

# PENGENDALIAN SEL BIOFILM BAKTERI PATOGEN OPORTUNISTIK DENGAN PANAS DAN KLORIN

Yusnita Wahyuni Silitonga<sup>1</sup>, It Jamilah<sup>2</sup> dan Dwi Suryanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara

<sup>2</sup> Staf Pengajar Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara  
Jalan Bioteknologi No. 1 Kampus USU Padang Bulan Medan, Sumatera Utara 20155  
E-mail: ainaya\_zahra@yahoo.com, it\_jamilah@yahoo.com

## Abstract

Opportunistic pathogenic bacteria are bacteria that are naturally not present in an environment that, but it dues to contamination of the environment by human waste. From previous research it was found *E. coli*, *Staphylococcus* sp. and *Salmonella* were opportunistic pathogens of the shrimp aquaculture (Percut, Pantai Labu, Pantai Cermin). The aims of this study is to know the ability of these bacteria to form biofilms as well as its control using chlorine and heat. In order to test the ability of the bacteria to form biofilms, the stainless steel have been soaked in SWC media for 1, 3, 6 days. *E. coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus* sp. may form biofilms on incubation of the 1<sup>st</sup> day but the highest growth was on the 6<sup>th</sup> day of incubation by *E. coli* with a  $6,35 \times 10^4$  CFU/SS, whereas of the lowest biofilm number was found in *Salmonella* with a  $0,28 \times 10^4$  CFU/SS. The number of biofilm cells grow in line with a length of incubation. In this research, the most effective concentration of chlorine to kill biofilm cell was 225 ppm for 2 minutes and heat was 100 °C for 5 minutes. The higher the concentration of chlorine and the temperature given more effective to kill the bacteria.

Keyword: biofilm, chlorine, heat, opportunistic, *stainless steel*

## Pendahuluan

Bakteri patogen oportunistik merupakan bakteri yang secara alami bukan berada di habitat suatu lingkungan tapi masuk akibat tercemarnya lingkungan dengan limbah manusia. Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan tiga jenis bakteri oportunistik dari tambak udang di Kota Medan dan sekitarnya (Percut, Pantai Labu dan Pantai Cermin). Bakteri tersebut ialah *E. coli*, *Staphylococcus* sp. dan *Salmonella* yang diduga masuk ke tambak melalui pasokan air tambak dari sungai. Ketiga bakteri tersebut dikhawatirkan dapat membentuk biofilm pada alat pengolahan makanan pada saat sanitasi seperti *stainless steel*.

Pada saat sekarang ini, penelitian mengenai biofilm di bidang industri pangan semakin meluas. Hal ini terjadi karena potensinya yang besar sebagai sumber kontaminan yang berperan terhadap kerusakan pangan seperti pembusukan produk dan penyebaran penyakit. Beberapa

penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa jika mikroba dapat membentuk biofilm pada proses pertumbuhannya, daya tahan terhadap kondisi-kondisi buruk lebih tinggi jika dibandingkan dengan pertumbuhannya sebagai sel planktonik (Donlan, 2002).

Peningkatan ketahanan biofilm terhadap senyawa desinfektan dan suhu tinggi terjadi karena adanya mekanisme pertahanan sel biofilm. Adanya senyawa polisakarida ekstraselular yang dihasilkan biofilm dapat memberikan perlindungan sehingga biofilm tahan terhadap senyawa kimia dan suhu tinggi. Umur sel biofilm juga merupakan faktor yang menyebabkan berbedanya ketahanan sel biofilm terhadap senyawa kimia. Semakin lama umur sel biofilm maka ketahanannya terhadap desinfektan semakin tinggi karena terbentuknya beberapa lapis sel biofilm (multilayers) pada substrat (Bal'a *et al.*, 1998)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri *E. coli*, *Staphylococcus* sp. dan *Salmonella* dalam membentuk biofilm pada pelat *stainless steel*. Selain itu penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui kemampuan panas dan klorin dalam mengendalikan sel biofilm.

