



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK FREKUENSI SUARA DALAM RENTANG AUDIOSONIK SECARA
BERSELING TERHADAP VIABILITAS *Escherichia coli***

SKRIPSI

Naldo Sofian
0806451473

FAKULTAS KEDOKTERAN
PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
JULI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK FREKUENSI SUARA DALAM RENTANG AUDIOSONIK SECARA
BERSELING TERHADAP VIABILITAS *Escherichia coli***

SKRIPSI

Disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran

Naldo Sofian
0806451473

FAKULTAS KEDOKTERAN
PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
JULI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Laporan Penelitian ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Naldo Sofian

NPM : 0806451473

Tanda Tangan :



Tanggal : 5 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Naldo Sofian
NPM : 0806451473
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul Laporan Penelitian :

Efek Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik
Terhadap Viabilitas *Escherichia coli*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Program Studi Pendidikan Dokter Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dra. Conny Riana Tjampakasari, MS, DMM (.....)
Penguji : Dra. Conny Riana Tjampakasari, MS, DMM (.....)
Penguji : Dra. Beti Ernawati Dewi, Ph.D (.....)
Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 28 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Pertama-tama, penulis mengucapkan syukur kepada Tuhan Yang maha Esa karena dengan penyertaannya, laporan penelitian dengan judul "Efek Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling Terhadap *Escherichia coli*" ini dapat diselesaikan. Penelitian ini dilakukan sebagai persyaratan untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pada kesempatan ini, saya juga mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak berikut ini:

- (1) Dra. Conny Riana T, selaku pembimbing utama penelitian ini sekaligus staff pengajar dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- (2) Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah menyediakan fasilitas, sarana, dan prasarana dalam mewujudkan penelitian ini
- (3) Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah berupaya menciptakan atmosfer penelitian pada semua kalangan akademisi, termasuk mahasiswa
- (4) Rekan kerja kelompok riset dengan tema "Pengaruh Suara Dalam Rentang Audiosonik Terhadap Viabilitas Bakteri" yang telah saling mendukung dalam mewujudkan penelitian ini hingga selesai.
- (5) Orang tua yang telah mendukung dalam bentuk finansial maupun bentuk lainnya
- (6) Pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu

Akhir kata, semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi berbagai pihak

Jakarta, 5 Juli 2011

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Naldo Sofian

NPM : 0806451473

Program Studi : Pendidikan Dokter Umum

Departemen : Mikrobiologi

Fakultas : Kedokteran

Jenis Karya : Laporan Penelitian

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti noneklusif** (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Efek Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling Terhadap *Escherichia coli*”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 7 Juli 2011

Yang menyatakan



(Naldo Sofian)

ABSTRAK

Nama : Naldo Sofian
Progam Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul : Efek Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling Terhadap *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan diare. Kemampuan hidup *E.coli* sangat mudah dipengaruhi oleh berbagai rangsangan. Akan tetapi, rangsangan bunyi, terutama dalam rentang audiosonik (20-20.000Hz), belum banyak diteliti. Peneliti menduga bahwa efek dari pemaparan frekuensi bunyi audiosonik secara berseling akan menstimulasi viabilitas *Escherichia coli*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan sonikator sebagai sumber bunyi. Frekuensi yang digunakan adalah 7 kHz dan 17 kHz selama 10 detik. Setelah itu, jumlah koloni *E.coli* dihitung dengan metode *total plate count* setelah sediaan diinkubasi. Untuk menjamin validitas, tiap perlakuan dilakukan dua kali. Penghitungan bakteri dilakukan dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah *E.coli* yang dihitung adalah *E.coli* pada pengenceran dengan jumlah 30-300 koloni. Terjadi penurunan viabilitas pada pemaparan frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik secara berseling. Penurunan viabilitas tersebut lebih besar pada frekuensi 7 KHz daripada 17 KHz. Rata-rata jumlah *E.coli* pada kontrol dan pajanan frekuensi 7 kHz dan 17 kHz berturut-turut sebesar $2,84 \times 10^9$ koloni, $4,05 \times 10^7$ koloni, dan $5,05 \times 10^8$ koloni. Jika dibandingkan dengan kontrol, terdapat perbedaan bermakna pada setiap perlakuan [7 kHz ($p=0.032$); 17 kHz ($p=0.023$)] dengan uji T berpasangan. Frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik secara berseling menurunkan viabilitas *E.coli*. Penurunan viabilitas lebih besar dialami oleh bakteri pada pajanan dengan frekuensi 7kHz daripada 17 kHz. Dapat disimpulkan bahwa, suara dalam rentang audiosonik secara berseling dapat menurunkan viabilitas *E.coli*.

Kata Kunci: *E.coli*, frekuensi bunyi, viabilitas

ABSTRACT

Name : Naldo Sofian

Study Program: General Practitioner Education

Title : “Effect of Sound Frequency in Audiosonic Range Alternately on *Escherichia coli* Viability”

Escherichia coli is one of the most common bacteria causing diarrhea. Its life is easily influenced by physical and chemical stimulation. However, sound stimulation, especially in audiosonic range (20-20.000 Hz) alternately, have not been explored much. Researcher hypothesized that it would stimulate *E.coli* growth. This research is categorized as experimental research by using sonication tools as the sound source. Researcher used frequency on 7 and 17 KHz for 10 seconds. By total plate count, the media contain colony of *E.coli* would be counted for analysis. In order to guarantee the validity, each action would be done twice. Counting would be done only those diluted preparation with 30-300 colonies. *E.coli* got its viability decreased by audible frequency sound alternately. Average of the *E.coli* count in control, 7 kHz, and 17 kHz is respectively $2,84 \times 10^9$; $4,05 \times 10^7$; and $5,05 \times 10^8$ colonies. Relation between each intervention and control are significant [7 kHz ($p=0.032$); 17 kHz ($p=0.023$)] by paired T-test. Audible sound frequency which is given alternately against *E.coli* would decrease *E.coli* viability. Its decreasing effect is greater in 7kHz stimulation than 17 kHz. In conclusion, sound in audiosonic range, alternately, may decrease *E.coli* viability.

Keywords: *E.coli*, sound frequency, viability.

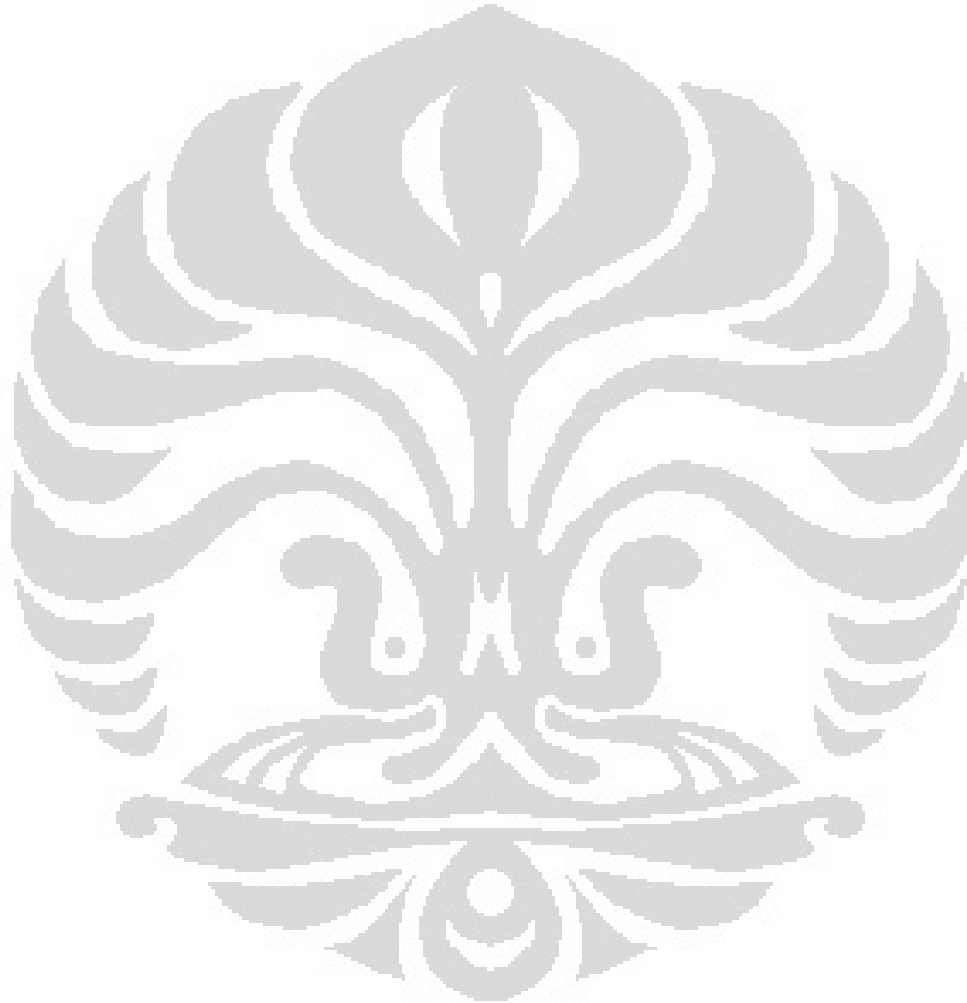
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	iv
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 LATAR BELAKANG	1
1.2 IDENTIFIKASI MASALAH	2
1.3 HIPOTESIS	2
1.4 TUJUAN PENELITIAN	2
1.4.1 Tujuan Umum Penelitian	2
1.4.2 Tujuan Khusus Penelitian	2
1.5 MANFAAT PENELITIAN	3
1.5.1 Bagi Peneliti	3
1.5.2 Bagi Perguruan Tinggi	3
1.5.3 Bagi Masyarakat/Institusi Terkait	3
2. TINJAUAN PUSTAKA DAN KERANGKA KONSEP	
2.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	4
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Kondisi yang Mempengaruhi Viabilitas Optimum Bakteri	7
2.2.1 Nutrisi	7
2.2.1.1 Karbon	7
2.2.1.2 Nitrogen	8
2.2.1.3 Sulfur	8
2.2.1.4 Fosfor	8
2.2.1.5 Mineral	8
2.2.2 Lingkungan	9
2.2.2.1 Ketersediaan Nutrisi	9
2.2.2.2 Derajat Keasaman (pH)	9
2.2.2.3 Temperatur	10
2.2.2.4 Aerasi	10
2.2.2.5 Tekanan Osmotik	11
2.2.2.6 Media yang digunakan	11
2.2.3 Fisiologi Viabilitas Bakteri dan Regulasinya	12
2.3 Frekuensi Bunyi dan Alat Penghasil Bunyi Pada Penelitian Mikrobiologi	15
2.4 Pajanan Frekuensi Bunyi, Khususnya Ultrasonik, Terhadap Bakteri	16

2.5 Pengaruh Paparan Frekuensi Bunyi Terhadap Viabilitas <i>E.coli</i> Pada Penelitian Yang Pernah Dilakukan.....	18
2.6 Kerangka Konsep.....	20
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Desain Penelitian	21
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.3 Bahan, Alat Penelitian, dan Cara Kerja	21
3.3.1 Bahan Penelitian	21
3.3.2 Alat Penelitian.....	21
3.3.3 Langkah Kerja.....	23
3,3,3,1 Pembuatan media perkembangbiakan.....	23
3.3.3.2 Sterilisasi Alat dan Media	24
3.3.3.3 Peremajaan Bakteri.....	25
3.3.3.4 Identifikasi Bakteri.....	25
3.3.3.5 Sonifikasi Bakteri	25
3.3.3.6 <i>Total Plate Count</i>	27
3.3.3.7 Menghitung Koloni Bakteri.....	28
3.4 Identifikasi Variabel.....	28
3.5 Definisi Operasional	29
3.6 Alur Penelitian	29
3.7 Rencana Manajemen dan Analisis Data	30
3.8 Etika Penelitian	30
4. HASIL PENELITIAN	
4.1 Karakteristik <i>E.coli</i>	31
4.2 Perhitungan <i>E.coli</i> Sesudah Perlakuan	32
5. PEMBAHASAN	
5.1 Perbandingan Viabilitas Bakteri Antara Kontrol Dengan Paparan Frekuensi Bunyi Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling.....	34
5.2 Perbandingan Viabilitas Bakteri Akibat Perbedaan Frekuensi Bunyi	37
6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	39
6.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	
Komposisi Media Perkembangbiakan.....	42
Cara Pemeriksaan Mikroba Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2897-1992 Dengan Angka Lempeng Total (<i>Total Plate Count</i>)	43
Kumpulan Hasil Pengumpulan dan Pengolahan Data.....	45
Dokumentasi Kegiatan	49

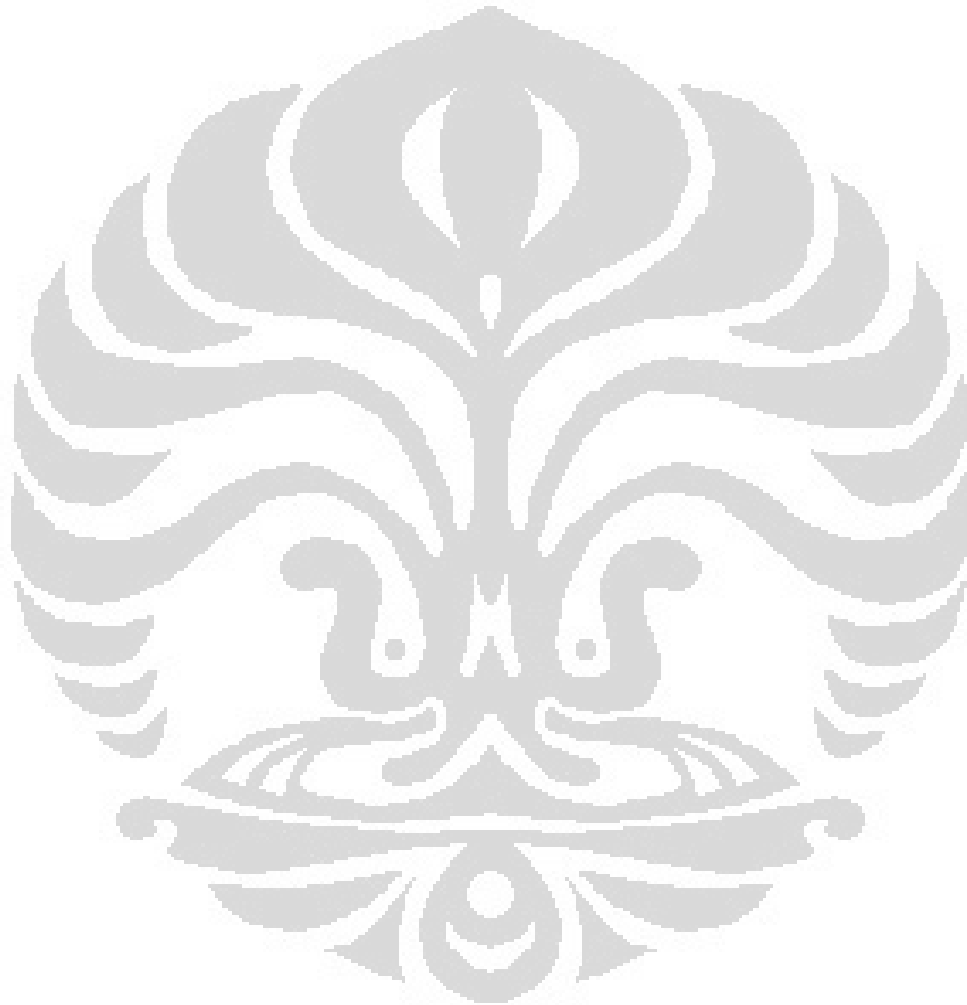
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Skema model regulasi genetik, substrat, serta hubungannya satu sama lain	13
Gambar 3.1 Lemari inkubator untuk menjaga suhu tertentu bagi viabilitas bakteri	22
Gambar 3.2 Agar <i>Plate Count Agar (PCA)</i> dalam kolf.....	24
Gambar 3.3 Sonikasi bakteri dalam wadah yang dikelilingi es untuk mengurangi pelepasan panas dari dalam wadah	26
Gambar 3.4 Urutan tindakan yang diberikan terhadap <i>E.coli</i> dalam penelitian ini.....	27
Gambar 3.5 Skema pengenceran hasil sonifikasi bakteri	28



