

**Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* sebagai Penanda
Genetik Potensial untuk Deteksi Molekuler
Enterobacteriaceae pada Sampel Air**

Skripsi



EUNIKE ILONA HILSON

31110011

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2015

Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* sebagai Penanda Genetik Potensial untuk Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Sampel Air

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana



Eunike Ilona Hilson

31110011

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2015

Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul:

SEKUEN PARSIAL GEN *rpoB* DAN *gyrB* SEBAGAI PENANDA GENETIK POTENSIAL
UNTUK DETEKSI MOLEKULER Enterobacteriaceae PADA SAMPEL AIR.

telah diajukan dan dipertahankan oleh:

EUNIKE ILONA HILSON

31110011

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

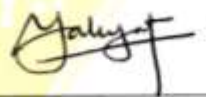
dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Sarjana Sains pada tanggal 30 September 2015.

Nama Dosen

1. Dr. Dhira Satwika, M. Sc
(Dosen Pembimbing I/Penguji)
2. Tri Yahya Budiarso, S.Si, MP
(Dosen Pembimbing II/Penguji)
3. Dr. Charis Amarantini, M.Si
(Dosen Penguji/Ketua Tim Penguji)

Tanda Tangan



Yogyakarta, 12 Oktober 2015

Disahkan oleh:

Dekan,



Drs. Kisworo, M.Sc

Ketua Program Studi



Dr. Dhira Satwika, M.Sc

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eunike Ilona Hilson

NIM : 31110011

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

“Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* Sebagai Penanda Genetik Potensial untuk Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Sampel Air”

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 12 Oktober 2015




Eunike Ilona Hilson

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang MahaEsa, karena atas berkat, rahmat, dan kasih karunia-Nya, sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* sebagai Penanda Genetik untuk Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Sampel Air**” Proses penelitian hingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan berkat bimbingan, bantuan serta motivasi dari berbagai pihak hingga terselesaikannya skripsi ini. Penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Dhira Satwika, M.Sc, selaku dosen pembimbing pertama atas dukungan, motivasi dan kesabarannya dalam membimbing saya selama proses penyelesaian skripsi.
2. Tri Yahya Budiarso, S.Si, MP. Selaku dosen pembimbing kedua atas saran dan arahnya selama penyelesaian skripsi ini.
3. Dr. Charis Amarantini, M.Si, selaku dosen penguji atas koreksi dan masukannya dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Dr. Kisworo, M.Sc., selaku Dekan Fakultas Bioteknologi dan semua dosen-dosen Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta yang telah membimbing dan membagikan ilmu dan pengalaman yang berharga.
5. Staff Fakultas Bioteknologi UKDW atas bantuannya selama proses perkuliaahan.
6. Laboran Fakultas Bioteknologi: Mbak Retno, Mas Setya, Mas Hari, Mas Istono, Mas Muji dan kak Dewi atas bantuan, dukungan dan bimbingannya selama proses penelitian di laboratorium.
7. Orangtua dan kakak tersayang yang selalu mendukung, mendoakan dan memotivasi setulus hati selama proses studi sarjana, juga dukungan dari Bang Frandy, Merta dan Dirci saudara tersayang, sertateman-teman Bioteknologi 2011.

Semoga melalui tulisan ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan kemajuan pendidikan serta ilmu pengetahuan. Harapannya penelitian ini dapat dikembangkan dan dilanjutkan oleh adik-adik di Fakultas Bioteknologi UKDW.