## Bahan dan Metode

### Pembentukan dan Penghitungan Sel Biofilm

Lempeng *Stainless steel* (SS) dipotong seluas 1 cm<sup>2</sup>, dicuci dengan deterjen pada bak sonikator lalu disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit, tekanan 1 atm, suhu 121<sup>0</sup>C. Lempeng ini digunakan untuk substrat pelekatan biofilm. Masing-masing isolat murni yang diperoleh dari tambak udang ditumbuhkan pada 50 ml media Sea Water complete (SWC) dengan konsentrasi sel 10<sup>8</sup> CFU/ml, dalam labu Erlenmeyer 100 ml. Setelah itu 6 lempeng SS dimasukkan ke masing-masing media pengkulturan tersebut, kemudian digoyang pada kecepatan 100 rpm, pada suhu ruang 28<sup>0</sup>C. Pembentukan dan pertumbuhan biofilm dilihat pada periode waktu 1 hari, 3 hari dan 6 hari untuk melihat perkembangan sel.

Selanjutnya lempeng SS diangkat dari kultur dengan menggunakan pinset steril, dibilas sebanyak 3 kali dengan akuades steril hingga sel planktonik terlepas. Lempeng SS dimasukkan ke dalam 10 ml NaCl 0,9 % pada tabung reaksi yang ditambah dengan 0.5g manik-manik kaca kemudian divorteks selama 1 menit untuk melepas sel biofilm. Pengenceran dilakukan dengan mengambil sebanyak 0.1 ml kultur kemudian disebar pada media Plate Count Agar (PCA), diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28<sup>0</sup>C kemudian dilakukan penghitungan. Ulangan dibuat sebanyak 2 kali.

### Pengendalian Sel Bakteri dengan Klorin

Untuk mengetahui kemampuan klorin dalam mengendalikan *E. coli*, *Staphylococcus* sp. dan *Salmonella* dilakukan uji pengendalian bakteri tersebut secara *in vitro*. Bakteri *E. coli*, *Staphylococcus* sp. dan *Salmonella* disuspensikan sebanyak 10<sup>8</sup> sel/ml (standard *McFarland*). 0,1 ml dari suspensi tersebut disebar pada media SWC kemudian diinkubasi selama 1 hari. Cakram yang mengandung klorin 75, 150, dan 227 ppm diletakkan pada bagian tengah media yang ditumbuhi bakteri. Kultur bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam. Diameter zona bening

dihitung dengan mengukur selisih diameter zona bening dengan diameter cakram.

### Perlakuan Panas dan Klorin untuk Pengendalian Biofilm

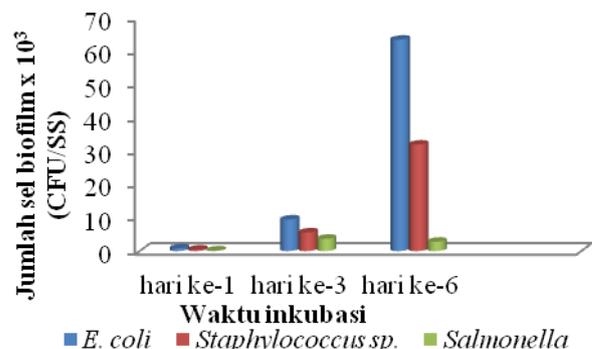
Untuk perlakuan klorin terhadap sel biofilm dilakukan dengan cara lempeng SS dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi klorin dengan konsentrasi 75, 150, dan 225 ppm. SS dibiarkan selama 2 dan sel biofilm dihitung dengan cara yang sama pada metode sebelumnya.

Perlakuan panas pada SS dilakukan dengan beberapa tahap yaitu akuades steril dipanaskan dalam gelas beaker di atas *hot plate*, hingga mencapai suhu 50, 75, dan 100<sup>0</sup>C. Lempeng *stainless steel* (SS) yang telah ditumbuhi sel biofilm dimasukkan ke dalam beaker masing-masing selama 5 menit. Es batu dimasukkan ke dalam beaker gelas agar panas tidak berkelanjutan dan sel biofilm dihitung dengan cara yang sama pada metode sebelumnya.

