



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**Angela Marcellina
0806451284**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
JULI 2011**

Universitas Indonesia



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran**

**Angela Marcellina
0806451284**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Angela Marcellina
NPM : 0806451284

Tanda Tangan : 
Tanggal : 28 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Angela Marcellina
NPM : 0806451284
Fakultas : Kedokteran
Judul Skripsi : Pengaruh Durasi Frekuensi Suara Dalam
Rentang Audiosonik Secara Berseling 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 : Dr. Dra. Beti Ernawati Dewi, S.si, PhD (.....)

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 "Pengaruh Durasi Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling terhadap Viabilitas *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:

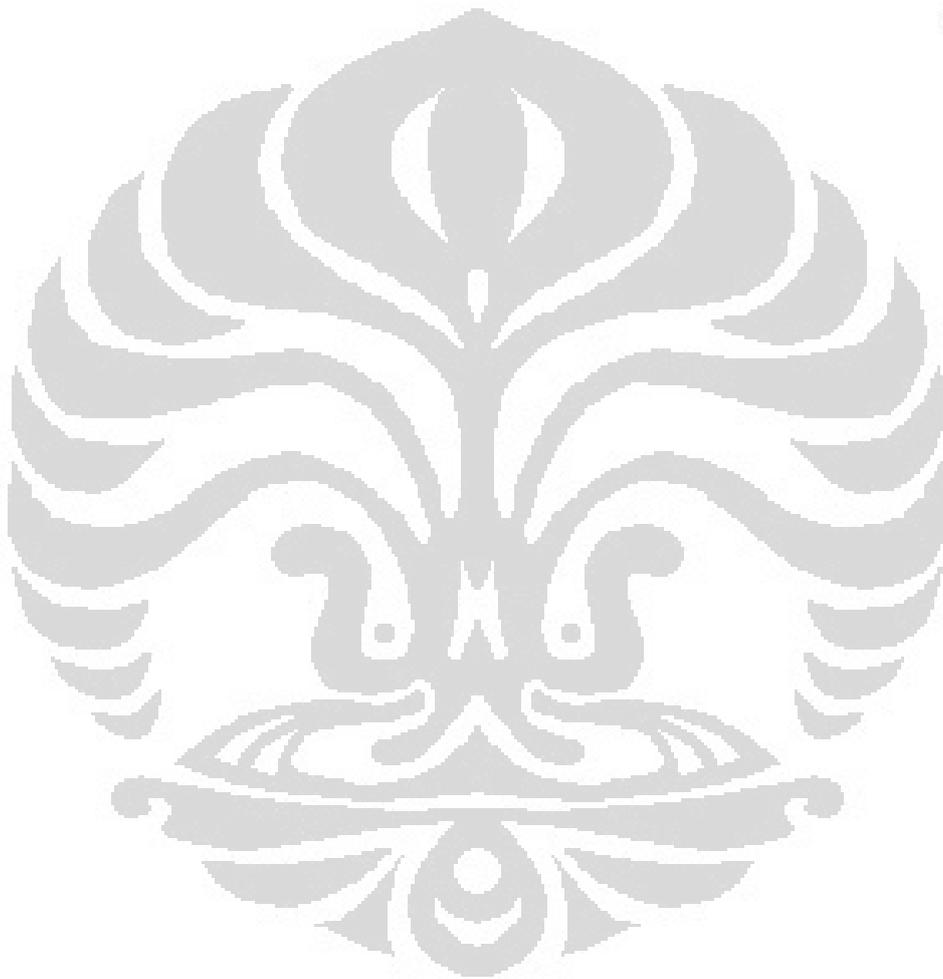
- (1) Dra. Conny Riana T, selaku pembimbing utama penelitian ini sekaligus staff pengajar dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia;
- (2) Dr. Dra. Beti Ernawati Dewi, S.si, PhD sebagai Ketua Modul Riset FKUI yang telah memberikan izin untuk melaksanakan penelitian ini;
- (3) Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah menyediakan fasilitas, sarana, dan prasarana dalam mewujudkan penelitian ini;
- (4) Pak Syarif dan Pak Aan yang telah membantu kelancaran pengerjaan eksperimen di laboratorium;
- (5) Sesama rekan penelitian peneliti, Agatha Grace, Marlene Irawan, Marshal Sumampouw, Naldo Sofian, dan Ricky Tjahjadi yang bersama peneliti mengerjakan penelitian kelompok sehingga menghasilkan lima penelitian serupa bersama penelitian ini;
- (6) Keluarga dan teman-teman sejawat yang telah mendukung baik dalam segi moril maupun material;
- (7) Pihak-pihak lain yang tidak disebutkan yang juga mendukung terealisasinya penelitian ini.

Akhir kata, peneliti sadar bahwa penelitian ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, peneliti terbuka menerima kritik dan saran yang membangun. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi penelitian selanjutnya.

Jakarta, 18 Juli 2011



Angela



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Angela Marcellina
NPM : 0806451284
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Departemen : Mikrobiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Skripsi

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

“Pengaruh Durasi Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling Terhadap Viabilitas *Escherichia coli*”
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai peneliti/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta

Pada tanggal: 18 Juli 2011

Yang menyatakan,



(Angela Marcellina)

ABSTRAK

Nama : Angela Marcellina
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul : Pengaruh Durasi Frekuensi Suara Dalam Rentang Audiosonik Secara Berseling Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*

Penelitian ini membahas pengaruh frekuensi suara pada dua durasi yang berbeda, yaitu 10 detik dan 30 detik, terhadap viabilitas bakteri *Escherichia coli* yang dikultur dalam medium *Bovine Heart Infusion* (BHI) dan *Plate Count Agar* (PCA). Bakteri yang sudah terpapar gelombang suara dikultur dalam agar nutrisi dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian viabilitas koloni dihitung menggunakan *colony counter*. Hasil penelitian menunjukkan viabilitas koloni *E.coli* dipengaruhi gelombang suara audiosonik pada frekuensi 7 kHz dengan durasi berbeda setelah dibandingkan dengan kontrol. Semakin lama durasi suara audiosonik pada frekuensi 7 kHz, semakin turun efek inhibisi terhadap viabilitas. Durasi 10 detik memberikan viabilitas 2,3 % dibanding kontrol sementara pada durasi 30 detik sebesar 58,5 % dari kontrol.

Kata Kunci:

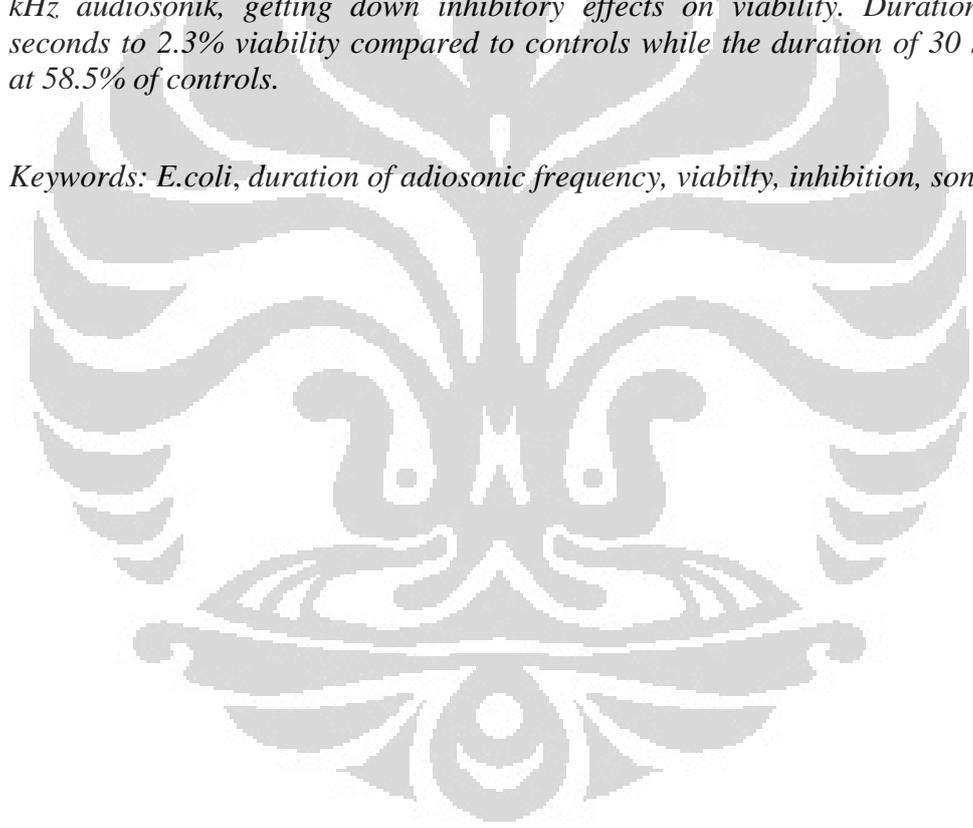
Escherichia coli, durasi frekuensi bunyi audiosonik, viabilitas, inhibisi, sonikator.

ABSTRACT

Name : Angela Marcellina
Study Program : General Practitioner Education
Title : “The Effect of Intermittent Audiosonic Soundwaves on the Viability of *Escherichia coli*”.

*This study discusses the influence of frequency sound on two different durations, namely 10 seconds and 30 seconds, against the viability of the bacterium *Escherichia coli* were cultured in medium Bovine Heart Infusion (BHI) and Plate Count Agar (PCA). Bacteria that are exposed to sound waves that were cultured in nutrient and incubated for 24 hours. Then the viability of colonies counted using colony counter. The results show the viability of *E. coli* colonies influenced the sound waves at a frequency of 7 kHz audiosonic with different duration when compared with controls. The longer the duration of the sound at a frequency of 7 kHz audiosonik, getting down inhibitory effects on viability. Duration of 10 seconds to 2.3% viability compared to controls while the duration of 30 seconds at 58.5% of controls.*

Keywords: E.coli, duration of audiosonic frequency, viability, inhibition, sonicator.



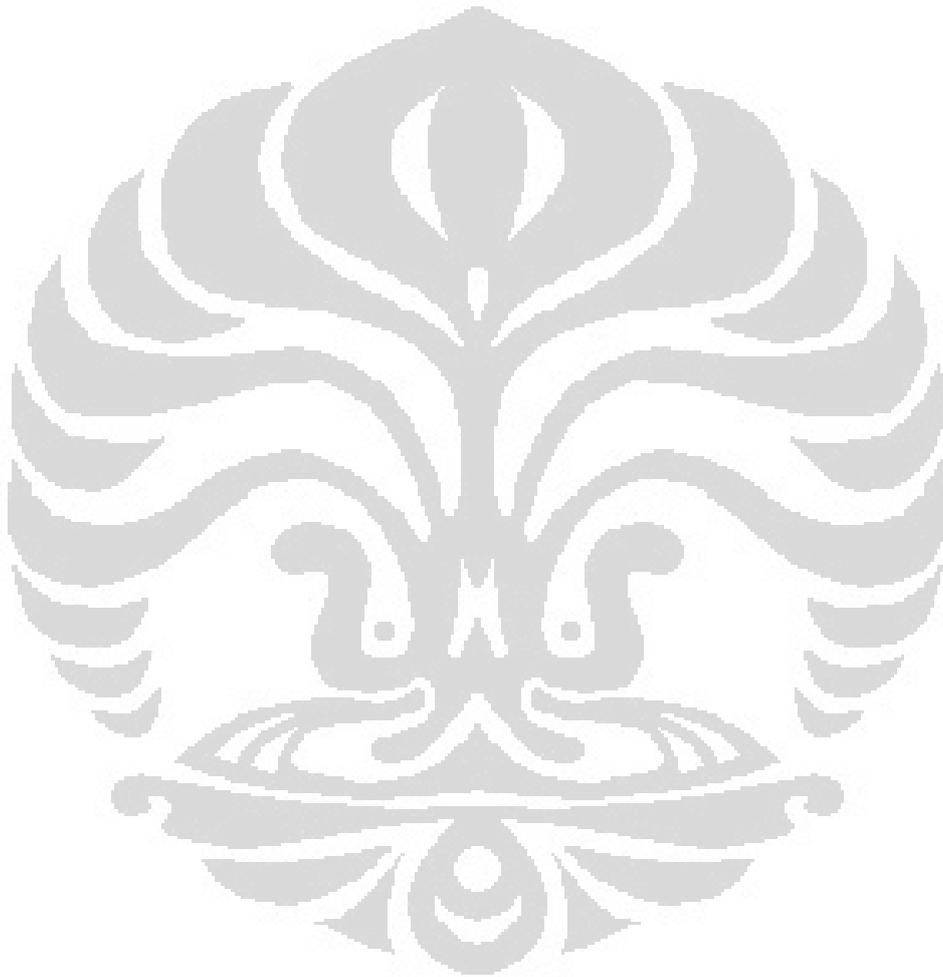
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	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.....	4
2.1 Prokariota.....	4
2.1.1 Keragaman Prokariota.....	4
2.1.2 Komunitas Prokariota.....	4
2.1.3 Struktur Sel Prokariota.....	5
2.1.3.1 Nukleoid.....	5
2.1.3.2 Struktur Sitoplasma.....	6
2.1.3.3 Selubung Sel.....	6
2.1.3.4 Membran Sitoplasma	7
2.1.3.5 Dinding Sel.....	8
2.1.3.6 Kapsul dan Glikokaliks	12
2.1.3.7 Flagella.....	13
2.1.3.8 Pili (Fimbriae).....	13
2.1.4 Perubahan Bentuk Selama Pertumbuhan	13
2.1.4.1 Pembelahan Sel	13
2.1.4.2 Pengelompokan Sel.....	14
2.1.4.3 Perubahan Siklus Hidup.....	14
2.2 <i>Enterobacteriaceae</i>	15
2.3 <i>Eschericia coli</i>	16
2.4 Kondisi yang Mempengaruhi Pertumbuhan Optimum Bakteri	17
2.4.1 Nutrisi.....	19
2.4.1.1 Karbon	20
2.4.1.2 Nitrogen	20
2.4.1.3 Sulfur	20
2.4.1.4 Fosfor	20
2.4.1.5 Mineral.....	20
2.4.2 Lingkungan	20