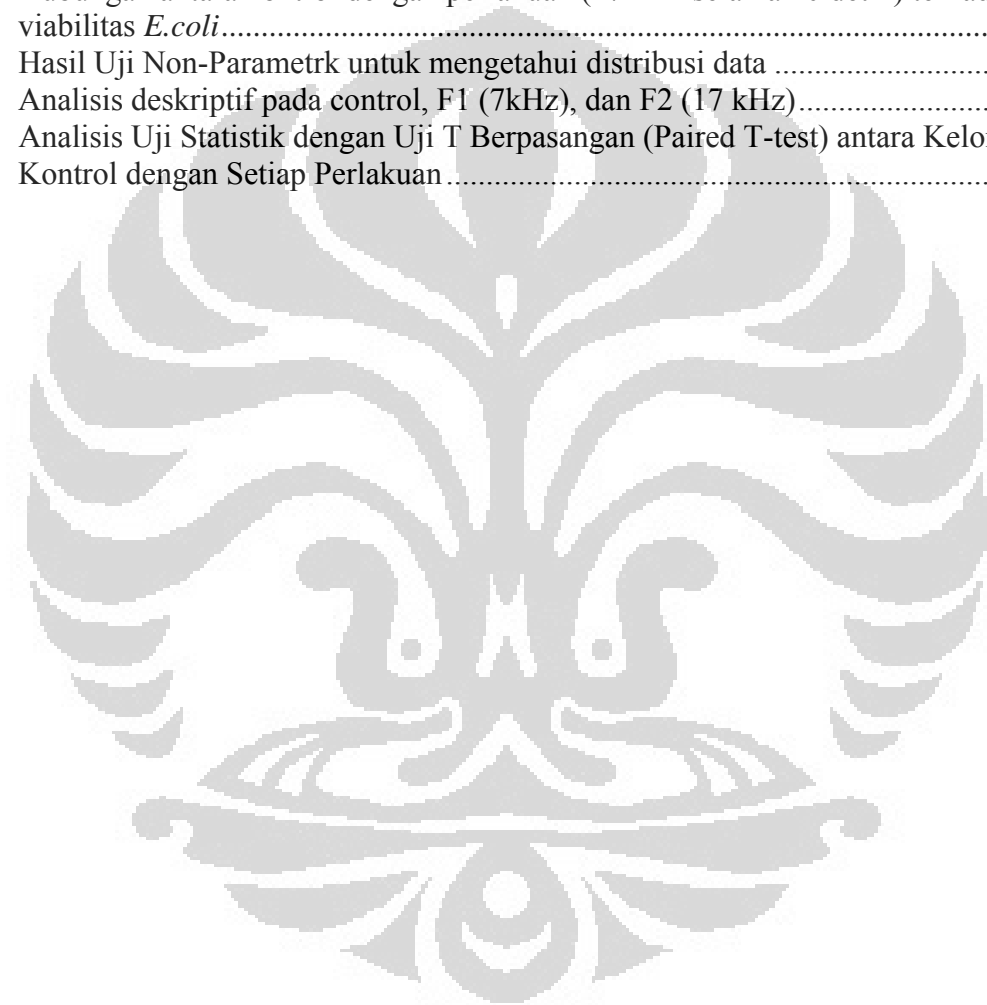
DAFTAR GRAFIK

Grafik 2.1	Komposisi dari hasil metabolisme yang terukur pada <i>Escherichia coli</i>	12
Grafik 2.2	Perbandingan jumlah sel bakteri yang hidup dengan pemberian frekuensi bunyi audiosonik pada salah satu penelitian yang telah ada	19



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rata-rata jumlah <i>E.coli</i> pada setiap perlakuan dan kontrol.....	33
Tabel 5.3 Perbandingan viabilitas antar perlakuan.....	37
Tabel 1. Hasil percobaan pemaparan audiosonik terhadap <i>E.coli</i>	45
Tabel 2. Rata-rata jumlah <i>E.coli</i> pada setiap pengenceran pada percobaan pemberian pajanan frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik secara berseling.....	45
Tabel 3 Hubungan antara kontrol dengan perlakuan (7 kHz selama 10 detik) terhadap viabilitas <i>E.coli</i>	46
Tabel 4 Hubungan antara kontrol dengan perlakuan (17 kHz selama 10 detik) terhadap viabilitas <i>E.coli</i>	46
Tabel 5 Hasil Uji Non-Parametrik untuk mengetahui distribusi data	46
Tabel 6 Analisis deskriptif pada control, F1 (7kHz), dan F2 (17 kHz).....	47
Tabel 7 Analisis Uji Statistik dengan Uji T Berpasangan (Paired T-test) antara Kelompok Kontrol dengan Setiap Perlakuan.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media Perkebangbiakan.....	42
Lampiran 2. Cara Pemeriksaan Mikroba Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2897-1992 Dengan Angka Lempeng Total (<i>Total Plate Count</i>).....	43
Lampiran 3. Hasil Pengolahan Data	45
Lampiran 4. Dokumentasi Kegiatan	49



BAB 1

PENDAHULUAN

1. 1 Latar Belakang

E.coli merupakan bakteri yang mudah ditemukan dalam kehidupan sehari-hari. Hal tersebut tidak lepas dari perannya baik sebagai patogen maupun flora normal tubuh. *E.coli* umumnya memicu patogenesis dari sepsis dan infeksi saluran cerna.¹ Namun, *E.coli* juga dapat dipakai untuk rekayasa bioteknologi, seperti sekresi insulin.²

Peranan dari *E.coli* dalam kehidupan manusia tidak terlepas dari faktor lingkungan, baik langsung maupun tidak langsung. Ada pun rangsangan yang digunakan berupa rangsang fisik (suhu, radiasi, dan aerasi) maupun kimia (kadar nutrisi dan obat, derajat keasaman (pH), dan tekanan osmotik). Semua keadaan tersebut berpengaruh pada kehidupan dari bakteri tersebut, baik viabilitas maupun perkembangannya untuk beradaptasi dengan lingkungan.³ Namun, kini telah diketahui bahwa semua rangsangan fisik dapat saja mempengaruhi kehidupan bakteri, termasuk gelombang bunyi. Rangsangan ini tidak hanya berpengaruh pada bakteri, tetapi juga tumbuhan dan jamur.

Berbagai macam metode dan hasil telah diteliti, baik viabilitas, perlambatan viabilitas, atau bahkan mematikan bagi organisme tersebut. Hanya saja, kebanyakan perlakuan tersebut masih menggunakan ultrasonik sebagai sumber rangsangan bunyi.^{4,5} Penggunaan frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik, khususnya secara berseling belum banyak diteliti. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa penggunaan frekuensi tertentu (5 kHz) secara berkelanjutan jauh lebih baik dalam menstimulasi viabilitas bakteri daripada frekuensi 1 kHz dan 15 kHz.⁶

Oleh karena itu, peneliti ingin melihat efek dari perbedaan tingkat pemberian frekuensi bunyi, secara audiosonik dan berseling, terhadap viabilitas *E.coli*. Perbedaan ini akan terlihat dari perbandingan tingkat viabilitas akibat pajanan dua tingkat frekuensi: 7 kHz dan 17 kHz. Kedua frekuensi tersebut belum pernah diteliti sebelumnya sehingga diharapkan akan menambah variasi frekuensi bunyi yang menjadi rangsangan bagi *E.coli*.

1. 2 Identifikasi Masalah dan Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, peneliti merumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut.

1. Bagaimanakah efek tingkat bunyi audiosonik yang dipajankan secara berseling terhadap viabilitas *E.coli*?
2. Bagaimanakah perbandingan nilai frekuensi bunyi antara 7 kHz dan 17 kHz bagi viabilitas *E.coli*?

1. 3 Hipotesis

1. Frekuensi bunyi audiosonik yang dipajankankan secara berseling akan menstimulasi viabilitas *E.coli*.
2. Pajanan frekuensi bunyi sebesar 7 KHz memberikan stimulasi lebih besar daripada 17 kHz pada viabilitas *E.coli*.

1. 4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum Penelitian

Mengetahui pengaruh tingkat bunyi audiosonik secara intermiten terhadap viabilitas *Escherichia coli*

1.4.2 Tujuan Khusus Penelitian

1. Diketuainya karakteristik bakteri *E.coli* yang digunakan dalam penelitian
2. Diketuainya berbagai kondisi yang menyebabkan viabilitas optimum dari *E.coli* beserta titik optimumnya
3. Diketuainya cara pemaparan frekuensi bunyi terhadap viabilitas *E.coli*
4. Diketuainya pengaruh dari pajanan frekuensi bunyi sebesar 7 kHz dan 17 kHz terhadap viabilitas *E.coli*
5. Diketuainya perbandingan pajanan frekuensi bunyi antara 7 kHz dan 17 kHz terhadap viabilitas *E.coli*

1. 5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat bagi peneliti

1. Sebagai sarana pelatihan dan pembelajaran melakukan suatu penelitian dalam bidang kesehatan.
2. Meningkatkan kemampuan berpikir analitis dan sistematis dalam mengidentifikasi masalah kesehatan di masyarakat.
3. Melatih kerjasama dalam tim peneliti.

1.5.2 Manfaat bagi perguruan tinggi

1. Sebagai perwujudan Tri Dharma Perguruan Tinggi.
2. Mewujudkan Universitas Indonesia sebagai universitas riset.
3. Sarana dalam menjalin kerjasama antara staff pengajar, mahasiswa, pimpinan fakultas, dan universitas.

1.5.3 Manfaat bagi masyarakat/instansi terkait

1. Menambah pengetahuan mengenai bunyi sebagai rangsangan bagi bakteri, khususnya *E.coli*
2. Sebagai pilot project pengaruh bunyi dalam kehidupan sehari-hari pada aktivitas bakteri
3. Meningkatkan efisiensi dan efektivitas penggunaan bakteri dalam bioteknologi

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae (disebut juga koliformis) merupakan kelompok gram-negatif yang pendek, berbentuk batang, dan hidup di dalam saluran cerna makhluk hidup. Ada pun yang termasuk dalam kelompok tersebut antara lain genus kelompok tersebut juga termasuk genus dari *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, dan lainnya.³

Kelompok tersebut merupakan bakteri fakultatif yang berarti dapat hidup secara anaerob maupun aerob, koloninya tampak mukoid. Bakteri ini mempunyai kemampuan menfermentasikan karbohidrat serta dapat memproduksi berbagai toksin dan faktor virulensi. Adapun ciri lainnya adalah kemampuannya untuk bergerak dengan flagel peritrikh, meski dapat pula ditemukan bakteri golongan tersebut tidak bergerak. Bakteri ini juga dapat hidup pada pepton atau ekstrak daging tanpa tambahan suplemen lain, seperti NaCl serta dapat hidup pada agar MacConkey's. Mikroorganisme memperlihatkan uji katalasa positif dan mempunyai kemampuan mereduksi nitrat menjadi nitrit.³

2.1.1 Escherichia coli

E. coli merupakan bakteri yang paling sering dijumpai sebagai salah satu penyebab infeksi pada berbagai organ tubuh makhluk hidup. Hal tersebut disebabkan karena bakteri tersebut merupakan flora normal pada makhluk hidup. Dalam keadaan tertentu bakteri ini dapat menjadi patogen yaitu apabila berada dalam jumlah berlebihan dan berada pada tempat yang tidak semestinya.³

E. coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk basil. Ada pun ciri utama dari bakteri gram negatif adalah dinding selnya yang tipis, terutama bagian peptidoglikannya yang hanya memiliki ketebalan sekitar 2 nm, lebih tipis jika

dibandingkan gram positif yang mencapai 15-80 nm. Khusus pada *E.coli*, bakteri ini tidak memiliki kapsul yang begitu tebal jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif lainnya seperti *Klebsiella sp.* Bakteri ini dapat ditemukan berupa sel tunggal maupun berpasangan, bersifat non-motil maupun motil dengan flagel yang tersebar di seluruh badan kuman (flagel *peritrich*). Ciri-ciri *E. coli* lainnya terlihat seperti logam yang berkilau pada media yang mengandung indikator *basic fuhsin* seperti agar Endo. Metabolismenya dilakukan dengan cara fermentasi karena bersifat fakultatif anaerob. Untuk keperluan diagnostik, *E.coli* dapat diidentifikasi di laboratorium dengan menggunakan beberapa zat seperti indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol serta adanya produksi gas dari glukosa³

Bakteri ini memiliki beberapa varian (strain) dan menyebabkan penyakit tertentu. Meningitis dan pneumonia merupakan penyakit yang dapat ditimbulkannya, tetapi tidak menutup kemungkinan munculnya penyakit lain oleh karena adanya berbagai varian:

a. *Verocytotoxin-producing E.coli (E.coli enterohemoragik)*

Bakteri ini paling sering menyebabkan diare pada penduduk di Eropa dan Amerika utara. Ada pun strain yang paling sering ditemui pada bakteri tersebut adalah VTEC O157. Bakteri itu menyebar secara zoonotik, hewan yang menjadi sumber infeksi tersebut umumnya adalah lembu, sapi, dan domba. Dalam jumlah kurang dari 100 mikroorganisme, bakteri ini dapat menginfeksi manusia¹