## Hasil dan Pembahasan

### Pembentukan Sel Biofilm pada *Stainless Steel*

Pertumbuhan sel biofilm *E. coli* dan *Staphylococcus* sp. pada media SWC terus meningkat sampai waktu inkubasi 6 hari. Jumlah sel biofilm tertinggi yang terbentuk ialah *E. coli* pada hari ke-6 yaitu 6,35 x 10<sup>4</sup> CFU/SS dan yang terendah ialah *Salmonella* yaitu 0,28 x 10<sup>4</sup> CFU/SS (Gambar 1). Menurut Dewanti & Hariyadi (1997) *E. coli* memiliki kemampuan yang tinggi membentuk biofilm ketika dalam kondisi ekstrim. Asooriya & Asam (2006) melaporkan bahwa *Salmonella* memiliki potensi paling rendah membentuk biofilm pada alat-alat pengolahan produk makanan laut.



### Gambar 1. Grafik pertumbuhan sel biofilm pada stainless steel

Jumlah sel biofilm bakteri pada hari ke-1 ialah *E. coli*  $0,84 \times 10^3$  CFU/SS, *Staphylococcus* sp.  $0,46 \times 10^3$  CFU/SS dan *Salmonella*  $0,17 \times 10^3$  CFU/SS. Jumlah ini masih cukup rendah karena pada tahap tersebut kemungkinan bakteri masih melakukan transpor ke permukaan SS, proses tersebut merupakan tahap awal pembentukan biofilm. Pada tahap ini yang paling berpengaruh adalah motilitas bakteri. Cepat lambatnya pergerakan bakteri dipengaruhi oleh flagel. Menurut Mattila (2002) *E. coli* memiliki flagel sebagai alat motilitas untuk transpor bakteri tersebut ke permukaan sehingga jumlah biofilmnya lebih tinggi dibanding yang lain. Kebanyakan jenis *Salmonella* juga melakukan motilitas dengan flagel (Mangalore, 2010). Berbeda dengan *Staphylococcus* sp. yang tidak memiliki flagel (Pelczar & Chan, 2008) sehingga motilitasnya sangat rendah, tetapi sel biofilm yang dibentuknya cukup tinggi dibanding *Salmonella* karena *Staphylococcus* sp. memiliki muatan ion positif pada membran yang mempermudah bakteri tersebut menempel pada SS (Dewanti & Hariyadi, 1997).

Pertumbuhan sel biofilm pada inkubasi hari ke-3 terus meningkat. *E. coli* dari  $0,84 \times 10^3$  CFU/SS menjadi  $0,95 \times 10^4$  CFU/SS, *Staphylococcus* sp. dari  $0,46 \times 10^3$  CFU/SS menjadi  $0,56 \times 10^4$  CFU/SS dan *Salmonella* dari  $0,17 \times 10^3$  CFU/SS menjadi  $0,37 \times 10^4$  CFU/SS. Pada tahap ini kemungkinan ekstrapolisakarida (EP) sudah banyak dihasilkan. Pada dasarnya EP berperan dalam proses penempelan, akan tetapi EP juga berperan dalam perlindungan sel biofilm. EP melindungi dengan cara menyelubungi koloni bakteri yang menempel. Pada kondisi ekstrim misalnya kehadiran senyawa antimikroba EP akan menghalangi antimikroba masuk ke membran bakteri. Dewanti & Wong (1995) menemukan bahwa *E. coli* tidak memproduksi EP dalam jumlah yang lebih banyak, akan tetapi EP yang dihasilkan mengandung asam glukuronat dan manosa sedangkan sel planktonik menghasilkan EP yang terdiri dari asam glukuronat, manosa, dan glukosa. Dapat disimpulkan bahwa bakteri membentuk EP spesifik pada proses pembentukan biofilm.

