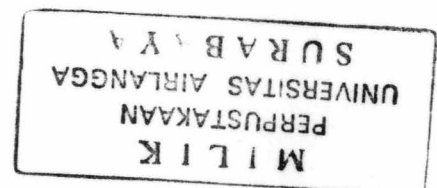


Dis. M.04/12  
Ast  
P

## DISERTASI

### POTENSI *LIGHT EMITTING DIODE* (LED) BIRU UNTUK FOTOINAKTIVASI BAKTERI *Staphylococcus aureus* DENGAN PORFIRIN ENDOGEN



**SURYANI DYAH ASTUTI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**POTENSI *LIGHT EMITTING DIODE* (LED) BIRU  
UNTUK FOTOINAKTIVASI BAKTERI *Staphylococcus aureus*  
DENGAN PORFIRIN ENDOGEN**

**DISERTASI**

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu MIPA  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah Dipertahankan Di Hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka**

**Pada Hari : Rabu**

**Tanggal : 16 Maret 2011**

**Pukul : 10.<sup>00</sup> - 12.<sup>00</sup> WIB**

**Oleh :**

**SURYANI DYAH ASTUTI  
NIM. 090710373 D**

## LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 18 MEI 2011**

**Oleh:  
Promotor**



**Prof. Dr. Suhariningsih, Ir**  
**NIP. 195206271979012001**

**Co Promotor I**



**Dr. Ni'matuzahroh**  
**NIP. 196801051992032003**

**Co Promotor II**



**Prof. Dr. H.M. Zainuddin, Apt**  
**NIP.194509181974121001**

## **PANITIA PENGUJI DISERTASI**

**Telah Diuji Pada Ujian Tertutup**

**Tanggal 8 Pebruari 2011**

---

- Ketua** : **Dr. Afaf Baktir, Dra., M.Si**
- Anggota** : **1. Prof. Dr. Suhariningsih, Ir**  
**2. Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt**  
**3. Dr. Ni'matuzahroh**  
**4. Dr. rer. Nat Aulia MT Nasution, Ir., M.Sc**  
**5. Dr. Hari Basuki, dr., M.Kes**  
**6. Dr. Eng. Kuwat Triyana, Drs., M.Si**  
**7. Dr. Tini Surtiningsih, Ir., DEA**

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan**

**Rektor Universitas Airlangga**

**Nomor : 4901/H3/KR/2011**

**Tanggal 22 Pebuari 2011**

# UCAPAN TERIMA KASIH

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah disertasi untuk ujian Tahap II Program Doktor S-3 MIPA Universitas Airlangga.

Disertasi ini dapat diselesaikan berkat bimbingan, saran dan koreksi dari tim Promotor. Dengan segala kerendahan hati saya menyampaikan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Suhariningsih, Ir selaku Promotor yang membimbing, memberikan wawasan dan falsafah berfikir yang sangat bermanfaat selama proses penyusunan proposal, penelitian dan penyusunan naskah disertasi. Terima kasih atas semangat dan dukungan yang diberikan untuk menyelesaikan penelitian dan waktu konsultasi di tengah-tengah kesibukan beliau yang sangat padat.

Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt selaku Ko-Promotor I yang membimbing dengan sabar, memberikan wawasan dan logika berfikir yang sangat bermanfaat selama proses penyusunan proposal, penelitian dan penyusunan naskah disertasi. Di tengah kesibukan beliau, dengan sabar mendengarkan dan memberi jalan keluar atas semua kendala yang saya temui serta selalu ada waktu untuk konsultasi dan mengoreksi naskah disertasi.

Dr. Ni'matuzahroh, Dra selaku Ko-promotor II yang telah membimbing dan memberikan masukan, nasehat dan saran dengan sabar, selama penelitian dan penyusunan naskah disertasi ini.

Ucapan terima kasih saya sampaikan pada Pemerintah Republik Indonesia melalui Menteri Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan kesempatan serta bantuan dana beasiswa studi BPPS, Hibah Program Doktor dan Program Sandwich-Like, sehingga saya dapat mengikuti pendidikan program Pascasarjana Universitas Airlangga dan menyelesaikan penelitian disertasi.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasich, Apt yang telah memberikan ijin dan berkenan menerima saya sebagai mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS dan mantan Asisten Direktur Bidang Akademik Prof. Dr. H.R. Eddy Rahardjo, dr. Ank.Ic yang telah memberikan fasilitas untuk mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga

Ketua Program Studi Doktor Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Prof. Dr. Suhariningsih, Ir, atas nasehat, perhatian dan dorongan semangat yang diberikan untuk menyelesaikan pendidikan Doktor

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Prof. Win Darmanto, Drs., M.S., Ph.D., dan mantan Dekan. Salamun, Drs., M.Kes yang telah memberikan ijin dan kesempatan pada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor dan membantu pembiayaan penelitian, publikasi dan studi

Seluruh Tim Penguji Dr. Afaf Baktir, Dra, M.Si., Dr. rer. nat. Aulia MT Nasution, Ir, M.Sc., Dr. Harry Basuki, dr, M.Kes., Dr Tini Surtiningsih, Ir. dan Dr. Eng. Kuwat Triyana, M.Si., selaku penguji yang telah memberikan saran dan masukan demi sempurnanya tulisan ini.

Ketua Departemen Fisika Fakultas Sains Dan Teknologi Arif Wibowo, Drs., M.Si dan Ketua Program Studi Fisika Siswanto, Drs., M.Si yang telah memberikan fasilitas dan motivasi pada saya

Prof. Haris, Dr. dan Associate Prof. Sulaiman Harun, Dr. dari University of Malaya Kualalumpur yang telah berkenan memberikan kesempatan pada saya untuk melakukan penelitian di laboratorium Photonik. Terima kasih juga saya sampaikan pada Associate Prof. Geoffrey Will, Dr., Esa Jaatinen, Dr., Sue Ellen dan Chris Calvalho dari Queensland University of Technology Australia yang telah menerima dan membantu penelitian saya melalui program Sandwich-Like

Senior yang sangat saya hormati: Welina R., Ir., Puspa Erawati, Ir., TriAnggono Prijo, Drs., Muzaki, Drs., Dr. Pratiwi Pujiastuti, M.Si., Dr. Moh. Yasin, M.Si, Dr. Sumarsih, M.Si, Puji Astuti, M.Si, yang selalu memotivasi saya untuk menyelesaikan studi, juga Febdian Rusdy, M.Sc, Herry M.Si, Riesta, M.Si. Apt., Deni S.Si, yang telah memberikan bantuan dalam penelitian

Sahabat saya dalam suka dan duka Catur Retnaningdyah M.Si, Dr. Sobri Abusini, M.Si dan Umi Marwati, M.Si. Juga pada sahabat-sahabat saya angkatan 2007: Suko Hardjana M.Si, Apt., Dr. Idha K., M.Si. Apt., Dr. Wiwied Ekasari,

M.Si, Apt., Tri Dewanti, M.Si, Harmadi, M.Si, Fajar, M.si., Tatang, M.Si., Yuni K., M.Si., Yulia, M.Si., Pangesti, M.Si., Serafina, M.Si., Gita, M.Si dan Syamsul M.kes., yang banyak membantu dan dengan kompak selalu saling memotivasi untuk menyelesaikan studi program Doktor,

Sahabat-sahabat saya Hendrik Setiabudi, drg., M.Si., Rini Devijanti drg., M.si., Indeswati drg., M.Si., Yeni Damayanti drh., M.Si., Tuti Juniastuti drh., M.Si., Arifa Mustika dr., M.Kes, mbak Helda Fathih, mbak Yanny Trisyani, mbak Janatin, mbak Herwin, mbak Rahmi, mbak Elya, mbak Ayomi, Pak Yuwono, Pak Andi dan mbak Fenny yang telah banyak membantu di Brisbane.

Rekan-rekan jurusan Fisika dan juga Dr. Retna Apsari, Dra., M.Si, Aminatun Ir., M.Si, Nuril Ukrowiyah, Dra., M.Si. atas kritik-kritiknya yang memotivasi saya untuk terus maju dan mengembangkan diri.

Ungkapan terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada yang sangat saya hormati dan kasihi, orang tua saya, ayahanda Sombo Soebiyanto (alm) dan Ibunda Laminah yang dalam kesederhanaan dan kasih sayang beliau telah mendidik, menyemangati dan selalu tulus mendoakan setiap langkah saya. Kakak-kakak saya tercinta Herry, Ir., mbak Nur, mbak Herning, Buntaran, drh., Dr. Haryono, SE.Ak., juga kepada mertua saya, Bapak Kamidi dan Ibu Sutanti, terima kasih atas doanya sehingga saya dapat menyelesaikan studi.

Ungkapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan pada suami tercinta Yunus Susilo, ST dan anak-anak tersayang P. Berliana Fika Aditama dan P. Anissa Dyah Permatasari atas doa, dukungan moral dan material, kesabaran serta pengorbanan yang diberikan selama saya menempuh studi,

Akhirnya kepada semua fihak yang namanya tidak bisa saya sebutkan satu persatu, yang telah membantu selama penelitian berlangsung hingga tahap penulisan, saya sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya

Semoga hasil penelitian dalam disertasi ini bermanfaat bagi masyarakat dan semoga Allah meridloinya. Amien ya Rabbal Alamin.

Surabaya, 15 Maret 2011

Penulis



# RINGKASAN

**POTENSI *LIGHT EMITTING DIODE (LED)* BIRU UNTUK  
FOTOINAKTIVASI BAKTERI *Staphylococcus aureus*  
DENGAN PORFIRIN ENDOGEN**

**Suryani Dyah Astuti**

**RINGKASAN**

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif yang diketahui memegang peran penting sebagai penyebab infeksi pada kulit. Pengobatan sistemik dengan antibiotik menyebabkan bakteri resisten, sehingga diperlukan terapi alternatif yang efektif dan selektif, salah satu alternatif adalah metode fotodinamik dengan penyinaran foton cahaya. *Photodynamic Inactivation (PDI)* merupakan suatu metode yang digunakan untuk inaktivasi pada mikroba dengan penyinaran foton cahaya (fotoinaktivasi). Kombinasi cahaya dan fotosensitizer pada PDI akan menyebabkan fotoinaktivasi bakteri. Mekanisme fotoinaktivasi melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh makromolekul dalam bakteri yang bersifat peka terhadap cahaya (porfirin fotosensitizer). Selanjutnya proses fotosensitisasi tersebut mengaktifkan terjadinya reaksi kimia lanjutan yang menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif. Proses fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kadar porfirin dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum serap porfirin.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama bertujuan untuk menguji kinerja (performansi) instrumen *Light Emitting Diode (LED)* yang telah dirakit, mengetahui jenis porfirin endogen bakteri dan potensi instrumen LED untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen. Tahap kedua bertujuan untuk mencari dosis energi penyinaran LED yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan mengetahui efek penyinaran LED terhadap karakteristik fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus* secara fisik pada dinding sel dan secara kimiawi pada profil asam lemak jenuh dan profil pita protein bakteri.

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment* menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan dua faktor yaitu faktor daya *power*

*width modulation* (PWM) penyinaran LED terdiri dari 4 taraf (25%, 50%, 75% dan 100%) dan faktor durasi waktu penyinaran 5 taraf (10, 20, 30, 40, dan 50) menit untuk mencari dosis optimal penyinaran LED pada fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen. Parameter yang diamati adalah jumlah koloni bakteri yang tumbuh menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Perbedaan antar perlakuan dengan kelompok kontrol dilihat dengan uji anova yang dilanjutkan uji tukey dengan menggunakan paket program SPSS for Window Release 14.

Penelitian tahap pertama menghasilkan instrumen sumber cahaya LED biru dan merah yang memiliki puncak emisi ( $430,05 \pm 0,13$ ) nm dan ( $629,03 \pm 0,18$ ) nm dan bandwidth 65 nm dan 30 nm, dan ketepatan alat pengukur temperatur (nilai  $R^2 = 0,9995$ ) dan lama waktu penyinaran (nilai  $R^2 = 1$ ) dengan kalibrator. Jenis porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* adalah coproporfirin III. Hasil uji potensi fotoinaktivasi bakteri menunjukkan bahwa penyinaran dengan LED biru 430 nm menghasilkan penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P sebesar ( $70 \pm 2$ ) %, sedangkan penyinaran LED merah 629 nm sebesar ( $22 \pm 4$ )%. Sehingga penyinaran LED biru memiliki potensi fotoinaktivasi yang lebih besar pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil karakteristik fotoinaktivasi pada penyinaran LED biru dosis optimal ( $135 \text{ J/cm}^2$ ) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbesar yaitu ( $75 \pm 2$ ) %. Analisis secara kimiawi menunjukkan adanya perubahan pada profil asam lemak jenuh miristat, palmitat dan laurat serta perubahan pada profil pita protein bakteri. Analisis fisis pada sel bakteri menunjukkan adanya kerusakan pada dinding sel bakteri akibat penyinaran LED biru. Jadi penyinaran dengan LED biru 430 nm memiliki potensi tinggi untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen.

