

**Kualitas air – Deteksi dan penghitungan bakteri
anaerob pereduksi sulfite pembentuk spora
(*Clostridia*) – Bagian 2: Metode filtrasi dengan
membran**

(ISO 6461-2:1986, IDT)

© BSN 2010

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN

Gd. Manggala Wanabakti

Blok IV, Lt. 3,4,7,10.

Telp. +6221-5747043

Fax. +6221-5747045

Email: dokinfo@bsn.go.id

www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Penggunaan di lapangan.....	1
3 Acuan normatif.....	1
4 Definisi	1
5 Prinsip.....	1
6 Media kultur dan pereaksi.....	2
7 Peralatan dan peralatan gelas.....	3
8 Pengambilan contoh	4
9 Prosedur	4
10 Pelaporan hasil	5
11 Laporan hasil uji.....	5

Prakata

SNI ISO 6461-2:2010 dengan judul *Kualitas air – Deteksi dan penghitungan bakteri anaerob pereduksi sulfite pembentuk spora (Clostridia) – Bagian 2: Metode filtrasi dengan membran* ini merupakan adopsi identik dengan metode terjemahan dari ISO 6461-2:1986, *Water quality - Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (Clostridia) - Part 2: Method by membrane filtration*.

SNI ISO 6461-2:2010 ini disusun atas kerjasama Panitia Teknis 65-05 *Produk Perikanan* dengan Panitia Teknis 13-03 *Kualitas Lingkungan dan Manajemen Lingkungan*, dan telah dibahas dalam rapat konsensus lingkup panitia teknis pada tanggal 27 Oktober 2009 di Jakarta.

Pengguna harus memperhatikan bahwa Standar Internasional mengalami revisi dan setiap acuan yang diterapkan adalah edisi terakhir.

SNI ini disusun sesuai dengan ketentuan yang diberikan dalam:

- a). Pedoman Standardisasi Nasional (PSN) 03.1:2007, Adopsi Standar Internasional dan Publikasi Internasional lainnya Bagian 1: Adopsi Standar Internasional menjadi SNI.
- b). Pedoman Standardisasi Nasional (PSN) 08:2007, Penulisan SNI.

Mengingat standar ini merupakan terjemahan langsung dari naskah bahasa Inggris dan walaupun sudah melalui rapat konsensus, mungkin masih dapat terjadi masalah dalam menginterpretasikannya. Apabila timbul interpretasi yang berbeda, agar memperhatikan naskah asli ISO 6461-2:1986 yang berbahasa Inggris.

Pendahuluan

Spora bakteri anaerob pereduksi sulfit (clostridia) tersebar luas dalam lingkungan. Bakteri ini terdapat pada manusia, kotoran hewan, air limbah dan tanah. Berbeda dengan *Escherichia coli* dan bakteri coliform lainnya, spora-spora tersebut dapat bertahan lama dalam air sehingga spora tersebut lebih tahan terhadap faktor kimia dan fisika dibandingkan dengan bentuk vegetatifnya. Dengan demikian bakteri ini dapat dijadikan sebagai indikator terjadinya pencemaran. Bakteri ini bahkan tahan terhadap klorinasi pada konsentrasi normal yang biasa digunakan dalam pengolahan air, sehingga bakteri ini berguna untuk tujuan pengawasan.

ISO 6461-2:2010 terdiri :

- *Bagian 1. Metode pengkayaan dalam medium cair*
- *Bagian 2. Metode filtrasi dengan membran.*

Kualitas air – Deteksi dan penghitungan spora bakteri anaerob pereduksi sulfit (*Clostridia*) – Bagian 2: Metode filtrasi dengan membran

1 Ruang lingkup

Metode ini spesifik untuk deteksi dan penghitungan spora bakteri anaerob pereduksi sulfit (*clostridia*) dengan filtrasi membran.

2 Penggunaan di lapangan

Metode ini dapat digunakan untuk semua jenis air kecuali air yang mengandung banyak bahan partikulat yang tertahan oleh membran.