Pada inkubasi hari ke-6 hanya *E. coli* dan *Staphylococcus* yang mengalami peningkatan. *E. coli* dari  $0,95 \times 10^3$  CFU/SS menjadi  $6,35 \times 10^4$  CFU/SS, *Staphylococcus* sp. dari  $0,56 \times 10^4$  CFU/SS menjadi  $0,32 \times 10^5$  CFU/SS. Peningkatan jumlah sel biofilm dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi pada media. Terbatasnya nutrisi mengharuskan bakteri menyesuaikan diri dalam memperoleh sumber energi, misalnya terjadinya *rounding* (sel menjadi bulat) dan *dwarfing* (mengecil ukuran dan volume) pada morfologi sel bakteri (Hood & Zottola, 1997). Dewanti & Wong (1995), menyatakan bahwa mengecilnya ukuran sel pada *E. coli* juga diikuti dengan meningkatnya hidrofobitas dan agregasi sel-sel menyebabkan meningkatnya massa yang dapat meningkatkan peran gravitasi pada proses transport bakteri ke permukaan SS.

Dari Gambar 1 juga dapat dilihat bahwa jumlah *Salmonella* mengalami fluktuasi. Pada hari ke-3 jumlah biofilm  $0,37 \times 10^4$  CFU/SS sedangkan hari ke-6  $0,28 \times 10^4$  CFU/SS. Kemungkinan ini terjadi karena lepasnya sel biofilm dari pelat SS. Menurut Yunus (2000) bakteri yang dapat balik menjadi sel planktonik terjadi karena adanya interaksi lemah yang tidak spesifik diantara bakteri dan permukaan. Penyebab lain ialah terlepasnya sel anak hasil pembelahan sel biofilm dari komunitas biofilm karena EP tidak mampu mempertahankannya.

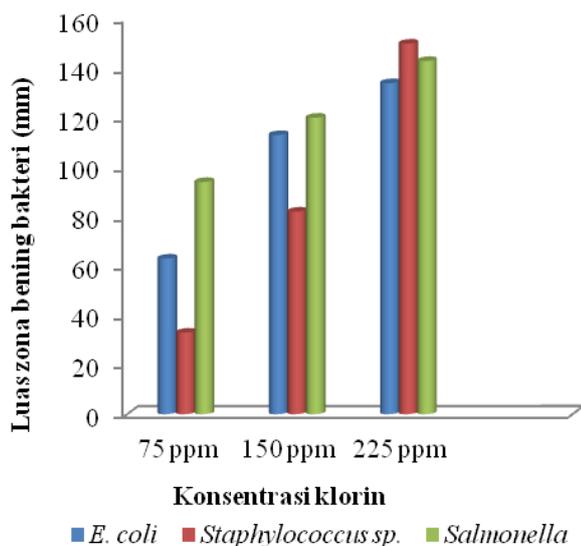
### Pengendalian Bakteri dengan Klorin

Klorin merupakan desinfektan yang mampu menghambat dan membunuh bakteri. Kemampuan klorin dalam menghambat pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari diameter zona bening yang terbentuk pada media. Zona bening yang terbentuk dapat dilihat dari Gambar 2.



Gambar 2. Pengendalian bakteri dengan klorin (A) 75 ppm pada *E. coli* (B) 150 ppm pada *E. coli* (C) 225 ppm pada *E. coli*

Pada perlakuan klorin 75 ppm zona bening yang terbentuk ialah *E. coli* 63 mm, *Staphylococcus* sp. 33 mm dan *Salmonella* 94 mm. Konsentrasi klorin 150 ppm zona bening yang terbentuk ialah *E. coli* 113 mm, *Staphylococcus* sp. 82 mm, dan *Salmonella* 120 mm. Zona bening yang terbentuk pada konsentrasi klorin 225 ppm ialah *E. coli* 134 mm, *Staphylococcus* sp. 150 mm dan *Salmonella* 143 mm seperti pada Gambar 3.



**Gambar 3. Luas zona bening bakteri**

Zona bening terbentuk karena bakteri yang terpapar dengan klorin mengalami kematian. Semakin tinggi konsentrasi klorin yang diberikan maka diameter zona bening yang terbentuk semakin besar karena lebih banyak bakteri yang terhambat pertumbuhannya.