2.4.2.1 Ketersediaan Nutrisi	21
2.4.2.2 Derajat Keasaman (pH)	21
2.4.2.3 Temperatur.....	22
2.4.2.4 Aerasi.....	22
2.4.2.5 Tekanan Osmotik.....	22
2.4.2.6 Media yang digunakan.....	23
2.5 Transfer Kultur.....	24
2.6 Frekuensi Bunyi dan Sonikator.....	24
2.7 Pemaparan Frekuensi Khususnya Ultrasonik Terhadap Bakteri.....	26
2.8 Pengenceran Serial.....	27
2.9 Teknik Pour Plate.....	27
2.10 Pengukuran Pertumbuhan Bakteri	28
2.11 Kerangka Konsep.....	29
3. METODE PENELITIAN	30
3.1 Desain Penelitian	30
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	30
3.3 Bahan, Alat Penelitian, dan Cara Kerja	30
3.3.1 Bahan Penelitian.....	30
3.3.2 Alat Penelitian.....	31
3.3.3 Cara Kerja.....	32
3.3.3.1 Pembuatan media perkembangbiakan.....	29
A. Brain Heart Infusion (BHI)	29
B. Agar Nutrisi.....	30
C. Plate Count Agar (PCA).....	33
3.3.3.2 Sterilisasi Alat dan Media.....	33
3.3.3.3 Peremajaan Bakteri	34
3.3.3.4 Identifikasi Bakteri.....	34
3.3.3.5 Sonikasi Bakteri.....	34
3.3.3.6 Total Plate Count	36
3.3.3.7 Menghitung Koloni Bakteri	37
3.4 Identifikasi Variabel.....	37
3.5 Definisi Operasional	37
3.6 Alur Penelitian	38
3.7 Rencana Manajemen dan Analisis Data.....	38
3.8 Etika Penelitian	39
4. HASIL PENELITIAN	40
4.1 Karakteristik <i>E.coli</i>	40
4.2 Hasil Penelitian	41
5. DISKUSI.....	44
5.1 Perbandingan Viabilitas Bakteri Antara Kontrol dengan Pemaparan Frekuensi Audiosonik Secara Berseling	44
5.2 Perbandingan Viabilitas Bakteri Akibat Perbedaan Durasi Frekuensi Suara	45
6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	47
6.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1 Pewarna dalam Metode Pewarnaan Gram.....	31
Gambar 3.2 Lemari inkubator untuk menjaga suhu tertentu bagi viabilitas bakteri.....	32
Gambar 3.3 Agar <i>Plate Count Agar (PCA)</i> dalam kolf.....	33
Gambar 3.4 Sonikasi Bakteri dalam Wadah yang Dikelilingi Es untuk Mengurangi Pelepasan Panas dari Dalam Wadah	35
Gambar 3.5 Urutan Tindakan yang Diberikan Terhadap <i>E.coli</i>	35
Gambar 3.6 Skema Pengenceran Hasil Sonifikasi Bakteri	36
Gambar 4.1 <i>E.coli</i> dalam Ahar Nutrisi	40
Gambar 4.2 Koloni Bakteri Gram Negatif	40
Gambar 4.3 Hasil Fermentasi <i>E.coli</i>	41



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni E.coli dengan Menggunakan Colony Counter.....	42
Tabel 4.2. Rata-rata Jumlah E.coli pada Setiap Perlakuan dan Kontrol	43



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri yang paling mudah ditemukan dalam kehidupan sehari-hari oleh karena perannya baik sebagai patogen maupun non-patogen. Bakteri itu umumnya memicu patogenesis dari sepsis dan infeksi saluran cerna.¹ Namun, penggunaannya sebagai agen biologis dalam bioteknologi justru berperan penting. Dengan berbagai macam teknik rekayasa biologis, *E.coli* dapat dipakai untuk mensekresi protein insulinotropik yang berguna bagi penderita diabetes.²

Peranan dari *E.coli* dalam kehidupan manusia tidak terlepas dari pengaruh faktor lingkungan. Rangsangan dari lingkungan ini secara langsung maupun tidak langsung akan berpengaruh kepada kehidupan *E.coli* itu sendiri. Ada pun rangsangan ini merupakan rangsangan fisik berupa fisika maupun kimia. Contoh rangsangan fisika yang telah lama kita ketahui adalah rangsangan suhu, radiasi, dan aerasi, sedangkan rangsangan kimia yang berpengaruh adalah kadar nutrisi dan obat, derajat keasaman (pH), dan tekanan osmotik. Semua keadaan tersebut berpengaruh dalam aktivitas dan komponen pendukung 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 suara. Berbagai macam metode dan hasil telah dilakukan, baik pertumbuhan, perlambatan pertumbuhan, atau bahkan mematikan bagi organisme tersebut. Hanya saja, semua perlakuan tersebut masih menggunakan ultrasonik sebagai rangsangannya.^{4,5} Penggunaan frekuensi suara dalam batas audiosonik belum banyak diteliti. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa penggunaan frekuensi tertentu (5 kHz) jauh lebih baik dalam menstimulasi viabilitas bakteri.⁶

Oleh karena itu, peneliti ingin melihat pengaruh dari perbedaan tingkat durasi pemberian frekuensi suara dalam batas audiosonik secara berseling

terhadap viabilitas *Eschericia coli*. Perbedaan ini akan terlihat dari perbandingan tingkat viabilitas akibat paparan frekuensi 7 kHz dengan durasi berbeda, yakni 10 detik dan 30 detik. Penelitian sebelumnya menggunakan durasi dan tingkat frekuensi yang berbeda sehingga diharapkan kedua durasi ini akan menambah variasi durasi frekuensi audiosonik yang mempengaruhi viabilitas *E.coli*.

1.2 Identifikasi Masalah dan Pertanyaan Penelitian

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

1. Bagaimanakah efek durasi paparan audiosonik yang dipaparkan secara berseling terhadap viabilitas *E.coli*?
2. Berapa lamakah durasi paparan audiosonik yang optimum bagi viabilitas *E.coli*?

1.3 Hipotesis

1. Durasi paparan audiosonik yang diberikan secara berseling akan menstimulasi viabilitas *E.coli*.
2. Paparan durasi audiosonik selama 30 detik pada frekuensi sebesar 7 kHz yang memberikan stimulasi paling optimum pada viabilitas *E.coli*.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum Penelitian

Mengetahui adanya pengaruh durasi paparan audiosonik secara berseling terhadap viabilitas *E.coli*.

1.4.2 Tujuan Khusus Penelitian

1. Diketahui karakteristik bakteri *E.coli* yang digunakan dalam penelitian
2. Diketahui berbagai kondisi yang menyebabkan viabilitas optimum dari *E.coli* beserta titik optimumnya
3. Diketuinya cara paparan frekuensi suara terhadap viabilitas *E.coli*
4. Diketuinya pengaruh dari durasi paparan audiosonik secara berseling terhadap aktivitas *E.coli*

5. Diketahui titik optimum durasi pemaparan audiosonik dari aktivitas *E.coli*

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat bagi peneliti

- a. Sebagai sarana pelatihan dan pembelajaran melakukan suatu penelitian eksperimental
- b. Meningkatkan kemampuan berpikir dalam mengidentifikasi masalah kesehatan di masyarakat.
- c. Melatih kerjasama dalam tim peneliti.
- d. Memperdalam pengetahuan dan keterampilan pengkulturan bakteri.
- e. Mengaplikasikan kemampuan dan keterampilan laboratorium yang diperoleh selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI).

1.5.2 Manfaat bagi perguruan tinggi

- a. Sebagai perwujudan Tri Dharma Perguruan Tinggi.
- b. Mewujudkan visi misi FKUI sebagai universitas riset terkemuka di Asia Pasifik.
- c. Sarana dalam menjalin kerjasama antara staff pengajar, mahasiswa, pimpinan fakultas, dan universitas.

1.5.3 Manfaat bagi masyarakat/instansi terkait

- a. Menambah pengetahuan mengenai cara pengkulturan bakteri.
- b. Menambah wawasan masyarakat mengenai bakteri.
- c. Menambah pengetahuan mengenai pengaruh frekuensi audiosonik dan durasi pemaparannya terhadap viabilitas *E.coli*.
- d. Sebagai dasar bagi penelitian selanjutnya yang juga memanfaatkan frekuensi audiosonik beserta durasinya terhadap viabilitas *E.coli*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Prokariota

Bakteri *Escherichia coli* yang akan dibahas dalam penelitian ini termasuk dalam filogeni prokariota. Karakteristik pembeda utama dari prokariota adalah ukuran yang relatif kecil, biasanya berdiameter 1 μm dan tidak adanya membran inti. DNA pada kebanyakan bakterinya adalah sirkuler dengan panjang sekitar 1 mm. Inilah yang dikatakan sebagai kromosom prokariota. DNA kromosom melipat diri sampai ribuan kali untuk bisa melekat pada membran sel pada prokariota. Daerah perlekatan DNA yang melipat diri itu dinamakan nukleoid.³

2.1.1 Keragaman Prokariota

Kecilnya ukuran kromosom prokariota membatasi jumlah informasi genetik yang dikandungnya. Data terbaru pada sekuensing genom menunjukkan bahwa jumlah gen dalam prokariota berkisar antara 468 pada *Mycoplasma genitalium* sampai 4288 pada *Escherichia coli*, dan beberapa dari gen tersebut mempunyai fungsi esensial seperti sintesis energi, sintesis makromolekul, dan replikasi sel. Beberapa prokariota membawa beberapa gen yang berperan pada adaptasi fisiologis terhadap lingkungan. Lingkungan potensial prokariota sangat luas dan masing-masing dapat beradaptasi pada sebuah lingkungan kecil yang terbatas (*niche*).³

Contoh keragaman prokariota yang mampu menyesuaikan diri terhadap lingkungannya misalnya, bakteri ungu (*purple bacteria*) yang mengubah energi matahari menjadi energi metabolik dalam keadaan tidak ada produksi oksigen, bakteri biru hijau (*cyanobacteria*) yang menghasilkan oksigen saat tidak ada cahaya matahari, organisme anaerobik yang menggunakan elektron sebagai pengganti oksigen dalam respirasinya, dan lain-lain.³

2.1.2 Komunitas Prokariota

Berbagai bakteri menunjukkan adanya mekanisme komunikasi antar sel

yang disebut sebagai *quorum sensing* untuk mengatur transkripsi gen yang terlibat pada proses perubahan fisiologis termasuk bioluminescence, perpindahan plasmid cara konjugasi dan menghasilkan faktor keganasan. *Quorum sensing* tergantung pada produksi dari satu atau lebih molekul sinyal yang mudah berdifusi yang diberi istilah *auto-inducer* atau *pheromone* yang memungkinkan bakteri memantau kepadatan populasi selnya sendiri. Itu adalah salah satu contoh dari sifat multisel prokariota.³

Karakteristik yang berbeda dari prokariota adalah kapasitasnya untuk saling bertukar sebagian kecil informasi genetik. Informasi ini dibawa oleh **plasmid**, elemen genetik yang kecil dan khusus, yang mampu melakukan replikasi dalam satu jenis prokariota. Beberapa plasmid memiliki kisaran inang yang luas, yang dampaknya bisa memindahkan berbagai gen ke berbagai jenis organisme. Saat ini, *plasmid pembawa gen pengkode kebal obat* sedang mendapat perhatian khusus karena dampaknya yang cukup berat, yakni bermunculannya berbagai organisme yang kebal terhadap antimikrobal pada terapi infeksi.³

Strategi mempertahankan kehidupan pada sebuah sel prokariota mengakibatkan terbentuknya berbagai interaksi dengan organisme lain. Hal ini termasuk juga hubungan simbiosis yang digambarkan dengan pertukaran nutrisi kompleks di antara organisme dalam usus manusia. Pertukaran ini memberi manfaat pada mikroorganisme maupun manusia sebagai inang.³

2.1.3 Struktur Sel Prokariota

Sel prokariota lebih sederhana dari sel eukariota dalam segala hal, kecuali satu : selubung sel yang lebih kompleks.³