**POTENCY OF BLUE LIGHT EMITTING DIODE (LED) FOR  
PHOTOINACTIVATION TO *Staphylococcus aureus* BACTERIA  
BY IT'S ENDOGENOUS PORPHYRIN**

**Suryani Dyah Astuti**

**SUMMARY**

*Staphylococcus aureus* is Gram positive bacteria which known to play an important role as cause of infection in human skin. Systemic treatment with antibiotics causes of resistant bacteria that require effective and selective treatment alternatives, that is photodynamic method with irradiating of light photon. Photodynamic Inactivation (PDI) represent a method be used for bacteria inactivation. The combination of light and photosensitizer on PDI will cause bacteria photoinactivation. The mechanism of photoinactivation were photosensitization, that was light absorption process by photosensitizer molecule (porphyrin) and then activation of the photochemistry reaction yielded various reactive oxygen species. Photosensitisation depend on concentration and type of porphyrin and so the suitability of the light spectrum with the absorption spectrum of porphyrin. At porphyrin molecule, irradiating effect early by event of photophysics in the form of light absorption on photosensitizer, then followed by photochemistry reaction yielding various reactive oxygen species.

This research consisted of two phases. The first phase aim to know the performance of Light Emitting Diode (LED) instrument with local raw material as light source which have been assembling, know the type of endogen porphyrin bacteria and LED instrument potency for the photoinactivation of *Staphylococcus aureus* bacteria by it's endogen porphyrin. The second phase aim to look for the optimal energy dose of LED irradiating for the photoinactivation and check effect irradiating of blue LED in saturated fatty acid profile, protein band profile and wall cell of bacteria.

This research represented experimental research. First phase used t test analysis to know difference of irradiating with red and blue LED. Second phase used complete random device with factorial pattern (two factors) that were the

power width modulation (PWM) 4 level ( 25%, 50%, 75% and 100%) and irradiating time 5 levels ( 10, 20, 30, 40, and 50) minutes to look for optimal energy dose of LED irradiating. Parameter perceived was the amount of bacterium colony by using Total Plate Count (TPC). To see the difference of parameter perceived between any treatments with control group were used anova factorial and post hoc Tukey test by using program package of SPSS Window Release for 14.

The first phase yield light source red and blue LED instrument. Result of performance measurement of LED instrument showed that blue LED had emission peak ( $430,05 \pm 0,13$ ) nm and red LED ( $629,03 \pm 0,18$ ) nm with bandwidth 65 nm and 30 nm, and accuracy of temperature ( $R^2 = 0,9995$ ) and irradiating time ( $R^2 = 1$ ) grader in comparison with calibrator. So the temperature and time grader of the LED instrument had accuracy with calibrator. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P bacterium accumulated coproporphyrin III and from potency test indicated that irradiating with blue LED 430 nm yielded reduction of *Staphylococcus aureus* bacteria colonies 70%, and irradiating of red LED 629 nm was 22%. So the irradiating of blue LED had a greater potency to photoinactivation of *Staphylococcus aureus* bacteria. The analysis of LED irradiating energy dose by anova indicated that interaction of power and irradiating time of blue LED 430 nm having decrease in the percentage of *Staphylococcus aureus* colonies, with optimal irradiating was  $75 \text{ mW/cm}^2$  power density and 30 minute time irradiating (energy density  $135 \text{ J/cm}^2$ ) yielded percentage decrease of *Staphylococcus aureus* colonies biggest 75%. Chemically analysis showed the changes in saturated fatty acid profile (mirystic, palmitic and lauric) and changes in bacterial protein band profile. Physically analysis showed the cell wall damage of bacteria as effect blue LED irradiating at optimal energy dose. Hence, the blue LED instrument has a high potential for photoinactivation to *Staphylococcus aureus* bacteria.

**POTENCY OF BLUE *LIGHT EMITTING DIODE* (LED) FOR  
PHOTOINACTIVATION TO *Staphylococcus aureus* BACTERIA  
BY IT'S ENDOGENOUS PORPHYRIN**

**Suryani Dyah Astuti**

**ABSTRACT**

Photodynamic Inactivation (PDI) represent a method was used for bacteria inactivation by using combination of endogenous pophyrin and light photon. The purpose of this study were to determine the instrument performance LED light source that had been assembled, recognize the potency of LED irradiating and optimization of LED irradiating energy dose for photoinactivation of *Staphylococcus aureus* bacteria ATCC 6538P with endogenous pophyrin, and characterized the effect of LED irradiating to bacteria by physically and chemically.

Performance measurement of LED instrument showed that blue LED had emission peak 430 nm and red 629 nm with 65 nm and 30 nm bandwidth. Temperature and irradiating time gauge of LED instrument showed that they had a good accuracy, comparison with calibrator. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P bacterium accumulated coproporphyrin III and from potency test indicated that irradiating with blue LED 430 nm yielded reduction of *Staphylococcus aureus* bacteria colonies 70%, and irradiating of red LED 629 nm was 22%. So that irradiating of blue LED had a greater potency to photoinactivation of *Staphylococcus aureus* bacteria. The analysis of LED irradiating energy dose by anova indicated that interaction of power and irradiating time of blue LED 430 nm having decrease in the percentage of *Staphylococcus aureus* colonies, with optimal irradiating was 75 mW/cm<sup>2</sup> power density and 30 minute time irradiating (energy density 135 J/cm<sup>2</sup>) yielded percentage decrease of *Staphylococcus aureus* colonies biggest 75%. Chemically analysis showed the changes in saturated fatty acid profile (mirystic, palmitic and lauric) and changes in bacterial protein band profile. Physically analysis showed the cell wall damage of bacteria as effect blue LED irradiating at optimal energy dose. Hence, the blue LED instrument has a high potential for photoinactivation to *Staphylococcus aureus* bacteria.

Key word: photodynamic inactivation, LED, endogenous porphyrin photosensitizer, *Staphylococcus aureus*

# DAFTAR ISI

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN DISERTASI.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PANITIA PENGUJI.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY.....	x
ABSTRACT.....	xii
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxi
DAFTAR SINGKATAN.....	xxiii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6
1.3. Tujuan Penelitian	
1.3.1. Tujuan Umum.....	7
1.3.2. Tujuan Khusus.....	7
1.4. Manfaat Penelitian.....	8
1.4.1. Pengembangan Ilmu.....	8
1.4.2. Praktis.....	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	9
2.1. <i>Photodynamic Therapy</i> .....	9
2.2. Interaksi Cahaya dengan Jaringan.....	10
2.3. Interaksi Cahaya dengan Molekul.....	13
2.3.1. Tinjauan Porfirin.....	13
2.3.2. Proses Fotofisika.....	18
2.3.3. Proses Fotokimia.....	22
2.3.4. Proses Fotobiologi.....	24



2.3.5. Dosimetri Dalam PDI.....	27
2.4. <i>Light Emitting Diode</i> (LED).....	28
2.4.1. Efisiensi LED.....	32
2.4.2. Spektrum Emisi.....	33
2.4.3. Pola Radiasi.....	36
2.5. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	<b>42</b>
3.1. Kerangka Konseptual.....	42
3.2. Hipotesis Penelitian.....	46
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>47</b>
4.1. Penelitian Fase I.....	47
4.1.1. Perancangan, Perakitan serta Karakterisasi Performansi Sumber Cahaya LED.....	48
4.1.1.1. Bahan dan Alat Penelitian.....	48
4.1.1.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	49
4.1.1.3. Prosedur Kerja.....	49
4.1.2. Analisis Porfirin Endogen Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
4.1.2.1. Bahan dan Alat Penelitian.....	55
4.1.2.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	55
4.1.2.3. Prosedur Kerja.....	55
4.1.3. Pengukuran Potensi Instrumen Sumber Cahaya LED Biru dan Merah untuk Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Dengan Porfirin Endogen.....	57
4.1.3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	57
4.1.3.2. Unit Eksperimen dan Replikasi.....	58
4.1.3.3. Variabel Penelitian.....	58
4.1.3.4. Bahan dan Alat Penelitian.....	60
4.1.3.5. Tempat dan Waktu Penelitian.....	60
4.1.3.6. Prosedur Kerja.....	60
4.2. Penelitian Fase II.....	63
4.2.1. Optimasi Dosis Energi Penyinaran LED untuk Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen Secara In Vitro .....	63

4.2.1.1. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	63
4.2.1.2. Unit Eksperimen dan Replikasi.....	63
4.2.1.3. Variabel Penelitian.....	64
4.2.1.4. Bahan dan Alat Penelitian.....	65
4.2.1.5. Tempat dan Waktu Penelitian.....	65
4.2.1.6. Prosedur Kerja.....	65
4.2.2. Karakteristik Fisik dan Kimiawi Terhadap Pengaruh Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal....	67
4.2.2.1. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	67
4.2.2.2. Unit Eksperimen dan Replikasi.....	68
4.2.2.3. Variabel Penelitian.....	68
4.2.2.4. Bahan dan Alat Penelitian.....	69
4.2.2.5. Tempat dan Waktu Penelitian.....	70
4.2.2.6. Prosedur Kerja.....	71
4.3. Analisis Statistik.....	78
BAB V. HASIL DAN ANALISIS DATA.....	79
5.1. Penelitian Fase I.....	79
5.1.1. Pengukuran Performansi Instrumen Sumber Cahaya LED.....	79
5.1.2. Analisis Porfirin Endogen Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	84
5.1.3. Pengukuran Potensi Penyinaran LED Biru dan Merah untuk Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen .....	84
5.2. Penelitian Fase II.....	86
5.2.1. Optimasi Dosis Energi Penyinaran LED Biru untuk Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureu</i> dengan Porfirin Endogen.....	86
5.2.2. Pengaruh Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal Terhadap Karakteristik Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen.....	89
5.2.2.1. Analisis profil pita protein Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal.....	91

5.2.2.2. Analisis Profil Asam Lemak Jenuh Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal.....	91
5.2.2.3. Analisis Fisik Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal...	93
BAB VI. PEMBAHASAN.....	95
6.1. Penelitian Fase I.....	95
6.1.1. Pengukuran Performansi Instrumen Sumber Cahaya LED.....	95
6.1.2. Pembahasan Porfirin Endogen Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	97
6.1.3. Pembahasan Potensi Instrumen Sumber cahaya LED Biru dan Merah untuk Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porphyrin Endogen .....	99
6.2. Penelitian Fase II.....	100
6.2.1. Pembahasan Optimasi Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin EDosis Energi Penyinaran LED Biru 430 nm.....	100
6.2.2. Pengaruh Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal Terhadap Karakteristik Fisik dan Kimiawi Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen.....	107
6.2.2.1. Pembahasan profil pita protein Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal.....	107
6.2.2.2. Pembahasan Profil Asam Lemak Jenuh Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal.....	109
6.2.2.3. Pembahasan Profil Fisik Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal.....	110
BAB VI. PENUTUP.....	113
6.1. Kesimpulan.....	113
6.2. Saran.....	114
DAFTAR PUSTAKA.....	115
LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

<b>TABEL</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1. Skala waktu proses eksitasi molekul porfirin .....	21
Tabel 2.2. Kecepatan relatif oksidasi oksigen triplet dan oksigen singlet dengan asam oleat, linoleat dan linolenat.....	26
Tabel 5.1. Distribusi rapat daya LED biru 430 nm daya PWM 25%, 50%, 75% dan 100% pada plat holder.....	80
Tabel 5.2. Hasil uji t dua sampel bebas untuk mengetahui perbedaan pengaruh putaran terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri.....	82
Tabel 5.3. Hasil pengukuran standar porfirin, atandar coproporfirin III dan porfirin endogen bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan HPLC..	84
Tabel 5.4. Hasil uji t dua sampel bebas untuk mengetahui perbedaan penyinaran dengan LED biru 430 nm dan merah 629 nm.....	85
Tabel 5.5. Hasil uji anova faktorial untuk untuk mencari dosis optimal Penyinaran dengan LED biru 430 nm.....	87
Tabel 5.6. Pita-pita protein bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada elektrogram SDS-PAGE dengan pengukuran densitometer.....	91
Tabel 5.7. Porsi asam lemak miristat, palmitat dan laurat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada kelompok kontrol dan kelompok penyinaran LED biru dosis energi optimal.....	92
Tabel 5.8. Hasil uji <i>Hotteling's trace</i> pada proporsi asam lemak jenuh bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> akibat penyinaran LED biru dosis energi optimal.....	93