Menurut Rosyidi (2008) klorin mampu membunuh mikroorganisme patogen seperti bakteri dengan cara memecah ikatan kimia pada molekulnya seperti merubah struktur ikatan enzim, bahkan merusak struktur kimia enzim. Ketika enzim pada mikroorganisme terpapar dengan klorin, satu atau lebih dari atom hidrogen akan diganti oleh ion klor. Hal ini dapat menyebabkan berubahnya ikatan kimia pada enzim tersebut atau bahkan memutus ikatan kimia enzim, sehingga enzim pada mikroorganisme tidak dapat berfungsi dengan baik dan sel atau bakteri akan mengalami kematian.

Menurut Yunus (2000) kemampuan klorin dalam mengendalikan bakteri dapat melalui persenyawaannya dengan protein membran sel yang membentuk N-kloro yang kemudian melalui metabolisme sel mengakibatkan kematian organisme. Efek bakterisidal dari hipoklorit berlangsung dalam 2 fase, pertama penetrasi bahan aktif germisidal ke dalam bakteri, dan reaksi bahan kimia tersebut dengan protoplasma sel untuk membentuk kompleks toksik (senyawa N-kloro) yang dapat merusak organisme. Diduga senyawa toksik ini dapat menghambat proses pertumbuhan sel biofilm.

### Pengendalian Sel Biofilm dengan Klorin

Konsentrasi klorin mempengaruhi kemampuannya dalam mengendalikan sel biofilm. Selain itu faktor yang mempengaruhi dalam pengendalian biofilm adalah umur biofilm tersebut. Jumlah sel biofilm setelah perlakuan klorin dapat dilihat dari Tabel 1 di bawah ini :

**Tabel 1. Pengendalian sel biofilm bakteri patogen oportunistik dengan klorin**

Bakteri	Konsentrasi klorin (ppm)	Jumlah sel biofilm (CFU/SS)		
		Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
<i>E. coli</i>	0	$0,84 \times 10^4$	$0,95 \times 10^4$	$63,5 \times 10^3$
	75	$6,15 \times 10^2$	$0,54 \times 10^4$	$9,95 \times 10^3$
	150	$0,31 \times 10^3$	$0,11 \times 10^3$	$3,15 \times 10^3$
	225	-	-	$0,05 \times 10^4$
<i>Staphylococcus</i> sp.	0	$0,46 \times 10^3$	$0,56 \times 10^4$	$0,32 \times 10^5$
	75	$2,22 \times 10^2$	$0,01 \times 10^4$	$4,85 \times 10^3$
	150	$0,85 \times 10^2$	$0,03 \times 10^4$	$1,45 \times 10^3$
	225	-	-	$0,15 \times 10^3$
<i>Salmonella</i>	0	$0,17 \times 10^3$	$0,37 \times 10^4$	$0,28 \times 10^4$
	75	$0,83 \times 10^2$	$0,08 \times 10^4$	$2,05 \times 10^3$
	150	$0,65 \times 10^2$	$0,25 \times 10^3$	$1,45 \times 10^3$

Ket : (-) tidak ditemukan bakteri

Bakteri *E. coli* yang diberi perlakuan klorin dengan konsentrasi 75 ppm masih tumbuh yaitu  $6,15 \times 10^2$  CFU/SS tapi pada konsentrasi 225 ppm *E. coli* tidak tumbuh lagi. Konsentrasi desinfektan sangat berpengaruh terhadap densitas biofilm pada pelat SS. Yunus (2000) menyatakan bahwa sanitasi menggunakan klorin 200 ppm memberikan persentasi penurunan dibanding dengan menggunakan klorin 100 ppm. Dewanti & Hariyadi (1997) menyatakan bahwa senyawa klorin dengan konsentrasi 200 ppm mampu membunuh sel biofilm *Salmonella blockly* inkubasi 2 hari pada permukaan SS.