2.1.3.1 Nukleoid

Nukleoid prokariota dapat dilihat dengan mikroskop cahaya pada benda yang diwarnai. Uji Feulgen pada nukleoid menunjukkan hasil yang positif yang mana mengindikasikan keberadaan DNA. DNA yang bermuatan negatif pada prokariota dinetralkan oleh sedikit poliamin dan ion magnesium. Protein mirip

histon (*hystone like protein*) ada pada bakteri dan diduga memiliki fungsi yang sama dengan histon pada kromatinn eukariota.³

Gambaran mikroskop elektron, tidak ditemukan adanya membran inti dan perangkat mitosis (*mitotic apparatus*). Daerah inti diisi oleh serabut DNA. Nukleoid sel bakteri terdiri dari molekul sirkuler tunggal dengan berat molekul kurang lebih 3×10^9 , berupa kromosom haploid, diperkirakan berukuran 1 mm dalam keadaan terlipat. Nukleoid sebagian besar sel bakteri dapat dipisahkan dengan lisis yang diikuti sentrifugasi. Struktur yang telah diisolasi itu mengandung DNA yang bergabung dengan sejumlah kecil RNA, RNA polimerase, dan protein lain.³

2.1.3.2 Struktur Sitoplasma

Sel prokariota tidak memiliki mithokondria dan kloroplas tersendiri. Enzim transpor elektron terletak dalam membran sitoplasma. Pigmen fotosintesa (karotenoid, bakterioklorofil) dari bakteri fotosintetik terletak pada membran khusus yang dapat berbentuk vesikel bulat atau lembaran tipis di bawah membran sel. Pada beberapa sianobakteria (*cyanobacteria*, sebelumnya dikenal sebagai alga biru-hijau), membran fotosintetik seringkali berupa struktur lapis ganda yang disebut tilakoid. Bagian penting dari pigmen yang digunakan untuk menangkap cahaya adalah pikobilin yang terdapat pada permukaan luar dari membran tilakoid.³

Bakteri sering menyimpan makanan dalam bentuk granula tidak larut, yang tersimpan sebagai *osmotic inert*, polimer netral. Jika sumber nitrogen, sulfur atau fosfor terbatas, pH terlalu rendah, kelebihan karbon dalam media akan diubah oleh beberapa bakteri menjadi polimer *poly-β-hydroxybutyric acid* dan oleh bakteri yang lain diubah menjadi berbagai polimer glukosa misalnya pati dan glikogen. Bakteri fotosintetik tertentu mengoksidasi sulfid dari H₂S, memproduksi granula intraseluler yang berisi sulfur. Beberapa bakteri juga mengumpulkan granula polifosfat yang menyimpan fosfat inorganik yang dapat digunakan dalam pembuatan ATP. Granula ini disebut *granula volutin* atau *granula metakromatik*

karena berwarna merah jika dicat dengan warna biru yang mana merupakan ciri khas dari corynebacteria.³

2.1.3.3 Selubung Sel

Lapisan yang mengelilingi sel prokariota secara menyeluruh disebut selubung sel. Struktur dan organisasi selubung sel berbeda antara bakteri gram positif dan gram negatif. Beberapa bakteri, Eubakteria dan Archaeobakteria gram positif dan negatif memiliki dua jenis paracrystalline, lapisan yang pertama terdiri dari anyaman molekul protein atau glikoprotein (S-layer) sebagai komponen selubung memiliki sel yang terluar. Glikoprotein lapis S (S-layer) dari bakteri gram positif, strukturnya serupa dengan lipopolisakarida dari bakteri gram negatif. Fungsi lapisan S ini untuk melindungi diri terhadap enzim perusak dinding sel, dari serangan *Bdellovibrio bacteriovorus* (bakteri predator) dan dari bakteriofaga. Lapis S juga berperan dalam mempertahankan bentuk sel pada beberapa spesies *Archaeobacteria* dan juga mungkin berperan melekatkan sel bakteri pada permukaan epidermal inang.³

Pada bakteri gram positif, selubung sel nya relatif sederhana, terdiri dari dua sampai tiga lapis. Membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikannya tipis dan pada beberapa bakteri terdapat lapisan luar, baik kapsul atau lapis S.³

Pada bakteri gram negatif, selubung sel sangat sangat kompleks dan strukturnya berlapis-lapis. Membran sitoplasma nya (pada bakteri gram negatif disebut sebagai membran dalam, *inner membrane*) dikelilingi oleh lembaran pipih tunggal peptidoglikan di mana melekat lapisan kompleks yang disebut membran luar (*outer membrane*). Kapsul paling luar atau lapis S juga mungkin ada. Ruang antara membran dalam dan luar disebut ruang periplasma (*periplasmic space*).³

2.1.3.4 Membran Sitoplasma

Struktur membran sitoplasma bakteri yang disebut juga membran sel, bisa dilihat dengan mikroskop elektron dengan irisan tipis. Pada sediaan, dapat dilihat adanya *unit membrane* yang tersusun atas fosfolipid dan protein. Membran prokariota berbeda dengan sel eukariota dalam hal tidak adanya sterol. Invaginasi

membran sitoplasma akan membentuk struktur khusus yang disebut mesosom. Ada 2 jenis mesosom, yakni mesosom septum yang berfungsi membentuk dinding pemisah sel saat pembelahan dan mesosom lateral. Kromosom (DNA) bakteri terikat pada mesosom septum.³

Fungsi sitoplasma ada bermacam-macam, yakni untuk permeabilitas selektif dan transpor bahan larut, transpor elektron dan fosforilasi oksidatif pada spesies aerobik, ekskresi eksoenzim hidrolitik, sekresi enzim dan pembawa molekul yang berfungsi dalam biosintesis DNA, polimer dinding sel dan lipid membran, dan penghasil reseptor dan protein lain pada sistem kemotaktik.³

Sekitar 50% membran sitoplasma berada dalam keadaan setengah cair agar sel dapat tumbuh dan membran ini membentuk barrier hidrofobik yang tidak permeabel terhadap kebanyakan molekul hidrofilik. Ada 4 jenis mekanisme transpor yang membawa nutrisi masuk dan membuang sisa keluar sel, yakni:³

1. **Difusi bersyarat (facilitated diffusion)** merupakan satu-satunya mekanisme transpor yang tidak memerlukan energi. Gliserol merupakan salah satu dari sedikit zat yang masuk ke dalam sel prokariota dengan menggunakan mekanisme ini.
2. **Transpor bergantung ikatan protein (binding protein-dependent transport)**. Pada bakteri gram negatif, transpor dari beberapa nutrisi dibantu oleh ikatan protein yang terdapat dalam ruang periplasmik. Protein ini berfungsi dengan cara memindah substrat yang diikat ke dalam membran transpor protein kompleks yang sesuai. Proses transpor ini memerlukan energi tinggi seperti ATP atau asetil fosfat.
3. **Transpor berbasis tekanan osmotik kimiawi (chemiosmotic-driven transport)**. Sistem ini memindahkan molekul melewati membran sitoplasma yang sebelumnya memiliki perbedaan kadar ion, seperti proton-motive atau sodium-motive force. Ada tiga tipe dasar, yakni unipor, simpor, dan antipor. Kurang lebih 40% dari substrat yang ditranspor oleh E.coli menggunakan mekanisme yang dikendalikan khemiosmotik. Unipor mengkatalis transpor substrat bebas dari beberapa pasang ion. Simpor mengkatalis transpor simultan dari dua substrat pada

arah yang sama dengan pembawa tunggal. Antipor mengkatalis transpor simultan dari dua senyawa yang bermuatan mirip yang saling berlawanan arah dengan sebuah pembawa biasa (misalnya H^+ , Na^+).

4. **Translokasi kelompok (group translocation).** Di samping transpor umum dimana suatu larutan dipindahkan melewati membran tanpa merubah struktur, bakteri dapat menggunakan suatu mekanisme translokasi kelompok, yakni suatu proses pengambilan gula tertentu (dapat berupa glukosa atau manosa), dimana selama pemindahannya substrat mengalami fosforilasi.

2.1.3.5 Dinding Sel

Lapisan selubung sel yang terletak antara membran sitoplasma dan kapsul secara menyeluruh disebut dinding sel. Pada bakteri gram positif, kandungan utama dinding sel adalah peptidoglikan dan asam teikoat. Pada bakteri gram negatif, dinding sel meliputi peptidoglikan dan membran luar.³

Dinding sel bakteri terlihat kuat karena adanya komposisi lapisan yang mengandung berbagai substansi, misalnya *murein*, *mucopeptide*, atau peptidoglikan (semua adalah sinonim).³

Perbedaan antara bakteri gram positif dan negatif telah diperlihatkan dari perbedaan dinding sel. Dinding sel gram positif dapat dihilangkan warnanya dengan aseton atau alkohol apabila dinding sel disapu setelah langkah pewarnaan tapi sebelum langkah pencucian. Walaupun komposisi kimia dinding sel gram positif dan negatif telah diketahui, namun bagaimana bakteri gram positif bisa menahan warna pada fase pencucian belum diketahui dengan jelas.³

Selain memberikan perlindungan osmose, dinding sel memainkan peranan penting dalam pembelahan sel dan juga membantu memulai biosintesisnya sendiri. Pada bakteri gram negatif, terdapat lipopolisakarida pada dinding selnya yang berfungsi aktif sebagai entodoksin nonspesifik. Dinding sel secara umum bersifat permeabel nonselektif. Berikut ini akan dibahas satu per satu komponen-komponen yang menyusun dinding sel bakteri :³

a. Lapisan peptidoglikan³

Peptidoglikan merupakan polimer kompleks yang terdiri dari tiga bagian, yakni backbone (terdiri dari *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic acid* secara berselang-seling), sekelompok rantai tetrapeptida identik yang melekat pada *N-acetylmuramic acid*, dan sekelompok *identical peptide-cross bridges*. Backbone pada semua spesies bakteri adalah sama sedangkan rantai tetrapeptida dan peptide-crossbridges berbeda-beda.

Rantai tetrapeptida pada semua spesies secara umum memiliki bagian yang penting. Kebanyakan memiliki *L-alanine* pada posisi 1 (menempel pada *N-acetylmuramic acid*), *D-glutamate* atau substitusi *D-glutamate* pada posisi 2, dan *D-alanine* pada posisi 4. Posisi 3 merupakan posisi yang paling bervariasi. Kebanyakan bakteri gram negatif memiliki diaminopimelic acid pada posisi ini, dimana ditautkan dengan komponen dinding sel lipoprotein. Bakteri gram positif mungkin memiliki *diaminopimelic acid*, *L-lysine*, atau beberapa *L-amino acid* lain pada posisi 3. Diaminopimelic acid merupakan elemen unik pada dinding sel prokariota dan merupakan prekursor intermediet lisin bakteri pada biosintesis asam amino.

Pada bakteri gram positif, terdapat 40 lembar peptidoglikan yang merupakan 50 % dari seluruh komponen dinding sel. Pada bakteri gram negatif hanya terdapat satu sampai dua lembar yang merupakan 5-10 % dari seluruh komposisi dinding sel.

Beberapa kelompok prokariota, misalnya archaeobacteria, tidak memiliki lapisan peptidoglikan. Beberapa spesies dari kelompok ini juga memiliki *N-acetyl* namun tidak memiliki *L-amino acid*, *muramic acid*, dan *D-amino acid*.

b. Komponen khusus dinding sel gram positif³

Komponen utama dinding sel gram positif adalah teichoic dan teichuronic acid yang menempati 50 % berat kering dinding sel dan 10 % berat kering seluruh sel. Beberapa dinding gram positif juga memiliki molekul polisakarida.

1. Teichoic dan teichuronic acid³

Merupakan polimer yang larut air, berisi residu ribitol atau gliserol yang berhubungan melalui ikatan phosphodiester dan membawa satu atau lebih asam

amino atau gula. Ada dua tipe teichoic acid, yakni teichoic acid dinding yang melekat pada peptidoglikan dan teichoic acid membran (lipoteichoic acid) yang melekat pada glikolipid membran dan berkumpul di mesosom. Beberapa spesies gram positif tidak memiliki teichoic acid dinding namun semua memiliki teichoic acid membran.

Teichoid acid merupakan penyusun utama antigen permukaan dari gram positif dan letaknya ada di antara lapisan membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan.

Fungsi teichoic acid sampai saat ini masih diperdebatkan. Teichoic acid mengikat ion magnesium dan mungkin berperan dalam suplai Mg ke dalam sel serta menjaga fungsi selubung sel.

2. Polisakarida³

Hidrolisis dinding gram positif pada spesies tertentu menghasilkan gula netral, misalnya mannosa, arabinosa, galaktosa, rhamnosa, dan glukosamin serta gula asam, seperti asam glukoronat dan asam mannuronat. Diduga gula ini merupakan subunit dari polisakarida dalam dinding sel.

c. **Komponen khusus dinding sel gram negatif³**

Dinding sel gram negatif mengandung tiga komponen yang terletak pada lapisan luar peptidoglikan, yakni lipoprotein, membran luar dan polisakarida.