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1. Berbagai interaksi cahaya dengan jaringan.....	10
Gambar 2.2. Interaksi antara cahaya dan jaringan target .....	11
Gambar 2.3. Spektrum absorpsi <i>chromophore</i> pada jaringan.....	12
Gambar 2.4. Struktur molekul porfirin .....	14
Gambar 2.5. Mekanisme biosintesis porfirin pada bakteri .....	15
Gambar 2.6. Struktur molekul Coproporfirin III, protoporfirin IX .....	15
Gambar 2.7. Spektrum serap dari porfirin tipe coproporfirin III dan Protoporfirin IX .....	16
Gambar 2.8. Transisi $\pi - \pi^*$ pada porfirin .....	17
Gambar 2.9. Spektrum absorpsi porfirin dengan skema yang menunjukkan orbital heme (model Gouterman) dan transisi yang menyebabkan terbentuknya spektrum tersebut .....	18
Gambar 2.10. Diagram Jablonski untuk jalur fotofisika .....	20
Gambar 2.11. Jalur umum fotokimia.....	22
Gambar 2.12 Diagram skematik lintasan aktivasi dan deaktivasi pada reaksi fotokimia tipe II .....	23
Gambar 2.13.a Sistein dan metionin dioksida menjadi sulfosida.....	25
Gambar 2.13.b Tirosin melalui kopling oksidasi phenol.....	25
Gambar 2.14. Peroksidasi lipid yang dimediasi oleh radikal.....	27
Gambar 2.15. Peroksidasi lipid yang dimediasi oleh oksigen singlet.....	27
Gambar 2.16a. Bagian bagian LED .....	29
Gambar 2.16b. Chip Semikonduktor.....	29
Gambar 2.17. Semikonduktor pada LED .....	31
Gambar 2.18. Diagram lintasan elektron yang melewati rangkaian <i>p-n</i> <i>junction</i> .....	32
Gambar 2.19. Hubungan dispersi parabolik elektron dan hole .....	34
Gambar 2.20. Spektrum emisi sebuah LED .....	35
Gambar 2.21. Model geometri untuk mendapatkan pola emisi lambertian .	36

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 2.22. LED dengan permukaan a) planar, b) hemispheric dan c) parabolik .....	38
Gambar 2.23. Gambar dan taksonomi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
Gambar 2.24. Struktur dinding sel bakteri Gram positif .....	40
Gambar 3.1. Skema kerangka konseptual penelitian.....	45
Gambar 4.1. Skema kerangka operasional tahap I.....	48
Gambar 4.2. Desain instrumen LED .....	50
Gambar 4.3. Diagram alur kerja instrumen LED.....	52
Gambar 4.4. Prosedur pengukuran porfirin endogen bakteri dan efek fisis serta kimiawi fotoinaktivasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan penyinaran LED.....	56
Gambar 4.4. Prosedur kerja penelitian uji potensi penyinaran LED biru dan merah untuk fotoinaktivasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan porfirin endogen secara in vitro.....	61
Gambar 4.5. Prosedur penentuan dosis optimal fotoinaktivasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan penyinaran LED .....	66
Gambar 5.1. (a) Rangkaian instrumen LED, (b) holder tempat sampel, (c) rangkaian elektronika instrumen LED.....	79
Gambar 5.2. (a) rangkaian LED, (b) urutan pembagian sel-sel pada plat rangkaian LED .....	80
Gambar 5.3. Distribusi intensitas pada plat holder jarak 2 cm dengan PWM (a) 25%, (b) 50%, (c) 75% dan (d) 100%.....	81
Gambar 5.4. Grafik regresi durasi waktu penyinaran instrumen LED dengan kalibrator .....	83
Gambar 5.5. Grafik regresi temperatur penyinaran instrumen LED dengan kalibrator.....	83

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 5.6. Diagram persentase penurunan jumlah koloni bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang tumbuh pada penyinaran LED biru 430 nm.....	89
Gambar 5.7. Profil pita protein bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada kelompok kontrol dan penyinaran LED biru dosis energi optimal.....	91
Gambar 5.8. Hasil pemotretan SEM sel bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada kelompok kontrol dan perlakuan penyinaran LED biru dosis energi optimal.....	94
Gambar 6.1. Karakteristik spektrum absorpsi dan fluoresensi porfirin tipe fotosensitiser.....	98
Gambar 6.2. Mekanisme fotofisika.....	99
Gambar 6.3. Reaksi fotokimia selama PDI.....	104
Gambar 6.4. Molekuler orbital dari oksigen triplet .....	105
Gambar 6.5. Molekuler orbital dari oksigen singlet.....	106
Gambar 6.6. Diagram level energi reaksi fotokimia tipe II .....	107
Gambar 6.7. Dinding bakteri Gram positif dan negatif .....	111

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1.1. Pengukuran Spektrum Panjang Gelombang LED Biru.....	123
Lampiran 1.2 Pengukuran Spektrum Panjang Gelombang LED Merah .....	124
Lampiran 1.3. Pengukuran Daya Penyinaran LED Biru.....	125
Lampiran 1.4. Kalibrasi Durasi Waktu Penyinaran .....	129
Lampiran 1.5. Kalibrasi Temperatur Penyinaran .....	130
Lampiran 1.6. Spesifikasi Silicon Detector.....	131
Lampiran 2.1. Sertifikat ATCC Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	133
Lampiran 2.2. Hasil Pewarnaan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	135
Lampiran 2.3. Kurva Standar Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	136
Lampiran 2.4. Komposisi Media Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	137
Lampiran 3.1. Data Jumlah Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Dengan dan Tanpa Putaran Holder Sampel.....	138
Lampiran 3.2. Analisis Statistik Jumlah Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Dengan dan Tanpa Putaran Holder Sampel.....	139
Lampiran 3.3. Data Jumlah Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Pada Penyinaran LED Biru dan Merah.....	140
Lampiran 3.4. Analisis Statistik Uji Potensi Penyinaran LED Biru dan Merah Untuk Fotoinaktivasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	141
Lampiran 3.5. Data Jumlah Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Pada Penyinaran LED Biru .....	142
Lampiran 3.6. Analisis Statistik Optimasi Dosis Energi Penyinaran LED Biru.....	144
Lampiran 4.1. Hasil Rekaman Data HPLC Porfirin Kit.....	157
Lampiran 4.2. Hasil Rekaman Data HPLC Coproporfirin III .....	158
Lampiran 4.3. Hasil Rekaman Data HPLC Porfirin Bakteri <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> .....	159



<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 4.4. Hasil Rekaman Data HPLC Pelarut Coproporfirin III.....	160
Lampiran 4.5. Hasil Rekaman Data HPLC Pelarut Porfirin kit .....	161
Lampiran 4.6. Spesifikasi Porfirin Kit.....	162
Lampiran 4.7. Spesifikasi Standar Coproporfirin III.....	163
Lampiran 5.1. Kurva Baku Untuk Penentuan Berat Molekul Protein.....	166
Lampiran 5.2. Hasil Pengukuran Densitometer Pada Elektrogram SDS-PAGE.....	168
Lampiran 6.1. Data Proporsi Asam Lemak Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan GC-FID.....	171
Lampiran 6.2. Analisis Statistik Uji Asam Lemak Jenuh Bakteri <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> .....	172
Lampiran 6.3. Hasil rekaman GC-FID Asam Lemak Bakteri <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> .....	177

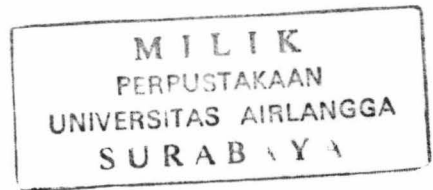
**DAFTAR SINGKATAN**

CBB	: <i>Coomassi Brilliant Blue</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CPD	: <i>Critical Point Drying</i>
FAME-ULP	: <i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
GC	: <i>Gas Chromatography</i>
HOMO	: <i>Highest Occupied Molecule Orbital</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC	: <i>Internal Conversion</i>
ISC	: <i>Intersystem Crossing</i>
LASER	: <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	: <i>Light Emitting Diode</i>
LUMO	: <i>Lowest Unoccupied Molecule Orbital</i>
Mr	: <i>Mobilitas rate</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDI	: <i>Photodynamic Inactivation</i>
PDT	: <i>Photodynamic Therapy</i>
PWM	: <i>Power Width Modulation</i>
PS	: <i>Photosensitizer</i>
ROS	: <i>Radical Oxygen Singlet</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel</i>
SEM	: <i>Scanning Microscope Electron</i>
SPSS	: <i>Statistical Package For Social Science</i>
TPC	: <i>Total Plate Count</i>
VR	: <i>vibrational relaxation</i>

# BAB I PENDAHULUAN

## BAB I

### PENDAHULUAN



#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Ilmu kedokteran modern mulai bangkit pada abad ke-19 yang ditandai dengan kemajuan-kemajuan besar pada bidang ilmu biologi, antara lain penemuan Pasteur tentang peran bakteri dalam peristiwa berjangkitnya penyakit. Bernard memusatkan perhatian pada faktor-faktor lingkungan, dan menekankan pandangan bahwa penyakit merupakan akibat hilangnya keseimbangan dalam tubuh dimana secara umum melibatkan secara bersama-sama berbagai faktor (Capra, 2007).

Pasteur dalam Capra (2007) menekankan bahwa setiap manusia berfungsi sebagai inang bagi sejumlah bakteri dan bakteri hanya menyebabkan kerugian pada saat metabolisme tubuh abnormal. Sebagai contoh adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang hidup secara komensal pada kulit, saluran hidung atau tenggorokan manusia. Pada kondisi abnormal, bakteri ini dapat menyebabkan sejumlah penyakit dari penyakit kulit ringan seperti infeksi kulit, *acne vulgaris*, *cellulitis folliculitis* sampai penyakit berat seperti *pneumonia*, *meningitis*, *osteomyelitis endocarditis*, *toxic shock syndrome*, dan *septicemia* (Jawetz, 1996). Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat juga disebabkan oleh kontaminasi langsung pada luka, misalnya pada infeksi luka pasca bedah atau infeksi setelah trauma (Jawetz, 1996). Pada *acne*, enzim lipase *Staphylococcus aureus* melepaskan asam-asam lemak dari lipid dan menyebabkan iritasi jaringan

dan peradangan (Webster, 2002). Umumnya, dermatolog menggunakan terapi sistemik berupa pemberian antibiotik seperti *methicillin* (Juanda, 2005) untuk mengurangi jumlah populasi bakteri penyebab infeksi, sehingga mekanisme melawan peradangan dapat terbentuk dan iritasi kulit dapat dikoreksi (Strauss, 1999). Namun, metode ini seringkali menyebabkan masalah, karena pemberian antibiotik dalam jangka waktu lama menyebabkan bakteri menjadi resisten (James, 2007), sehingga diperlukan metode alternatif yang bersifat efektif dan selektif membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*.

Secara alamiah beberapa bakteri mengandung senyawa porfirin sebagai molekul fotosensitizer yang bersifat peka terhadap cahaya. Hasil penelitian Papageorgiou et al (2000) menunjukkan bahwa penyinaran cahaya yang memiliki spektrum panjang gelombang yang sesuai dengan spektrum serap porfirin fotosensitizer dengan dosis energi penyinaran yang tepat dapat menyebabkan fotoinaktivasi sel bakteri. Mekanisme fotoinaktivasi melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh porfirin bakteri yang selanjutnya mengaktifkan terjadinya reaksi kimia lanjutan menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif (Grossweiner, 2005). Fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kuantitas dari porfirin yang berperan sebagai molekul penyerap cahaya (Nitzan et al., 2004) dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum serap fotosensitizer (Papageorgiou, 2000).

Fotoinaktivasi adalah penghambatan aktivitas metabolisme sel karena kerusakan membran sitoplasmik akibat peroksidasi oleh oksigen reaktif pada lipid dan protein mengakibatkan lisis sel atau inaktivasi sistem transport membran dan sistem enzim transport membran pada sel bakteri tersebut (Hamblin & Hasan,

2003). Hasil penelitian ini diperkuat oleh Nitzan *et al.* (2001) yang melaporkan adanya gangguan sintesis dinding sel pada fotoinaktivasi bakteri serta munculnya struktur multilamelar di dekat septum pemisah sel seiring dengan hilangnya ion kalium dari sel bakteri Gram negatif dan Maclean *et al.* (2008) yang melaporkan peran oksigen pada fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Setiap bakteri mengakumulasi jenis porfirin yang spesifik (Ramberg & Johnsson., 2004). Sintesis porfirin bakteri terjadi pada sitoplasma dengan prekursor alami asam  $\delta$ -aminolevulinat (dALA) (Grossweiner, 2005) yang menghasilkan berbagai tipe porfirin yaitu, coproporfirin III, uroporfirin III dan protoporfirin IX (Cornelius *et al.*, 1967). Nitzan *et al.* (2004) melaporkan bahwa strain bakteri Gram positif Staphylococci menghasilkan jenis coproporfirin III (68 – 75%). Grinholc *et al.* (2007) melaporkan peran konsentrasi porfirin pada fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* resisten *methicillin* (40 MRSA) dan sensitif *methicillin* (40 MSSA) dengan penambahan eksogen fotosensitizer ALA dan protoporfirin IX dengan penyinaran lampu biostimul 624 nm dosis 0,2 J/cm<sup>2</sup> tiap menit. Lipovsky *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi pada strain 101 (*sensitif methicilin*) dan strain 500 (resisten *methicillin*) dengan lampu halogen 400-800 nm dosis energi 18-180 J/cm<sup>2</sup> dengan intensitas 300 mW/cm<sup>2</sup> dan waktu penyinaran 1, 5 dan 10 menit.