Pengendalian sel biofilm dengan klorin pada konsentrasasi 225 ppm masih kurang efektif untuk sel biofilm umur 6 hari. Hal ini dapat disebabkan karena biofilm lebih stabil pada inkubasi hari ke-6, sehingga pengendalian dengan klorin sulit. Terbentuknya beberapa lapis biofilm (multilayer) menyebabkan senyawa klorin tidak bisa menembus bagian dalam. Menurut Bal'a *et al.*, (1998) desinfeksi pada sel biofilm hanya terjadi pada bagian terluar karena sulit masuk ke bagian terdalam biofilm, padahal semua sisi biofilm berpeluang menjadi kontaminan sehingga diperlukan pengendalian khusus. Pada hari ke-6 jumlah nutrisi juga semakin terbatas. Dewanti & Hariyadi (1997) menyatakan terbatasnya nutrisi dalam medium pertumbuhan menyebabkan laju pertumbuhan sel yang lambat. Laju pertumbuhan yang rendah dapat meningkatkan ketahanan bakteri biofilm terhadap senyawa antibiotik, dan juga ketahanannya terhadap desinfektan.

Kaporit ketika dilarutkan dalam air akan berubah menjadi asam hipoklorit (HOCl) dan ion hipoklorit (OCI<sup>-</sup>) yang memiliki sifat desinfektan. Klorin mampu melakukan reaksi hidrolisis dengan berbagai komponen kimia bakteri seperti peptidoglikan, lipid dan protein yang dapat menimbulkan kerusakan fisiologis dan mekanisme seluler bakteri. Klor aktif dapat melakukan inaktivasi kerja enzim dengan cara merubah ikatan kimia atau bahkan memutus ikatan kimia enzim. Klor juga dapat mengganggu proses sintesis protein bakteri dengan memodifikasi basa purin dan pirimidin (Rosyidi, 2008).

Matriks ekstraselular dikeluarkan oleh bakteri untuk membantu penempelannya pada SS. Semakin banyak jumlah senyawa ekstraselular tersebut semakin menghalangi kemampuan penetrasi klorin. Selain menghalangi penetrasi, kehadiran senyawa ekstraselular yang sebagian besar merupakan senyawa organik, akan menghambat mekanisme kerja senyawa klorin. Jenie dalam Yunus (2000) menyatakan bahwa salah satu kelemahan penggunaan senyawa klorin sebagai desinfektan adalah mampu diinaktivasi oleh senyawa organik.

### Pengendalian dengan Panas

Sel biofilm dapat dikendalikan dengan suhu tinggi. Perlakuan biofilm pada suhu 100°C menyebabkan kematian biofilm pada inkubasi 1 hari. Sedangkan pada inkubasi 3 dan 6 hari sel biofilm tidak semua dapat dikendalikan (Tabel 2)

**Tabel 2. Pengendalian sel biofilm bakteri patogen oportunistik dengan panas**

Bakteri	Tinggi Suhu	Jumlah sel biofilm (CFU/SS)		
		Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-6
<i>E. coli</i>	Suhu ruang	$0,84 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$	$6,35 \times 10^4$
	50°C	$0,85 \times 10^3$	$9,25 \times 10^3$	$2,73 \times 10^3$
	75°C	$0,03 \times 10^3$	$0,78 \times 10^3$	$0,98 \times 10^3$
	100°C	-	$0,95 \times 10^3$	$2,95 \times 10^3$
<i>Staphylococcus sp</i>	Suhu ruang	$0,46 \times 10^3$	$0,56 \times 10^4$	$0,32 \times 10^5$
	50°C	$3,25 \times 10^2$	$0,39 \times 10^4$	$2,97 \times 10^4$
	75°C	$0,81 \times 10^2$	$0,08 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$
	100°C	-	$0,02 \times 10^4$	$0,95 \times 10^3$
<i>Salmonella</i>	Suhu ruang	$0,17 \times 10^3$	$0,37 \times 10^4$	$0,28 \times 10^4$
	50°C	$0,16 \times 10^3$	$0,35 \times 10^4$	$2,51 \times 10^2$
	75°C	$0,34 \times 10^2$	$0,05 \times 10^4$	$0,95 \times 10^3$