1. Lipoprotein

Lipoprotein mengandung 57 asam amino yang merupakan ulangan sekuen 15 asam amino, yang bertaut dengan ikatan peptida dengan residu diaminopilemic acid dari sisi tetrapeptida rantai peptidoglikan. Komponen lipid terdiri dari *diglyseride thioether* yang terikat pada sistein terminal, terletak pada membran luar. Lipoprotein merupakan protein yang mendominasi sel gram negatif (hingga 700.000 molekul per sel). Fungsinya adalah menstabilkan membran luar dan menjadi perlekatan pada lapisan peptidoglikan.

2. Membran luar

Membran luar merupakan struktur dua lapis. Komposisi lembaran/ lapisan dalamnya mirip membran sitoplasma namun fosfolipid pada lapisan luarnya diganti dengan molekul lipopolisakarida (LPS) sehingga lapisan dari membran ini asimetris.

Membran luar memiliki saluran khusus, yang terdiri dari molekul protein yang disebut *porin*, yang dapat meloloskan difusi pasif dan beberapa molekul hidrofilik dengan berat rendah, misalnya gula, asam amino dan ion tertentu. Molekul antibiotik yang besar menembus membran luar dengan sangat lambat sehingga bakteri gram negatif relatif sangat tahan terhadap antibiotik. Permeabilitas membran luar bakteri gram negatif sangat bervariasi antara spesies yang satu dengan lainnya, misalnya membran luar *P.aeruginosa* sangat tebal terhadap bahan antibakteri namun mempunyai permeabilitas yang rendah 100 kali dibandingkan *E.coli*. Membran luar juga mengandung sekelompok kecil protein yang terlibat dalam transpor molekul spesifik seperti vitamin B₁₂ dan *iron-siderophore complex*.

3. Lipopolisakarida (LPS)

LPS dinding sel gram negatif terdiri dari lipid kompleks, yang disebut lipid A, dimana melekat polisakarida yang terangkai dengan pusat dan ujung dari unit pengulangan. LPS terikat pada membran luar dengan ikatan hidrofobik. Lipid A terdiri dari unit disakarida glukosamin berfosfor dimana dilekatkan sejumlah rantai panjang asam lemak. Inti polisakarida identik pada seluruh spesies bakteri gram negatif yang memiliki LPS.

LPS yang sangat toksik terhadap binatang, disebut endotoksin dari bakteri gram negatif karena dia sangat erat melekat pada permukaan sel dan hanya dikeluarkan jika sel mengalami lisis. Jika LPS diuraikan menjadi lipid A dan polisakarida, semua toksisitas berkaitan dengan bentuk asalnya. Polisakarida yang merupakan bagian terbesar antigen permukaan, disebut antigen O.

4. Ruang Periplasma

Ruang antara membran dalam dan luar disebut ruang periplasma, terdiri dari lapisan murein dan larutan protein mirip gel. Ruang periplasma mengisi 20-40% dari seluruh volume sel. Protein periplasma terdiri dari protein pengikat substrat tertentu (misalnya asam amino, gula, vitamin, dan ion), enzim hidrolitik (misalnya alkaline phosphatase dan 5'-nucleotidase) yang memecah substrat nontransportable menjadi transportable, dan enzim detoksifikasi (misalnya β -lactamase dan aminoglycoside-phosphorylase) yang membuat antibiotik tertentu menjadi tidak aktif.

d. Pertumbuhan dinding sel³

Seperti peningkatan massa sel, dinding sel memanjang oleh interkalasi unit yang baru disintesa ke dalam berbagai lapisan dinding. Pada *E.coli*, pertumbuhan membran luar terpusat pada kutub sel, komponen khusus seperti reseptor faga dan permease dimasukkan secara acak ke dalam jaringan ini. Lapisan peptidoglikan dari *E.coli* tumbuh dengan interkalasi yang terletak secara acak.

e. Protoplas, Steroplas, dan Bentuk L (*L-form*)³

Pelepasan dinding bakteri dapat terjadi melalui hidrolisis oleh enzim lisosim atau dengan penghambatan biosintesa peptidoglikan menggunakan antibiotik misalnya Penisilin. Pada media dengan tekanan osmosa terkontrol, beberapa perlakuan menyebabkan terbentuknya protoplas dari sel gram positif atau sferoplas dari sel gram negatif.

Jika sel dapat tumbuh dan membelah, maka disebut bentuk L. Bentuk L sulit untuk dibiakkan dan biasanya memerlukan medium agar padat dan juga tekanan osmotik yang tepat. Beberapa bentuk L dapat kembali pada bentuk bakteri normal jika faktor pencetusnya dihilangkan. Jadi, mereka dapat mengembalikan daya sintesis dinding sel secara normal. Namun, ada bentuk L yang stabil dan tidak bisa kembali. Beberapa spesies bakteri menghasilkan bentuk L secara spontan atau dengan pengaruh antibiotik pada inang yang menyebabkan infeksi kronik. Karena bentuk L resisten terhadap antibiotik, maka kemoterapi menjadi bermasalah. Perubahan mereka ke bentuk bakteri dapat menyebabkan berjangkitnya kembali infeksi.

2.1.3.6 Kapsul dan Glikokaliks³

Beberapa bakteri membuat banyak polimer ekstraseluler jika tumbuh pada lingkungan alami mereka. Jika polimer dalam bentuk pekat, lapisan terlihat jelas mengelilingi sel, disebut kapsul. Jika berbentuk jalinan fibril yang longgar dan menonjol ke luar sel dinamakan glikokaliks. Polimer ekstraseluler disintesis oleh enzim yang terletak pada permukaan sel bakteri. Polimer yang mengandung lebih dari satu macam monosakarida disebut heteropolimer.

Kapsul membantu penyerangan bakteri patogenik dan glikokaliks berperan dalam perlekatan bakteri ke permukaan pada lingkungan mereka termasuk sel tanaman dan inang.

2.1.3.7 Flagella³

Flagella bakteri merupakan tonjolan mirip benang yang terdiri dari protein dengan diameter 12-30 nm. Flagella merupakan organ untuk pergerakan. Ada tiga tipe flagella, yaitu monotrichous (flagella tunggal di kutub sel), Lophotrichous (flagella banyak di kutub sel), dan peritrichous (flagella yang tersebar pada seluruh permukaan sel).

Flagella bakteri tersusun dari ribuan molekul protein, yang dinamakan flagelin. Struktur utama flagelin dari spesies bakteri yang berbeda diduga berbeda dengan spesies lainnya. Mereka sangat antigenik dan beberapa reaksi bertahan terhadap infeksi ditentukan oleh protein ini. Flagella melekatkan pada tubuh sel bakteri oleh struktur kompleks yang mengandung kait dan badan basal. Semua komponen motor flagella terletak dalam selubung sel dan perputaran berjalan normal jika media berisi substrat yang cocok.

2.1.3.8 Pili (Fimbriae)³

Beberapa bakteri gram negatif memiliki tonjolan permukaan yang rigid, yang disebut pili atau fimbriae. Pili terdiri dari struktur protein yang disebut pilin. Ada dua jenis pili, yakni pili biasa yang berperan dalam penempelan/ perlekatan bakteri simbiotik dan patogenik terhadap sel inang, dan pili seks yang berperan dalam penempelan sel donor atau resipien pada proses konjugasi bakteri.

Virulensi bakteri patogenik tidak hanya bergantung pada produksi toksin tapi juga tergantung antigen kolonisasi. Untuk *E.coli*, ia memiliki tiga tipe tonjolan, yakni pili biasa (pendek, kaku), pili seks lebih panjang dan fleksibel serta beberapa flagella yang panjang dan tebal. Diameter pili biasa 7 nm, pili seks 8,5 nm, dan flagella 25 nm.

2.1.4 Perubahan Bentuk Selama Pertumbuhan ³

2.1.4.1 Pembelahan Sel

Secara umum, bakteri memproduksi dengan pembelahan yang selanjutnya diikuti dengan pemanjangan sel, pembentukan membran sel melintang dan dinding sel secara berurutan. Nukleoid yang berjumlah ganda sebelum pembelahan, dibagi secara sama pada dua anak sel.

2.1.4.1 Pengelompokan Sel

Jika sel tetap melekat setelah membelah, akan terbentuk pola pengelompokan yang khas. Bidang dan jumlah pembelahan akan menentukan pola pengelompokan sel, yakni rantai (*streptococcus*), berpasangan (*pneumococcus*), bundel kubik (*sarcinae*) atau pipih, dan lain-lain.

2.1.4.2 Perubahan Siklus Hidup

Selama perkembangan bakteri dari dorman menjadi aktif. Terjadi perubahan yang bisa diamati. Sel tumbuh menjadi lebih besar, granula menghilang, dan protoplas yang diwarnai dengan pewarna menjadi lebih jelas.

2.2 Enterobacteriaceae ³

Enterobacteriaceae merupakan kelompok bakteri gram negatif berbentuk batang yang habitat alaminya pada sistem usus manusia dan binatang. Keluarga enterobacteriaceae meliputi *eschericia*, *shigella*, *salmonella*, *enterobacter*, *klebsiella*, *serratia*, *proteus*, dan lainnya.

Enterobacteriaceae merupakan fakultatif anaerob atau aerob yang dapat memfermentasikan karbohidrat, memiliki struktur antigenik yang kompleks, dan

menghasilkan berbagai toksin yang mematikan. Enterobacteriaceae mempunyai struktur antigenik yang kompleks dengan lebih dari 150 antigen somatik O yang tahan panas yang berbeda, lebih dari 100 antigen K (Kapsular) yang tidak tahan panas, dan lebih dari 50 antigen H (flagellar).

Antigen O merupakan bagian terluar dinding sel lipopolisakarida dan terdiri dari unit berulang polisakarida. Beberapa polisakarida spesifik O mengandung gula unik. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol dan biasanya dideteksi dengan cara aglutinasi bakteri.

Antigen K merupakan bagian luar dari antigen O pada beberapa bakteri namun tidak pada semua enterobacteriaceae. Beberapa antigen K adalah polisakarida, termasuk antigen K dari *E.coli*, dan yang lainnya adalah protein. Antigen K dapat berpengaruh pada reaksi aglutinasi dan mereka dapat dihubungkan dengan virulensi (misalnya strain *E.coli* memproduksi antigen K1 yang menyebabkan meningitis neonatal dan antigen K dari *E.coli* menyebabkan perlekatan bakteri pada sel epitelial yang memungkinkan invasi ke sistem gastrointestinal atau saluran air kemih).

Antigen H terletak pada flagella dan didenaturasi dengan panas atau alkohol. Mereka dapat diawetkan dengan pemberian formalin. Antigen H mengadakan aglutinasi dengan antibodi H, biasanya Ig G. Penentu dalam antigen H merupakan fungsi dari rangkaian asam amino pada protein flagella (flagelin).

2.3 *Eschericia coli*

Eschericia coli atau *E.coli* merupakan bakteri yang paling sering digunakan dalam penelitian mikrobiologi dan salah satu penyebab infeksi pada berbagai organ tubuh makhluk hidup. Hal ini dikarenakan *E.coli* merupakan flora normal yang ada pada makhluk hidup namun *E.coli* dapat menjadi patogen jika jumlahnya berlebih dan berada pada tempat yang tidak semestinya.³

E.coli tidak memiliki kapsul yang begitu tebal jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif lainnya seperti *Klebsiella sp.* *E. coli* merupakan bakteri gram negatif berbentuk basil. *E.coli* berkilau pada media yang mengandung basic fuchsin seperti agar Endo, motil, pipih, dan biasanya ditemukan baik sendiri

maupun berpasangan dengan *E.coli* lainnya. Bakteri ini dapat bersifat non-motil maupun motil dengan flagel yang tersebar di seluruh badan kuman (flagel *peritrich*).³

Untuk keperluan diagnostik, *Escherichia coli* dapat diidentifikasi di laboratorium dengan menggunakan beberapa zat seperti indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol serta adanya produksi gas dari glukosa.³

E.coli memiliki beberapa varian (strain) dan menyebabkan penyakit tertentu, seperti meningitis dan pneumonia. Berbagai varian *E.coli* yang ditemukan, antara lain :

a. *Verocytotoxin-producing Escherichia coli (Enterohemorrhagic E.coli/ EHEC)*

Bakteri ini paling sering menyebabkan diare pada penduduk di Eropa dan Amerika utara. EHEC banyak dihubungkan dengan *hemorrhagic colitis*, sebuah bentuk diare yang parah. Ada pun strain yang paling sering ditemui pada bakteri tersebut adalah VTEC O157:H7.³ Bakteri itu menyebar secara zoonotik, hewan yang menjadi sumber infeksi tersebut umumnya adalah lembu, sapi, dan domba.¹

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 Hemorrhagic colitis dan komplikasinya dapat dicegah dengan memasak daging yang segar.³

b. *E.coli enteropatogenik (EPEC)*

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

Akibat dari infeksi EPEC adalah diare yang cair yang biasanya sulit diatasi meskipun kronis. Diare EPEC berhubungan dengan berbagai serotipe spesifik dari *E.coli*. Strain diidentifikasi dengan antigen O dan kadangkala dengan antigen H.³

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

Beberapa ETEC memproduksi eksotoksin yang sifatnya labil terhadap panas di bawah kontrol plasmida.³ 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 (EAEC)*