Verositotoksin yang dimiliki oleh bakteri ini merupakan racun yang berbahaya. Hal tersebut dikarenakan verositotoksin serupa dengan toksin shiga dari *S.dysenteriae*. Racun itu tidak hanya dapat merusak sel-sel usus besar, tetapi juga endotel kapiler sehingga dapat menyebabkan kolitis hemoragik dan mikrovaskular angiopati, terutama di glomerulus dan sistem saraf pusat.¹

b. *E.coli enteropatogenik (EPEC)*

E.coli tersebut disebut juga enteroadheren *E.coli*. Bakteri tersebut merupakan penyebab utama diare infantil di negara berkembang sehingga sering ditemukan wabah pada tempat perawatan anak.¹

Bakteri tersebut menyebabkan gejala klinis dengan cara melekat pada sel mukosa usus halus yang dapat merusak mikrovili sebagai tempat masuk zat makanan ke dalam tubuh.¹

c. *E.coli enterotoksigenik (ETEC)*

Secara epidemiologi, bakteri tersebut juga menjadi penyebab utama diare pada negara berkembang, tetapi bakteri tersebut lebih sering menjadi penyebab *traveller's diarrhoea*.¹

Bakteri tersebut menjadi patogen dengan cara melepaskan dua macam toksin: *heat labile toxin* (bekerja melalui peningkatan adenilat siklase) dan *heat stable toxin* (bekerja melalui guanilat siklase). Keduanya menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi usus.¹

d. *E.coli enteroagregatif (EAggEC)*

Bakteri tersebut sering menyebabkan diare yang menetap pada anak-anak.¹

e. *E.coli enteroinvasif (EIEC)*

Invasi bakteri tersebut jarang terjadi. Ada pun gejala yang ditimbulkan menyerupai disentri di negara berkembang. Hal tersebut dikarenakan inflamasi yang ditimbulkan sering terjadi pada mukosa ileum dan kolon.¹

EPEC dan ETEC mudah ditemui karena kontaminasi makanan, sedangkan ETEC dan EIE juga dapat terkontaminasi melalui air minum. Masa inkubasinya dapat mencapai 1-2 hari, tetapi dapat berlangsung lebih singkat.¹

2.2 Kondisi yang mempengaruhi viabilitas optimum bakteri

Ada beberapa zat yang dapat dibutuhkan oleh bakteri tersebut untuk dapat hidup. Beberapa di antaranya adalah D-glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol, dulcitol, adonitol, D-sorbitol, L-arabinosa, rafinosa, L-rhamnosa, D-xylosa, melibiosa. Namun, kebutuhan dari viabilitas optimum tersebut tidak hanya berasal dari nutrisi yang diberikan, tetapi juga keadaan lingkungannya. Keadaan yang berperan tersebut antara lain berupa agen fisik dan kimia. Agen kimia yang berperan berupa ada tidaknya zat bakterisidal, bakteriostatik, antibiotik, antiseptik, alkohol, asam organik, fenol, aldehyd, *growth factor*, dan derivat dari logam berat. Ada pun agen fisik yang berperan pada umumnya berupa panas dan radiasi.³

2.2.1 Nutrisi

Nutrisi yang diperlukan bagi bakteri dapat berupa produk yang kaya akan karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, dan mineral. Keseluruhan nutrisi tersebut akan memasuki jalur metabolisme di dalam bakteri untuk aktivitas serta fungsinya sebagai makhluk hidup.³

2.2.1.1 Karbon

Sumber karbon yang digunakan oleh bakteri pada umumnya berupa gas karbondioksida, karbon organik, dan glukosa. Ketiganya merupakan sumber karbon yang digunakan spesifik untuk bakteri-bakteri tertentu.³

Karbondioksida digunakan oleh bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk energinya sendiri. Bakteri golongan tersebut disebut autotrof. Penggunaannya dapat dibantu oleh reaksi fotosintesis yang mirip dengan fotosintesis tumbuhan maupun penggunaan bahan kimia tertentu sebagai reduktor reaksi anabolisme bakteri tersebut (disebut kemolitotrof). Reduktor yang biasanya digunakan berupa ion hidrogen atau pun thiosulfat.³

Ada pun bakteri lainnya yang heterotrof lebih cenderung menggunakan glukosa sebagai sumber makanannya. Glukosa ini dimetabolisme melalui fermentasi. Jumlahnya perlu dijaga agar cukup untuk viabilitas bakteri yang diinginkan.³

2.2.1.2 Nitrogen

Nitrogen merupakan salah satu komponen terbesar yang ada pada bakteri karena menempati sekitar 5% berat sebuah bakteri. Molekulnya pun paling stabil oleh karena dibutuhkan energi yang sangat tinggi untuk memecah ikatan rangkap tiganya. Namun, untuk kebutuhan hidup, nitrogen dapat diserap dalam bentuk lain, seperti NH_3 , NO_2^- , NH_4^+ , dan NO_3^- . Adapun bentuk yang paling sering digunakan berupa amonia (NH_3), sedangkan bentuk lainnya akan diubah menjadi bentuk amonia ini. Amonia dapat menembus kanal transmembran untuk digunakan bakteri dalam proses viabilitasnya.³

2.2.1.3 Sulfur

Pada beberapa organisme, asam sulfida yang menjadi bentuk aktif yang dapat diproses dalam organisme merupakan senyawa toksik. Namun, sulfur merupakan komponen penting di dalam koenzim reaksi-reaksi kimia dalam organisme. Bentuk sulfur yang dapat diserap oleh mikroorganisme berupa sulfat (SO_4^{2-}). Bentuk tersebut akan diubah menjadi asam sulfida H_2S oleh bakteri.³

2.2.1.4 Fosfor

Fosfat sangat penting sebagai komponen energi makhluk hidup. Fosfat tidak hanya digunakan sebagai bagian dari *adenosine triphosphat* (ATP), tetapi juga perlu adanya fosfat diperlukan dalam komponen struktural dinding sel, lipid, maupun metabolit lainnya.³

2.2.1.5 Mineral

Sumber mineral yang esensial bagi mikroorganisme adalah ion magnesium, kalsium, kalium, natrium, dan besi. Magnesium merupakan ion yang diperlukan untuk klorofil, sedangkan besi digunakan sebagai koenzim sitokrom dan

Universitas Indonesia

peroksidase. Keduanya juga diperlukan untuk menjaga integritas ribosom. Kalsium diperlukan hanya pada gram positif sebagai komponen dari dinding sel. Natrium diperlukan bagi mikroorganisme laut untuk tumbuh.³

2.2.2 Lingkungan

Keadaan lingkungan yang perlu diperhatikan adalah ketersediaan nutrisi, pH, temperatur, aerasi, tekanan osmotik, kekuatan ionik, serta media yang digunakan.³

2.2.2.1 Ketersediaan Nutrisi

Komposisi nutrisi yang dibutuhkan pada mikroorganisme tidak jauh berbeda satu sama lain. Untuk keperluan penelitian, biasanya digunakan komposisi berupa donor dan akseptor hidrogen (2 g/L), karbon (1g/L), nitrogen (1g/L), mineral: sulfur dan fosfor (50 mg/L), *trace elements* (masing-masing 0.1-1 mg/L), *growth factor* (asam amino, purin, dan pirimidin, masing-masing sebesar 50 mg/L), vitamin (masing-masing 0.1-1 mg/L). Namun, penggunaan materi alami lain, seperti ekstrak ragi, sudah cukup untuk menumbuhkan mikroorganisme tersebut, kecuali pada mikroorganisme tertentu seperti *Chlamydia trachomatis* atau mikroorganisme lain yang membutuhkan suplementasi khusus.³

2.2.2.2 Derajat Keasaman (pH)

Setiap makhluk hidup memiliki pH optimum. Nilai pH ini pun harus diketahui untuk setiap spesies agar dapat mencapai viabilitas optimumnya. Organisme pada umumnya (*neutrophiles*), memiliki pH optimum berkisar antara 6.0 – 8.0 meskipun beberapa makhluk hidup dapat memiliki pH terendah hingga 3.0 (*acidophiles*) maupun 10.5 pada titik tertingginya (*alkaliphiles*).³

Mikroorganisme juga mengatur pH internalnya melalui pompa proton baik dari maupun ke dalam sel. *Acidophiles* menjaga pH internalnya pada kisaran 6.5; *neutrophiles* pada kisaran 7.5; dan *alkaliphiles* pada kisaran 9.5. Pompa proton ini menggunakan ATP untuk pertukaran antara natrium dengan hydrogen, sama seperti $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{ATPase}$ pada gaster manusia. Ada pun pertukaran kalium dengan

Universitas Indonesia

hidrogen juga diduga mempengaruhi pengaturan pH internal pada *neutrophiles*. Seluruh mekanisme tersebut ditujukan sebagai homeostasis dari mikroorganisme tersebut.³

2.2.2.3 Temperatur

Berdasarkan suhu optimum viabilitasnya, bakteri dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu *Psychrophilic* dapat hidup optimal pada suhu rendah (15 – 20 °C), *mesophilic* lebih cocok pada suhu 30 – 37 °C, dan *thermophilic* mampu hidup pada suhu 50 – 60 °C. Ada juga beberapa organisme yang tergolong *hyperthermophilic* sehingga mampu hidup pada suhu di atas 100 °C. Meski demikian, kebanyakan bakteri bersifat *mesophilic* dengan kisaran 30 °C sebagai suhu optimumnya.³

Titik tertinggi dari rentang suhu yang dapat ditoleransi oleh spesies tertentu berhubungan dengan stabilitas suhu pada protein dari spesies tersebut. Mikroorganisme bersama dengan tumbuhan maupun hewan yang menjadi hostnya memiliki protein khusus untuk memberikan *heat shock response* maupun *cold shock response* ketika ada perubahan suhu secara tiba-tiba. Gliserol dan dimetil sulfoksida sering digunakan untuk *cold shock response* ini. Namun, suhu ekstrim dapat membunuh mikroorganisme ini, baik panas maupun dingin.³

2.2.2.4 Aerasi

Penyediaan udara untuk kultur mikroorganisme cenderung menjadi permasalahan teknis dalam beragam penelitian. Umumnya, oksigen bagi mikroba disediakan dengan cara diguncangkan atau diberi tekanan. Namun, difusi dari oksigen seringkali menghambat viabilitas bagi bakteri aerob, terutama ketika konsentrasinya mencapai $4-5 \times 10^9$ /ml.³

Lain halnya dengan anaerob obligat, kelompok bakteri tersebut memiliki masalah pada pengeluaran oksigen. Ada beberapa cara untuk mengeluarkan oksigen tersebut, seperti melarutkan natrium thioglikolat pada medium cair. Selain itu,

Universitas Indonesia

tabung medium dapat dilapisi dengan lapisan petroleum dan paraffin untuk tujuan serupa.³

2.2.2.5 Tekanan Osmotik

Faktor ini tidak menjadi masalah kecuali mikroba yang biasa hidup dalam larutan gula pekat. Mereka yang biasa hidup dalam konsentrasi garam yang tinggi disebut halofilik, sedangkan mereka yang membutuhkan tekanan osmosis yang tinggi disebut osmofilik.³

Kebanyakan bakteri dapat memiliki toleransi tinggi terhadap tekanan osmotik dari luar dan kekuatan ionik karena kemampuannya mengatur kadar osmolalitas dan konsentrasi ionik. Osmolalitas diatur dengan menjaga mobilisasi aktif ion kalium ke dalam sel. Keadaan ini diimbangi dengan pengeluaran poliamina putresin organik yang bermuatan positif sehingga tekanan osmotik dapat terjaga sesuai kebutuhan.³

2.2.2.6 Media Yang Digunakan

Agar sangat cocok digunakan sebagai media untuk viabilitas berbagai sel. Agar akan larut pada suhu 100°C, tetapi agar berubah menjadi bentuk gel pada suhu dibawah 45 °C. Sel dapat ditanam pada suhu 45 °C tersebut tanpa mengalami kerusakan.³ Pada penelitian ini, peneliti menggunakan *Brain Heart Infusion* (BHI) agar, *Plate Count Agar* (PCA), dan agar nutrisi (berupa agar darah) sebagai media viabilitas *Escherichia coli*.

BHI merupakan medium yang dianjurkan untuk perbanyakan beberapa jenis mikroba patogen oportunistik dan dimorfik.⁷ Contoh organisme yang efektif ditumbuhkan pada medium ini adalah bakteri dan jamur (*Histoplasma capsulatum* dan *Blastomyces dermatitidis*). Terkadang medium ini diperkaya dengan darah domba atau kuda untuk meningkatkan viabilitas mikroba tersebut.^{7,8}

PCA digunakan untuk menumbuhkan koloni aerobik dari sampel makanan dan minuman olahan. PCA terdiri dari ekstrak ragi, tripton, glukosa, dan agar.⁹ Dapat pula dimodifikasi dengan adanya *casein enzymic hydrolysate* dan dextrosa. Mikroba yang dapat hidup di media ini antara lain *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus casei*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus pyrogenes*.¹⁰

Agar nutrisi biasanya digunakan untuk isolasi mikroorganisme, baik yang berkembang cepat maupun lambat. Keunggulannya adalah kemampuannya untuk menjaga bakteri agar tidak terjadi viabilitas yang berlebihan. Oleh karena itu, sifatnya yang non-spesifik juga banyak digunakan sebagai standar dalam pemeriksaan laboratorium mikrobiologi, khususnya untuk pemantauan sterilitas dari media sebelum reaksi kimia atau pun pemeriksaan serologi. Jika ingin menumbuhkan mikroorganisme tertentu secara cepat, agar ini dapat ditambahkan dengan darah kuda atau domba, serum, dan kuning telur.¹¹

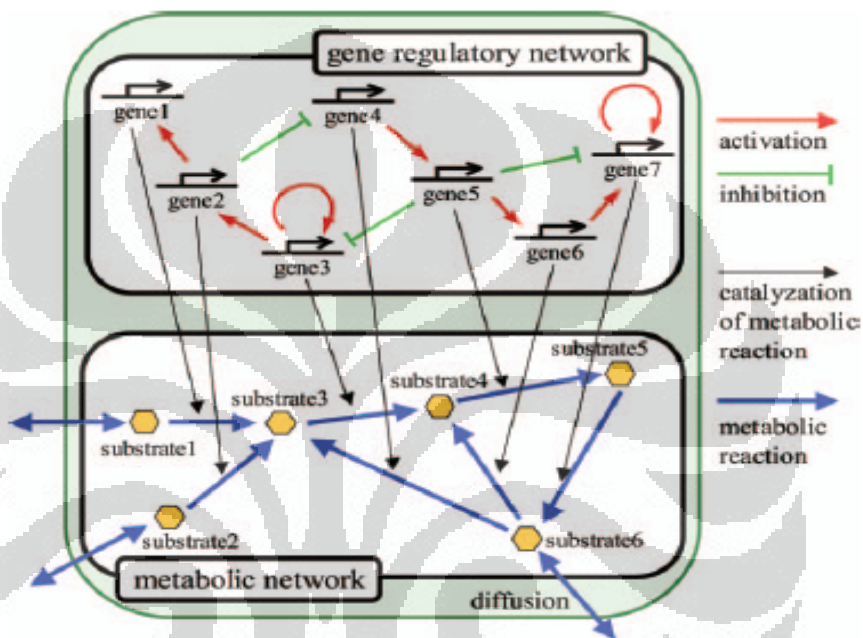
2.2.3 Fisiologi Viabilitas Bakteri dan Regulasinya

