et al.*, 2006). Perbedaan keduanya didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel yang berbeda dan dapat dinyatakan oleh prosedur pewarnaan gram (Cooper and Hausman, 2007).

Adapun gambar pewarnaan gram negatif dapat disajikan pada Gambar 2.

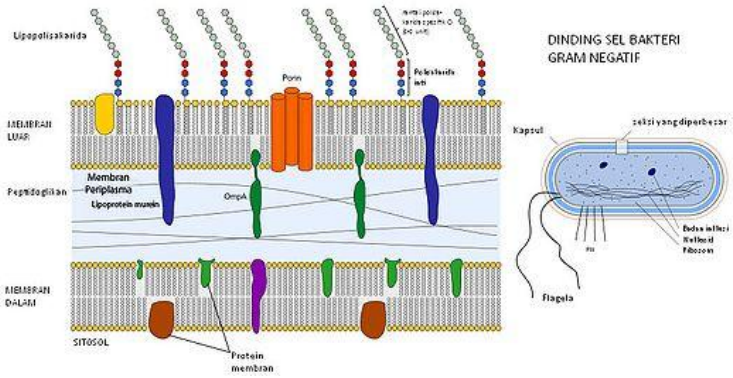


Gambar 2. Pewarnaan gram negatif (Cooper and Hausman, 2007).

Prosedur ini ditemukan pada tahun 1884 oleh ilmuwan Denmark bernama Christian Gram dan merupakan prosedur penting dalam klasifikasi bakteri (Singleton and Sainsbury, 2006). Bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus* (bakteri patogen yang umum pada manusia) hanya mempunyai membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berupa peptidoglikan. Sekitar 90% dari dinding sel tersebut tersusun atas peptidoglikan sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama asam teikhoat. Di sisi lain, bakteri gram negatif (seperti *Escherichia coli*) memiliki sistem membran ganda di mana membran plasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tebal berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya.

Banyak spesies bakteri gram negatif yang bersifat patogen, yang berarti mereka berbahaya bagi organisme inang. Sifat patogen ini umumnya berkaitan dengan komponen tertentu pada dinding sel gram negatif, terutama lipopolisakarida (dikenal juga dengan LPS atau endotoksin) (Prescott, 2002).

Adapun gambar dinding sel bakteri gram negatif dapat disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Dinding sel bakteri gram negatif (Prescott, 2002).

C. Metode Perhitungan Jumlah Bakteri

Ada beberapa macam cara untuk menghitung jumlah sel bakteri, antara lain dengan lempeng total cawan (*plate count*), hitungan mikroskopik langsung (*direct microscopic count*) atau MPN (*Most Probable Number*) (Fardiaz, 2000). Penetapan jumlah bakteri dapat dilakukan dengan menghitung jumlah sel bakteri yang mampu membentuk koloni di dalam media biakan atau membentuk suspensi dalam larutan biak (Schlegel dan Schmidt, 2000).

Metode lempeng total cawan (*plate count*) adalah metode yang paling umum digunakan untuk menentukan jumlah mikroba yang masih hidup berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh. Teknik ini di awali dengan pengenceran sampel dengan kelipatan 1: 10. Masing-masing suspensi pengenceran ditanam dengan metode cawan tuang (pour plate) atau cawan sebar (spread plate). Bakteri akan bereproduksi pada medium agar dan membentuk koloni setelah diinkubasi selama

18-24 jam. Metode ini dibantu dengan menggunakan alat, yaitu *colony counter* (Berazandeh, 2008).

Colony counter adalah alat untuk menghitung jumlah koloni bakteri atau mikroorganisme dalam cawan petri yang biasanya dilengkapi dengan pencatat elektronik. Bakteri yang akan dihitung adalah bakteri yang masih hidup, dengan melakukan pengeceran dari medium bakteri misalnya sampai 3 kali dalam tabung reaksi. Kemudian bakteri ditanam dan diinkubasi, setelah itu dihitung koloni yang tumbuh (Marasahi, 2011). Adapun gambar alat *colony counter* dapat disajikan pada Gambar 4.

Gambar 4. Alat *colony counter*.

Perhitungan jumlah koloni bakteri dipermudah dengan adanya *counter electronic*. Dengan adanya counter tersebut peneliti tinggal menandai koloni bakteri yang dihitung dengan menggunakan pen yang terhubung dengan *counter*. Setiap koloni yang ditandai maka *counter* akan menghitung (Asriyah, 2010).

Metode *plate count* ini terbagi menjadi dua yaitu, metode cawan tuang (*pour plate*) dan cawan sebar (*spread plate*).

1. Metode *pour plate*

Metode *pour plate* (cawan tuang) adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme di dalam media agar dengan cara mencampurkan media agar yang masih cair dengan stok kultur bakteri (agar) sehingga sel-sel tersebut tersebar merata dan diam baik di permukaan agar atau di dalam agar (Harley and Presscot, 2002).