Bakteri tersebut sering menyebabkan diare yang menetap pada anak-anak serta diare yang akut dan kronis dalam jangka waktu lebih dari 14 hari. EAEC melekat pada mukosa intestinal dan menghasilkan enterotoksin dan sitotoksin.³ Akibatnya adalah kerusakan mukosa, pengeluaran sejumlah besar mukus, dan terjadinya diare.¹

e. *E.coli enteroinvasif (EIEC)*

Invasi bakteri tersebut jarang terjadi. EIEC menyebabkan penyakit yang mirip dengan shigellosis. Hal tersebut dikarenakan inflamasi yang ditimbulkan sering terjadi pada mukosa ileum dan kolon.¹

Strain EIEC memfermentasi laktosa dengan lambat atau tidak memfermentasi laktosa dan tidak motil. EPEC dan ETEC mudah ditemui karena kontaminasi makanan, sedangkan ETEC dan EIEC juga dapat terkontaminasi melalui air minum. Masa inkubasinya dapat mencapai 1-2 hari tetapi dapat berlangsung lebih singkat.¹

2.4. Kondisi yang mempengaruhi pertumbuhan optimum bakteri

Ada beberapa zat yang dapat dibutuhkan oleh bakteri tersebut untuk dapat tumbuh. Beberapa di antaranya adalah D-glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol, dulcitol, adonitol, D-sorbitol, L-arabinosa, rafinosa, L-rhamnosa, D-xylosa, melibiosa. Namun, kebutuhan dari pertumbuhan 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

2.4.1. 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

2.4.1.1. 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 pertumbuhan bakteri yang diinginkan.³

2.4.1.2. 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 pertumbuhannya.³

2.4.1.3.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

2.4.1.4.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

2.4.1.5. 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 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

2.4.2. Lingkungan

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

2.4.2.1. 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

2.4.2.2. Derajat Keasaman (pH)

Setiap makhluk hidup memiliki pH optimum. Nilai pH ini pun harus diketahui untuk setiap spesies agar dapat mencapai pertumbuhan 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 hidrogen juga diduga mempengaruhi pengaturan pH internal pada *neutrophiles*. Seluruh mekanisme tersebut ditujukan sebagai homeostasis dari mikroorganisme tersebut.³

2.4.2.3. Temperatur

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, bakteri dibagi mejadi 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 organism yang tergolong *hyperthermophilic* sehinga 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 rentan suhu yang dapat ditoleransi oleh spesies tertentu berhubungan dengan stabilitas suhu pada protein dari spesies tersebut. Mikroorganisme bersama dengan tumbuhan maupun hewan yang menjadi host nya 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

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

2.4.2.5. 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

2.4.2.6. Media Yang Digunakan

Agar sangat cocok digunakan sebagai media untuk pertumbuhan 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 pertumbuhan *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 pertumbuhan 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 hydrolusate* dan dextrosa. Mikroba yang dapat tumbuh 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 pertumbuhan

yang berlebihan. 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

2.5. Transfer kultur

Bakteri dipindahkan dari satu medium ke medium lainnya dengan teknik subkultur. Teknik ini merupakan dasar yang penting dan sering digunakan dalam prosedur perkembangbiakan bakteri. Proses ini dilakukan secara hati-hati dan teliti karena mikroorganisme yang ada di ruangan maupun alat-alat kerja dapat menjadi sumber kontaminasi eksternal dan dapat mempengaruhi hasil penelitian.¹²

Langkah-langkah yang harus dilakukan saat transfer kultur antara lain:

1. Mengambil bakteri dari media dengan menggunakan sengkeli. Sebelumnya, jangan lupa menandai terlebih dahulu tabung yang akan digunakan dengan nama bakteri dan tanda lain yang diperlukan.
2. Menggenggam tabung dengan menggunakan telapak tangan.
3. Memanasi sengkeli hingga berwarna merah untuk mencegah kontaminasi.
4. Membuka kapas pada tabung dengan sengkeli yang sudah steril.
5. Memanasi leher tabung dengan cara melewati tabung di atas bunsen dengan cepat dan cukup sekali.
6. Memasukkan sengkeli segera ke dalam tabung, lalu kembali dikeluarkan dengan membentuk gaya zigzag supaya bakteri dalam sengkeli tertinggal dalam tabung.
7. Memanaskan leher tabung kembali di atas bunsen dan segera ditutup dengan kapas.
8. Memanaskan lagi sengkeli.
9. Selanjutnya, tabung-tabung diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam.

2.6 Frekuensi Bunyi dan Sonikator

Frekuensi bunyi adalah banyaknya getaran yang dihasilkan dalam selang waktu tertentu yang dinyatakan dalam satuan hertz. Satu hertz didefinisikan sebagai satu kali getaran dalam satu detik.¹³

Untuk melepaskan gelombang suara, kita memerlukan suatu alat yang disebut sonikator. Sonikator ini dapat menghasilkan frekuensi yang masih dalam batas ambang pendengaran maupun ultrasonik. Tujuan dari pemberian rangsangan suara melalui sonikator adalah untuk menghasilkan suatu reaksi yang dapat melepaskan suatu bahan teragregasi yang terlarut dalam medium. Tindakan sonikasi juga banyak dipakai untuk disosiasi, transfer zat tertentu, mencampur, penguat reaksi, pemisahan, atau penambahan zat tertentu.¹⁴

Sonikator yang paling sering digunakan adalah *microtip sonicator probe*. Sonikator terdiri dari bagian transduser sebagai penghasil frekuensi bunyi dan sonotrode sebagai pengarah suara yang dihasilkan dari sonikator tersebut. Untuk efektivitas penggunaannya, ujung dari *sonotrode* harus terendam di dalam cairan. Cairan 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. Tinggi cairan di dalam wadah yang digunakan harus cukup untuk menutup sebagian besar ujung sonikator.¹⁴

Pada sonikasi yang tegak lurus terhadap permukaan medium, perhitungannya dapat dituliskan sebagai berikut.¹⁴

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

Keterangan: P1 = kekuatan yang dihasilkan

P2 = kekuatan yang diteruskan ke medium

Z1 = impedansi akustik sumber bunyi

Z2 = impedansi akustik di medium

Impedansi akustik merupakan karakteristik hantaran dari gelombang suara. Impedansi akustik (Z) ini dihitung sebagai $Z = \rho c$, dimana ρ adalah massa jenis medium yang disonikasi dan c adalah kecepatan hantaran suara dalam 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.¹⁴

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.¹⁴

2.7. Pemaparan Frekuensi Bunyi, Khususnya Ultrasonik, Terhadap Bakteri

Pemaparan frekuensi bunyi nampaknya mempengaruhi morfologi bakteri. Perubahan yang dapat terjadi biasanya berupa lisis sel, hambatan pertumbuhan, penurunan resistensi antibiotik, dan lain-lain. Perubahan yang terjadi tergantung pula dari cara pemaparannya.¹⁵

Ultrasonik dapat mempengaruhi bakteri melalui interaksi antara bunyi dengan membran sel. Gelombang ultrasonik tersebut menyebabkan timbulnya getaran (osilasi) dengan frekuensi tinggi pada medium (cairan) di sekitar bakteri.^{15,16}

Dengan adanya gelombang ultrasonik, gelembung gas udara di dalam cairan tersebut akan berosilasi. Proses inilah yang dinamakan kavitasi dan kavitasi ini dapat terjadi pada semua frekuensi. Kavitasi dibagi menjadi dua, yakni 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 menyebabkan timbulnya gelombang 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.^{15,16}

Gelombang ultrasonik dikatakan berintensitas tinggi jika lebih dari 2 W/cm^2 dan dikatakan frekuensi rendah jika kurang dari 100 kHz. Namun,

intensitas tinggi tersebut baru mampu melisiskan bakteri jika lebih dari 10 W/cm².⁴ Pengaruh yang ditimbulkan oleh adanya ultrasonik tergantung dari 4 faktor: tipe bakteri, suhu dari buffer sonikasi, durasi, serta komposisi dari tabung sonikasi tersebut.¹⁶

2.8. Pengenceran serial

Setelah bakteri disonifikasi, maka bakteri yang ada perlu dihitung. Penghitungan dengan menggunakan mikroskop dan metode kimia memiliki kekurangan karena bakteri yang mati juga terhitung. Oleh karena itu, untuk penghitungan bakteri pada percobaan ini dilakukan teknik pengenceran serial.¹²

Prosedur teknik pengenceran serial yaitu:

1. Melabeli tabung kultur berisi *E.coli* yang sudah disonifikasi dengan nomor 1 dan sembilan tabung berisi 9 ml akuades steril lainnya dengan nomor 2 hingga 10.
2. Melabeli plat steril dengan tulisan 1A, 1B, 2A, 2B, dan seterusnya hingga 10B.
3. Meletakkan tabung nomor 1 pada vortex agar tercampur merata.
4. Dengan menggunakan pipet steril, 1 ml suspensi bakteri pada tabung nomor 1 dipindahkan ke tabung nomor 2. Dengan demikian telah terjadi pengenceran 10 kali semula.
5. Supaya tercampur sempurna, tabung nomor 2 dihomogenisasi menggunakan vortex. Kemudian kembali diambil 1 ml untuk dipindahkan ke tabung nomor 3.
6. Hal di atas dilanjutkan dengan cara yang sama hingga mencapai tabung nomor 10. Pada tabung terakhir, 1 ml larutan dibuang sehingga volume larutan sama untuk setiap tabung.

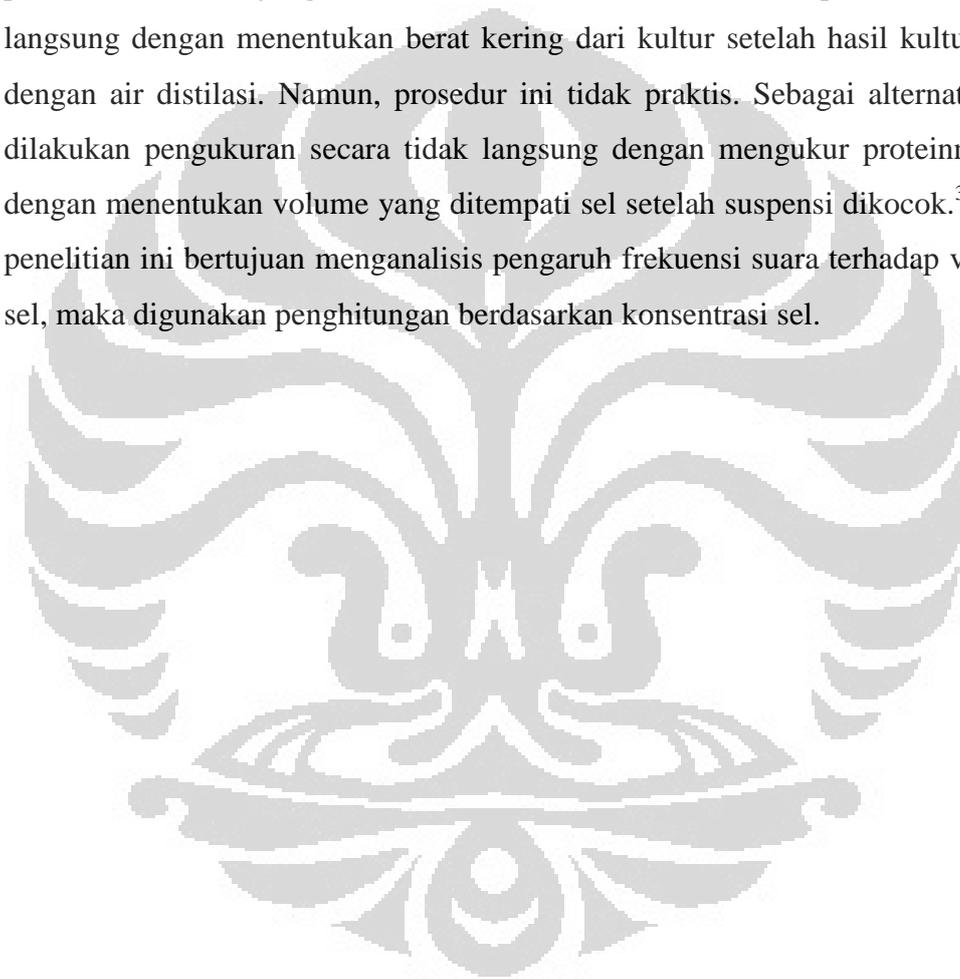
2.9. Teknik *Pour Plate*

Setelah diencerkan, suspensi bakteri kemudian ditempatkan pada media nutrisi yang cocok untuk berkembangbiak. Teknik *pour plate* merupakan teknik yang umum digunakan. Agar yang digunakan sebagai medium harus didinginkan hingga suhu 45°C.¹²

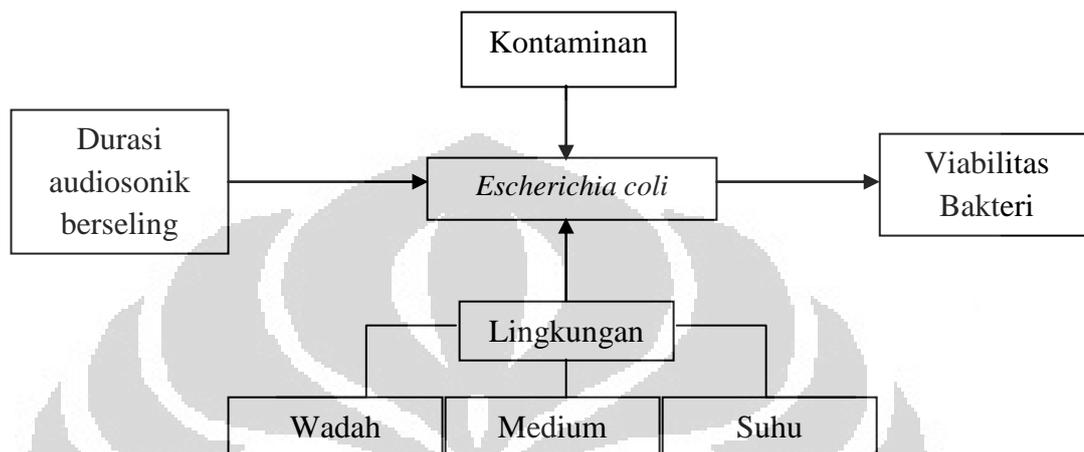
2.10. Pengukuran viabilitas bakteri

Viabilitas adalah peningkatan jumlah seluruh komponen suatu organisme dengan hasil multiplikasi sel. Peningkatan jumlah akibat penyerapan air atau deposit lemak bukan merupakan suatu pertumbuhan.