Bakteri dapat beradaptasi dengan mudah pada berbagai keadaan lingkungan. Namun, pada bakteri mekanisme adaptasi tersebut tidak selalu melibatkan transduksi sinyal, melainkan langsung dari ekspresi genetik. Melalui gen yang meregulasi transduksi sinyal dari bakteri, protein yang disintesis untuk kebutuhan tersebut tidaklah cukup untuk sebuah *E.coli* agar dapat bertahan pada berbagai lingkungan dengan banyak jenis stressor dan perbedaan kadar karbon dan nitrogen yang dibutuhkan. Hal tersebut tentu berbeda dari adaptasi sel yang selalu dimulai dengan adanya transduksi sinyal sebelum dilakukan perubahan ekspresi genetik serta perubahan distribusi metaboliknya.⁷

Setelah bakteri tersebut beradaptasi, viabilitas pun terjadi. Namun, tidak seperti kebanyakan makhluk hidup tingkat tinggi, bakteri bertumbuh dengan didominasi oleh aktivitas pembelahan dirinya yang sangat cepat. Selain itu, akibat dari aktivitas pembelahan diri yang cepat, bakteri tersebut memiliki jumlah individu

Universitas Indonesia

yang banyak dalam waktu singkat dengan peluang kejadian mutasi yang paling besar. *E.coli* memiliki peluang untuk bermutasi sekitar 1 dari 10 juta sel bakteri, tetapi dengan jumlah 2×10^{10} *E.coli* baru akan muncul dalam saluran cerna, setidaknya akan ada 2.000 bakteri yang mengalami mutasi.¹²



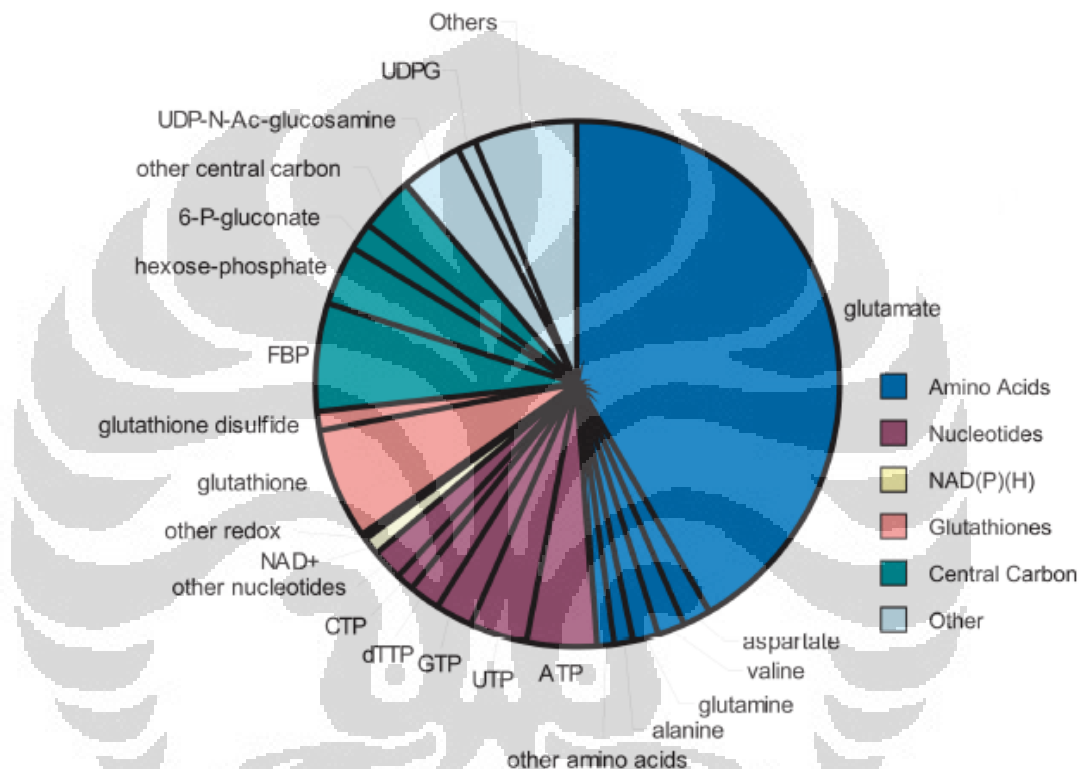
Gambar 2.1. Skema model regulasi genetik, substrat, serta hubungannya¹³ (Campbell NA, et al. 2008).¹³

Kedua regulasi tersebut dihubungkan dengan protein hasil ekspresi gen. Panah berwarna merah menunjukkan aktivasi; warna hijau menunjukkan inhibisi; warna hitam menunjukkan adanya produk protein yang berperan sebagai katalisator sekaligus penghubung dengan reaksi metabolit; dan warna biru sebagai perubahan substrat yang terkatalisis. Ada pun panah yang menunjuk pada gen yang sama menunjukkan adanya autoregulasi.¹³

Ada pun hasil dari metabolisme *E.coli* dapat dipaparkan dalam grafik 1 berikut ini. Komposisi metabolit pada *E.coli* didominasi oleh adanya asam amino, terutama glutamat, hingga mencapai 49% dari seluruh metabolit yang dihasilkan

Universitas Indonesia

oleh bakteri tersebut. Jumlah terbanyak kedua setelahnya adalah nukleotida, terutama ribonukleotida trifosfat yang mencapai 15%. Komponen metabolit yang terbanyak berikutnya berturut-turut adalah glutathione, fruktosa-1,6-bifosfat, dan ATP.¹⁴



Grafik 2.1 Komposisi dari Hasil Metabolisme yang Terukur Pada *E. coli*¹⁴
(Bennett BD, et al. 2010)¹⁴

Menurut Bennett BD, et al (2010), *E.coli* menghasilkan molekul-molekul terukur berupa adenosin-5'-trifosfat (ATP); uridin-5'-trifosfat (UTP); guanosin 5'- trifosfat (GTP); thymidin 5'- trifosfat (dTTP); sitidin-5'- trifosfat (CTP); nikotinamida adenin dinukleotida (NAD+); fruktosa-1,6-bisfosfat (FBP); 6-P-glukonat, 6-fosfo-glukonat; Heksosa-P, uridin-5'-difosfat N-asetil-glukosamin (UDP-N-Ac-Glucosamine); uridine-5'-difosfatglukosa (UDPG). Semua komponen tersebut

penting untuk menghasilkan energi dan membantu berbagai aktivitas dari bakteri tersebut.¹⁴

2.3 Frekuensi Bunyi dan Sonikator pada Penelitian Mikrobiologi

Frekuensi bunyi adalah banyaknya getaran yang dihasilkan dalam selang waktu tertentu. Frekuensi ini dinyatakan dengan satuan hertz. Satu hertz didefinisikan sebagai satu kali getaran dalam selang waktu satu detik. Frekuensi tersebut digunakan untuk mengukur tinggi rendahnya suatu nada (*pitch*).¹⁵

Untuk melepaskan gelombang suara yang berupa rangsangan mekanik ini, kita memerlukan suatu alat yang disebut sonikator. Sonikator ini dapat digunakan untuk pemberian suara sesuai batas ambang pendengaran maupun ultrasonik. Biasanya alat ini digunakan sebagai alat bantu diagnostik secara *in vitro* pada laboratorium yang kecil. Tujuan dari pemberian rangsangan tersebut adalah untuk menghasilkan suatu reaksi, terutama melepaskan suatu bahan teragregasi yang terlarut dalam medium. Hal tersebut sangat membantu pada *immunoassay*. Selain itu, tindakan sonikasi banyak dipakai untuk disosiasi, transfer zat tertentu, mencampur, penguat reaksi, pemisahan, atau penambahan zat tertentu.¹⁶

Sonikator yang paling sering digunakan adalah *microtip sonicator probe*. Sonikator terdiri dari bagian transduser sebagai penghasil frekuensi bunyi dan sonotrode sebagai “laras” atau pengarah suara yang dihasilkan dari sonikator tersebut. Desain tersebut berguna untuk efektivitas hantaran suara serta memudahkan pengaturan kavitas yang dihasilkan (definisi kavitas diterangkan di sub bab 2.4). Untuk efektivitas penggunaannya, ujung dari *sonotrode* harus terendam di dalam cairan. Cairan ini merupakan penghantar gelombang suara terhadap medium yang mengandung bahan untuk disonifikasi. Cairan ini disebut sebagai *acoustic couplant* dan dapat diganti dengan bahan-bahan penghantar khusus seperti gel dan material semipadat lainnya. Oleh karena itu, tinggi cairan di dalam wadah yang digunakan harus cukup untuk menutup sebagian besar ujung sonikator. *Acoustic couplant* dapat digunakan juga sebagai pelarut dari medium atau material yang hendak disonikasi.¹⁶

Untuk memperkirakan pengaruh dari sonikasi ini, kita harus mengetahui terlebih dahulu mengenai impedansi akustik. Sederhananya, impedansi akustik merupakan karakteristik hantaran dari gelombang suara. Impedansi akustik (Z) ini dihitung sebagai $Z = \rho c$, dimana ρ adalah masa jenis medium yang disonikasi dan c adalah kecepatan hantaran suara dalam medium. Pada sonikasi yang tegak lurus terhadap permukaan medium, perhitungannya dapat dituliskan sebagai berikut.¹⁶

$$\frac{P_2}{P_1} = \frac{4Z_1Z_2}{(Z_1+Z_2)^2} \dots\dots\dots(2.1)$$

Keterangan: P_1 = kekuatan yang dihasilkan
 P_2 = kekuatan yang diteruskan ke medium
 Z_1 = impedansi akustik sumber bunyi
 Z_2 = impedansi akustik di medium

Medium yang digunakan pada suatu sonikasi dapat terdiri dari berbagai macam bentuk. Namun, yang paling sering digunakan adalah bentuk cairan atau suspensi. Di dalamnya dapat terdiri dari berbagai macam zat, mulai dari partikel, ligan, polimer, koloid, mikroba, hingga spesimen cairan tubuh dapat digunakan. Medium ini dapat langsung dipakai, tetapi sentrifugasi, hemolisis, atau penambahan zat tertentu dapat dilakukan jika dirasa perlu.¹⁶

Frekuensi, amplitudo, dan waktu sonikasi dapat disesuaikan. Biasanya sonikasi dilakukan minimal pada 1 kHz dan dapat ditingkatkan hingga keadaan ultrasonik dalam rentang 20-100 kHz. Daya yang dihasilkan dapat mencapai lebih dari 10 W. Ada pun amplitudo yang dihasilkan dapat mencapai 100 μm di dalam medium, tergantung dari energi yang diserap oleh medium tersebut.¹⁶

2.4 Paparan Frekuensi Bunyi, Khususnya Ultrasonik, Terhadap Bakteri

Pemaparan dengan frekuensi bunyi turut mempengaruhi beberapa keadaan bakteri, khususnya pada morfologinya. Hal tersebut berkaitan dengan penelitian-penelitian yang sudah banyak dilakukan dengan mengaplikasikan gelombang ultrasonik pada sampel bakteri yang ada sehingga terjadi berbagai macam hal, baik lisis sel, viabilitas,

hingga penurunan resistensi antibiotik. Semuanya itu tergantung pula dari cara pemaparannya.¹⁷

Ultrasonik dapat mempengaruhi bakteri dengan adanya interaksi antara bunyi dengan membran sel. Namun, gelombang ultrasonik tersebut tidak langsung atau sedikit sekali menyebabkan perubahan pada membran sel bakteri. Peranan perubahan terbesar pada sel bakteri disebabkan oleh tekanan osilasi (getaran) pada medium di sekitarnya. Gelombang ultrasonik tersebut menyebabkan getaran dengan frekuensi tinggi pada cairan medium dari bakteri tersebut.^{17,18}

Dengan adanya gelombang ultrasonik tersebut, gelembung gas udara di dalam cairan tersebut akan berosilasi. Proses itu disebut kavitasi dan kavitasi ini terjadi pada frekuensi pada semua frekuensi. Namun, pada frekuensi di bawah 100 KHz, kavitasi terjadi oleh karena adanya intensitas bunyi, tetapi intensitas bunyi ini tidak tergantung dengan frekuensi bunyi. Untuk frekuensi di atas 100 KHz, gelembung ini membutuhkan intensitas yang sebanding dengan frekuensinya. Kavitasi dibagi menjadi dua: stabil dan kolaps. Kavitasi stabil adalah osilasi lemah pada gelembung udara tanpa terjadinya kolaps yang sempurna, sedangkan kavitasi kolaps terjadi pada osilasi dengan intensitas tinggi tetapi berfrekuensi rendah. Kavitasi kolaps inilah yang menyebabkan timbulnya gelombang pada cairan yang lebih cepat menyebar pada daerah sekitarnya. Kolaps tersebut menyebabkan pelepasan panas secara adiabatik. Panas yang dilepaskan memiliki temperatur yang sangat tinggi sehingga menyebabkan pula pelepasan radikal bebas disertai adanya gaya gesek yang kuat pada membran sel. Tidak hanya itu, kavitasi stabil turut menarik kumpulan bakteri yang ada di dekatnya sehingga tertarik dalam gelembung yang berosilasi tersebut. Hal tersebut menyebabkan bakteri mengalami radiasi dalam keadaan rotasi oleh adanya *torque*.^{17,18}

Mekanisme tersebut tidak langsung menyebabkan kerusakan pada dinding bakteri oleh karena perbedaan berbagai batasan variabel dari ultrasonik itu sendiri. Gelombang ultrasonik dikatakan berintensitas tinggi jika lebih dari 2 W/cm² dan

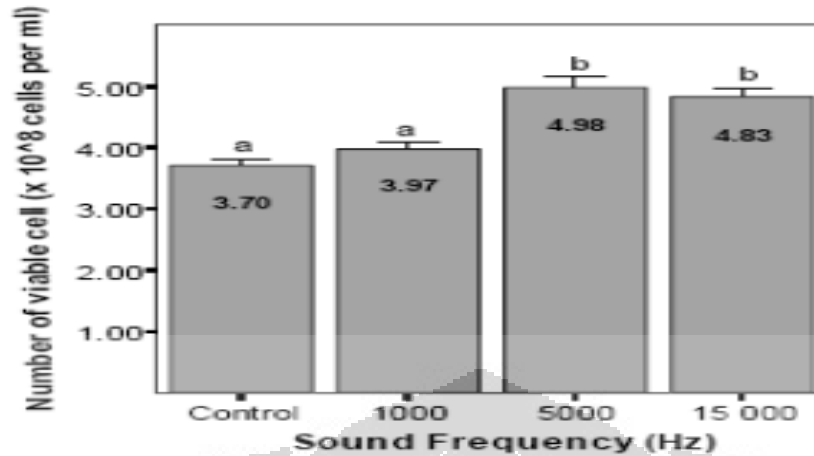
Universitas Indonesia

dikatakan frekuensi rendah jika kurang dari 100 kHz. Namun, intensitas tinggi tersebut baru mampu melisiskan bakteri jika lebih dari 10 W/cm².⁴ Selain itu, pengaruh yang ditimbulkan oleh adanya ultrasonik tergantung dari 4 faktor: tipe bakteri, suhu dari buffer sonikasi, durasi, serta komposisi dari tabung sonikasi tersebut.¹⁸