Berbagai penelitian dalam bidang biofisika tentang keberhasilan fotoinaktivasi pada mikroba secara *in vitro* juga dilakukan oleh Kjeldstad *et al.* (1986), Ramstad *et al.* (1997) dan Ashkenanzi *et al.* (2003) yang meneliti fotoinaktivasi pada bakteri *Propionibacterium acnes*. Nitzan *et al.* (2004) meneliti fotoinaktivasi dengan lampu halogen biru (407-420) nm (intensitas 20 mW/cm<sup>2</sup>),

dosis energi  $100 \text{ J/cm}^2$  pada berbagai strain bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan eksogen ALA. Guffey *et al.* (2006) meneliti fotoinaktivasi dengan sinar biru 405 nm dan 470 nm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro.

Beberapa literatur di atas menunjukkan bahwa sinar tampak, terutama sinar biru pada spektrum 400-470 nm dapat menyebabkan fotoinaktivasi pada beberapa bakteri melalui fotostimulasi pada porfirin endogen intraseluler. Kemampuan porfirin dalam menyerap cahaya adalah bersifat spesifik. Hasil penelitian Papageorgiou *et al.* (2000) menunjukkan bahwa spektrum serap porfirin tipe fotosensitiser berada pada panjang gelombang 400 nm sampai 650 nm. Secara teoritis porfirin memiliki 2 intensitas spesifik, yaitu *Soret Band* yang berada pada panjang gelombang 401, 6983 nm (jangkauan UV) dan *Q Band* yang berada pada panjang gelombang 271,84 nm, 631,2591nm, 719,8765 nm, dan 929,9591 nm (Makarska & Radzki, 2002).

Salah satu sumber cahaya yang berada pada rentang spektrum serap porfirin fotosensitiser antara lain adalah *Light-emitting diode* (LED). LED merupakan piranti semikonduktor yang efektif mengkonversi energi listrik menjadi cahaya dengan lebar spektral 10 nm yang dapat dimodulasi pada kecepatan tinggi (Ross, 1979). LED menghasilkan cahaya dengan berbagai warna. Warna cahaya yang diemisikan oleh LED bergantung pada komposisi dan kondisi dari material semikonduktor yang digunakan, baik infra merah, cahaya tampak maupun ultraviolet (Schubert, 2006). LED memiliki kelebihan antara lain menghasilkan sedikit panas sehingga tidak menimbulkan kerusakan pada lapisan dermis (Karu, 2003), dengan harga bahan yang relatif murah dan lebih sederhana dalam perakitan. Kelebihan dari LED ini selanjutnya dimanfaatkan untuk

fotoinaktivasi pada mikroba, karena temperatur merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan, multiplikasi dan kelangsungan hidup mikroorganisme (Irianto, 2007).

Berbagai penelitian dalam bidang biofisika tentang fotoinaktivasi mikroba secara *in vitro* menggunakan sumber cahaya LED dilakukan oleh:

1. Johansen *et al.* (2003) melaporkan keberhasilan fotoinaktivasi *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 dengan eksogen fotosensitizer  $\delta$ -ALA pada penyinaran LED biru (430 nm intensitas  $100 \text{ mW/m}^2$  selama 10 menit).
2. Soares *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi *Candida* dengan eksogen *toluidine blue O* dengan penyinaran LED merah (630 nm) dosis energi  $180 \text{ J/cm}^2$ , intensitas  $200 \text{ mW/cm}^2$  dan waktu penyinaran 9 menit.
3. Maclean *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* NCTC 4135 dengan penyinaran LED biru 405 nm dosis  $36 \text{ J/cm}^2$  (intensitas  $10 \text{ mW/cm}^2$ ) selama 60 menit.

Berbagai hasil penelitian fotodinamik yang telah dilakukan menunjukkan bahwa keberhasilan fotoinaktivasi pada bakteri ditentukan oleh kesesuaian panjang gelombang cahaya dengan spektrum serap porfirin bakteri untuk terjadinya eksitasi molekul porfirin. Faktor penentu yang lain adalah dosis energi penyinaran. Dosis energi yang sesuai akan mengaktifkan terjadinya reaksi kimia lanjutan menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Dalam rangka mengembangkan penelitian fotodinamik tentang penentuan dosis energi fotoinaktivasi pada berbagai spektrum sumber cahaya, maka penelitian ini bertujuan untuk mencari dosis energi



penyinaran LED yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen. Penelitian Astuti *et al.* (2009) menunjukkan bahwa LED biru 454 nm dan 430 nm (Astuti *et al.*, 2010) berpotensi fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*, sehingga sumber cahaya ini dapat digunakan untuk fotoinaktivasi bakteri.

## 1.2. Rumusan Masalah

Pada penelitian pendahuluan telah dilakukan perancangan dan perakitan instrumen LED sebagai sumber cahaya untuk aplikasi fotoinaktivasi bakteri. Secara lebih spesifik permasalahan dalam penelitian ini adalah:

### A. Penelitian fase I

1. Bagaimanakah karakterisasi performansi instrumen sumber cahaya LED yang telah dirakit?
2. Apakah jenis porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P?
3. Apakah penyinaran LED biru dan merah berpotensi fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen secara *in vitro*?

### B. Penelitian fase II

1. Berapakah dosis energi optimal penyinaran LED yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen?
2. Bagaimana pengaruh penyinaran LED dosis energi optimal terhadap karakteristik fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara fisis dan kimiawi?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan instrumen sumber cahaya LED yang berpotensi fotoinaktivasi dan menemukan dosis energi optimal fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen secara in vitro serta meneliti pengaruh penyinaran LED terhadap karakteristik fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara fisis dan kimiawi.

#### **1.3.2. Tujuan Khusus**

##### **A. Penelitian fase I**

1. Mengukur performansi instrumen sumber LED yang telah dirakit
2. Mengetahui jenis porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.
3. Mengetahui potensi sumber cahaya LED biru dan merah yang telah dirakit untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen.

##### **B. Penelitian fase II**

1. Mencari dosis energi penyinaran LED optimal yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen secara in vitro.
2. Mengetahui pengaruh penyinaran LED dengan dosis energi optimal terhadap karakteristik fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara fisis dan kimiawi.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Pengembangan ilmu**

Pengembangan penelitian optimasi dosis energi fotoinaktivasi yang bersifat spesifik pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro.

### **1.4.2. Praktis**

Aplikasi metode fotodinamik untuk pengobatan penyakit infeksi pada kulit.

# BAB II TINJAUAN PUSTAKA

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

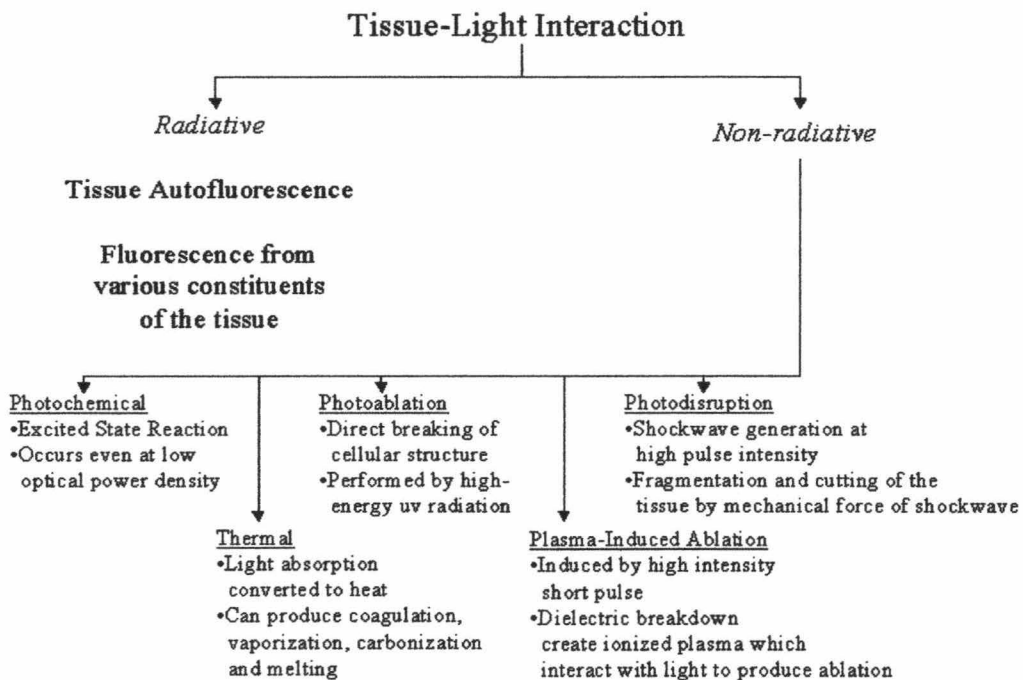
#### 2.1. *Photodynamic Therapy* (PDT)

*Photodynamic Therapy* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menghilangkan suatu sel yang berbahaya atau tidak dikehendaki seperti kanker dan penyakit infeksi (Plaetzer *et al.*, 2009). *Photodynamic Inactivation* (PDI) merupakan bagian dari PDT untuk inaktivasi pada mikroba (Hamblin & Hasan, 2003). Kombinasi cahaya dan fotosensitizer tertentu pada PDI akan menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri (Wardle, 2009), yaitu penghambatan aktivitas metabolisme sel karena kerusakan membran sitoplasmik akibat peroksidasi oleh oksigen reaktif (Hamblin & Hasan, 2003).

Mekanisme fotoinaktivasi melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh molekul yang bersifat fotosensitizer (porfirin) pada bakteri yang selanjutnya mengaktifasi terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif. Fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kuantitas dari porfirin yang berperan sebagai molekul penyerap cahaya (Nitzan *et al.*, 2004) dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum serap fotosensitizer (Papageorgiou *et al.*, 2000). Pada tingkat molekuler akibat penyinaran diawali oleh peristiwa fotofisika berupa penyerapan cahaya yang selanjutnya mengaktifasi molekul fotosensitizer, diikuti reaksi fotokimia yang menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif (Plaetzer *et al.*, 2009). Oksigen reaktif menyebabkan peroksidasi lipid dan protein mengakibatkan lisis sel atau inaktivasi

sistem transport membran dan sistem enzim transport membran pada sel bakteri tersebut (Hamblin & Hasan, 2003).

Pada PDT, cahaya dengan rapat daya dan durasi waktu penyinaran tertentu memegang peran penting pada jenis interaksinya dengan target. Interaksi fotokimia (PDT) terjadi pada rapat daya optik rendah dan reaksi terjadi pada keadaan eksitasi (Prasad, 2005). Berbagai interaksi cahaya dengan target ditunjukkan pada Gambar 2.1.