Dalam metode ini diperlukan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri. Setelah diinkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung. Metode *pour plate* sangat mudah dilakukan karena tidak membutuhkan keterampilan khusus dengan hasil biakan yang cukup baik. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan sumber isolat yang telah diketahui beratnya ke dalam 9 mL garam fisiologis (NaCl 0,85%) atau larutan *buffer fosfat*. Larutan ini berperan sebagi penyangga pH agar sel bakteri tidak rusak akibat menurunnya pH lingkungan. Pengenceran dapat dilakukan beberapa kali agar biakan yang didapatkan tidak terlalu padat atau memenuhi cawan (biakan terlalu padat akan mengganggu pengamatan). Sekitar 1 ml suspensi dituang ke dalam cawan petri steril, dilanjutkan dengan menuangkan media penyubur (nutrien agar) steril hangat (40-50 ^{o}C) kemudian ditutup rapat dan diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37 ^{o}C. Penuangan dilakukan secara aseptik atau dalam kondisi steril agar tidak terjadi kontaminasi atau tumbuh atau masuknya organisme yang tidak diinginkan (di laboratorium, kontaminasi biasanya terjadi akibat tumbuhnya kapang, seperti *Penicilium* dalam biakan).

Media yang dituang hendaknya tidak terlalu panas, karena selain mengganggu proses penuangan (media panas sebabkan tangan jadi panas juga), media panas masih mengeluarkan uap yang akan menempel pada cawan penutup, sehingga mengganggu proses pengamatan. Pada metode ini, koloni akan tumbuh di dalam media agar. Kultur diletakkan terbalik, dimasukkan di dalam plastik dengan diikat kuat kemudian diletakkan dalam *incubator*.

Pada metode *pour plate* volume kultur sebanyak 0,1-1,0 mL diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Kemudian ditambahkan media agar cair dan dilakukan pencampuran antara kultur dan media dengan memutar cawan petri secara pelan pada permukaan yang rata. Karena sampel dicampur dengan media agar cair, maka volume kultur yang digunakan dapat lebih tinggi dibanding dengan metode *spread plate*. Pada pengujian dengan metode *pour plate*, kultur/sampel mikroba yang digunakan harus dapat bertahan hidup pada saat media agar dengan suhu sekitar 45 ºC ditambahkan.

Keuntungan metode *pour plate* adalah sebagai berikut:

1. Hanya sel yang masih hidup yang dihitung
2. Beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus
3. Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk
4. Mungkin berasal dari satu sel mikroba dengan penambahan spesifik.

Kelemahan metode *pour plate* adalah sebagai berikut:

1. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroba yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.

2. Medium dan kondisi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda.
3. Mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
4. Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi beberapa hari sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung (Asriyah, 2010).

2. Metode *spread plate*

Metode *spread plate* (cawan sebar) adalah suatu teknik di dalam menumbuhkan mikroorganisme di dalam media agar dengan cara menuangkan stok kultur bakteri di atas media agar yang telah memadat. Kelebihan teknik ini adalah mikroorganisme yang tumbuh dapat tersebar merata pada bagian permukaan media agar.

Pada metode cawan sebar sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri yang telah diencerkan (disebar pada media penyubur steril yang telah disiapkan. Selanjutnya, suspensi dalam cawan diratakan dengan batang drugal agar koloni tumbuh merata pada media dalam cawan tersebut, kemudian diletakkan dalam inkubator (37 ^{o}C) selama 1-3 hari (Pradika, 2008).

Metode ini cukup sulit terutama saat meratakan suspensi dengan batang drugal, untuk menumbuhkan koloni secara merata, biakan justru terkontaminasi. Oleh karena itu, batang drugal harus benar-benar steril, yaitu dengan mensemprotkannya terlebih oleh alkohol kemudian dipanaskan dengan api bunsen. Perlu diingat, batang drugal, yang masih panas akibat pemanasan dengan api bunsen, dapat merusak media agar, sehingga harus didinginkan terlebih dahulu dengan meletakkannya di atas api bunsen dengan jarak sekitar 15 cm.

Di dalam penggunaan metode *spread plate* dan *pour plate* sangat penting jika jumlah koloni yang tumbuh pada media agar tidak terlalu banyak. Hal ini dikarenakan apabila pada cawan petri ditumbuhi koloni yang banyak, beberapa sel tidak dalam bentuk koloni yang tunggal, sehingga dapat menyebabkan perhitungan yang salah. Jumlah koloni yang sangat sedikit juga tidak diharapkan karena secara statistik keakuratan hasil perhitungan jumlah koloni ini sangat rendah. Dalam penerapannya, secara statistik yang paling baik adalah menghitung jumlah koloni hanya jika pada media agar terdapat koloni antara 30-300 koloni (Asriyah, 2010).