Yogyakarta, 12 Oktober 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
Sekuen Parsial Gen <i>rpoB</i> dan <i>gyrB</i> sebagai Penanda Geneti Potensial untuk Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Sampel Air	
Abstrak	1
Abstract	2
BAB 1 PENDAHULUAN	3
1. Latar Belakang	3
2. Tujuan	3
3. Perumusan Masalah	4
4. Manfaat Penelitian	4
BAB 2 STUDI PUSTAKA.....	5
1. Mikrobiologis Air	5
2. Genus Enterobacteriaceae	6
3. Deteksi Enterobacteriaceae	7
3.1. Isolasi bakteri.....	7
3.2. Uji biokimia	8
3.3. Deteksi molekuler dengan metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	10
BAB 3 METODE PENELITIAN	12
1. Waktu dan Tempat Penelitian	12
2. Alat dan Bahan	12
2.1. Alat	12
2.2. Bahan	12
3. Tahapan Penelitian	13
3.1. Desain primer untuk deteksi Enterobacteriaceae melalui <i>in silico study</i>	14
3.2. Isolasi bakteri	15
3.3. Uji biokimia dan pengecatan gram.....	15
3.4. Isolasi DNA dengan metode fenol kloroform dimodifikasi.	16
3.5. Deteksi molekuler berdasarkan sekuen parsial gen <i>gyrB</i> dan <i>rpoB</i>	16
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	19
1. Isolasi Bakteri	19
2. Uji Biokimia dan Pengecatan Gram	20
3. Hasil <i>In Silico Study</i> Gen <i>gyrB</i> dan <i>rpoB</i> untuk Deteksi Enterobacteriaceae	22
4. Hasil Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Air Sumur	24
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	33
1. Kesimpulan	33
2. Saran	33

DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	36
LAMPIRAN 1	37
LAMPIRAN 2	38
LAMPIRAN 3	44
LAMPIRAN 4	53
LAMPIRAN 5	56
LAMPIRAN 6	57
LAMPIRAN 7	59
LAMPIRAN 8	60

©UKPDW

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 1. Total jumlah bakteri pada feses manusia (Cabral, 2010, dimodifikasi)	5
Tabel 2. Patogen <i>waterborne</i> di daerah berkembang (Ashbolt, 2004)	6
Tabel 3. Karakteristik beberapa koloni bakteri enterik pada media SSA (Madigan <i>et al.</i> , 2009, dimodifikasi)	8
Tabel 4. Karakteristik biokimia bakteri enteric kelompok Enterobacteriaceae (Madigan <i>et al.</i> , 2009, dimodifikasi).....	9
Tabel 5. Karakteristik biokimia untuk memisahkan genus bakteri enterik <i>butanediol fermenters</i> (Madigan, <i>et al.</i> , 2009, dimodifikasi).....	9
Tabel 6. Metode deteksi sederhana Enterobacteriaceae enterik(Madigan <i>et al.</i> ,2009)...	15
Tabel 7. Primer hasil <i>in silico study</i> untuk deteksi Enterobacteriaceae	17
Tabel 8. Variasi suhu <i>annealing</i> pada gradient PCR.....	17
Tabel 9. Kondisi PCR untuk gen <i>gyrB</i> dan <i>rpoB</i>	18

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 1. Uji positif pada medium <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	8
Gambar 2. Bagan alir tahapan penelitian.....	13
Gambar 3. Pertumbuhan <i>Enterobacteriaceae</i> pada media <i>EE broth</i>	19
Gambar 4. Karakteristik morfologi koloni bakteri <i>Enterobacteriaceae</i> pada CCA dari sampel air	19
Gambar5. Karakteristik koloni merah dari media CCA yang ditumbuhkan pada media SSA.....	20
Gambar 6. Persentase jumlah genus <i>Enterobacteriaceae</i> terdeteksi melalui uji biokimia sederhana berdasarkan Madigan <i>et.al.</i> (2009)	21
Gambar 7. Hasil pengecatan gram.....	21
Gambar 8. <i>Conserved area</i> hasil <i>alignment</i> sekuen gen <i>rpoB</i> bakteri <i>Enterobacteriaceae</i>	22
Gambar 9. Analisis hubungan filogenetik berdasarkan gen <i>rpoB</i>	25
Gambar 10. Analisis hubungan filogenetik berdasarkan gen <i>gyrB</i> 1.....	26
Gambar 11. Analisis hubungan filogenetik berdasarkan gen <i>gyrB</i> 2.....	27
Gambar 12. Hasil deteksi molekuler <i>Enterobacteriaceae</i> berdasarkan gen <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> 1 dan <i>gyrB</i> 2	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Data Hasil Pengolahan Air	37
Lampiran 2. Bahan-bahan yang Digunakan dalam Penelitian	38
Lampiran 3. Langkah Kerja	44
Lampiran 4. Gambar Karakteristik Bakteri Enterobacteriaceae pada Berbagai Media	53
Lampiran 5. Hasil BLASTN 2.2.3.1 sekuen parsial gen <i>rpoB</i> 462 bp (tanggal 9 April 2015)	56
Lampiran 6. Hasil BLASTN 2.2.3.1 sekuen parsial gen <i>rpoB</i> 462 bp (tanggal 17 September 2015)	57
Lampiran 7. Hasil BLASTN 2.2.3.1 sekuen parsial gen <i>gyrB</i> 1 (tanggal 9 April 2015)	59
Lampiran 8. Hasil BLASTN 2.2.3.1 sekuen parsial gen <i>gyrB</i> 2 (tanggal 9 April 2015)	60

Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* Sebagai Penanda Genetik Potensial untuk Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Sampel Air

EUNIKE ILONA HILSON
31110011

Fakultas Bioteknologi, Program Studi Biologi
Universitas Kristen Duta Wacana

Abstrak. Enterobacteriaceae merupakan kelompok bakteri penting karena patogenitasnya yang berkaitan dengan *waterborne disease* dan perannya sebagai indikator kontaminasi fecal dari saluran pencernaan manusia dan hewan. Tujuan dari penelitian ini adalah desain primer spesifik sebagai alternatif marker melalui *in silico study* untuk deteksi Enterobacteriaceae pada air sumur yang diproses. Proses deteksi dilakukan melalui tahapan isolasi bakteri, uji biokimia dan pengamatan morfologi dilanjutkan deteksi molekuler dengan melakukan amplifikasi gen target. Bakteri target ditumbuhkan pada media *selective enrichment* dan *selective differential* dilanjutkan dengan uji biokimia dan pengecatan gram. Primer yang diperoleh dari *conserved area* pada gen *gyrB* dan *rpoB* didesain secara spesifik dan ampikon *in silico* yang dihasilkan dianalisis kemampuannya mendeteksi anggota Enterobacteriaceae. PCR *in vitro* menunjukkan primer baru dapat mendeteksi Enterobacteriaceae pada sampel air sumur selama proses pengolahan air.

Kata kunci: Enterobacteriaceae, *in silico*, primer *gyrB*, primer *rpoB*

Partial Sequences of *rpoB* and *gyrB* as Potential Genetic Markers for Molecular Detection of Enterobacteriaceae in Water Sample

EUNIKE ILONA HILSON
31110011

Faculty of Biotechnology, Dept. of Biology
Duta Wacana Christian University

Abstract. Enterobacteriaceae has become the important bacterial group due to its pathogenicity related to waterborne disease and as the indicator of fecal contamination from human and animal gastrointestinal. The objective of this research is to design new primer pairs covering specific marker deduced by *in silico* study, to effectively detect the presence of Enterobacteriaceae from processed-well water, supported by bacterial isolation, biochemical test and morphological test continued by molecular detection to amplify specific gene target. Suspected bacteria grown on selective enrichment and selective differential media continued by biochemical assays and gram staining. Primer pairs covering the most conserved area of *gyrB* and *rpoB* genes were specifically designed and the *in silico* amplicons produced were checked for its ability to specifically detect the members of Enterobacteriaceae. *In vitro* PCR were done and it is proven the newly design primer pairs could detect the presence of Enterobacteriaceae in the samples, before and after the treatment.

Key words: Enterobacteriaceae, *in silico*, *gyrB* primer, *rpoB* primer

Sekuen Parsial Gen *rpoB* dan *gyrB* Sebagai Penanda Genetik Potensial untuk Deteksi Molekuler Enterobacteriaceae pada Sampel Air

**EUNIKE ILONA HILSON
31110011**

**Fakultas Bioteknologi, Program Studi Biologi
Universitas Kristen Duta Wacana**

Abstrak. Enterobacteriaceae merupakan kelompok bakteri penting karena patogenitasnya yang berkaitan dengan *waterborne disease* dan perannya sebagai indikator kontaminasi fecal dari saluran pencernaan manusia dan hewan. Tujuan dari penelitian ini adalah desain primer spesifik sebagai alternatif marker melalui *in silico study* untuk deteksi Enterobacteriaceae pada air sumur yang diproses. Proses deteksi dilakukan melalui tahapan isolasi bakteri, uji biokimia dan pengamatan morfologi dilanjutkan deteksi molekuler dengan melakukan amplifikasi gen target. Bakteri target ditumbuhkan pada media *selective enrichment* dan *selective differential* dilanjutkan dengan uji biokimia dan pengecatan gram. Primer yang diperoleh dari *conserved area* pada gen *gyrB* dan *rpoB* didesain secara spesifik dan ampikon *in silico* yang dihasilkan dianalisis kemampuannya mendeteksi anggota Enterobacteriaceae. PCR *in vitro* menunjukkan primer baru dapat mendeteksi Enterobacteriaceae pada sampel air sumur selama proses pengolahan air.