Konsentrasi bakteri dapat diukur berdasarkan konsentrasi sel atau konsentrasi biomassa. Konsentrasi sel didapatkan dengan menghitung jumlah sel per unit volume yang dikultur. Konsentrasi biomassa dapat diukur secara langsung dengan menentukan berat kering dari kultur setelah hasil kultur dicuci dengan air distilasi. Namun, prosedur ini tidak praktis. Sebagai alternatif dapat dilakukan pengukuran secara tidak langsung dengan mengukur proteinnya atau dengan menentukan volume yang ditempati sel setelah suspensi dikocok.³ Karena penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh frekuensi suara terhadap viabilitas sel, maka digunakan penghitungan berdasarkan konsentrasi sel.



2.11. Kerangka Konsep



Keterangan:

Subyek : *Escherichia coli*

Variabel bebas : Perlakuan yang diberikan kepada subjek, berupa durasi frekuensi audiosonik berseling

Variabel kontrol : Lingkungan sebagai tempat perlakuan diberikan, keadaan antarsampel disamakan untuk meminimalisasi pengaruh lingkungan terhadap hasil

Variabel perancu : Faktor-faktor yang dapat merubah hasil penelitian walaupun sudah dilakukan penyamaan keadaan berupa kontaminan

Variabel terikat : Hasil akhir dari interaksi subjek penelitian dengan agen, perancu, dan lingkungan, yaitu viabilitas bakteri

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorik.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini 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. Agar nutrisi
3. *Plate Count Agar* (PCA)
4. Bakteri *P.aeruginosa*
5. Akuades steril
6. Es
7. Alkohol

3.3.2 Alat Penelitian

1. Sengkelit / jarum inokulasi 10 μ l
2. Mikropipet ukuran 1000 μ l
3. Tip
4. Wadah sonikasi (tabung falkon 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. Cawan petri dari gelas/plastik (90-100 mm)
19. Otoklaf
20. Sarung Tangan
21. Masker
22. Vortex
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 tertentu bagi viabilitas bakteri

3.3.3 Cara Kerja

3.3.3.1 Pembuatan media perkembangbiakan

A. *Brain Heart Infusion (BHI)*¹⁷

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

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)*¹⁷

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 Media

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 sesuai 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, kultur bakteri yang hendak diinkubasi, media perkembangbiakan dan sengkeliit.
2. Mensterilkan sengkeliit dengan cara dipanaskan di atas bunsen hingga menyala merah.
3. Mengambil bakteri dari media sebanyak satu sengkeliit (sudah disetarakan dengan 0,5 McFarland).
4. Membuka tabung berisi media NHI, mulut tabung dipanaskan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi
5. Mencampurkan bakteri ke dalam larutan BHI.
6. Langkah 2 sampai 4 dilakukan sebanyak tiga kali, 1 tabung untuk kontrol dan 2 tabung lain untuk perlakuan.
7. Ketiga tabung reaksi berisi bakteri diinkubasi di suhu 35 °C selama 18-24 jam.

3.3.3.4 Identifikasi Bakteri

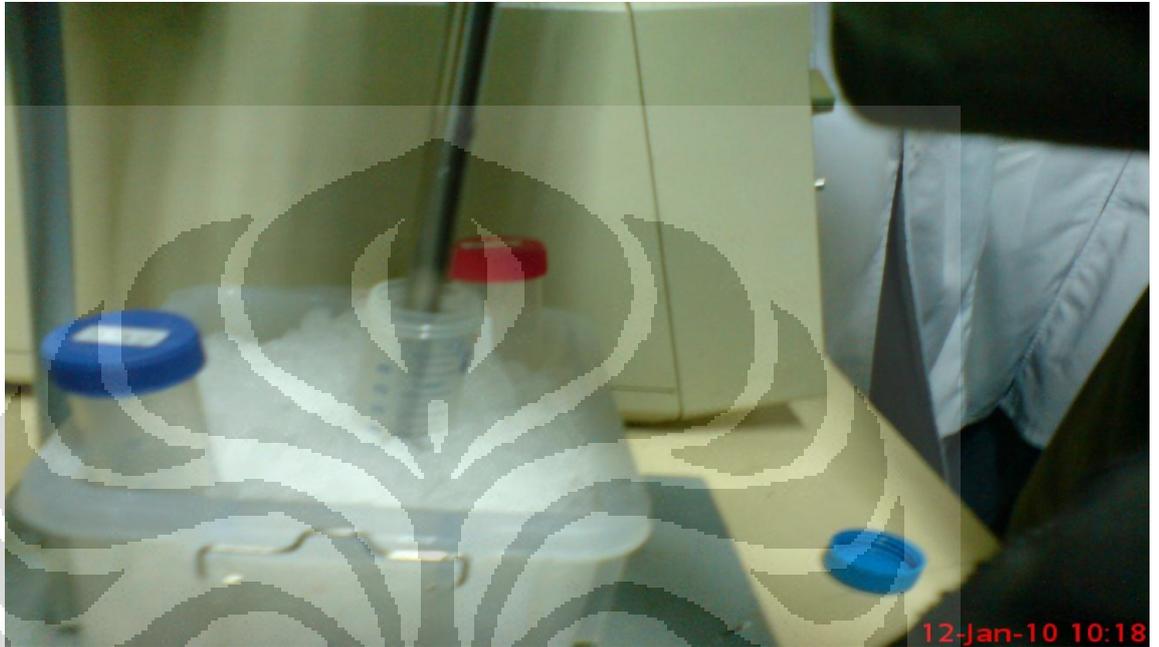
Untuk melakukan identifikasi bakteri, peneliti melakukan pewarnaan gram

3.3.3.5 Sonikasi Bakteri

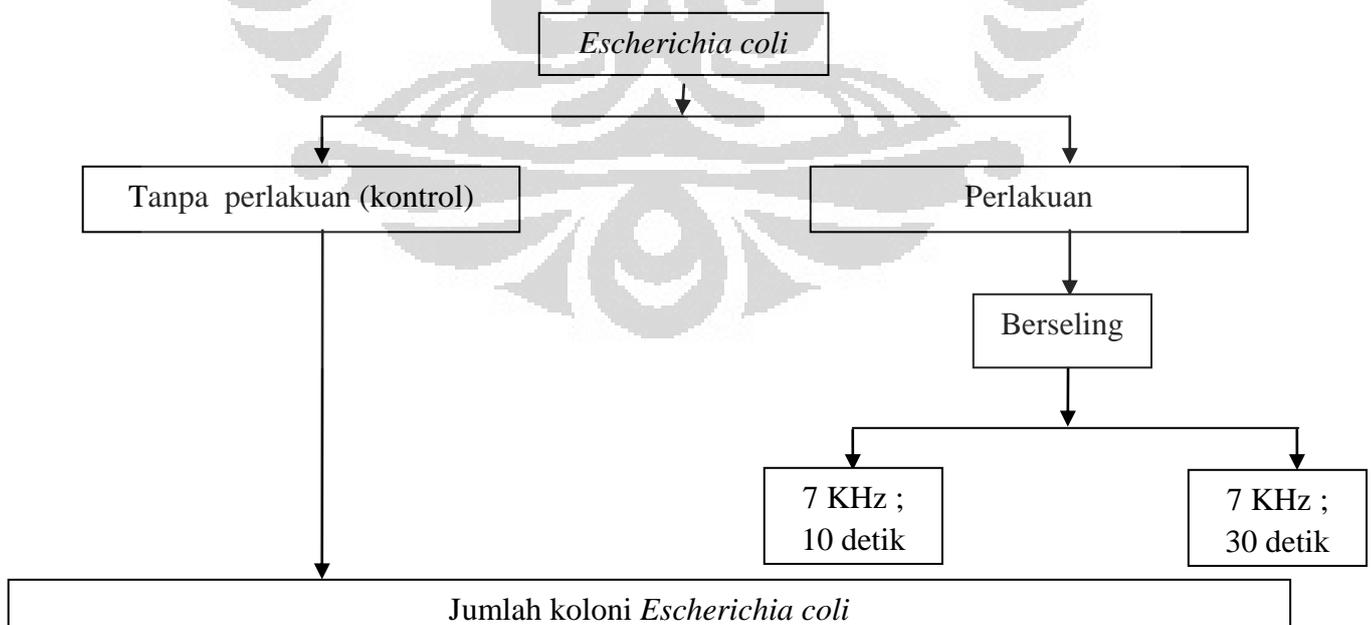
Untuk perlakuan dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Memindahkan biakan bakteri dari tabung pertama ke dalam wadah sonikasi.
2. Meletakkan wadah sonikasi dalam es untuk menjaga suhu biakan tidak meningkat akibat proses sonikasi.
3. Membersihkan tip (ujung sonikator) dengan alkohol sebelum perlakuan untuk mencegah kontaminasi.
4. Mencelupkan ujung sonikator ke dalam biakan bakteri tanpa menyentuh dasar wadah sonikasi.
5. Menyalakan sonikator pada frekuensi 7 kHz secara intermiten setiap 1 detik selama 10 detik. Setelah perlakuan, bakteri dikembalikan ke dalam tabung reaksi dan ditandai "F1".
6. Langkah 1-4 diulang dengan biakan dari tabung kedua.

7. Menyalakan sonikator pada frekuensi 7 kHz secara intermiten setiap 1 detik selama 30 detik. Setelah perlakuan, bakteri dikembalikan ke dalam tabung reaksi dan ditandai "F2".
8. Tabung reaksi ketiga ditandai "Kontrol" tanpa diberikan perlakuan.



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

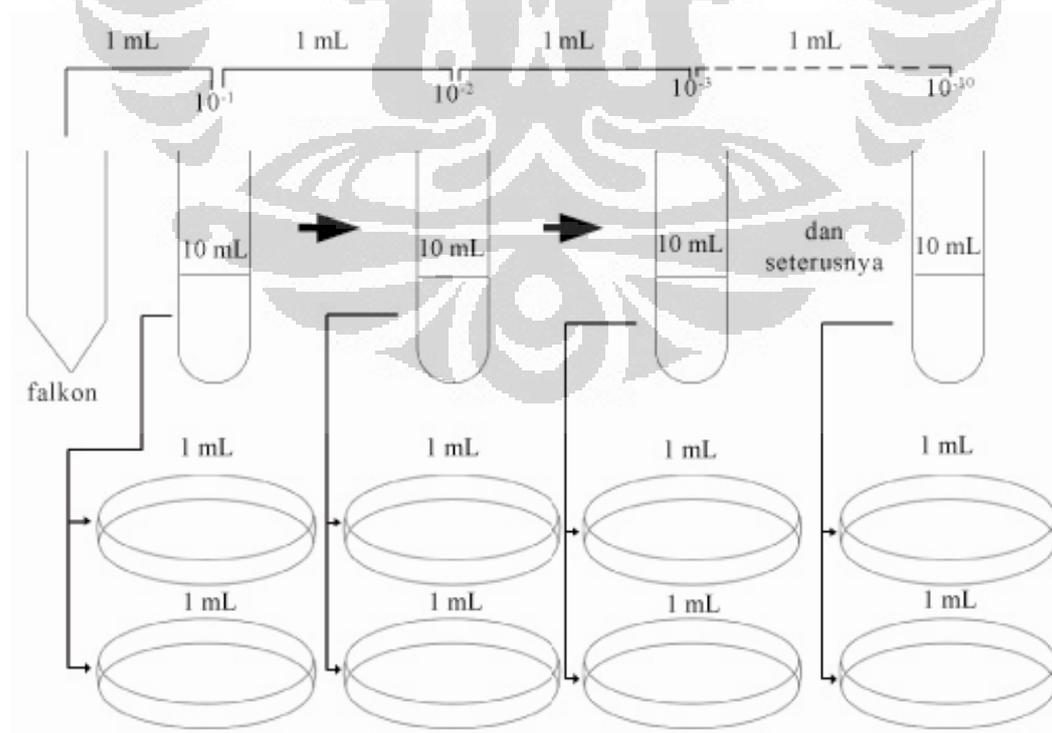


Gambar 3.5 Urutan tindakan yang diberikan terhadap *Escherichia coli* dalam penelitian ini

3.3.3.6 Total Plate Count (TPC) ^{12,18}

Masing-masing biakan bakteri, yaitu F1, F2, dan Kontrol, dikembangkan dengan cara sebagai berikut:

1. Peneliti mengambil hasil sonikasi sebanyak 1 ml lalu mencampurkannya dengan 9 ml H₂O pada tabung reaksi.
2. Dari campuran nomor 1, peneliti mengambil 1 ml dan mencampurkan 9 ml H₂O dalam tabung reaksi lain (melakukan pengenceran).
3. Mengulangi terus kegiatan di atas hingga konsentrasi 10^{-10} .
4. Dari setiap pengenceran diambil masing-masing 1 ml dan dimasukkan ke dalam plat steril.
5. Menambahkan agar PCA bersuhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ hingga menutupi permukaan plat (± 20 ml).
6. Kemudian plat digoyang dengan memutar ke kiri dan kanan hingga campuran merata.
7. Setelah agar membeku, semua plat 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

Jumlah koloni bakteri pada plat steril dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300 setiap cawan.²⁷ Jumlah koloni yang valid kemudian dirata-rata dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasilnya dinyatakan sebagai jumlah bakteri per milliliter atau gram.