---

100<sup>0</sup>C

-

0,05 x 10<sup>3</sup>

0,07 x 10<sup>3</sup>

---

Ket : (-) tidak ditemukan bakteri

Suhu dimana enzim berfungsi dengan sempurna disebut suhu optimum. Bila suhu ini menyimpang dari suhu optimum, maka aktivitas enzim menurun. Kisaran suhu tidak hanya mempengaruhi aktivitas enzim saja, namun mempengaruhi sifat fisik membran. Permeabilitas membran sel tergantung pada kandungan dan jenis lipida. Peningkatan 5<sup>0</sup> – 10<sup>0</sup>C di atas suhu optimum dapat menyebabkan proses lisis dan kematian sel mikroorganisme (Lay, 1994).

Panas yang mematikan bakteri bergantung pada banyak faktor yaitu ketahanan panas bakteri, jumlah sel, suhu, dan waktu yang digunakan selama pemanasan (Astuti. 2012). Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa sel biofilm susah di bunuh walaupun dengan suhu 100<sup>0</sup>C. Menurut Dewanti & Wong (1995) biofilm menghasilkan senyawa ekstrapolisakarida yang berfungsi untuk melindungi bakteri. Lapisan ekstrapolisakarida tersebut menghambat panas untuk kontak langsung dengan bakteri, walaupun suhu yang diberikan 100<sup>0</sup>C tidak semua bakteri dapat dibunuh, tapi yang rusak ialah senyawa ekstrapolisakarida dan sebagian bakteri yang dekat dengan permukaan.

### Kesimpulan

Dari ketiga bakteri patogen oportunistik *E. coli*, *Staphylococcus* sp. dan *Salmonella* yang paling tinggi jumlah biofilmnya ialah *E. coli* yaitu 6,35 x 10<sup>4</sup> dan yang terendah ialah *Salmonella* yaitu 2,8 x 10<sup>4</sup>. Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa semakin tinggi suhu dan konsentrasi klorin yang diberikan semakin efektif dalam mengendalikan sel biofilm.

### Daftar Pustaka

Astuti,T. 2012. Studi kandungan bakteri *Salmonella* sp. pada minuman susu telur madu jahe (STMJ) di Taman Kota Damay Kecamatan Kota Gorontalo. [Skripsi]. Gorontalo: FKM Universitas Negeri Gorontalo. hlm 8.

Bal'a, MFA, I. Jamilah & D.L. Mrshall. 1998. Attachment of *Aeromonas hydrophyla* to stainless steel surface. *Food Environ. Sanit.* 18: 645.

Dewanti, R & A.C.L. Wong 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Intl. J. Food Mikrobiol.* 26: 147.

Dewanti, R & Hariyadi. 1997. Pembentukan biofilm bakteri pada permukaan padat. *Bul Teknol dan Industri Pangan.* 8 : 71-74

Donlan, R. M. 2002. Biofilms: Microbial life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* 8: 881-890.

Hood, S.K. & Zottola. 1997. Growth Media and Surface Conditioning Influence the Adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella thyphimurium*, and *Listeria monocytogenes* Bacteria to stainless steel. *J Food Protection* : 60 : 1034

Lay B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta: Rajawali Press. hlm. 111.

Mangalore, I. 2010. FAO expert workshop on the application of biosecurity measures to control *Salmonella* contamination in Sustainable Aquaculture. *J. Fisheries Aquac* 19: 8-11.

Mattila, K. 2002. Biofilm on stainless steel exposed to process water. Finland: Microbiology of University of Helsinki. hlm. 9-10.

Rosyidi, M.B. 2010. Pengaruh breakpoint chlorination (BPC) terhadap jumlah bakteri koliform dari limbah cair rumah sakit umum daerah Sidoarjo. [Skripsi]. Surabaya: FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember. hlm. 3-6.

Yunus, L. 2000. Pembentukan biofilm oleh *Salmonella blockey* pada permukaan stainless steel serta Pengaruh Sanitasi terhadap Pembentukan kembali Biofilm Baru. [Skripsi]. Bogor: IPB. hlm. 12-15.