2.5 Pengaruh Paparan Frekuensi Bunyi Terhadap Viabilitas *E.coli* Pada Penelitian Yang Pernah Dilakukan

Pemaparan adanya frekuensi bunyi tersebut terhadap viabilitas *E.coli* sendiri memiliki pengaruh yang unik. Pada penelitian yang pernah dijalankan, penggunaan frekuensi bunyi dalam batas ambang pendengaran memicu viabilitas dari *E.coli* tersebut. Namun, intensitas pengaruh tersebut berubah, dengan adanya faktor lingkungan yang lain, seperti penggunaan gula dan garam.¹⁹

Penelitian tersebut (grafik 2) menunjukkan adanya peningkatan jumlah bakteri dengan pemaparan frekuensi 1 kHz sebesar 7%, 5 kHz sebesar 34%, dan 15 kHz sebesar 30.5%. Perhitungan itu dilakukan dengan menggunakan *plate count*. Dengan demikian, penelitian tersebut tidak hanya menyimpulkan adanya viabilitas bakteri yang lebih banyak, tetapi juga mengindikasikan adanya viabilitas selektif bakteri itu, yaitu adanya viabilitas tertinggi pada frekuensi 5 kHz. Namun, penelitian tersebut baru menggunakan 3 tingkat frekuensi.⁶

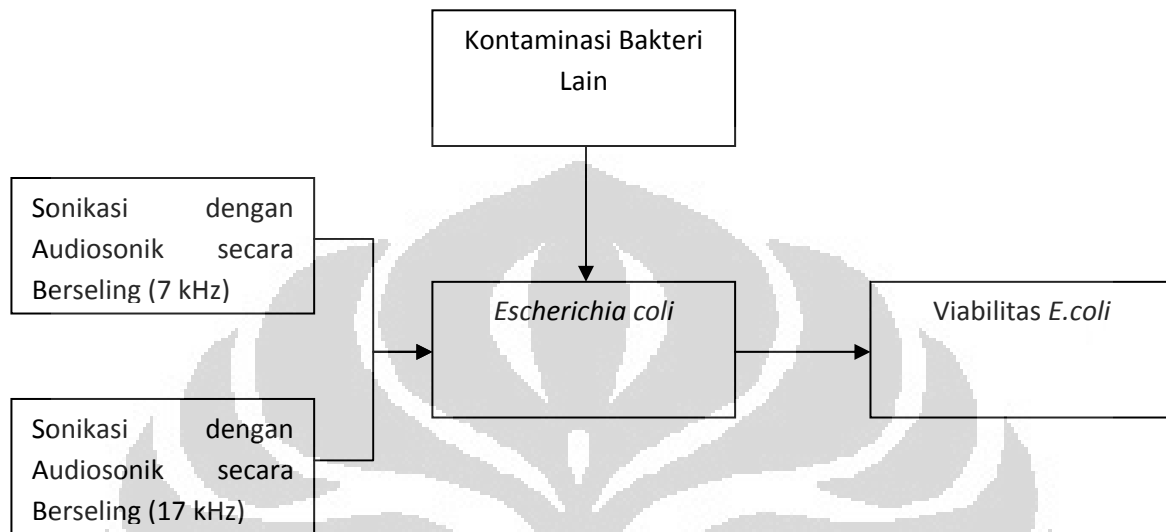


Grafik 2.2 Perbandingan jumlah sel bakteri yang hidup dengan pemberian frekuensi bunyi audiosonik pada salah satu penelitian yang telah ada.⁶ (Ying JCL, et al. 2009).⁶

Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Shaobin G, et al (2010)¹⁹. Dalam penelitiannya yang juga bertujuan melihat pengaruh dari frekuensi bunyi dalam batas pendengaran manusia (audiosonik) mengungkapkan bahwa efek peningkatan koloni *E.coli* tetap ditemukan. Namun, efek tersebut berubah menjadi penurunan viabilitas jika ditambah dengan garam dalam konsentrasi tertentu. Hal menarik lainnya dari penelitian Shaobin G, et al ini adalah efek tersebut berkurang jika konsentrasi garam ditingkatkan dari 20 g/L menjadi 30 g/L. Penelitian tersebut masih belum mengetahui mekanisme pasti dari hasil yang mereka temukan tersebut.¹⁹

Selain itu, perlu diketahui bahwa mekanisme yang dihasilkan ultrasonik pada keadaan yang sudah dipaparkan sebelumnya, dapat pula menyebabkan disrupsi membran yang cukup walaupun kavitasi yang dihasilkan adalah kavitasi stabil.¹⁷ Namun, adanya perbedaan ketebalan dinding membran sel pada bakteri gram positif dan negatif menghasilkan perbedaan kerentanan terhadap stimulasi oleh adanya ultrasonik. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa *E.coli* pada berbagai media akan mengalami penurunan viabilitas pada frekuensi pemaparan lebih dari 70 kHz, sedangkan bakteri gram positif relatif resisten terhadap pemaparan ultrasonik.¹⁸

2.6 Kerangka Konsep



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorik.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan diadakan pada tahun 2010-2011, mulai dari membuat proposal sampai dengan penyusunan laporan penelitian. Penelitian bertempat di laboratorium mikrobiologi, Departemen Mikrobiologi FKUI, di Jl. Pegangsaan Timur No.16 Jakarta Pusat.

3.3 Bahan, Alat Penelitian, dan Cara Kerja

3.3.1 Bahan Penelitian*

1. *Brain Heart Infusion* (BHI)
2. *Plate Count Agar* (PCA)
3. Agar nutrisi
4. *Eschericia coli* dalam biakan agar nutrisi
5. Akuades steril
6. Es
7. Alkohol

3.3.2 Alat Penelitian

1. Sengkelit 10 μ l 1 buah
2. Mikropipet 1000 μ l
3. Tip dari mikropipet
4. Wadah sonikasi (tabung falcon atau gelas kaca)
5. Sonikator
6. Wadah es
7. Tabung reaksi steril
8. Gelas ukur

9. Pipet gondok
10. Inkubator
11. *Colony counter*
12. *Stopwatch*
13. Pemanas air
14. Timbangan
15. Sendok
16. Alat penguap
17. Termometer
18. Plat steril
19. Sarung Tangan
20. Masker
21. Vortex
22. Otoklaf
23. Lampu spiritus
24. Mikroskop
25. Alkohol 95%
26. Larutan safranin, methylene blue, lugol
27. Preparat kaca



Gambar 3.1 Pewarna dalam metode pewarnaan gram



Gambar 3.2 Lemari inkubator untuk menjaga suhu 37°C bagi viabilitas *E.coli*

3.3.3 Langkah Kerja

3.3.3.1 Pembuatan Media Perkembangbiakan

A. *Brain Heart Infusion (BHI)*¹⁹

BHI yang digunakan merupakan BHI dengan komposisi sesuai standar dari DIFCO Laboratories incorporated (1977). Bahan-bahan tersebut dapat dilihat pada lampiran 1. Semua bahan tersebut dicampurkan, lalu diambil sebanyak 18.75 gram dan dilarutkan pada aquadest sebanyak 500 ml. Larutan tersebut dididihkan, lalu saring larutan tersebut dengan kertas saring hingga media menjadi jernih. Sterilkan dengan otoklaf sesudahnya, lalu hasilnya dibagi dalam beberapa tabung. Masing-masing berisi 10 ml, lalu tutup dengan kapas steril.

B. *Agar Nutrisi*¹⁹

Agar nutrisi ini dibuat dengan bahan-bahan seperti yang tertera pada lampiran 1. Seluruh bahan tersebut dicampur, lalu diaduk dan dimasak hingga mendidih (100°C). Saring bahan tersebut sesudahnya hingga air agar menjadi jernih. Tentukan pH sesudah bahan tersebut dingin, lalu sterilkan dengan otoklaf. Penentuan pH ini dilakukan dengan *Brom Timol* sebagai indikator. Tuangkan media steril ini pada cawan petri sebanyak 10 ml. Jika tahapan-tahapan tersebut sudah dilalui, agar nutrisi siap digunakan. Agar tersebut juga dapat disimpan di lemari es terlebih dahulu.

C. *Plate Count Agar (PCA)*

Untuk PCA, bahan tersebut ditimbang sebanyak 8.75 gram, lalu dicampurkan dalam air sebanyak 500 ml. Larutan ini dipanaskan hingga mendidih, lalu dimasukkan dalam otoklaf. PCA siap digunakan jika suhunya sudah mencapai 45 °C.



Gambar 3.3 Agar *Plate Count Agar (PCA)* dalam kolf. Satu tabung kolf berisi sekitar 500 ml PCA.

3.3.3.2 Sterilisasi Alat dan Media²⁰

Tindakan ini tetap perlu dilakukan untuk menjamin tidak adanya kontaminasi dari mikroorganisme lain. Alat dan media tumbuh merupakan sumber kontaminan utama karena digunakan sebagai alat pemindah dan penempatan mikroorganisme.

Sterilisasi alat dan media didahului dengan penempatan terlebih dahulu di dalam sebuah botol perbenihan untuk disterilkan dengan otoklaf. Penggunaan otoklaf dilakukan sesudah dengan prosedurnya, yaitu pemanasan pada suhu 120°C dengan tekanan 2 atmosfer (15 lbs). Durasi prosedur ini berkisar 15-20 menit.

3.3.3.3 Peremajaan Bakteri

1. Menyiapkan bunsen yang sudah dinyalakan apinya, bakteri uji, media perkembangbiakan dan sengkeli atau jarum inokulasi
2. Jarum inokulasi dipanaskan untuk mensterilkannya
3. Sediaan bakteri diambil dari media agar darah agar sebanyak satu sengkeli (sudah disetarakan dengan 0.5 McFarland)
4. Membuka tabung berisi media NHI, mulut tabung dipanaskan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi
5. Bakteri yang ada dalam sengkeli dibiakkan ke dalam media tersebut. Pemiakan dilakukan sebanyak 3 kali: 1 untuk kontrol dan 2 untuk perlakuan
6. Menginkubasi pada inkubator 35°C selama 24 jam

3.3.3.4 Identifikasi Bakteri

Untuk melakukan identifikasi bakteri, peneliti melakukan pewarnaan gram.

3.3.3.5 Sonifikasi Bakteri

Untuk perlakuan terhadap bakteri, dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Memasukkan media perkembangbiakan (BHI) yang telah berisi bakteri 24 jam ke dalam wadah sonifikasi
2. Memasukkan wadah sonifikasi ke dalam wadah berisi es untuk menjaga agar panas yang dihasilkan ultrasound tidak keluar dari wadah.
3. Melakukan sonifikasi bakteri dengan perlakuan sebagai berikut
 - a. Mencilupkan ujung sonikator ke dalam medium perkembangbiakan pada wadah sonifikasi. Perhatikan agar ujung sonikator tidak menyentuh dasar wadah.
 - b. Memaparkan pada frekuensi 7 kHz selama 10 detik secara terputus-putus (*intermitten*). Ditandai sebagai "F1"
 - c. Memaparkan pada frekuensi 17 kHz selama 10 detik secara terputus-putus (*intermitten*). Ditandai sebagai "F2"
 - d. Satu tabung lagi tidak diberikan perlakuan apapun. Ditandai sebagai "K" (Kontrol)

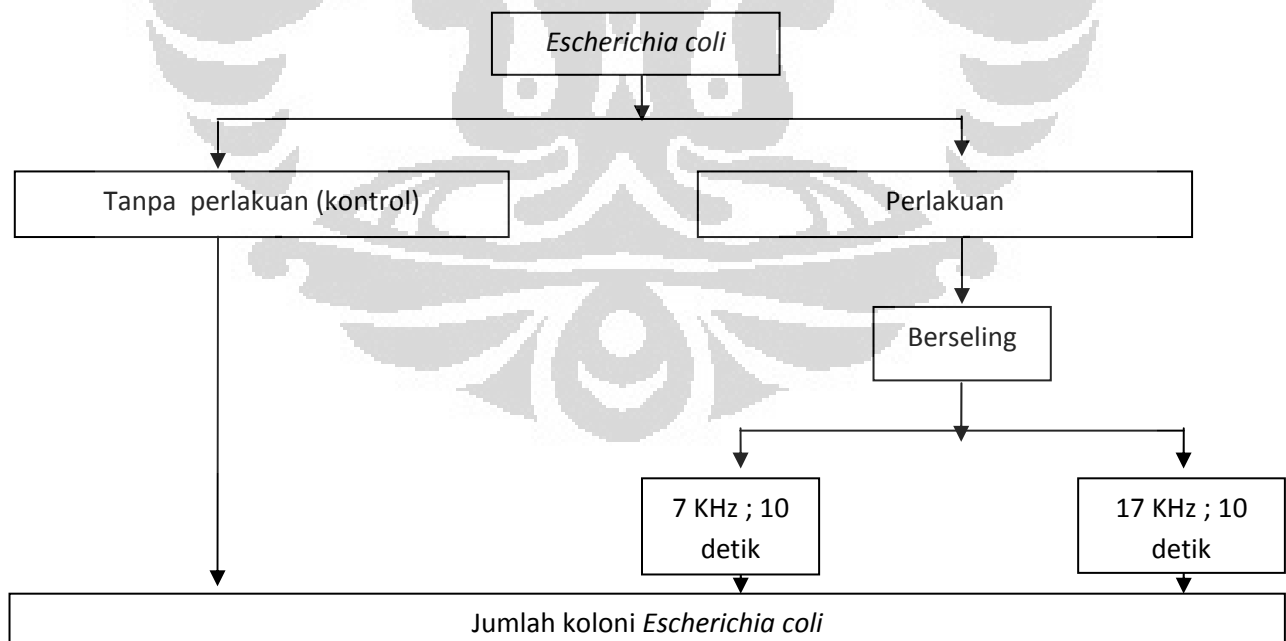
Catatan: Bunyi dipaparkan selama kurang dari 1 detik dengan perbedaan waktu antar bunyi selama 1 detik.

4. Jika telah selesai, kembalikan hasil sonifikasi ke dalam wadah untuk perkembangbiakan.



Gambar 3.4 Sonikasi bakteri dalam wadah yang dikelilingi es untuk mengurangi pelepasan panas dari dalam wadah

Secara umum, langkah-langkah sonifikasi yang dilakukan terhadap *E.coli* dilakukan dengan urutan sesuai bagan di bawah ini.