Dalam pelaporan jumlah koloni hanya digunakan 2 angka penting, yaitu angka pertama dan kedua dari kiri, sedangkan angka yang ketiga diganti dengan 0 apabila < 5 dan dijadikan satu jika ≥ 5 , lalu ditambahkan pada angka kedua.

3.4 Identifikasi Variabel

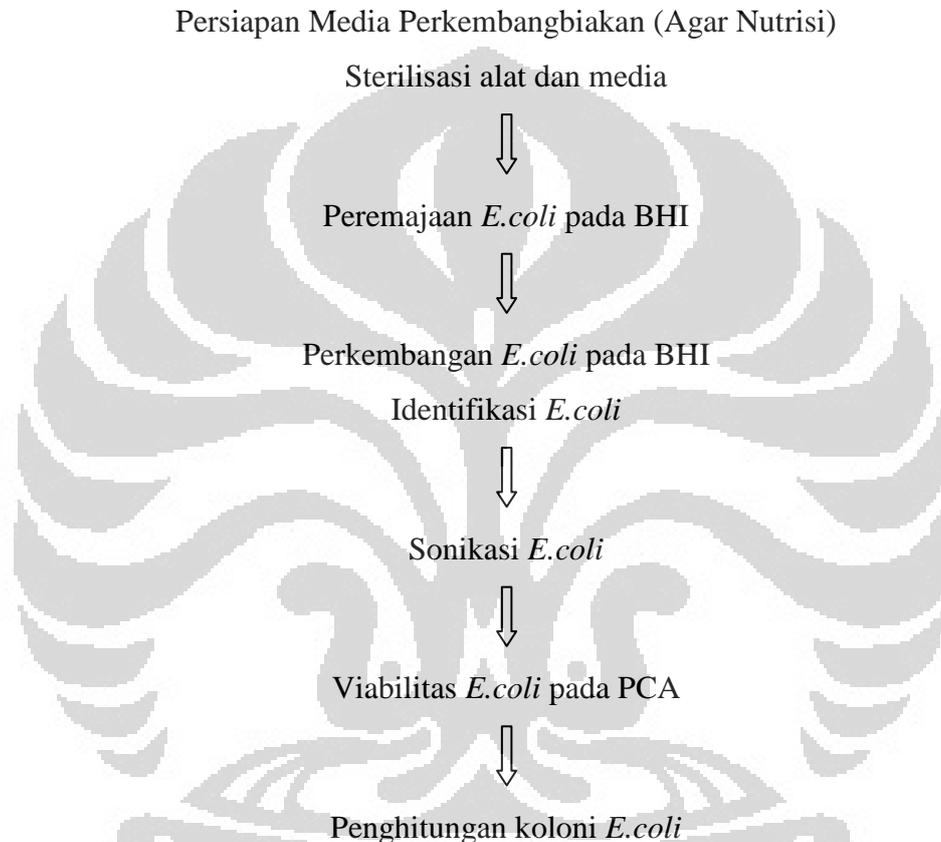
Variabel Bebas	: Sonifikasi dengan audiosonik secara berseling
Variabel Terikat	: Viabilitas bakteri <i>Escherichia coli</i>
Variabel Perancu	: kontaminasi bakteri lain
Variabel kontrol	: wadah, medium, suhu, standar McFarland

3.5 Definisi Operasional

- a. Sengkelit adalah alat untuk mengambil biakan bakteri, baik dari medium cair maupun padat. Sengkelit yang digunakan pada penelitian ini berukuran 100 μ l.
- b. Sonikator adalah alat yang digunakan untuk memberi pajanan gelombang suara terhadap kultur bakteri dengan frekuensi yang dapat dimanipulasi.
- c. Media perkembangbiakan adalah media yang digunakan bakteri untuk berkembang biak. Pada percobaan ini digunakan dua media, yaitu BHI dan PCA.
- d. Frekuensi suara adalah banyaknya getaran suara per detik.
- e. Audiosonik adalah bunyi dengan frekuensi antara 20 – 20.000 Hz.
- f. Bakteri adalah mikroorganisme prokariot.

- g. *Total plate count* adalah 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 Manajemen dan Analisis Data

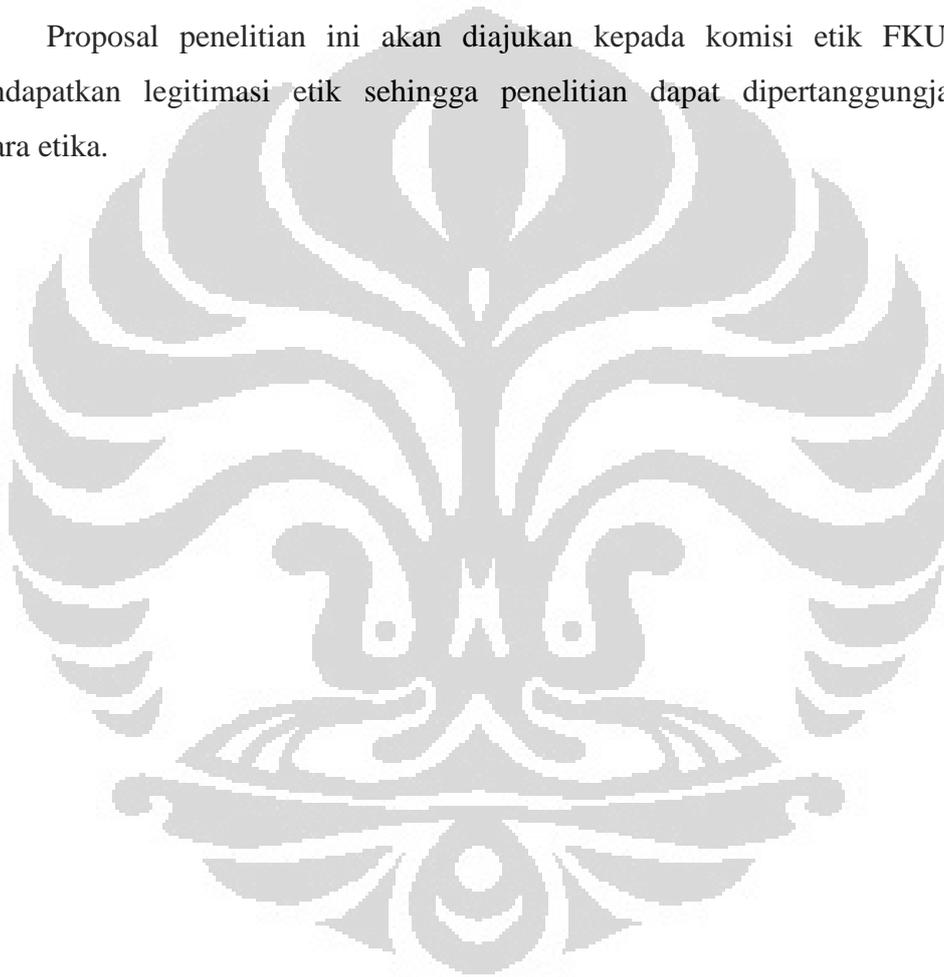
Data yang diperoleh akan dianalisa secara kuantitatif untuk mendapatkan kesimpulan penelitian. Pengolahan secara kuantitatif ini dilakukan dengan mengambil sampel yang paling mewakili penelitian, yaitu sediaan yang memiliki jumlah bakteri antara 30-300 koloni. Sediaan dengan jumlah koloni dalam batas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

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).

3.8 Etika Penelitian

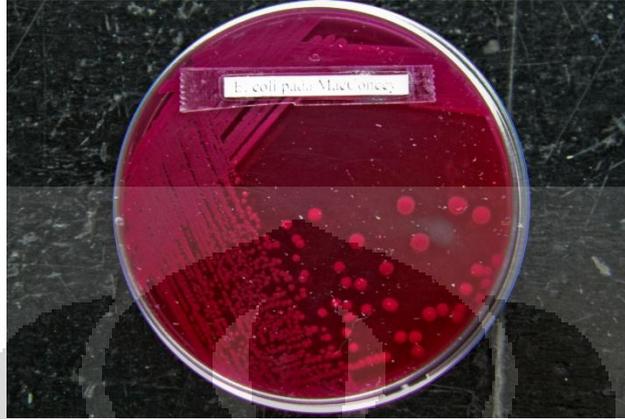
Proposal penelitian ini akan diajukan kepada komisi etik FKUI untuk mendapatkan legitimasi etik sehingga penelitian dapat dipertanggungjawabkan secara etika.



BAB IV

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* menunjukkan koloni dalam berbagai ukuran. Koloni terlihat berbentuk bulat dan tersebar tidak merata. Ada pula koloni-koloni kecil yang tampak tersusun rapi membentuk garis pada agar nutrisi tersebut.

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). *E.coli* dapat ditemukan sebagai bakteri tunggal atau berpasangan dengan *E.coli* lainnya.



Gambar 4.2 Koloni bakteri gram negatif (-)

Pada gambar 4.1 tampak persebaran bakteri gram negatif yang tidak merata. Terdapat koloni yang padat pada daerah-daerah tertentu karena spesimen yang digunakan mengandung konsentrasi bakteri yang cukup tinggi. Pada gambar 4.2 dapat dilihat bahwa sebenarnya bentuk bakteri tersebut adalah basil (batang).

Selain pewarnaan gram, dapat pula dilakukan uji Iodium. Pada *E.coli*, fermentasi paling banyak dilakukan terhadap sediaan sukrosa (tabung reaksi dengan warna biru muda) seperti pada gambar 4.3 di bawah 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 Hasil Penelitian

Dari hasil percobaan, peneliti mendapatkan hasil sebagaimana tertera dalam tabel berikut.

Tabel 4.1 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni *E.coli* dengan Menggunakan Colony Counter

Pengenceran	Rata-Rata Jumlah Koloni					
	K		F1		F2	
	A	B	A	B	A	B
10^{-1}	≈	≈	≈	≈	≈	≈
10^{-2}	≈	≈	≈	≈	≈	≈
10^{-3}	≈	≈	≈	≈	≈	≈
10^{-4}	≈	≈	≈	≈	≈	≈
10^{-5}	≈	≈	≈	≈	≈	≈
10^{-6}	≈	≈	68		≈	≈
10^{-7}	295.5		2.5		173	
10^{-8}	29		0		3.5	
10^{-9}	5		0		0	
10^{-10}	0		0		0	

Keterangan :

K = kontrol

F1 = paparan 7 kHz selama 10 detik

F2 = paparan 7 kHz selama 30 detik

≈ tidak dapat dihitung karena jumlahnya terlalu banyak

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 4.2 berikut ini

Tabel 4.2 Rata-rata jumlah *E.coli* pada setiap perlakuan dan kontrol

Perlakuan	Rata-rata koloni (x 10 ⁷ CFU)	Viabilitas (%)	Nilai Kemaknaan (95% IK)*
Kontrol	295.5	100	-
7 kHz ; 10 detik	6.8	2.3	P=0.024
17 kHz; 30 detik	173	58.5	P=0.065

*Bermakna jika $p < 0.05$

Perhitungan rata-rata dilakukan secara bertahap. Pertama, peneliti merata-rata jumlah koloni pada setiap pengenceran. Untuk perhitungan rata-rata keseluruhan koloni *E.coli* pada setiap perlakuan, peneliti hanya menghitung jumlah koloni yang memenuhi persyaratan (30-300 koloni). Dengan demikian, peneliti mendapatkan rata-rata jumlah *E.coli* sebagaimana tertera pada tabel 4.1 dan 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 $6,8 \times 10^7$ koloni, dan F2 (7 kHz; 30 detik) sebesar $1,7 \times 10^9$ koloni.