Kata kunci: Enterobacteriaceae, *in silico*, primer *gyrB*, primer *rpoB*

Partial Sequences of *rpoB* and *gyrB* as Potential Genetic Markers for Molecular Detection of Enterobacteriaceae in Water Sample

EUNIKE ILONA HILSON
31110011

Faculty of Biotechnology, Dept. of Biology
Duta Wacana Christian University

Abstract. Enterobacteriaceae has become the important bacterial group due to its pathogenicity related to waterborne disease and as the indicator of fecal contamination from human and animal gastrointestinal. The objective of this research is to design new primer pairs covering specific marker deduced by *in silico* study, to effectively detect the presence of Enterobacteriaceae from processed-well water, supported by bacterial isolation, biochemical test and morphological test continued by molecular detection to amplify specific gene target. Suspected bacteria grown on selective enrichment and selective differential media continued by biochemical assays and gram staining. Primer pairs covering the most conserved area of *gyrB* and *rpoB* genes were specifically designed and the *in silico* amplicons produced were checked for its ability to specifically detect the members of Enterobacteriaceae. *In vitro* PCR were done and it is proven the newly design primer pairs could detect the presence of Enterobacteriaceae in the samples, before and after the treatment.

Key words: Enterobacteriaceae, *in silico*, *gyrB* primer, *rpoB* primer

BAB 1

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Teknologi pengolahan air modern meskipun aman dan berteknologi tinggi, belum tentu steril dan terbebas dari bakteri, terutama bakteri patogen penyebab penyakit. Salah satu kelompok bakteri yang sering ditemukan pada sumber air adalah Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae juga sering digunakan dalam mempelajari bakteri patogen pada air dan sebagai indikator fecal polusi dari hewan dan manusia (Cabral, 2010). Beberapa genusnya termasuk dalam bakteri enterik yang berasal dari sistem pencernaan manusia dan hewan, seperti *Escherichia* sp, *Citrobacter* sp, *Edwardsiella* sp, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp, dan *Enterobacter* sp (Madigan *et al.*, 2009). Keberadaan bakteri enterik ini seringkali menjadi indikator kualitas mikrobiologis air dan beberapa diantaranya berkaitan erat dengan *waterborne disease* yang menyebabkan penyakit pada manusia.

Melalui penelitian ini dilakukan desain penanda alternatif melalui *in silico study* untuk deteksi molekuler Enterobacteriaceae pada sampel air selama proses pengolahan air sumur. Desain primer menjadi sangat penting mengingat belum ada primer spesifik untuk deteksi Enterobacteriaceae. Desain primer spesifik *in silico study* menggunakan beberapa *software* seperti *ClustalX*, *MEGA6*, *GeneDoc*, *CloneManager* dan program BLASTN 2.2.3.1 (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Primer didesain berdasarkan *conserved area* sekuen parsial gen *rpoB* dan *gyrB*. Perbandingan hasil deteksi berdasarkan gen *gyrB* dan *rpoB* dilakukan untuk mengetahui tingkat resolusi, sensitifitas dan spesifitas primer yang didesain. Deteksi Enterobacteriaceae dilakukan melalui tahapan isolasi bakteri, uji biokimia, dan pengecatan gram yang dilanjutkan dengan deteksi molekuler menggunakan primer hasil *in silico study*. Enterobacteriaceae enterik yang diteliti meliputi 9 genus, yaitu *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Serratia*, *Proteus*, dan *Klebsiella*.