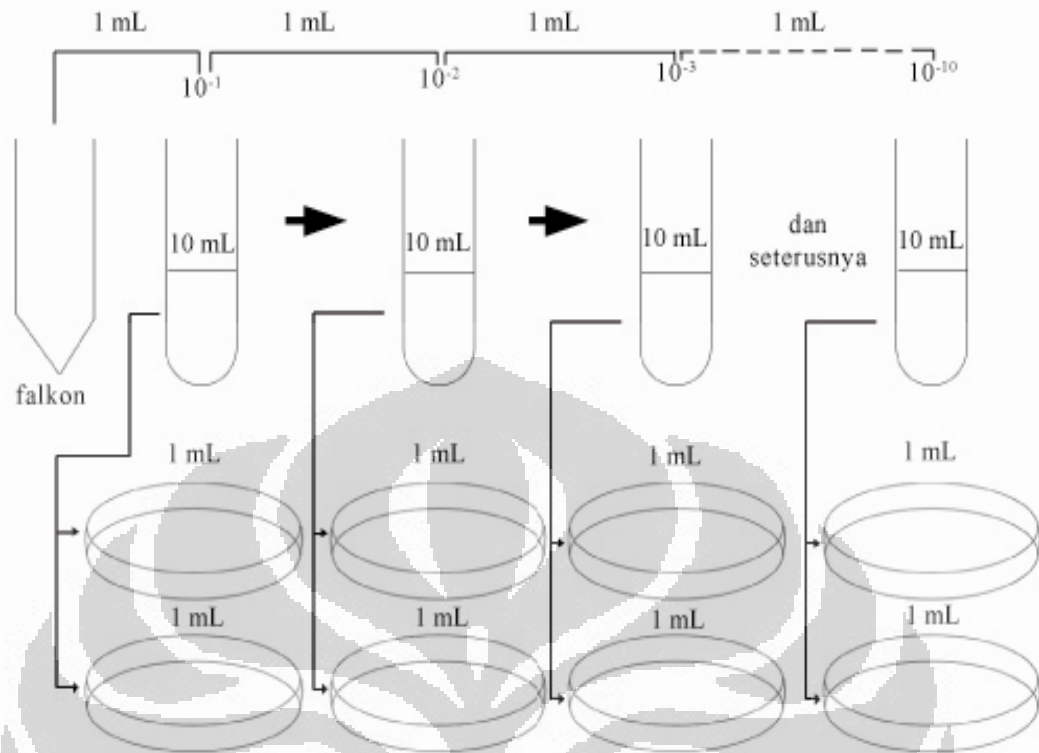


Gambar 3.5 Urutan tindakan yang diberikan terhadap *Escherichia coli* dalam penelitian ini.

3.3.3.6 Total Plate Count^{21,22}

Peneliti melakukan langkah-langkah untuk mengembangbiakan bakteri hasil perlakuan (kontrol, F1, dan F2):

1. Mengambil hasil sonifikasi sebanyak 1 ml lalu mencampurkannya dengan 9 ml akuades di dalam tabung reaksi.
2. Dari hasil pencampuran tersebut, ambil 1 ml untuk diteteskan pada tabung reaksi berikutnya. Tindakan tersebut dilakukan hingga tabung reaksi ke-10. Tindakan ini merupakan tindakan pengenceran.
3. Mengambil 1 ml cairan pada tabung reaksi untuk diteteskan pada plat steril. Tindakan ini dilakukan dua kali, masing-masing untuk kedua plat steril: A dan B.
4. PCA dituangkan pada setiap plat steril sebanyak \pm 20 ml.
5. Plat steril yang kini berisi PCA dan cairan dari tabung reaksi diaduk perlahan dengan cara menggerakkan plat searah dan berlawanan arah jarum jam dengan jumlah yang sama (10 kali pada masing-masing arah) agar campuran menjadi homogen.
6. Setelah agar membeku, plat tersebut diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam.



Gambar 3.6 Skema pengenceran hasil sonifikasi bakteri

Cara ini merupakan *total plate count*. Metode ini mengacu pada standar nasional Indonesia mengenai cara pemeriksaan mikroba. Rincian metode standar dapat dilihat dalam lampiran.

3.3.3.7 Menghitung Koloni Bakteri

Bakteri yang hidup (*viable*) dihitung jumlah koloninya dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah representatif berkisar antara 30 – 300 koloni pada pengencerannya.^{21,22}

3.4 Identifikasi Variabel

- Variabel Bebas : Sonifikasi dengan audiosonik secara intermiten
 Variabel Terikat : Viabilitas bakteri *Escherichia coli*
 Variabel Perancu : kontaminasi bakteri lain
 Variabel kontrol : wadah, medium, suhu, standar McFarland

3.5 Definisi Operasional

Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan beberapa definisi sebagai berikut:

- a. **Sonikator** adalah alat penghasil gelombang suara.
- b. **Audiosonik** adalah bunyi dengan frekuensi antara 20 – 20.000 Hz.
- c. **Frekuensi bunyi** adalah banyaknya getaran bunyi yang terjadi selama satu detik
- d. **Sengkelit/jarum inokulasi/ose** adalah alat untuk mengambil biakan bakteri dalam medium cair maupun padat
- e. **Bakteri** adalah mikroorganisme prokariot
- f. **Media perkembangbiakan** adalah media yang digunakan bakteri untuk berkembang biak (Agar)
- g. **Total Plate Count** merupakan cara yang digunakan untuk menghitung koloni bakteri.
- h. Viabilitas bakteri *Escherichia coli* akan dilihat dari jumlah koloni yang terbentuk sesudah diinkubasi pasca-perlakuan.

3.6 Alur Penelitian



3.7 Rencana Manajemen dan Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisa secara kuantitatif untuk mendapatkan kesimpulan penelitian. Pengolahan secara kuantitatif ini dilakukan dengan mengambil sampel yang paling mewakili penelitian, yaitu sediaan yang memiliki jumlah bakteri antara 30-300 koloni. Sediaan dengan jumlah koloni dalam batas pada pengenceran tertinggi dirata-ratakan untuk setiap perlakuan.^{21,22}

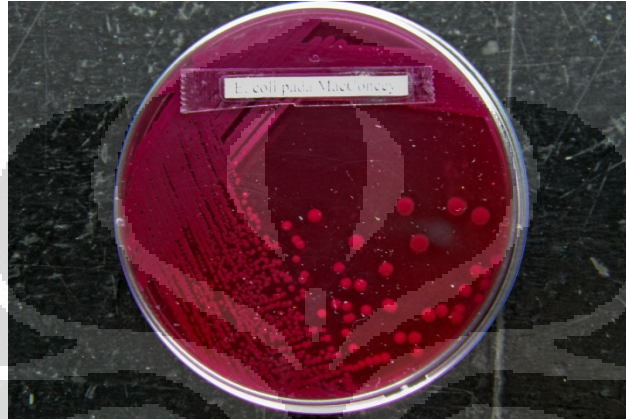
Untuk analisis nilai kemaknaannya, peneliti menggunakan uji statistik dengan menggunakan program SPSS versi 17. Peneliti melakukan uji normalitas terlebih dahulu sebelum menganalisis dengan menggunakan uji T berpasangan. Uji T berpasangan dipilih karena data yang disajikan merupakan data numerik yang akan membandingkan viabilitas perlakuan dengan kontrol. Jika distribusi data tidak normal, peneliti akan menganalisis data dengan uji McNemar karena hanya terdiri dari 2 kali pengulangan (A dan B) dan 2 kategori (kontrol dan perlakuan).²³

3.8 Etika Penelitian

Karena tidak menggunakan subjek manusia maupun hewan, tidak ada permasalahan etik yang mungkin timbul.

BAB 4 HASIL PENELITIAN

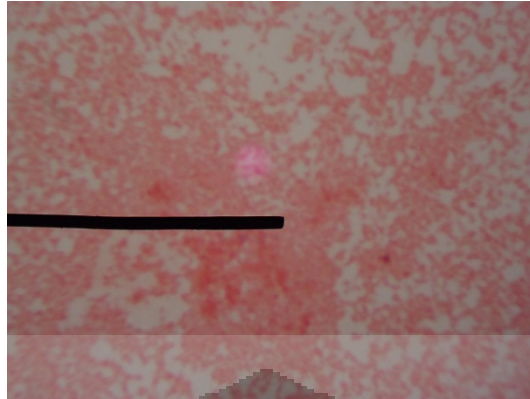
4.1 Karakteristik *E.coli*



Gambar 4.1 *E.coli* dalam sediaan agar nutrisi

Dalam sediaan agar nutrisi (gambar 4.1), *E.coli* tampak menunjukkan koloni dalam berbagai ukuran. Koloni tersebut berbentuk bulat dan tersebar tidak merata. Ada pula koloni-koloni kecil yang tampak tersusun rapi membentuk garis pada agar nutrisi tersebut. Itulah penampilan *E.coli* pada sediaan agar nutrisi.

E.coli merupakan bakteri gram negatif karena menunjukkan warna merah muda pada pewarnaan gram sebagai hasil dari penyerapan safranin. Safranin merupakan pewarna akhir dari tahapan identifikasi bakteri dengan metode pewarnaan gram. *E.coli* tampak berbentuk batang (basil). Ia dapat ditemukan sebagai bakteri tunggal atau berpasangan dengan *E.coli* lainnya. Deskripsi tersebut merupakan penjelasan pada gambar 4.2 berikut ini.



Gambar 4.2 Koloni bakteri gram negatif (-)

Pada gambar 4.1 tersebut terdapat persebaran bakteri gram negatif yang tidak merata. Bakteri tersebut tampak berkelompok dan padat pada daerah-daerah tertentu sebagai akibat dari teknik pewarnaan Gram dan spesimen yang digunakan mengandung konsentrasi bakteriyang cukup tinggi. Bentuk bakteri tersebut tampak sebagai batang.

Namun, keadaan tersebut belum memastikan bahwa bakteri *E.coli*, perlu dilakukan pemeriksaan mikrobiologi lainnya. Pemeriksaan tersebut menggunakan beberapa zat untuk dilihat kemampuannya memfermentasi bakteri tersebut. Pada *E.coli*, fermentasi paling banyak dilakukan terhadap sediaan sukrosa (tabung reaksi dengan warna biru muda) seperti pada gambar 4.3 berikut ini. Tabung reaksi tersebut sudah diberikan larutan untuk uji Iodium sehingga perubahan jenis karbohidrat akan tampak dengan perubahan warna menjadi ungu.



Gambar 4.3 Hasil fermentasi *E.coli*.

4.2 Perhitungan *E.coli* Setelah Perlakuan

Hasil pengenceran sekali (1) hingga sepuluh ribu (10^5) kali memiliki terlalu banyak koloni sehingga *tidak dapat dihitung* untuk rerata. Untuk perhitungan, peneliti mengalikan rata-rata jumlah koloni yang hidup dengan jumlah pengenceran yang dilakukan. Rata-rata tersebut akan dijadikan dasar dari analisis penelitian ini. Adapun rata-rata akhir yang menjadi dasar untuk analisis tertera pada tabel 4.1 berikut ini

Tabel 4.1 Rata-rata jumlah *E.coli* pada setiap perlakuan dan kontrol

Perlakuan	Rata-rata koloni (x 10^7 CFU)	Viabilitas (%)	Nilai Kemaknaan (95% IK)*
Kontrol	284	100	-
7 kHz ; 10 detik	4.05	1.43	0.023 (98.2-461.6)
17 kHz; 10 detik	50.5	17.96	0.032 (125-341.5)

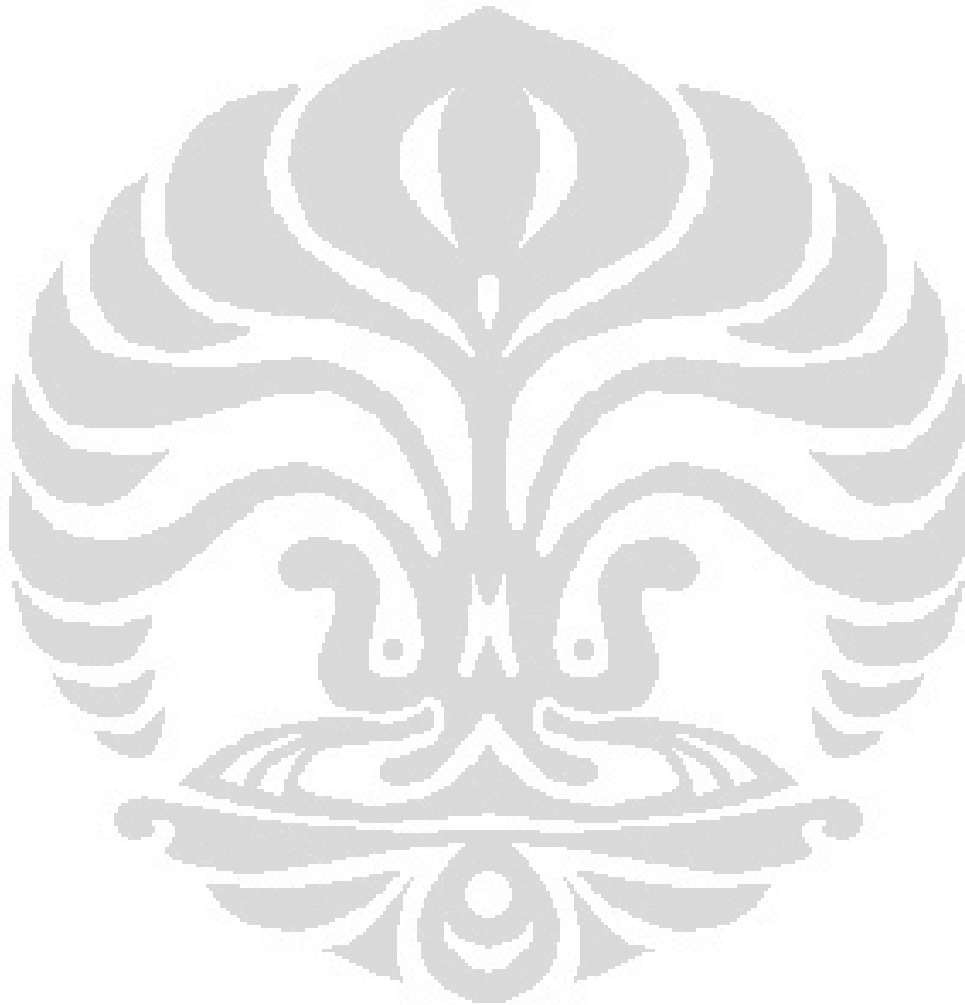
*Bermakna jika $p < 0.05$

Perhitungan rata-rata dilakukan secara bertahap. Peneliti merata-ratakan setiap pengenceran terlebih dahulu. Namun, untuk perhitungan rata-rata keseluruhan koloni *E.coli* pada setiap perlakuan, peneliti hanya akan merata-ratakan yang sesuai dengan persyaratan yang telah dijelaskan sebelumnya (30-300 koloni). Dengan demikian, peneliti mendapatkan rata-rata jumlah *E.coli* sebagaimana tertera pada tabel 4.2. Untuk kepentingan pelaporan hasil penelitian tersebut, peneliti membulatkannya menjadi dua angka penting. Jadi, hasil akhir penelitian ini mendapatkan sejumlah bakteri kontrol terdiri dari $2,9 \times 10^9$ koloni, F1 (7 kHz; 10 detik) sebesar $4,1 \times 10^7$ koloni, dan F2 (17 kHz; 10 detik) sebesar $5,1 \times 10^8$ koloni.