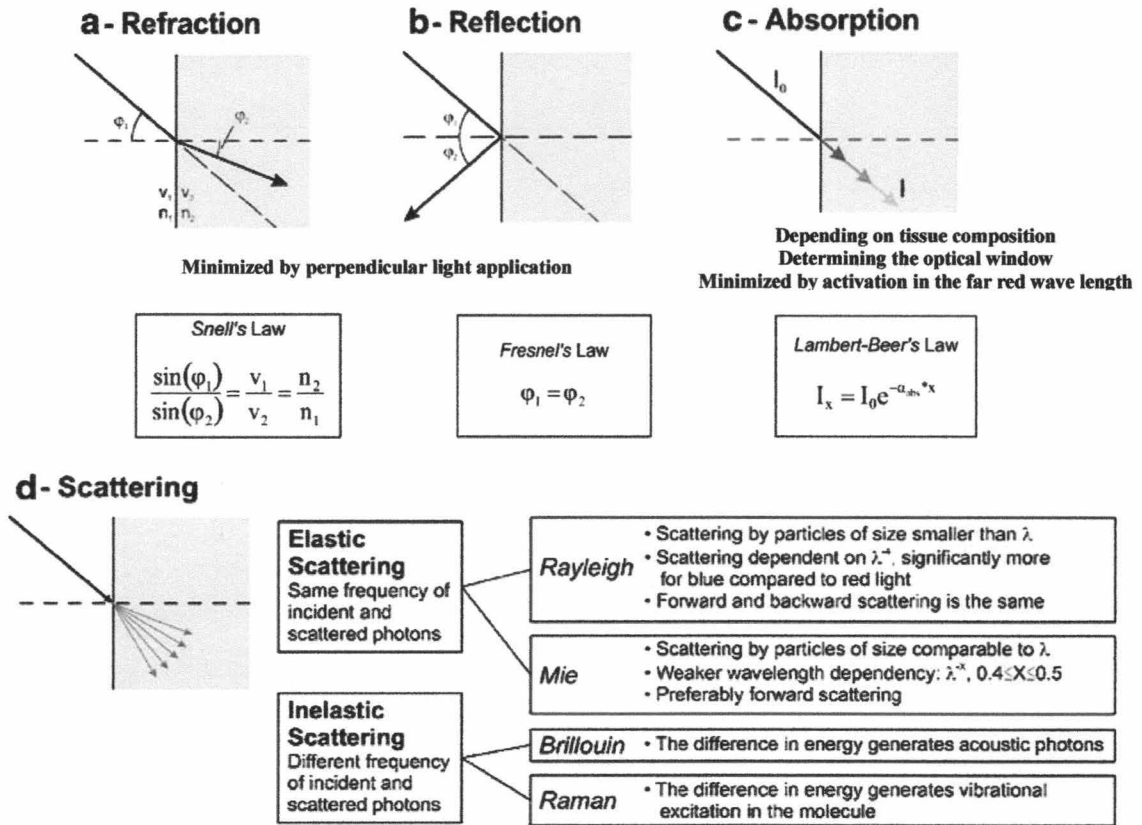


Gambar 2.1. Bagan interaksi cahaya dengan jaringan (Prasad, 2005)

## 2.2. Interaksi Cahaya dengan Jaringan

Reaksi pada tingkat molekuler akibat penyinaran cahaya diawali oleh peristiwa fotofisika yang sangat cepat, kemudian diikuti reaksi fotokimia primer, dilanjutkan dengan proses lambat pada tingkat fisiologis. Interaksi cahaya melalui

suatu medium (Gambar 2.2) melibatkan proses pembiasan (*refraction*), pemantulan (*reflection*), absorpsi (*absorption*) dan hamburan (*scattering*).



Gambar 2.2. Interaksi antara cahaya dan jaringan target (Plaetzer *et al.*, 2009)

Proses pembiasan dan pemantulan cahaya mengikuti hukum Snellius dan hukum Fresnel. Peristiwa tersebut di atas dapat diminimalisasi dengan aplikasi cahaya yang tegak lurus dengan target. Penghamburan cahaya pada jaringan target berpengaruh terhadap intensitas cahaya dan arah penyinaran pada target. Hamburan cahaya dalam jaringan sangat kompleks. Hamburan inelastik (Hamburan Brillouin dan Raman) tidak memegang peran penting dalam kasus ini. Hamburan elastik terutama teori hamburan Rayleigh foton pada arah ke depan berpengaruh pada jaringan target (Niemz, 2007). Absorpsi foton cahaya

merupakan interaksi yang paling dominan dalam proses ini. Hukum Lambert-Beer tentang absorpsi cahaya adalah (Wardle, 2009):

$$I_x / I_0 = 10^{-\epsilon cl}; \log \left( \frac{I_x}{I_0} \right) = -\epsilon cl; \log \left( \frac{I_0}{I_x} \right) = \epsilon cl \quad (2.1)$$

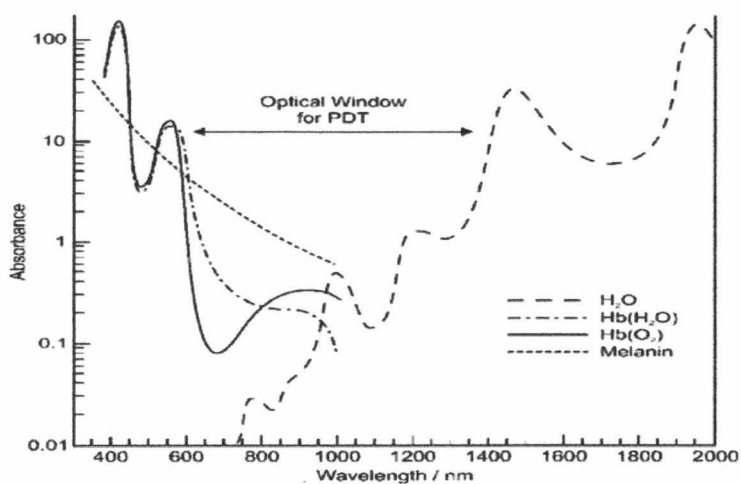
$$A = \epsilon cl$$

Dengan  $A$  adalah absorbansi,  $I_x$  adalah intensitas pada kedalaman  $x$ ,  $I_0$  intensitas mula-mula,  $c$  adalah konsentrasi,  $l$  adalah panjang dan  $\epsilon$  adalah koefisien absorpsi molar. Besarnya intensitas cahaya yang diserap oleh jaringan target dapat dihitung berdasarkan persamaan (Plaetzer, 2009):

$$I_x = I_0 e^{-(\alpha_{abs} + \alpha_{sca})x} \quad (2.2)$$

Dengan,  $\alpha_{abs}$  dan  $\alpha_{sca}$  menunjukkan koefisien absorpsi dan hamburan.

*Chromophore* (porfirin) yang paling penting dalam jaringan adalah air, *oxyhemoglobin* ( $HbO_2$ ), melanin dan *cytochromes* (Plaetzer, 2009). Spektrum absorpsi *chromophore* berada pada range spektrum 600-1400 nm yang disebut jendela optik (*optical window*) untuk PDT (Gambar 2.3), dengan absorpsi maksimum di antara 650 nm – 850 nm (Plaetzer, 2009).



Gambar 2.3. Spektrum absorpsi *chromophore* pada jaringan (Plaetzer, 2009)



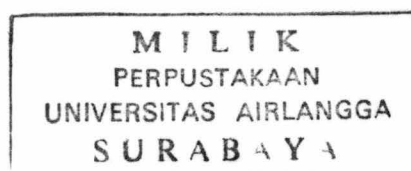
## 2.3. Interaksi Cahaya dengan Molekul

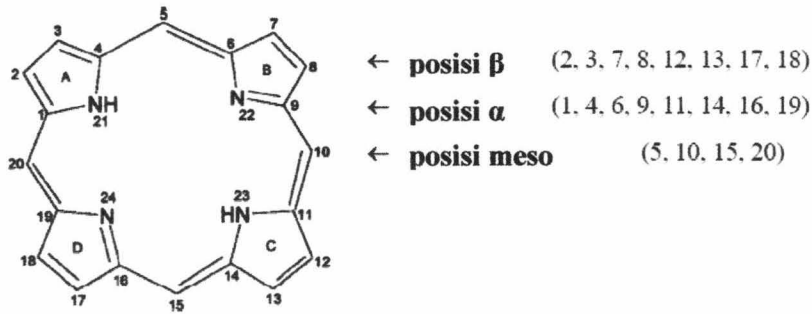
Molekul pengabsorpsi cahaya (fotosensitiser) yang berperan dalam proses PDI pada bakteri adalah porfirin (Wainwright, 2009). Pembahasan selanjutnya mengenai porfirin bakteri, sintesis dan spektrum serapnya serta mekanisme interaksinya dengan cahaya.

### 2.3.1. Tinjauan Porfirin

Nama porfirin berasal dari bahasa Yunani *porphyra* yang berarti ungu. Porfirin merupakan senyawa aromatik makrosiklik spesifik (senyawa dengan gabungan cincin aromatik), yang terdiri atas empat cincin *pyrrole* yang terikat pada jembatan metan (=CH-) dan membentuk *coupled system* dari ikatan rangkap (termasuk di dalamnya  $18\pi$  elektron yang terlokalisasi ( $4n + 2$ , dengan  $n = 4$ )) (Makarska & Radzki, 2002). Cincin *pyrrole* membentuk bidang aromatik tertutup, yang berperan sebagai inti dari senyawa porfirin. Cincin datar porfirin dapat mengalami deformasi bila terjadi metalasi (masuknya ion logam menggantikan atom hidrogen pada kelompok imida *pyrrole* (=NH-).

Penomoran atom pada makrosiklik porfirin, mengikuti aturan Bonnet, yang dikenal sebagai bentuk kanonik dari porfirin. Cara lain dalam melakukan penomoran adalah dengan menentukan substituen dengan huruf  $\alpha$ -,  $\beta$ -, dan meso-porfirin. Karakteristik molekul porfirin antara lain adalah sifat spektroskopi yang khas, luminansi (fluoresensi dan fosforesensi), sifat magnetik (para dan diamagnetik, stabilitas termal, fotokonduksi, fotoemisi, dan aktivitas permukaan. Gambar 2.4. menunjukkan struktur molekul porfirin.





Gambar 2.4. Struktur molekul porfirin (Makarska & Radzki, 2002)

Beberapa porfirin dan metaloporfirin pada kondisi atmosferik (mendapat pengaruh cahaya, udara dan kelembaban) bersifat tidak stabil. Kontak dengan cahaya akan menyebabkan fotooksidasi dari porfirin yang apabila diikuti dengan proses fisi dari cincin makrosiklik, senyawa kompleksnya menjadi mudah terdemetalasi. Bagian dari cincin porfirin yang terlibat dalam reaksi kimia adalah dua pusat acidic N-H, dua atom =N- dengan pasangan elektron bebas, ikatan etilen tak jenuh -CH=CH- dan elektron  $\pi$  makrosiklik  $C_{12}H_4$  (Makarska & Radzki, 2002).

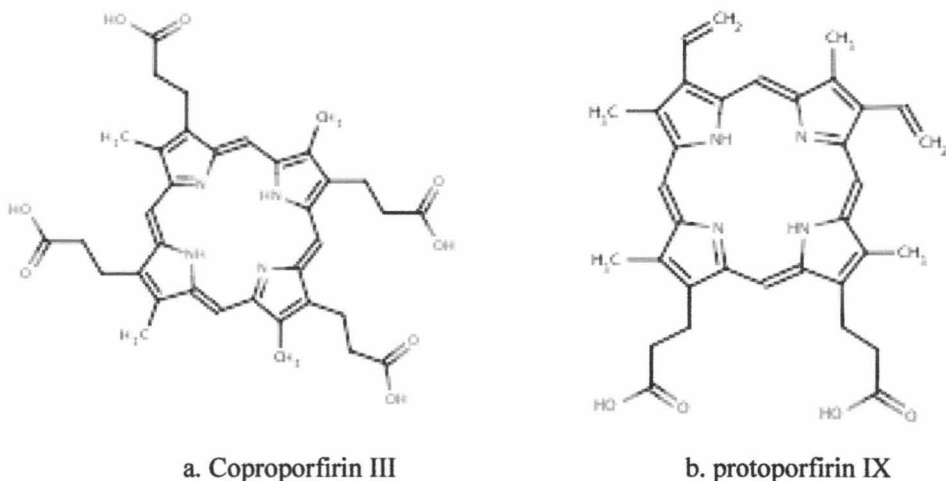
Gambar 2.5 menunjukkan ringkasan biosintesis dari porfirin pada bakteri (Hamblin & Hasan, 2003). *5-aminolevulinic acid* (5-ALA) adalah prekursor biosintetik dari semua porfirin alam (Grossweiner, 2005). Sintesis porfirin pada sel bakteri dimulai dengan pembentukan asam 5-ALA secara endogen dengan mereaksikan asam amino *glycine* dan *succinyl-CoA* dari lingkaran asam sitrat (Bruce *et al.*, 2009). Dua molekul ALA bergabung menjadi porfobilinogen (PBG) yang mengandung cincin *pyrrole*. Empat PBG melalui deamilasi bergabung menjadi *hydroxymethyl bilane* (HMB), yang selanjutnya dihidrolisis menjadi *circular tetrapyrrole* uroporfirinogen III. Coproporfirin III dengan rumus kimia  $C_{36}H_{38}N_4O_8$  adalah produk akhir *tetrapyrrole* dari oksidasi spontan jembatan

metilena coproporfirinogen. Molekul ini mengalami modifikasi lebih lanjut sehingga dihasilkan protoporfirin IX dengan rumus kimia  $C_{34}H_{34}N_4O_4$  (HMD, 2008). Hasil akhir protoporfirin IX dikombinasi dengan besi membentuk heme.