Jadi berdasarkan hasil penelitian ini, kedua perlakuan memberikan penurunan viabilitas pada bakteri. Hal tersebut terlihat dari jumlah koloni bakteri pada kedua perlakuan yang lebih rendah daripada viabilitas pada kontrol. Namun, viabilitas pada bakteri yang diberikan frekuensi 7 kHz selama 30 detik lebih besar daripada bakteri dengan frekuensi 7 KHz selama 10 detik. Jadi, durasi audiosonik yang diberikan selama 10 detik lebih menghambat pertumbuhan bakteri dibandingkan dengan durasi audiosonik selama 30 detik pada frekuensi yang sama. Dengan pajanan selama 10 detik, *E.coli* hanya dapat membentuk koloni sebanyak 2,3 % dari koloni kontrol. Lain halnya dengan pajanan selama 30 detik, *E.coli* masih mampu membentuk koloni sebanyak 58,5 % dari jumlah koloni kontrol. Perbandingan hasil pajanan 7 kHz selama 10 detik dengan 30 detik ini tercatat sebesar 25,4 kali.

BAB V

DISKUSI

5.1 Perbandingan Viabilitas Bakteri Antara Kontrol dengan Pemaparan Frekuensi Audiosonik Secara Berseling

Pada hasil penelitian yang dilakukan, terlihat bahwa pertumbuhan bakteri pada kontrol (tanpa perlakuan) lebih besar daripada perlakuan F1 dan F2. F1 dan F2 dipaparkan frekuensi suara dengan besar yang sama namun durasinya berbeda. Jumlah koloni pada F1 dan F2 lebih sedikit daripada kontrol. Namun, jumlah koloni pada F2 jauh lebih banyak daripada F1.

Jumlah bakteri yang menurun pada F1 dan F2 dibandingkan dengan kontrol dapat terjadi karena efek sonikasi dalam batas pendengaran. Kavitas dan radikal bebas yang ditimbulkan oleh suara akan mempengaruhi membran sel bakteri. Membran sel nya lama-kelamaan akan mulai rusak sehingga jumlah bakteri yang mati dalam medium akan semakin banyak. Pemaparan frekuensi suara secara intermiten akan menyebabkan kerusakan minimal pada dinding sel bakteri. Pada bakteri yang lemah, pemaparan ini akan merusak dinding sel nya namun pada bakteri yang lebih kuat, akan terjadi respons adaptasi terhadap lingkungan. Oleh karena itu, pada hasil penelitian ini, jumlah bakteri pada perlakuan F1 dan F2 memang berkurang dibanding kontrol namun bukan berarti dengan pemaparan frekuensi suara secara berseling ini, jumlah bakterinya menjadi 0 atau mati semua.

Pada penelitian-penelitian yang pernah diadakan sebelumnya dengan menggunakan frekuensi 1,5 dan 15 kHz secara simultan (terus-menerus), hasilnya memperlihatkan viabilitas bakteri. Viabilitas bakteri pada frekuensi 5 kHz paling besar bila dibandingkan dengan yang lainnya. Sementara pada penelitian ini, peneliti menggunakan frekuensi 7 dan 17 kHz dengan 2 jenis durasi yang berbeda, yakni 10 dan 30 detik. Cara pemaparannya pun bukan simultan, namun secara berseling. Pada frekuensi 7 kHz dengan durasi 10 detik dan 30 detik, viabilitas bakteri lebih berkurang dibandingkan dengan kontrol.

Pada penelitian ini, semua perlakuan disamakan kecuali durasi. Frekuensi yang digunakan sama 7 kHz dengan jenis bakteri yang sama pula, yaitu *E.coli*.

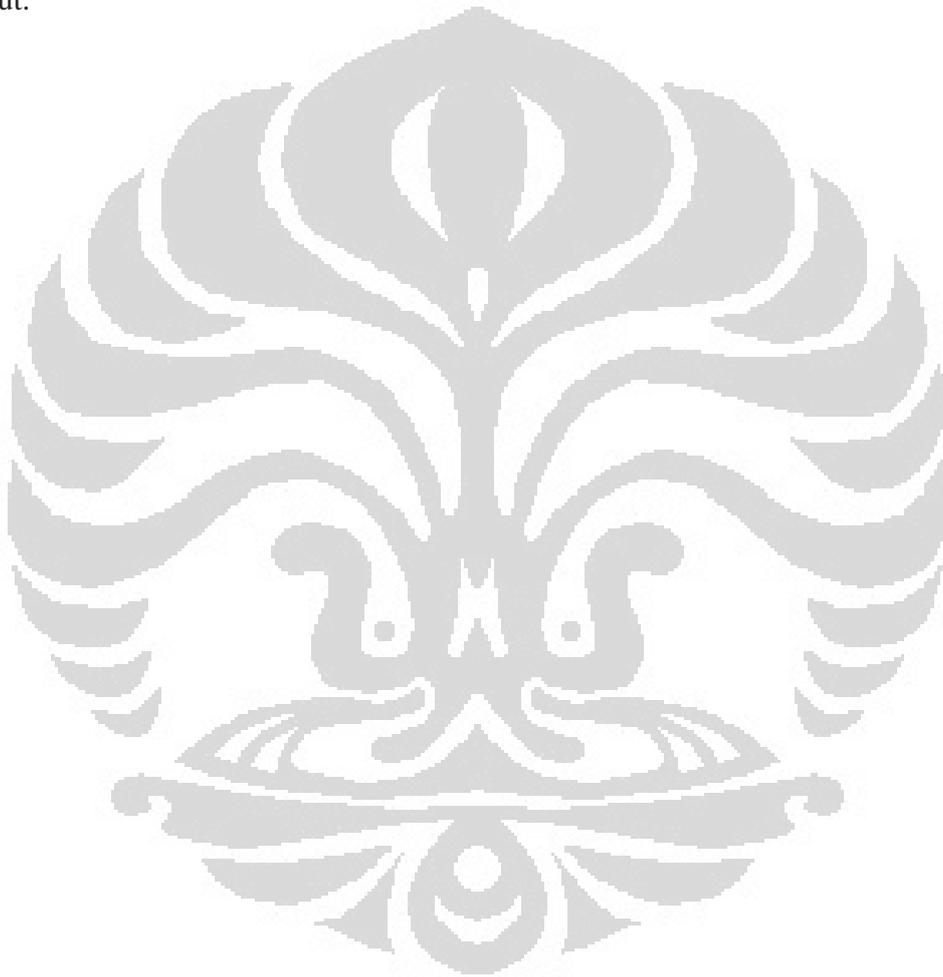
Stimulus suara yang diberikan juga sama secara berseling pada durasi 10 dan 30 detik. Hambatan pertumbuhan bakteri yang berbeda pada durasi 10 detik dan 30 detik diduga karena adanya mekanisme adaptasi yang berbeda. Bakteri memerlukan nutrisi, temperatur, dan pH untuk mendukung pertumbuhannya. Pemberian stimulus secara berseling ini diduga mengurangi ketersediaan faktor-faktor pendukung viabilitas bakteri ini. Pada pemberian stimulus secara simultan, bakteri dihadapkan pada paparan suara yang terus-menerus dari awal. Paparan ini merupakan stressor bagi bakteri yang mengancam kehidupannya. Oleh karena itu, bakteri ini akan berusaha melakukan upaya adaptasi terhadap stressor yang dihadapinya, misalnya perubahan permeabilitas, perubahan metabolisme termasuk di dalamnya peningkatan pengambilan nutrisi yang ada di lingkungan. Respons adaptasi yang dilakukan bakteri ini bersifat menetap sehingga mereka memiliki masa pengenalan terhadap lingkungan barunya. Oleh karena itu, paparan suara secara simultan justru meningkatkan viabilitas bakteri dibandingkan paparan suara yang secara berseling.

5.2 Perbandingan Viabilitas Bakteri Akibat Perbedaan Durasi Frekuensi Suara

Pada penelitian ini, terlihat adanya perbedaan tingkat viabilitas bakteri. Frekuensi suara 7 kHz dengan durasi 10 detik ternyata lebih menghambat viabilitas bakteri dibandingkan dengan frekuensi yang sama namun durasinya 30 detik.

Perbedaan tingkat viabilitas pada durasi yang berbeda 20 detik ini disebabkan karena efek sonikasi terhadap dinding dan membran sel bakteri. Peneliti menduga alasan penyebab perbedaan tingkat viabilitas pada perbedaan durasi ini adalah pada durasi yang 10 detik, bakteri mengalami perubahan metabolisme secara bertahap sehingga bakteri yang kuat akan bertahan namun yang lemah akan mati. Pada durasi yang 30 detik, bakteri terpapar lebih lama terhadap suara yang diberikan secara berseling. Hal ini mirip dengan proses adaptasi bakteri yang dipaparkan dengan frekuensi suara yang simultan. Kalau pada frekuensi suara secara simultan, dari awal bakteri telah terpajan dengan paparan suara yang terus-menerus. Paparan suara ini merupakan stressor bagi bakteri sehingga ia harus segera memulai respons adaptasi agar dirinya dapat bertahan hidup. Waktu pengenalan bakteri terhadap lingkungannya menjadi lebih lama sehingga perubahan fisiologis juga akan terjadi,

seperti peningkatan ambilan nutrisi dari lingkungan, penurunan permeabilitas, dan bukan tidak mungkin juga terbentuk gen kebal terhadap paparan suara yang dapat ditransmisikan dari satu bakteri ke bakteri yang lainnya. Oleh karena itu, jumlah bakteri yang tumbuh justru lebih banyak dan bukan berkurang. Jadi, pada paparan suara berseling selama 30 detik, diduga bakteri memiliki respons adaptasi yang mirip dengan paparan suara simultan, namun hal ini masih membutuhkan penelitian lebih lanjut.



BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Tujuan penelitian ini adalah untuk menemukan pengaruh durasi frekuensi suara pada frekuensi audiosonik, yaitu 10 detik dan 30 detik terhadap viabilitas bakteri *E.coli*.

Hasil dari penelitian ini adalah durasi frekuensi audiosonik yang dipaparkan terhadap viabilitas *E.coli* selama 10 detik bersifat lebih inhibitorik dibandingkan dengan durasi 30 detik pada frekuensi yang sama. Pada pemaparan 10 detik, tumbuh koloni *E.coli* sebanyak $6,8 \times 10^7$ koloni (memberikan viabilitas 2,3 % dari kontrol), sedangkan pada pemaparan 30 detik, $1,7 \times 10^9$ (memberikan viabilitas 58,5 dari kontrol). Jadi, terlihat adanya penurunan jumlah viabilitas bakteri pada frekuensi 7 kHz dengan durasi pemaparan 10 detik dibandingkan dengan 30 detik.

Penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi usaha pencarian penanganan terbaik pada infeksi *E.coli*. Penelitian ini juga diharapkan menambah pengetahuan peneliti mengenai penelitian itu sendiri.

6.2 Saran

Peneliti mengharapkan agar tersedia fasilitas baru yang memungkinkan dilaksanakannya penelitian dengan variabel yang lebih beragam dan dengan rentang durasi frekuensi suara yang lebih luas. Selain itu, peneliti berharap agar peneliti lain, khususnya mahasiswa SI Kedokteran UI, dapat meningkatkan minat dan perhatian dalam bidang mikrobiologi kedokteran.

Peneliti juga berharap agar adanya penelitian ini membuka jalan bagi penelitian-penelitian baru yang bertujuan memanfaatkan pengaruh paparan frekuensi suara terhadap viabilitas koloni bakteri. Bagi peneliti yang akan melanjutkan penelitian ini dengan lebih mendalam, disarankan untuk menegaskan hubungan yang ada antara paparan frekuensi suara dengan viabilitas koloni bakteri, serta mencari kemungkinan pemanfaatan paparan suara terhadap viabilitas bakteri secara klinis.

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. 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

10. 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>
11. Media Laboratories. Nutrient agar. 2009 [Diakses 4 Februari 2011]. Tersedia di <http://www.himedialabs.com/TD/M001.pdf>
12. Cappuccino, Sherman. Microbiology: a laboratory manual. 7th Ed. India: Pearson Education; 2005. p 131-3.
13. Despopoulos A, Silbernagi S. Color atlas of physiology. Edisi ke-5. New York: Thieme. h362, 2003.
14. European Patent Specification. Sonication of a medium [Online]. 22 April 2009 [Diakses 21 Maret 2011]. Tersedia di <http://www.freepatentsonline.com/EP1879688.pdf>
15. 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>
16. 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>
17. OXOID. The Oxoid manual. 5th ed. Hampshire: OXOID Limited; 1982.
18. Dewan Standardisasi Nasional. Cara uji cemaran mikroba. SNI 01-2897-1992. Standar Nasional Indonesia, p6-8. 1992.

LAMPIRAN

1. 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 $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
- b. Peralatan
 - i. Cawan petri dari gelas atau plastic (90-100 mm)
 - ii. Pipet ukur (1.5 dan 10 ml)
 - iii. Penangas air $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
 - iv. Lemari pengeram $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
 - 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 $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per militer atau gram.
 - iii. 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.
 - iv. 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.
 - v. 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.
 - vi. 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 x faktor pengenceran).

vii. 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).

viii. 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)