Jadi berdasarkan hasil penelitian ini, kedua perlakuan memberikan penurunan viabilitas pada bakteri. Hal tersebut terlihat dari jumlah koloni bakteri pada perlakuan yang lebih rendah daripada viabilitas pada kontrol. Namun, viabilitas pada bakteri yang diberikan frekuensi bunyi sebesar 17 KHz lebih besar daripada bakteri dengan frekuensi bunyi sebesar 7 KHz. Hal tersebut menunjukkan penurunan viabilitas lebih besar pada pemberian gelombang bunyi sebesar 7 kHz

Universitas Indonesia

daripada 17 KHz. Dengan pajanan 7 kHz, *E.coli* hanya dapat membentuk koloni sebanyak 1.43% koloni kontrol. Lain halnya dengan pajanan 17 kHz, *E.coli* masih mampu membentuk koloni sebanyak 17.96% dari jumlah koloni kontrol. Perbandingan hasil pajanan 17 kHz dengan 7 kHz ini tercatat sebesar 7.9 kali. Dengan kata lain, terjadi penurunan viabilitas berturut-turut hingga 98.57% dan 82.04% pada pajanan 7 kHz dan 17 kHz selama 10 detik.



BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Perbandingan Viabilitas Bakteri Antara Kontrol Dengan Pemaparan Frekuensi Bunyi Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan temuan bahwa pemaparan frekuensi bunyi pada batas pendengaran secara berseling menyebabkan penurunan viabilitas pada bakteri jika dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Penurunan viabilitas tersebut ditunjukkan dengan berkurangnya jumlah koloni yang terbentuk jika dibandingkan dengan kontrol secara bermakna, baik antara 7 kHz dengan kontrol ($p=0.032$) maupun 17 kHz ($p=0.023$).

Jumlah bakteri tersebut menurun akibat adanya pengaruh dari sonikasi dalam batas pendengaran normal. Pengaruh tersebut sama seperti pada pemaparan dengan ultrasonik. Kavitas serta radikal bebas yang ditimbulkan oleh bunyi akan mengenai membran sel yang ada. Kerusakan tersebut akan menyebabkan penurunan jumlah bakteri yang masih hidup dalam medium.¹⁸ Pemaparan stimulus secara berseling tersebut hanya menyebabkan efek destruktif minimal pada dinding sel bakteri. Kerusakan hanya terjadi sesekali sehingga bakteri yang cukup kuat akan melakukan respons adaptasi, sedangkan bakteri yang lemah akan mengalami kerusakan membran secara signifikan dan mati oleh pemaparan stimulus tersebut. Hal tersebut menyebabkan penurunan jumlah koloni bakteri, tetapi tidak cukup untuk mematikan seluruh bakteri yang ada. Pengaruh variabel lain tidak diperhitungkan karena semua faktor telah disamakan. Resiko kontaminasi pun telah dihilangkan oleh karena penggunaan kontrol medium dan kontrol pelat agar yang tidak menunjukkan viabilitas. Jadi, penelitian ini telah bebas dari segala variabel perancu yang mungkin mengganggu hasil penelitian.

Penelitian yang ada saat ini tidak banyak melibatkan penggunaan gelombang bunyi dalam batas pendengaran manusia (20 – 20.000 Hz). Penelitian yang sudah ada baru mengemukakan adanya pengaruh viabilitas pada *E.coli* dalam gelombang bunyi tersebut. Namun, penelitian tersebut menggunakan frekuensi dan cara pemaparan yang berbeda dengan peneliti. Dalam hal intervensi langsung yang diberikan, Ying JCL, et al menggunakan frekuensi 1, 5, dan 15 kHz terus-menerus (*continue*) untuk menghasilkan viabilitas meskipun tidak signifikan (berturut-turut 7%,

34%, dan 30.5% lebih banyak). Berbeda dengan penelitian ini, peneliti menggunakan frekuensi 7 KHz dan 17 KHz secara terputus-putus (berseling) dengan hasil berupa efek penurunan viabilitas hingga jumlah koloni pada sampel yang diberi perlakuan hanya sekitar 1.43% dan 17.96% dari jumlah koloni pada kontrol. Dengan frekuensi 7 dan 17 KHz yang digunakan peneliti, peneliti telah memberikan stimulus yang hampir sama dengan penelitian sebelumnya. Namun, pemaparan secara berseling memberikan penurunan viabilitas signifikan. Diduga terdapat mekanisme adaptasi yang berbeda antara kedua bentuk perlakuan tersebut. Sebagaimana kita ketahui, suatu sel akan membelah dengan sendirinya jika keadaan lingkungannya memungkinkan untuk itu, terutama dengan tidak adanya stressor serta ketersediaan nutrisi yang cukup. Paparan frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik secara berseling diduga akan mengurangi ketersediaan nutrisi bakteri untuk memasuki fase selanjutnya dalam siklus sel. Nutrisi yang ada dapat saja disimpan untuk perbaikan dan regenerasi dari sel itu sendiri. Pada paparan terus-menerus, bakteri akan menghadapi stressor pada masa awal setelah dipaparkan dengan frekuensi bunyi. Namun, selama bakteri tersebut masih bertahan hidup, mereka akan melakukan mekanisme adaptasi untuk mengalami perubahan secara fisiologis untuk menghadapi perubahan keadaan yang terjadi. Mekanisme tersebut berupa peningkatan ambilan nutrisi dari lingkungan bakteri tersebut untuk disimpan hingga keadaan memungkinkan untuk kehidupan bakteri. Berbeda dengan paparan secara berseling, peneliti menduga bahwa stimulus yang diberikan menyebabkan bakteri gagal menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan yang sangat cepat dan berulang-ulang. Selain itu, secara perlahan-lahan dinding sel bakteri akan lisis sebagai dampak lanjutan perubahan dari lingkungan stressor dan lingkungan normal dengan cepat. Namun, mekanisme mengenai hal tersebut perlu diteliti lebih lanjut. Oleh karena itu, peneliti meyakini bahwa ada penurunan viabilitas pada bakteri tersebut akibat paparan berulang dengan cepat dari frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik.

Perubahan pada keadaan lingkungan pun ternyata mempengaruhi efek dari gelombang bunyi yang diberikan. Shaobin G, et al (2010) menggunakan garam sebagai perlakuan sehingga frekuensi bunyi tersebut justru memperlemah viabilitas dari bakteri tersebut, tetapi peningkatan viabilitas tersebut tetap ditemui pada pemaparan tanpa pemberian garam. Dengan pemaparan gelombang bunyi secara berseling yang dilakukan peneliti, terjadi perubahan lingkungan secara

terus-menerus. Lain halnya dengan pemaparan secara berkelanjutan, *E.coli* akan memiliki masa pengenalan terhadap lingkungan barunya dan menjalankan mekanisme adaptasi yang tetap.

Perlu diperhatikan juga bahwa *E.coli* termasuk bakteri gram negatif. Karakteristik utama dari bakteri gram negatif adalah tipisnya lapisan dinding sel yang melindunginya. *E.coli* sendiri, sebagaimana disebutkan dalam landasan teori, memiliki dinding sel yang lebih tipis dibandingkan bakteri gram negatif lainnya. Tipisnya dinding sel *E.coli* ini menunjukkan kemampuannya untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan lebih rendah daripada bakteri gram negatif lainnya. Kegagalan viabilitas bakteri ini terlihat dari jumlah koloni bakteri pasca perlakuan yang lebih kecil daripada koloni bakteri kontrol. Oleh karena itu, rangsangan suara audiosonik secara berseling menurunkan viabilitas *E.coli*.

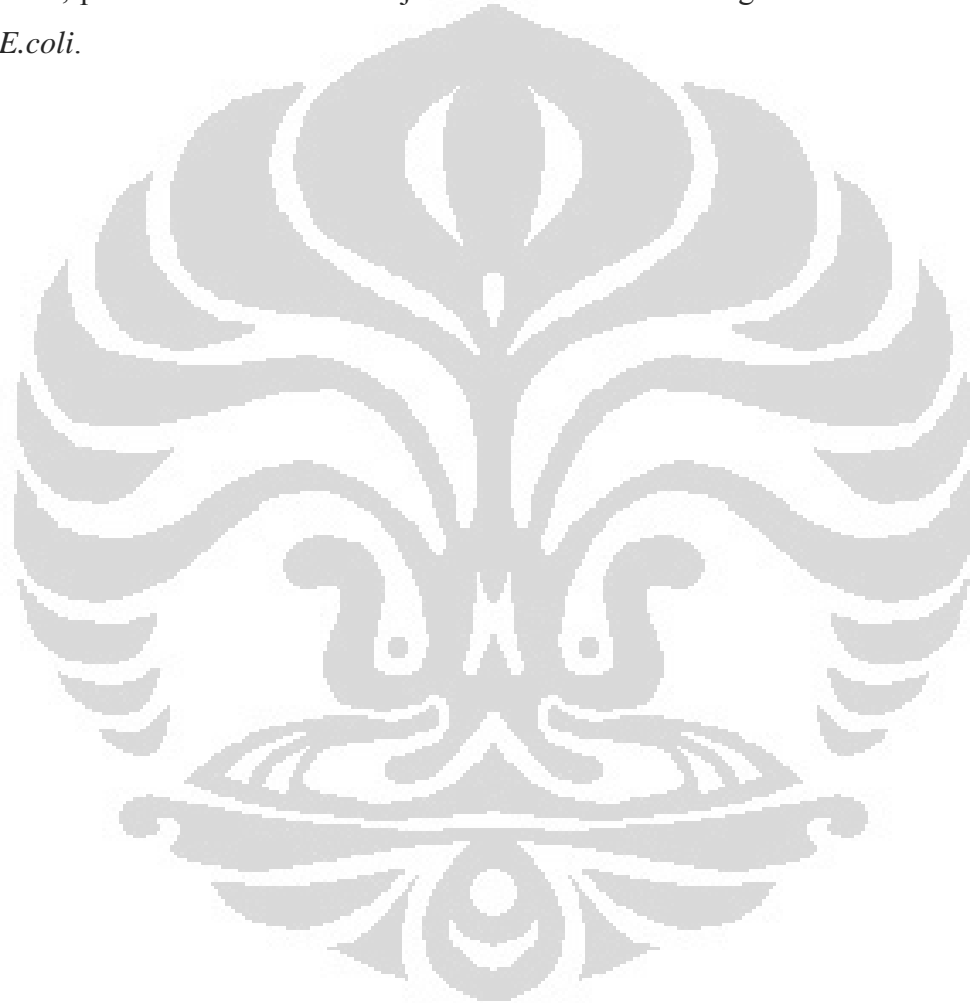
5.2 Perbandingan Viabilitas Bakteri Akibat Perbedaan Frekuensi Bunyi

Hasil analisis antara kedua perlakuan menunjukkan bahwa viabilitas *E.coli* lebih rendah pada perlakuan dengan frekuensi 7 kHz selama 10 detik (1.43% terhadap kontrol) daripada perlakuan dengan frekuensi 17 kHz selama 10 detik (17.96% terhadap kontrol) sebagaimana tertera pada tabel 4.2. Temuan tersebut memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan tingkat penurunan viabilitas pada kedua tingkat frekuensi yang dipaparkan terhadap sampel *Escherichia coli*. Berbeda dengan teori dan temuan yang ada, pemaparan dengan frekuensi bunyi sebesar 7 KHz ternyata menurunkan viabilitas lebih kuat daripada 17 KHz. Penurunan tersebut terbukti sangat berpengaruh karena tingkat perbedaannya mencapai lebih dari 10 kali lipat antara kedua perlakuan tersebut.

Untuk menganalisis perbedaan tersebut, kita perlu kembali mengingat mekanisme dari sonikasi terhadap membran sel. Untuk menimbulkan suatu kavitasi, dibutuhkan adanya getaran dari sonikator. Getaran ini timbul akibat intensitas bunyi yang tinggi, tetapi dihasilkan oleh frekuensi bunyi yang rendah. Oleh karena itu, getaran yang timbul cukup kuat untuk menghasilkan banyak kavitasi untuk merusak membran sel *E.coli*. Hal sebaliknya terjadi pada frekuensi tinggi, intensitas yang dihasilkan tidak cukup kuat untuk merusak membran sel *E.coli*. Namun, perlu diketahui bahwa sebenarnya frekuensi dan intensitas merupakan dua hal berbeda yang tidak

berhubungan secara langsung. Oleh karena itu, tingkat stress oksidatif yang diperlukan untuk merusak membran sel *E.coli* perlu diketahui.

Kelemahan penelitian ini adalah tidak diukurnya intensitas bunyi yang dihasilkan oleh sonikator. Pengukuran intensitas bunyi tidak dilakukan karena keterbatasan alat yang dipakai oleh peneliti. Intensitas bunyi perlu diketahui untuk menentukan tingkatan stress oksidatif yang diterima oleh *E.coli*. Namun, penelitian ini tidak bertujuan untuk melihat hubungan intensitas bunyi terhadap viabilitas *E.coli*.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Frekuensi bunyi dalam batas ambang pendengaran yang dipaparkan secara berseling menurunkan viabilitas dari *E.coli*. Efek tersebut terlihat terutama pada frekuensi 7 kHz, sedangkan efek yang lebih lemah terlihat pada frekuensi 17 kHz. Jadi, ada penurunan viabilitas *E.coli* akibat bunyi dalam rentang audiosonik secara berseling, terutama pada pemaparan dengan frekuensi 7 kHz.

6.2 Saran

Peneliti menyarankan untuk diadakannya penelitian lanjutan mengenai mekanisme viabilitas dan perbedaan mekanisme penyesuaian cepat *E.coli* yang distimulasi oleh gelombang bunyi dalam rentang audiosonik, baik secara berseling maupun secara berkelanjutan. Penelitian tersebut dapat berupa pemeriksaan kadar zat hasil metabolisme *E.coli* selama pemaparan dengan menggunakan bunyi dalam batas rentang audiosonik.