3 Acuan normatif

ISO 3696, *Water for laboratory use-Specifications*

ISO 5667, *Water quality – sampling -*

Part 2 : Guidance on sampling techniques

Part 3 : Guidance on the preservation and handling of samples

ISO 7704, *Water quality – Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses.*

ISO 8199, *Water quality – General guidance for microbiological examination by enumeration of microorganisms on culture media*

4 Definisi

Untuk penggunaan SNI ISO 6461bagian ini, berlaku definisi sebagai berikut.

4.1

clostridia

mikroorganisme anaerob pereduksi sulfit, membentuk spora yang termasuk dalam famili Bacillaceae dan genus *Clostridium*

5 Prinsip

Deteksi spora bakteri anaerob pereduksi sulfit (*clostridia*) dalam air memerlukan tahapan sebagai berikut.

5.1 Pemilihan spora

Pemilihan spora dilakukan dengan cara memanaskan contoh uji dalam waktu yang cukup untuk menghancurkan bakteri vegetatif.

5.2 Filtrasi dengan membran dan kultur

Saring contoh air dengan menggunakan filter membran berukuran pori 0,2 µm sehingga spora-spora bakteri tertahan pada filter membran.

Letakkan filter membran pada media selektif (*sulfite-iron-agar*), kemudian inkubasi pada suhu $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ selama (20 ± 4) jam dan (44 ± 4) jam dan hitung setiap koloni yang berwarna hitam.

6 Media kultur dan pereaksi

6.1 Bahan-bahan dasar

Untuk meningkatkan reproduibilitas hasil pengujian disarankan pada persiapan pengencer dan kultur media menggunakan komponen kering (*dehydrated basic*) atau *complete dehydrated*. Media komersial dapat juga digunakan dan harus mengikuti petunjuk yang ditetapkan oleh manufaktur.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk kultur media dan pereaksi harus berkualitas analitis.

Air yang digunakan harus didestilasi atau air deionisasi, bebas dari unsur - unsur yang mungkin menghambat pertumbuhan mikroorganisme sesuai dengan kondisi pengujian (lihat ISO 3696).

Pengukuran pH harus dilakukan dengan menggunakan pH meter pada suhu 25°C .

Jika media kultur yang disiapkan tidak langsung digunakan, maka harus disimpan dalam ruang gelap pada suhu 4°C selama tidak lebih dari 1 bulan.

6.2 Sulfite-Iron-Agar

6.2.1 Media basal (*nutrient agar*)

Komposisi

<i>Meat extract</i>	3 g
Pepton	10 g
<i>Natrium Klorida</i> (NaCl)	5 g
Agar	15 g
Akuades	1000 ml

Persiapan

Panaskan sampai larut, tambahkan air hingga volume 1 liter, dan atur pH $(7,6 \pm 0,1)$ dengan larutan Natrium hidroksida 1 mol/l. Sterilisasi pada suhu $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ dalam *autoclave* selama 20 menit.

Simpan dalam refrigerator setelah padat.

6.2.2 Larutan Natrium Sulfit (Na_2SO_3)

Larutkan 10 gram natrium sulfit dalam 100 ml akuades.

Disarankan larutan dibuat segar, setiap 2 minggu.

6.2.3 Larutan besi (II) sulfat (FeSO_4)

Larutkan 8 gram kristal besi (II) sulfat dalam 100 ml akuades.

6.2.4 Medium lengkap

Sebelum digunakan cairkan media dasar (6.2.1) dan setiap 18 ml volume tambahkan 1 ml larutan natrium sulfit (6.2.2) dan 5 tetes larutan besi (II) sulfat (6.2.3).

Tambahkan 1 ml larutan natrium sulfit dan 5 tetes larutan besi (II) sulfat ke tabung agar sebelum melakukan prosedur berikutnya (lihat 9.3).

6.3 Tryptose-sulfite-Agar (media pilihan)**Komposisi**

<i>Tryptose</i>	15 g
<i>Soytone</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	5 g
Natrium metabisulfit	1 g
Amonium besi (II) sitrat	1 g
Akuades	1000 ml

Persiapan

Panaskan sampai larut, dan atur pH hingga ($7,6 \pm 0,1$) pada suhu 25°C .

Tuangkan 18 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilisasi media pada suhu (121 ± 1) $^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

Simpan dalam refrigerator pada suhu 4°C sampai dengan 5°C .

Buang media yang tidak digunakan setelah 2 minggu persiapan.