2. Tujuan

- 2.1. Desain primer untuk deteksi Enterobacteriaceae melalui *in silico study* berdasarkan gen *rpoB* dan *gyrB*.
- 2.2. Deteksi molekuler kelompok Enterobacteriaceae pada sampel air sumur menggunakan primer dengan target sekuen gen parsial *rpoB* dan *gyrB* hasil *in silico study*.

3. Perumusan Masalah

Analisis potensi primer gen parsial *rpoB* dan *gyrB* hasil *in silico study* sebagai penanda alternatif dalam mendeteksi Enterobacteriaceae pada sampel air.

4. Manfaat Penelitian

- 4.1. Mengetahui proses *in silico study* untuk desain penanda alternatif berdasarkan gen *rpoB* dan *gyrB*.
- 4.2. Mengetahui potensi primer gen parsial *rpoB* dan *gyrB* hasil *in silico study* sebagai penanda alternatif dalam mendeteksi Enterobacteriaceae pada sampel air .

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Primer baru berhasil didesain berdasarkan sekuen parsial gen *rpoB* dan gen *gyrB* hasil *in silico study* untuk mendeteksi Enterobacteriaceae pada sampel air. Berdasarkan hasil *in silico study* dan deteksi dengan metode PCR, gen *rpoB* memiliki kemampuan untuk deteksi pada tingkat spesies yang mampu mengelompokkan genus Enterobacteriaceae yang sama pada satu klaster, sedangkan gen *gyrB* memiliki kemampuan untuk deteksi pada tingkat genus pada kelompok Enterobacteriaceae maupun genus non-Enterobacteriaceae yang berkerabat dekat.

2. Saran

- 2.1. Perlu dilakukan optimalisasi kondisi PCR meliputi suhu dan lamanya waktu pada proses denaturasi, *annealing* dan ekstensi untuk primer dengan target fragmen sekuen *rpoB* dan *gyrB* 1 dan 2.
- 2.2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kekuatan primer yang di desain melalui studi *Bioinformatic* dengan dilengkapi *sequencing* hasil PCR berdasarkan sekuen parsial gen *rpoB* dan *gyrB* yang diperoleh pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, M., , Tomar, RS., dan Jyoti, A. 2014. Detection of Water-borne pathogenic bacteria: where molecular methods rule. *Int. J. Multidisc. Current Res.* 351-358.
- Ashbolt, NJ. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing region. *Toxicology* 198, 229–238.
- Brisse, S., Grimont, F., dan Grimont, PAD. 2006. The Genus *Klebsiella*. Springer: Prokaryotes 6:159-196. Editor: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugen Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, dan Erko Stackebrandt.
- Case, RJ., Boucher, Yan., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W F., dan Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (1) : 278–288.
- Cabral, JPS. 2010. Bacterial pathogens dan water microbiology. *Water. Int. J. Environ. Res. Public Health* 7:3657-3703.
- Dauga, C. 2002. Evolution of the *gyrB* gen and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:531±547.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., Kawaguchi, R. 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J. Clin. Microbiol.* 40 (80): 2779-2785.
- Griebler, C., Lueders, T. 2008. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biol.* (2009) 54:649–677.
- Howard, G., Pedley, S., Barrett, M., Nalubega, M., Johal, K. 2003. Risk factors contributing to microbiological contamination of shallow groundwater in Kampala, Uganda. G. Howard et al. / *Water Res.* 37:3421–3429.
- Irwanto MI. 2015. Karakterisasi biokimiawi dan molekuler isolate *Staphylococcus aureus* dari produk susu segar. Skripsi. Fakultas Bioteknologi. Universitas Kristen Duta Wacana. Yogyakarta.
- Madigan, MT., Martinko, JM., Dunlap, PV., Clark, DP. 2009. Brock : Biology of microorganism. Edisi 12. Prentice Hall.
- Mitchel, R., Gu, J-D. 2010. Environmental Microbiology. Second Edition. Wiley- Blackwell: A John Wiley dan Sons. Inc. Publication, 57-61.

- Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Biol.* 1997 26 (5): 1005-1011.
- Monyatsi, LM., Onyango, MS., Momba, MN. 2012. Groundwater Quality in South African Rural Community : A Possible Threat to Public Health. *Pol. J. Environ. Study* 21 (5): 1349-1358.
- Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, Marie-Renée., Laurent, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49: 31 – 54.

©UKPDW