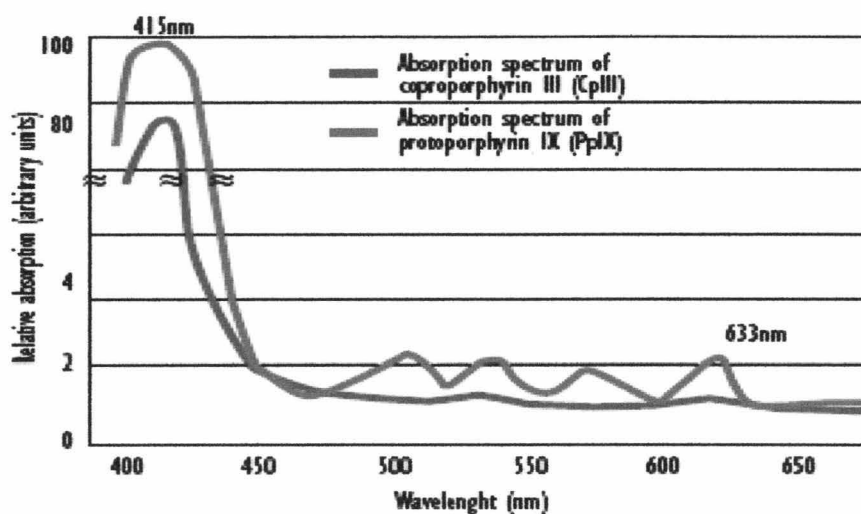
Gambar 2.5. Mekanisme biosintesis porfirin pada bakteri (Hamblin & Hasan, 2003)

Struktur kimia Coproporfirin III dan protoporfirin IX ditunjukkan Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Struktur molekul Coproporfirin III dan protoporfirin IX (HMD, 2008)

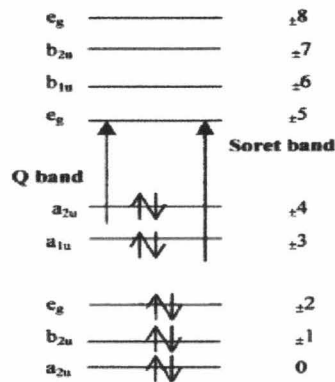
Porfirin fotosensitiser bersifat peka terhadap cahaya. Kepekaan terhadap cahaya ini terutama berkaitan dengan panjang gelombang cahaya yang dipaparkan. Kebanyakan porfirin memiliki serapan pada daerah sinar tampak (400 – 700 nm). Gambar 2.7 menunjukkan spektrum serap dari porfirin tipe coproporfirin III dan coproporfirin IX.



Gambar 2.7. Spektrum serap dari porfirin tipe coproporfirin III dan coproporfirin IX (Papageorgiou, 2000)

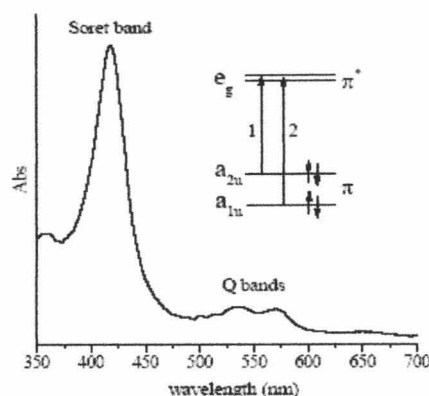
Spektrum porfirin terdiri atas 2 pita terpisah, muncul pada daerah ultraviolet dekat dan daerah cahaya tampak, yang menyebabkan porfirin kaya warna. Spektrum porfirin terbentuk dari transisi  $\pi - \pi^*$  (teori Gouterman) (Makarska & Radzki, 2002), yang menunjukkan bahwa cincin porfirin merupakan sistem terkopel yang mengikuti hukum aromatik Hückel  $4n + 2$ , sehingga cincin porfirin dikatakan sebagai senyawa 16 polyene siklik pembawa  $18\pi$  elektron. Pada kasus ini, keadaan dasar makrosiklik berhubungan dengan orbital lengkap dengan  $\mu = 0, \pm 1, \dots, \pm 4$ , sedangkan orbital eksitasi terendah dihubungkan dengan transisi dari  $\mu = \pm 4$  menuju  $\mu = \pm 5$ .

Pada model polyene yang diganggu oleh atom nitrogen dari cincin porfirin menghasilkan dua orbital lengkap  $a_{1u}$  dan  $a_{2u}$ , yang dikenal sebagai *Highest Occupied Molecule Orbital* (HOMO), dan dua orbital tak lengkap  $e_g$ , yang dikenal sebagai *Lowest Unoccupied Molecule Orbital* (LUMO) (Wainwright, 2009). Spektrum absorpsi porfirin merupakan hasil transisi elektron  $a_{1u} \rightarrow e_g$  (terbentuk pita Soret) dan  $a_{2u} \rightarrow e_g$  (terbentuk pita Q) (Gambar 2.8).



Gambar 2.8. Transisi  $\pi - \pi^*$  pada porfirin (Makarska & Radzki, 2002)

Porphyrin memiliki 2 intensitas spesifik, yaitu pita soret (*Soret Band*) sebagai konsekuensi transisi yang diperbolehkan yang berada pada panjang gelombang 401,6983 nm dan *Q Band* sebagai konsekuensi transisi terlarang yang berada pada panjang gelombang 271,84 nm, 631,2591 nm, 719,8765 nm, dan 929,9591 nm (Makarska & Radzki, 2002). Gambar 2.9. menunjukkan spektrum absorpsi porfirin dengan skema yang menunjukkan orbital heme (model Gouterman) dan transisi yang menyebabkan terbentuknya spektrum tersebut (Bonaficio, 2006).



Gambar 2.9. Spektrum absorpsi porfirin dengan skema yang menunjukkan orbital heme (model Gouterman) dan transisi yang menyebabkan terbentuknya spektrum tersebut (Bonaficio, 2006)

### 2.3.2. Proses Fotofisika

Pada suhu ruang, kebanyakan molekul berada pada keadaan dasar, tingkat elektronik diasosiasikan dengan energi paling rendah dan sebuah konfigurasi dimana semua elektron berpasangan secara orbital. Saat penyinaran cahaya, peristiwa yang berlangsung pertama kali adalah absorpsi satu foton cahaya oleh molekul porfirin. Peristiwa absorpsi primer berlangsung sangat cepat (sekitar  $10^{-15}$  s) diikuti dengan eksitasi molekul ke tingkat energi yang lebih tinggi (Lanzani, 2006). Pada transisi elektronik satu dari elektron dieksitasikan dari keadaan dasar selanjutnya menempati orbital dengan energi yang lebih tinggi, sehingga elektron memiliki perbedaan energi di antara 2 keadaan elektronik sebesar:

$$\Delta E_n = E_n - E_0 = N_A h \nu = \frac{N_A h c}{\lambda} \quad (2.3)$$

Dengan  $h$  = konstanta Planck =  $6,626 \cdot 10^{-34}$  J.s

$\nu$  = frekuensi,  $c$  = kecepatan cahaya dalam ruang hampa =  $3 \cdot 10^8$  m.s<sup>-1</sup>

$N_A$  = bil. Avogadro =  $6,023 \cdot 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>

Elektron tiap orbital dikarakterisasikan oleh spin yang direpresentasikan oleh satu dari dua nilai diskrit  $s=+1/2$  dan  $s=-1/2$ . Total bilangan kuantum spin dari orbital didefinisikan sebagai jumlah dari spin elektronik  $S$ . Masing-masing orbital dikarakterisasikan oleh bilangan kuantum magnetik (Grossweiner, 2005):

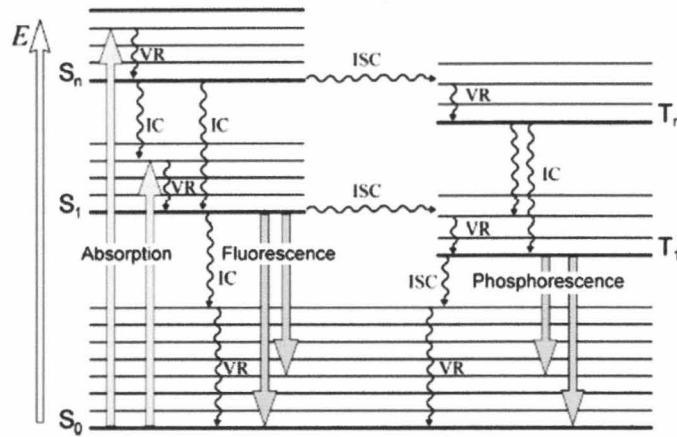
$$M = 2.S + 1 \text{ dengan } S = \sum_i |s_i| \quad (2.4)$$

Keadaan elektronik kebanyakan molekul organik berada dalam keadaan singlet ( $S, M=1$ ), dimana semua elektron dalam molekul adalah spin berpasangan, dan triplet ( $T, M=3$ ) dimana satu set dari spin elektron tidak berpasangan.

Absorpsi radiasi oleh molekul akan mengeksitasi molekul tersebut dari tingkat vibrasional dalam keadaan dasar singlet elektronik  $S_0$  ke salah satu tingkat vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik. Eksitasi molekul menuju keadaan energi yang lebih tinggi ini cenderung kembali ke keadaan dasar, baik melalui reaksi kimia atau menjadi panas yang dilepas ke lingkungan. Pada molekul poliatomik (seperti porfirin) terdapat beberapa jalur bagi molekul tereksitasi untuk mengeluarkan energi eksitasi. Jalur yang berbeda ini dikelompokkan pada proses fotofisika molekul tereksitasi elektronik, digambarkan dalam diagram *Jablonski* (Gambar 2.10). Seluruh proses fotofisika ini harus muncul pada periode waktu yang kurang dari *radiative lifetime* alami molekul (Grossweiner, 2005).

Keadaan dasar molekul ( $S_0$ ) berada pada energi vibrasi terendah. Keadaan energi yang lebih tinggi  $S_1, S_2, S_3, \dots$  muncul akibat absorpsi cahaya. Panjang panah vertikal menunjukkan kemungkinan transisi energi foton. Keadaan vibrasi yang tinggi menunjukkan keadaan molekul yang tidak setara dengan keadaan sekitarnya. Energi vibrasi yang berlebih ini ditransfer pada medium dalam bentuk panas melalui relaksasi vibrasi (VR) yang ditunjukkan melalui panah berombak.

Keadaan vibrasi terendah dari  $S_1$  berada pada keadaan setara termal selama  $10^{-8}$  s. Emisi cahaya dari keadaan  $S_1$  (yang ditunjukkan oleh panah menuju bawah) menuju  $S_0$  menunjukkan proses fluoresensi.



Gambar 2.10. Diagram Jablonski untuk jalur fotofisika.  $S_1 \dots S_n$  adalah keadaan singlet;  $T_1 \dots T_n$  adalah keadaan triplet; Tingkat vibrasi ditunjukkan oleh garis horizontal tipis; Keadaan energi elektronik ditunjukkan oleh garis horizontal tebal; transisi non radiatif oleh panah bergelombang, yang terdiri atas *vibrational relaxation* (VR), *internal conversion* (IC), dan *intersystem crossing* (ISC) (Juzenas, 2002)

Spin sebuah elektron yang tereksitasi singlet  $S_n$  dapat terbalik, meninggalkan molekul pada keadaan eksitasi triplet  $T_n$ . Ini disebut *intersystem crossing*. Keadaan eksitasi triplet  $T_n$  memiliki energi elektronik lebih rendah daripada keadaan eksitasi singlet  $S_n$ . Probabilitas transisi ini akan meningkat jika tingkat vibrasi dari dua keadaan ini overlap, misalnya tingkat vibrasional singlet terendah mengalami overlap dengan satu dari tingkat vibrasional yang lebih tinggi dari keadaan triplet. Sebuah molekul pada tingkat vibrasional tinggi dari keadaan eksitasi triplet dapat kehilangan energi saat bertumbukan dengan molekul lain, meninggalkannya pada tingkat vibrasional paling rendah dari keadaan triplet, dan selanjutnya molekul dapat mengalami *intersystem crossing* kedua pada tingkat



vibrasional yang lebih rendah. Molekul tersebut akhirnya kembali ke tingkat vibrasional paling rendah dari keadaan dasar elektronik  $S_0$  oleh relaksasi vibrasi.