7 Peralatan dan peralatan gelas

Peralatan umum laboratorium mikrobiologi, dan

7.1 Peralatan gelas (labu Erlenmeyer, labu beralas bulat atau labu conical) kapasitas 2 liter

7.2 Tabung reaksi, ukuran 160 mm x 16 mm.

7.3 Pipet ukur, kapasitas 10 ml ketelitian 0,1 ml.

7.4 Pipet volumetrik, kapasitas 10 ml.

SNI ISO 6461-2:2010

7.5 Jars, kapasitas 1 liter.

7.6 Pemanas.

7.7 Penangas air (*Water bath*).

7.8 Seperangkat alat filtrasi membran.

7.9 Filter membran steril, ukuran pori 0,2 μm .

CATATAN Kualitas filter membran sangat bervariasi dari berbagai merk dagang atau dari *batch* ke *batch*. Oleh karena itu disarankan untuk memeriksa mutunya secara berkala sesuai ISO 7704.

7.10 Inkubator, terkontrol pada suhu $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.11 Cawan petri

8 Pengambilan contoh

Mengacu pada ISO 5667-2 dan ISO 8199 tentang teknik pengambilan contoh.

9 Prosedur

9.1 Penanganan contoh uji

Petunjuk pengawetan dan penanganan contoh uji mengacu pada ISO 5667-3 dan ISO 8199.

9.2 Pemilihan spora (teknik)

Sebelum melakukan pengujian contoh air harus dipanaskan pada penangas air dengan suhu $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ selama 15 menit mulai dari saat tercapainya suhu. Sebagai kontrol waktu pemanasan yang diperlukan, gunakan wadah dan volume yang sama dengan contoh yang diuji secara berkala. Suhu air dalam wadah kontrol dapat diukur dengan termometer.

9.3 Inokulasi dan inkubasi

Deskripsi umum teknik filtrasi dengan membran mengacu pada ISO 7704.

Menurut petunjuk pada dokumen tersebut, saring contoh air dengan volume yang sesuai. Untuk air minum, air tanah dan mata air, air mineral, air laut dan air permukaan, air yang kurang tercemar dengan clostridia saring 100 ml. Air dengan pencemaran tinggi atau air limbah domestik menggunakan volume yang lebih kecil. Volume air yang lebih kecil dari 10 ml harus dicampur dengan 10 sampai 100 ml air steril atau pengencer.

Lakukan pengenceran sehingga koloni berwarna hitam yang dihasilkan dapat dipisahkan dan dapat mudah dihitung.

Setelah disaring pindahkan membran dengan *forceps steril* dan letakkan pada cawan Petri, pastikan tidak ada gelembung udara di bawah penyaring. Kemudian dengan hati-hati tuang 18 ml medium lengkap yang berbentuk cair, yang sebelumnya didinginkan sekitar 50°C, di atas membran yang ditahan dengan *forceps steril*. Setelah padat inkubasi secara anaerob atau kondisi lain yang menjamin anaerob pada suhu $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ selama (20 ± 4) jam dan (44 ± 4) jam. Jika menggunakan *jar* anaerobik atau inkubator anaerobik, filter membran dapat diletakkan di permukaan media agar dengan posisi menghadap ke atas.

9.4 Interpretasi

Hitung semua koloni yang berwarna hitam setelah diinkubasi selama (20 ± 4) jam dan (44 ± 4) jam.

10 Pelaporan hasil

Laporkan hasil sesuai dengan ISO 8199.

11 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji harus sesuai dengan metode yang digunakan dan nyatakan hasil sebagai jumlah bakteri anaerob pereduksi sulfat pembentuk spora (*clostridia*) per volume contoh uji. Hasil yang dilaporkan sebaiknya didapat dari penghitungan normal (44 ± 4) jam. Jika ini tidak memungkinkan penghitungan pada (20 ± 4) jam dilaporkan sebagai perkiraan.

Laporan hasil uji juga harus menjelaskan secara detail yang tidak spesifik dituangkan pada ISO 6461 atau setiap penyimpangan yang sekiranya dapat mempengaruhi hasil uji.

Laporan hasil uji harus termasuk semua informasi yang dibutuhkan untuk mengidentifikasi contoh uji secara lengkap.

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id