Selain itu, penelitian perlu diperbaiki pada metodologi yang digunakan, terutama pengukuran intensitas bunyi dan perhitungan jumlah bakteri sebelum perlakuan. Pengamatan intensitas bunyi terhadap viabilitas *E.coli* juga diperlukan untuk melihat efek langsung kombinasi antara kedua variabel, intensitas dan frekuensi bunyi, terhadap viabilitas *E.coli*. Selain itu, penelitian dapat dilakukan dengan memperbanyak sampel yang *E.coli* dalam rentang frekuensi dan intensitas bunyi yang lebih banyak lagi dari penelitian yang sudah pernah dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mandal BK, Wilkins EGL, Dunbar EM, Mayon-White RT. *Lecture notes penyakit infeksi* [Terjemahan]. Edisi ke-6. Jakarta: Erlangga, 2008.
2. Duan F, Curtis KL, March JC. *Secretion of insulinotropic proteins by commensal bacteria: rewiring the gut to treat diabetes* [Online]. *Appl Environ Microbiol* , 74(3): 7437-8. 26 September 2008 [Diakses 12 September 2010]. Tersedia di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2592943/pdf/1019-08.pdf>.
3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 24th Ed. San Fransisco: The McGraw-Hill Companies Inc.
4. Pitt WG, Ross SA. *Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth* [Online] *Biotechnol Prog.* 2003; 19 (3): 1038-1044. 6 Februari 2006 [Diakses 22 Agustus 2009]. Tersedia di: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1361254&blobtype=pdf>
5. Dayou J, Phin CK. *Experimental investigation on the effects of audible sound to the growth of Aspergillus spp* [Online]. *Modern Applied Science.* Vol 3. No 4. April 2009 [Diakses 14 Maret 2010]. Tersedia di: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/mas/article/viewFile/1264/1227>
6. Ying JCL, Dayou J, Phin CK. *Experimental investigation on the effects of audible sound to the growth of Escherichia coli* [Online]. Maret 2009 [Diakses 26 Maret 2010]. Tersedia di: <http://journal.ccsenet.org/index.php/mas/article/view/397/419>
7. Ochei J, Kolhatkar A. *Medical laboratory science: theory and practice.* New Delhi: Tata McGraw-Hill. p1060, 2000
8. Larone DH. *Medically important fungi: a guide to identification.* Edisi ke-4. Washington: ASM Press. p333, 2002.
9. *Standards Unit, Evaluations, and Standards Laboratory Specialist and Reference Microbiology Division.* Plate count agar. 31 Mei 2005 [Diakses 18 Januari 2011]. Tersedia di: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/msop/pdf/msop44.pdf>
10. Becton, Dickinson, and Company. *Plate count agar/standard methods agar (tryptone glucose yeast agar).* 2011 [Diakses 18 Januari 2011]. Tersedia di: http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Plate_Count_Agar_Standard_Methods_Agar.pdf
11. HiMedia Laboratories. *Nutrient agar.* 2009 [Diakses 4 Februari 2011]. Tersedia di <http://www.himedialabs.com/TD/M001.pdf>
12. Furusawa C, Kaneko K. *A generic mechanism for adaptive growth rate regulation.* *Plos computational biology.* 2008 [Diakses 2 Oktober 2010]. Tersedia di: <http://www.ploscompbiol.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pcbi.0040003>
13. Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. *Biology.* Edisi ke-8. San Fransisco: Benjamin Cummings. p228, 556, 2008.
14. Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Dien SJV, Rabinowitz JD. *Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli.* *Nat Chem Biol.* Agustus 2009; 5(8):593-9. 1 Februari 2010 [Diakses October 2nd, 2010]. Tersedia di: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754216/pdf/nihms109101.pdf>

15. Despopoulos A, Silbernagi S. *Color atlas of physiology*. Edisi ke-5. New York: Thieme. h362, 2003.
16. European Patent Specification. *Sonication of a medium* [Online]. 22 April 2009 [Diakses 21 Maret 2011]. Tersedia di <http://www.freepatentsonline.com/EP1879688.pdf>
17. Runyan CM, Carmen JC, Beckstead BL, Nelson JL, Robinson RA, Pitt WG. *Low-frequency ultrasound increases outer membrane permeability of Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Appl. Microbiol. 20 September 2006. [Diakses 14 Maret 2010]. Tersedia di: <http://assets0.pubget.com/pdf/17310073.pdf>
18. Monsen T, Lövgren E, Widerström M, Walliner L. *In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections* [Online]. Journal of Clinical Microbiology, Agustus 2009 [Diakses 16 Desember 2010] 47(8): 2496-501. Tersedia di: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725697/pdf/2316-08.pdf>
19. Shaobin G, Wu Y, Li K, Ma S, Wang Q, Wang R. *A pilot study of the effect of audible sound on the growth of Escherichia coli* [Abstract]. 4 Maret 2010 [Diakses 28 Maret 2010], Tersedia di: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TFS-4YHT7PJ-1&_user=10&_coverDate=07%2F01%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_searchStrId=1609144836&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=f96c63d86078cf62bf4c28617e367629&searchtype=a
20. Difco-BBL Manual. *Manual of microbiology culture media*. Edisi ke-2. Maryland: Becton Dickinson and Cooperation, 2009.
21. Cappuccino, Sherman. *Microbiology: a laboratory manual* [Online]. Edisi ke-7. Pearson Education India. [Diakses 1 Januari 2011]. p131-3, 2005.
22. Dewan Standardisasi Nasional. Cara uji cemaran mikroba. SNI 01-2897-1992. Standar Nasional Indonesia, p6-8. 1992.
23. Dahlan MS. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Edisi ke-4. Jakarta: Salemba Medika; 2009, h21,45-57

Lampiran 1. Komposisi media perkembangbiakan

1.1 Komposisi BHI standar DIFCO Laboratories Incorporated.

- a. Otak sapi 200 gram
- b. Hati sapi 200 gram
- c. Protease pepton 10 gram
- d. Bacto-dextrose 2 gram
- e. NaCl 5 gram
- f. Dinatrium Fosfat 2.5 gram
- g. Aquadest 1000 ml

Dalam produksinya, langkah-langkah yang dilakukan tercantum sebagai berikut:

1. Seluruh bahan yang disebutkan (poin a-f) dicampur menjadi satu sebelum diambil sejumlah 37 gram untuk dilarutkan pada aquadest 1000 ml.
2. Larutan tersebut diaduk dan dimasak hingga mendidih (100°C)
3. Mengangkat dan menyaringnya dengan kertas saring dan dilakukan hingga media menjadi jernih.
4. Mensterilkan dengan otoklaf
5. Menempatkan di dalam tabung reaksi pireks 10 ml sebanyak 5 ml

1.2 Komposisi Agar Nutrisi standar DIFCO Laboratories Incorporated

- a. Ekstrak daging sapi 3 gram
- b. Pepton 5 gram
- c. NaCl 5 gram
- d. Aquadest 1000 ml
- e. Agar difco 15 gram

Lampiran 2. Cara Pemeriksaan Mikroba Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2897-1992 Dengan Angka Lempeng Total (*Total Plate Count*)

- a. Prinsip
Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 35 ± 1 °C
- b. Peralatan
 - i. Cawan petri dari gelas atau plastic (90-100 mm)
 - ii. Pipet ukur (1.5 dan 10 ml)
 - iii. Penangas air 45 ± 1 °C
 - iv. Lemari pengeram 36 ± 1 °C
 - v. Alat penghitung koloni (*colony counter*)
- c. Perbenihan dan Pengencer
 - i. *Buffered Peptone Water* (BPW)
 - ii. *Plate Count Agar* (PCA)
- d. Cara Kerja
 - i. Melakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A6
 - ii. Mengambil dengan pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri steril secara simplo dan duplo
 - iii. Menunagkan ke dalam setiap cawan petri sebanyak 12-15 ml media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu 45 ± 1 °C dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama
 - iv. Menggoyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan perbenihan.
 - v. Kerjakan pemeriksaan blangko dengan mencampur air pengencer dengan perbenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
 - vi. Membiarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku
 - vii. Memasukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram (incubator) dan inkubasikan pada suhu 35 ± 1 °C selama 24-48 jam.
 - viii. Mencatat pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 25-250 koloni setelah 48 jam.
 - ix. Menghitung angka lempeng total dalam 1 gram atau 1 ml contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan (sesuai)
- e. Cara Menghitung dan Menyatakan Hasil
 - i. Memilih cawan petri (simplo dan duplo) dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni (*colony counter*). Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per milliliter atau gram.
 - ii. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar 250, hitung rata-rata jumlah koloni, kalikan dengan

(Lanjutan)

- iii. faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per militer atau gram.
- iv. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25-250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran seperti yang disebut pada butir i dan ii di atas, dan hitung rata-rata jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, nyatakan jumlah yang lebih kecil sebagai jumlah bakteri per milliliter atau gram.
- v. Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing cawan petri tidak terletak antara 25 dan 250 koloni. Hitung jumlah koloni seperti pada butir I dan ii di atas, dan nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per militer atau gram.
- vi. Jika jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2,4, atau 8 sektor. Hitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per militer atau gram.
- vii. Jika dalam seperdelapan bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang di dapat adalah 8×200 (1600), dikalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan permililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari $1600 \times$ faktor pengenceran).
- viii. Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan pengenceran yang terendah (kurang dari 10).
- ix. Menghitung koloni perambat (*spreader*)
 1. Ada 3 macam perambatan pada koloni, yaitu:
 - a. Rantai yang tidak terpisah-pisah
 - b. Antara dasar cawan petri dan perbenihan
 - c. Pinggir atau permukaan perbenihan
 2. Kalau terjadi hanya satu perambatan, maka koloni dianggap satu. Namun, bila satu atau lebih rantai terbentuk dan yang berasal dari sumber yang berpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.
 3. Bila (b) dan (c) terjadi, maka sebaiknya pemeriksaan diulangi karena koloni dalam keadaan semacam ini agak sukar dihitung.
- f. Cara menghitung dan membulatkan angka
Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan, hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka yang pertama dan kedua (dimulai dari kiri), sedangkan angka yang ketiga diganti dengan 0 apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambahkan pada angka yang kedua.
Contoh: 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 (5.2×10^5)

Lampiran 3. Kumpulan hasil pengumpulan dan pengolahan data

Tabel 1 Hasil percobaan pemaparan audiosonik terhadap *Escherichia coli*.

Pengenceran/ Perlakuan	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
K	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
F1	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
F2	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈

Pengenceran/ Perlakuan	10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
K	≈	≈	296	272	29	29	6	3	0	4
F1	18	64	1	1	0	0	0	0	0	0
F2	155	132	54	47	0	0	0	0	0	0

Tabel 2 Rata-rata jumlah *E.coli* pada setiap pengenceran pada percobaan pemberian pajanan frekuensi bunyi dalam rentang audiosonik secara berseling

Rata-Rata*	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
K	≈	≈	≈	≈	≈
F1	≈	≈	≈	≈	≈
F2	≈	≈	≈	≈	≈
10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	
≈	284	29	4.5	2	
41	1	0	0	0	
143.5	50.5	0	0	0	

Keterangan :

F1=Pemaparan 7 kHz selama 10 detik; F2= Pemaparan 17 kHz selama 10 detik; K=Kontrol
 ≈ tidak dapat dihitung karena jumlahnya terlalu banyak

*Satuan perhitungan dalam penelitian ini adalah *colony forming unit* (CFU)

(Lanjutan)

Tabel 3 Hubungan antara kontrol dengan perlakuan (7 kHz selama 10 detik) terhadap viabilitas *E.coli*

Perlakuan	Jumlah ($\times 10^7$ CFU)		Nilai Kemaknaan (95% IK)
	A	B	
Kontrol	296	272	0.032 (98.2-461.6)
7 kHz; 10 detik	1.8	6.4	

Tabel 4 Hubungan antara kontrol dengan perlakuan (17 kHz selama 10 detik) terhadap viabilitas *E.coli*

Perlakuan	Jumlah ($\times 10^7$ CFU)		Nilai Kemaknaan (95% IK)
	A	B	
Kontrol	296	272	0.023 (125.5-341.5)
17 kHz; 10 detik	54	47	

Tabel 5. Hasil uji non-parametrik untuk mengetahui distribusi data
Data deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	2	284	16.971	272	296
F1	2	4.1	3.2527	1.8	6.4
F2	2	50.5	4.95	47	54

One-sample Kolmogorov-Smirnov Test

	Kontrol	F1	F2	
N	2	2	2	
Normal Parameters (a,b)	Mean	284	4.1	50.5
	Std. Deviation	16.971	3.2527	4.95
Most Extreme Differences	Absolute	0.26	0.26	0.26
	Positive	0.26	0.26	0.26
	Negative	-0.26	-0.26	-0.26
Kolmogorov-Smirnov Z	0.368	0.368	0.368	
Asymp. Sig (2-tailed)	0.999	0.999	0.999	

a. Test distribution is normal

b. Calculated from data

(Lanjutan)

Tabel 6. Analisis Deskriptif pada Kontrol, F1 (7 kHz), dan F2 (17 kHz)

		Statistic	Std. Error
Kontrol	Mean	284	12
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	131.53
		Upper Bound	436.47
	5% Trimmed Mean		
	Median	284	
	Variance	288	
	Std. Deviation	16.971	
	Minimum	272	
	Maximum	296	
	Range	24	
	Interquartile Range		
	Skewness		
	Kurtosis		
	7 kHz ; 10 detik	Mean	4.1
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	-25.124
		Upper Bound	33.324
5% Trimmed Mean			
Median		4.1	
Variance		10.58	
Std. Deviation		3.2527	
Minimum		1.8	
Maximum		6.4	
Range		4.6	
Interquartile Range			
Skewness			
Kurtosis			
17 kHz ; 10 detik		Mean	50.5
	95% Confidence Interval for Mean		6.03
			94.97
	5% Trimmed Mean		
	Median	50.5	
	Variance	24.5	
	Std. Deviation	4.95	
	Minimum	47	
	Maximum	54	
	Range	7	
	Interquartile Range		
	Skewness		
	Kurtosis		

Tabel 7. Analisis Uji Statistik dengan Uji T Berpasangan (*Paired T-test*) antara Kelompok Kontrol dengan Setiap Perlakuan

Paired Sample Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Kontrol	284.00	2	16.971	12.000
	7 kHz ; 10 detik	4.10	2	3.2527	2.300
Pair 2	Kontrol	284.00	2	16.971	12.000
	17 kHz ; 10 detik	50.50	2	4.95	3.500

Paired Samples Correlations				
		N	Correlation	Sig
Pair 1	Kontrol & 7 kHz ; 10 detik	2	-1.000	
Pair 2	Kontrol & 17 kHz ; 10 detik	2	1.000	0.000

Paired Sample Test									
		Paired Differences					t	df	Sig (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Kontrol & 7 kHz ; 10 detik	279.9	20.2233	14.3	98.2013	461.5987	19.573	1	0.032
Pair 2	Kontrol & 17 kHz ; 10 detik	233.5	12.021	8.5	125.497	341.503	27.471	1	0.023



Gambar 1. Kolf agar nutrisi yang terpakai



Gambar 2. Penghitungan koloni dengan *colony counter*.