Molekul pada keadaan eksitasi triplet tidak selalu kembali ke keadaan dasar melalui *intersystem crossing*, tetapi dapat kehilangan energi melalui emisi sebuah foton. Emisi dari transisi triplet-singlet disebut fosforesensi. Energi dari foton yang dipancarkan selama fluoresensi atau fosforesensi secara berurutan adalah setara dengan perbedaan energi antara keadaan dasar  $S_0$  dan singlet eksitasi  $S_1$  atau keadaan triplet  $T_1$ . Foton yang dipancarkan memiliki energi yang lebih rendah dari foton yang diserap, sesuai dengan hukum Stokes-Lommel (Grossweiner, 2005):

$$h\nu_{emisi}^{max} < h\nu_{absorpsi}^{max} \quad (2.5)$$

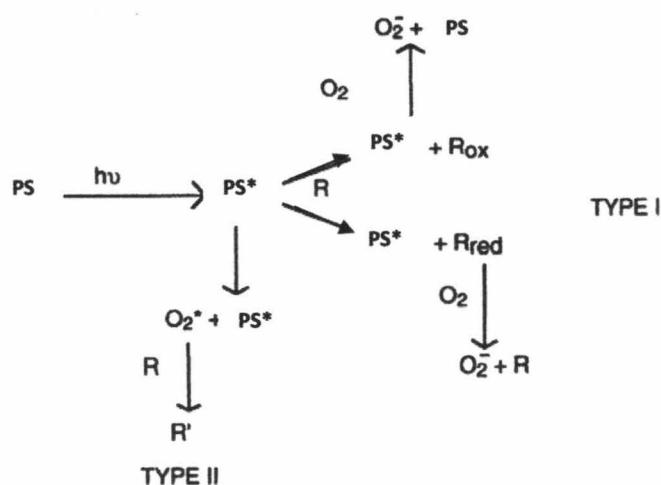
Probabilitas sebuah transisi singlet-triplet lebih rendah dari transisi singlet-singlet. Pada kebanyakan molekul organik keadaan singlet  $S_1$  dan triplet  $T_1$  yang berlanjut untuk inisiasi dari reaksi fotokimia dan fotobiologi. Hal ini ditunjukkan oleh fakta bahwa keadaan elektronik yang lebih tinggi  $S_n$  dan  $T_n$  (dimana  $n \geq 2$ ) mengalami konversi internal yang sangat cepat  $S_n \rightarrow S_1$  dan  $T_n \rightarrow T_1$ , dikarenakan transisi  $T_1$  menuju  $S_0$  adalah terlarang, maka keadaan triplet memiliki *lifetime* yang lebih lama, sehingga kebanyakan reaksi fotokimia terjadi pada eksitasi triplet. Skala waktu tahapan eksitasi deeksitasi porfirin ditunjukkan Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Skala waktu proses eksitasi molekul porfirin (Juzenas, 2002)

Proses	Life time ( $\tau$ ) (sekon)	Reaksi
Eksitasi	$\sim 10^{-15} - 10^{-12}$	$h\nu_0 + S_0 \rightarrow S_1, S_2, \dots, S_n$
Konversi internal	$\sim 10^{-13} - 10^{-10}$	$S_n, \dots, S_2 \rightarrow S_1 + \text{panas}$
Konversi internal	$\sim 10^{-10}$	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{panas}$
Intersystem crossing	$\sim 10^{-7}$	$S_1 \rightarrow T_1 + \text{panas}$
Intersystem crossing	$\sim 10^{-2} - 10^2$	$T_1 \rightarrow S_0 + \text{panas}$
Fluoresensi	$\sim 10^{-11} - 10^{-8}$	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fluoresensi}$
Fosforesensi	$> 10^{-6}$	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fosforesensi}$

### 2.3.3. Proses Fotokimia

Fotokimia merupakan perubahan kimia yang disebabkan oleh cahaya (Coyle, 1991), yaitu radiasi elektromagnetik pada range ultraviolet dan cahaya tampak. Perubahan kimia hanya terjadi jika cahaya diabsorpsi oleh sistem (Wardle, 2009). Perubahan kimia merupakan peristiwa yang muncul pada tingkatan molekuler akibat absorpsi oleh foton, meskipun foton tidak berperan dalam keseluruhan perubahan kimia. Proses fotokimia memiliki kaitan erat dengan proses fotofisika, yang berperan dalam perubahan energi dan struktur elektronik akibat eksitasi molekul setelah peristiwa absorpsi. Mekanisme fotokimia (Gambar 2.11) dibagi menjadi dua (Grossweiner, 2005):

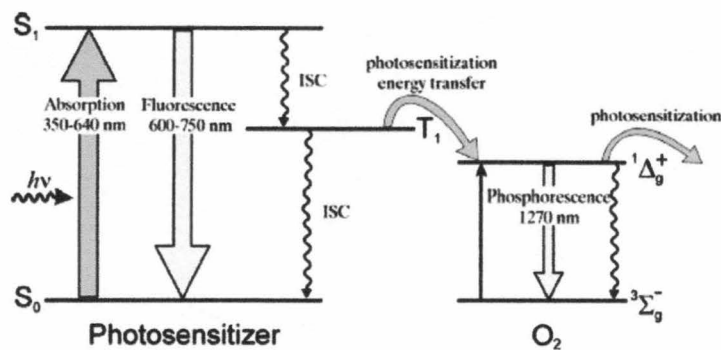
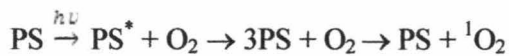


Gambar 2.11. Jalur umum fotokimia. Pada jalur tipe II, fotosensitiser pada keadaan tereksitasi ( $PS^*$ ) mentransfer energi ke molekul oksigen, menjadi oksigen singlet  $O_2(^1\Delta_g)$  yang bereaksi dengan molekul substrat ( $R$ ), menghasilkan produk  $R'$ .  $PS^*$  mungkin pada keadaan singlet ataupun triplet. Pada jalur tipe I,  $PS^*$  mengoksidasi atau mereduksi molekul substrat ( $R$ ). Substrat tereduksi ( $R_{red}$ ) dengan fotosensitiser tereduksi ( $PS^-$ ) dan substrat teroksidasi ( $R_{oks}$ ) dengan fotosensitiser teroksidasi ( $PS^+$ ) dapat berubah menjadi superoksida ( $O_2^-$ ) melalui reaksi dengan molekul oksigen (Grossweiner, 2005)

- Type 1, molekul fotosensitif yang tereksitasi secara optis bereaksi secara langsung dengan molekul biologi, dan mentransfer sebuah proton atau

elektron untuk membentuk anion atau kation radikal. Radikal ini selanjutnya akan bereaksi dengan oksigen menghasilkan jenis oksigen reaktif (ROS). Superoksida anion yang terbentuk akan bereaksi dengan molekul biologi menghasilkan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Pada konsentrasi tinggi hidrogen peroksida bereaksi dengan superoksida anion membentuk hidroksil radikal (reaksi Haber Weiss) yang juga dihasilkan dari ion logam seperti besi dan tembaga melalui reaksi Fenton. Hidroksil radikal dengan mudah berdifusi melalui membran dan merusak sel.

- b. Tipe 2, fotosensitizer triplet dapat mentransfer energinya secara langsung pada molekul oksigen untuk membentuk oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) tereksitasi. Oksigen singlet terjadi dari fotosensitizer yang memiliki energi gap antara keadaan triplet dasar dan eksitasi yang lebih besar daripada energi  $E_\Delta$  yang diperlukan untuk eksitasi oksigen ke keadaan singlet tereksitasi (Gambar 2.12). Molekul oksigen kemudian tereksitasi dari keadaan triplet dasar ke keadaan singlet tereksitasi, menurut reaksi berikut:



Gambar 2.12. Diagram skematik lintasan aktivasi dan deaktivasi pada reaksi fotokimia tipe II (Juzenas, 2002)

Oksigen singlet dan radikal hidroksil yang dihasilkan pada reaksi fotokimia memiliki reaktivitas tinggi dan *life-time* pendek < 40 ns dengan radius aktivasi oksigen singlet sekitar 20 nm (Moan and Berg, 1991), sehingga hanya molekul yang berada pada area fotosensitiser yang secara langsung terjadi fotosensitisasi.

#### 2.3.4. Proses Fotobiologi

Efek cahaya tampak pada organisme telah banyak diinvestigasi pada tingkat kompleksitas yang berbeda-beda. Berbagai molekul fotosensitif telah dikenal dan banyak di antaranya bereaksi pada sistem biologis yang berbeda-beda, dari biologi molekul *in vitro* hingga organisme keseluruhan (Hamblin & Hasan, 2003) dan hampir semuanya menampakkan kontribusinya dalam menimbulkan perubahan fisiologis pada sistem biologi. Kerusakan yang disebabkan oleh PDI pada bakteri meliputi:

##### 1. Kerusakan DNA

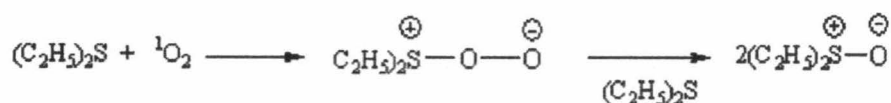
Kerusakan DNA yang disebabkan oleh radiasi cahaya dan molekul fotosensitif antara lain: (Hass *et al.*, 1981; Menezes *et al.*, 1999):

- a. Putusnya rantai DNA baik rantai DNA tunggal maupun ganda
- b. Hilangnya fraksi superkoil plasmid
- c. Intercalate dalam rantai ganda DNA

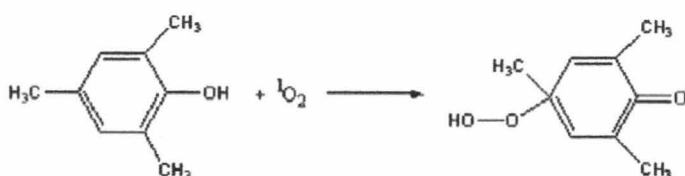
Beberapa peneliti sepakat walaupun kerusakan DNA terjadi, namun bukan merupakan penyebab utama kematian sel. Kerusakan ini diperbaiki oleh berbagai sistem perbaikan DNA (Imray *et al.*, 1973). Sebagai contoh adalah bakteri *D. radiodurans* yang memiliki mekanisme perbaikan sel yang sangat efisien, ditemukan mudah terbunuh oleh pemaparan cahaya (Schafer *et al.*, 1998).

## 2. Kerusakan Protein

Oksigen singlet bersifat elektrofilik dan bereaksi cepat dengan 5 asam amino yaitu triptofan, histidin, tirosin, metionin dan sistein untuk membentuk peroksida. Kecepatan reaksi oksigen singlet dan protein sangat tergantung pada jumlah dan jenis asam amino yang mempunyai ikatan rangkap atau atom sulfur kaya elektron. Triptofan, histidin, tirosin mempunyai ikatan rangkap sedang metionin dan sistein mempunyai atom sulfur dengan 4 elektron tidak berikatan. Asam amino lain bereaksi dengan oksigen singlet dengan kecepatan 2 - 3 kali lebih rendah daripada triptofan, histidin, tirosin, metionin atau sistein (Min & Boff, 2002). Beberapa reaksi  $^1\text{O}_2$  dengan protein adalah (Grossweiner, 2005) ditunjukkan pada Gambar 2.13:



(a)



(b)

Gambar 2.13. a. Sistein dan metionin dioksidasi menjadi sulfoksida (Grossweiner, 2005)  
b. Tirosin melalui kopling oksidatif phenol (2,6-di-tert-butylphenol) menjadi quinon hidroperoksida (Grossweiner, 2005)

## 3. Kerusakan membran

Membran biologi adalah penting untuk kehidupan. Membran mengatur aliran material dan informasi antar sel dan antara sel dengan lingkungannya.

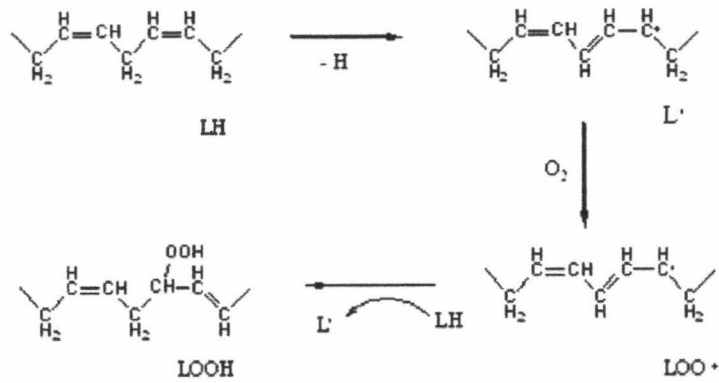
Kerusakan pada membran sitoplasma mengakibatkan lisis sel dan menginaktivasi sistem transport membran dan sistem enzim transport membran (Valduga *et al.*, 1999) dan Bertoloni *et al.*, 1990), menyebabkan gangguan sintesis dinding sel dan munculnya struktur multilamelar disisi sekat sel-sel yang membelah seiring dengan bocornya ion-ion kalium dari dalam sel (Demidova & Hamblin, 2005).

Radikal oksigen singlet dan oksigen triplet menginisiasi perubahan pada asam lemak tak jenuh seperti linolenat, linoleat dan oleat membentuk hidropiroksida dengan kecepatan reaksi ditunjukkan oleh Tabel 2.2 (Min dan Boff, 2002). Proses selanjutnya radikal oksigen singlet dan oksigen triplet mempengaruhi formasi asam lemak jenuh yang lebih stabil dengan memutuskan ikatan hidrogen menghasilkan hidropiroksida yang bersifat racun.

Tabel 2.2. Kecepatan relatif oksidasi oksigen triplet dan oksigen singlet dengan asam oleat, linoleat dan linolenat (Min & Boff, 2002)

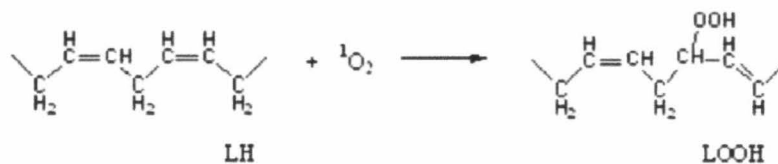
	Oleat	Linoleat	Linolenat
Oksigen triplet	1	27	77
Oksigen singlet	$3 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$7 \times 10^4$

Asam lemak adalah bentuk paling sederhana dari lipid yang berisi grup *carboxylate* yang berhimpitan pada rantai hidrokarbon panjang. Peroksidasi lipid yang dimediasi oleh ROS (reaksi fotokimia tipe I) ditunjukkan oleh Gambar 2.14. Fotooksidasi dari kelompok *phospholipid linoleoyl* (LH) dimulai dengan reaksi fotosensitiser tereksitasi triplet dengan lipid yang selanjutnya menempatkan lipid pada keadaan tereksitasi triplet ( $L^*$ ). Reaksi oksidasi lipid dengan oksigen menghasilkan radikal *peroxyl* ( $LOO^*$ ) yang dapat menginisiasi penambahan oksidasi melalui serangkaian reaksi yang menghasilkan hidropiroksida lipid ( $LOOH$ ) (Grossweiner, 2005).



Gambar 2.14. Peroksidasi lipid yang dimediasi oleh radikal (Grossweiner, 2005)

Mediasi peroksidasi lipid oleh oksigen singlet  $^1\text{O}_2$  ditunjukkan oleh Gambar 2.15. Lipid (LH) langsung bereaksi dengan oksigen singlet menghasilkan hidropiroksida lipid (LOOH). Oksigen singlet  $^1\text{O}_2$  teridentifikasi berpengaruh pada membran plasma dan membran intraselular, terutama pada fosfolipid, kolesterol dan membran protein.



Gambar 2.15. Peroksidasi lipid yang dimediasi oleh oksigen singlet (Grossweiner, 2005)

### 2.3.5. Dosimetri dalam PDI

Penentuan dosis energi penyinaran memegang peran penting pada PDI. Keberhasilan terjadinya fotosensitisasi akibat penyinaran foton cahaya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain:

- a. Jenis dan kuantitas agen pengabsorpsi cahaya (porfirin), yang menentukan spektrum serap dari porfirin (Nitzan *et al.* (2004)
- b. Spektrum panjang gelombang sumber cahaya yang digunakan untuk penyinaran. Penyerapan foton cahaya hanya terjadi jika spektrum panjang gelombang sumber cahaya sesuai dengan spektrum serap porfirin bakteri (Papageorgiou, 2000)
- c. Intensitas (*luminous flux*) sumber cahaya per satuan luas penyinaran (*illuminance*) atau rapat daya, adalah banyaknya foton cahaya tiap satuan luasan penyinaran ( $\text{Watt/cm}^2$ ) (Grossweiner, 2005)
- d. Rapat energi penyinaran (*luminous exposure*) yaitu besarnya intensitas sumber cahaya kali lama waktu penyinaran dibagi dengan luas area penyinaran ( $\text{J/cm}^2$ ) (Grossweiner, 2005)

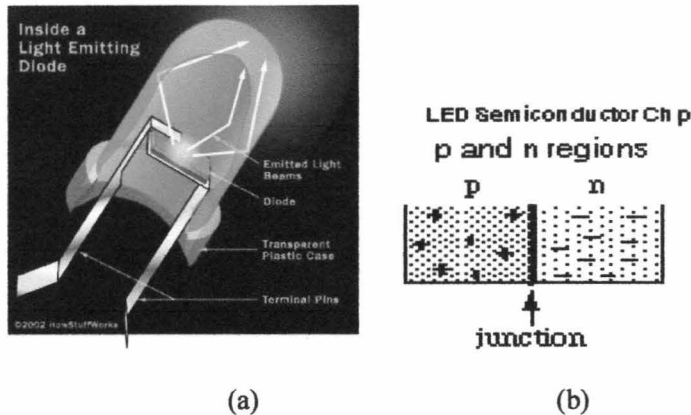
#### **2.4. Light Emitting Diode (LED)**

LED adalah suatu piranti semikonduktor yang dapat mengkonversi energi listrik menjadi energi cahaya oleh karena sifat konduktivitas pada material semikonduktornya. Bagian-bagian LED ditunjukkan pada Gambar 2.16a. LED beroperasi pada tegangan yang relatif rendah antara 1 - 5 V, dan arus antara 10 - 40 mA (Schubert, 2006)

LED yang terdiri dari chip berupa dioda, kawat LED sebagai terminal dan lensa penyebar yang melingkupinya. Chip LED berupa bahan semikonduktor yang disisipi dengan ketidakmurnian untuk menciptakan sebuah struktur yang disebut *p-n junction*. Daerah p didominasi muatan listrik positif dan daerah n



didominasi muatan listrik negatif. *Junction* bertindak sebagai sekat antara daerah p dan daerah n (Gambar 2.16b).



Gambar 2.16. a. Bagian bagian LED, terdiri dari chip LED yang berupa dioda, kawat LED sebagai terminal dan lensa penyebar yang melingkupinya  
b. Chip semikonduktor yang terdiri dari daerah p, daerah n dan *junction* (Haris, 2008)

Saat suatu tegangan yang cukup diberikan, maka arus mulai mengalir, elektron dalam daerah n mempunyai cukup energi untuk berpindah melewati *junction* ke dalam daerah p. Pada daerah p elektron segera tertarik pada muatan positif menurut gaya tarik Coulomb antara dua muatan listrik yang berbeda. Ketika suatu elektron bergerak cukup dekat dengan suatu muatan positif pada daerah p, dua muatan tersebut berekombinasi. Saat elektron bertemu dengan *hole*, maka elektron akan jatuh ke tingkat energi yang lebih rendah, dan melepas energi dalam bentuk foton (Sze, 1985).

Energi listrik pembangkit LED bergantung pada besarnya tegangan yang diberikan karena tegangan listrik ( $V$ ) merupakan sumber energi yang menyebabkan elektron dapat melewati sambungan p-n. Sehingga energi *bandgap* LED dipengaruhi oleh banyaknya muatan listrik ( $q$ ) dari bahan semikonduktor yang digunakan dan tegangan listrik yang diberikan ( $V$ ) yaitu:

$$E = qV \quad (2.6)$$

dengan  $q = -1.6 \times 10^{-19}$  *Coulomb*. Panjang gelombang dan warna dari cahaya yang dipancarkan, tergantung dari energi *bandgap* dari bahan yang membentuk p-n junction (Krane, 1992). Sebuah dioda normal, biasanya terbuat dari silikon atau germanium, memancarkan cahaya tampak dekat-inframerah, tetapi bahan yang digunakan untuk sebuah LED memiliki energi *bandgap* antara cahaya dekat-inframerah, tampak, dan dekat-ultraungu.

Energi foton cahaya yang dipancarkan sebanding dengan energi bandgap dari bahan yang membentuk p-n junction. Besarnya energi foton adalah (Krane, 1992):

$$E = h \frac{c}{\lambda} = hv \quad (2.7)$$

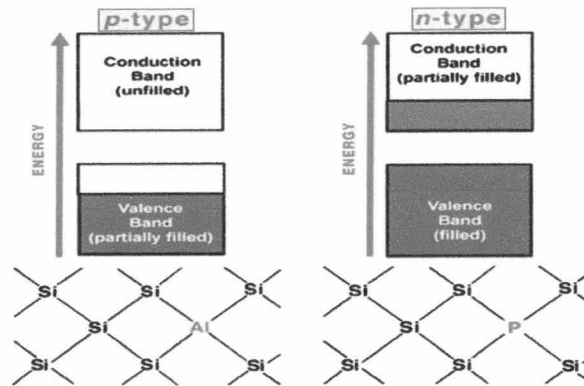
Frekuensi cahaya yang dihasilkan oleh LED adalah:

$$v = \frac{c}{\lambda} \quad (2.8)$$

dengan  $c$  adalah kecepatan cahaya ( $3 \times 10^8$   $m/s$ ) dan  $\lambda$  adalah panjang gelombang cahaya LED yang dapat diukur dengan spektrometer optik (orde nanometer atau  $10^{-9}$  meter).

LED dibuat dari semikonduktor, dengan konduktivitas yang telah ditingkatkan untuk membuat sifat khusus pada LED, yaitu dengan menyisipkan ketidakmurnian dalam bahan semikonduktor dengan atom yang mempunyai elektron lebih atau kurang dari atom bahan semikonduktor tersebut. Penyisipan atau *doping* dengan atom berelektron lebih banyak dapat memberikan elektron-elektron ekstra yang mengisi pita konduksi (*doping* tipe n) dan penyisipan dengan

atom berelektron lebih sedikit dapat mengeluarkan elektron dari pita valensi sehingga menghasilkan *hole* pada pita valensi (*doping* tipe p) (Gambar 2.17).

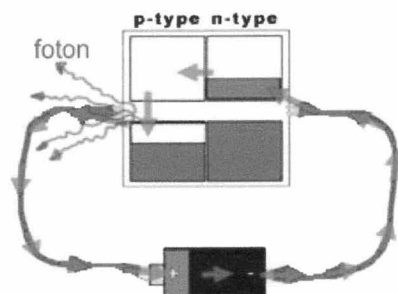


Gambar 2.17. Semikonduktor yang konduktivitasnya ditingkatkan dengan penyisipan elektron ekstra disebut semikonduktor tipe n dan semikonduktor yang konduktivitasnya ditingkatkan dengan *hole* ekstra disebut semikonduktor tipe p (Schubert, 2006)

Ketidakhadiran dengan elektron valensi yang lebih sedikit membentuk ruang kosong pada pita konduksi namun masih menyumbangkan beberapa elektron pada pita valensi, sehingga menimbulkan defisit elektron. Jenis penyisipan ini membentuk suatu ruang (*hole*) pada pita valensi dan menyediakan ruang bagi elektron untuk berpindah. Ketidakhadiran dengan elektron valensi yang lebih banyak menyumbangkan elektron ekstra pada pita. Karena pita valensi telah terisi penuh, elektron ekstra harus berpindah ke energi yang lebih tinggi yaitu ke pita konduksi. Elektron-elektron tersebut mengisi sebagian pita konduksi.

Untuk mengkonversi arus listrik menjadi cahaya, sebuah LED dibuat dengan cara menyambungkan semikonduktor tipe p dan tipe n. Kombinasi dua jenis semikonduktor ini disebut sebagai *p-n junction*, atau disebut juga sebagai dioda. Ketika sebuah *p-n junction* diletakkan pada suatu rangkaian dengan suatu beda potensial eksternal, elektron dari beda potensial eksternal tersebut akan

mengalir melalui dioda dan mengubah posisi elektron dalam dioda (Schubert, 2006) yang ditunjukkan pada Gambar 2.18.



Gambar 2.18 Diagram lintasan elektron yang bergerak melewati rangkaian *p-n junction*. Jika terdapat potensial eksternal, elektron mengalir (sesuai anak panah) dari terminal negatif sumber tegangan ke daerah n pada *p-n junction*. Elektron akan memenuhi pita konduksi, karena tidak ada ruang kosong pada pita valensinya. Saat elektron terus mengalir menuju pita konduksi, elektron ini akan terdorong ke bagian tipe-p dari *p-n junction*, yang mempunyai ruang kosong (*hole*) untuk menangkap elektron, elektron akan berpindah menuju pita konduksi tipe-p. Saat elektron berada di pita konduksi dengan energi yang lebih tinggi pada daerah tipe-p, elektron-elektron tersebut akan jatuh menuju pita valensi dengan energi yang lebih rendah untuk mencapai keadaan setimbang. Peristiwa ini disebut rekombinasi. Ketika elektron melewati pita gap, energi yang bersesuaian besarnya dengan ukuran pita gap dilepaskan dalam bentuk foton (Schubert, 2006)

#### 2.4.1. Efisiensi LED

Bagian aktif LED ideal mengemisikan satu foton untuk tiap elektron yang diinjeksikan. Masing-masing elektron menghasilkan satu cahaya partikel kuantum (foton). Jadi daerah aktif sebuah LED memiliki efisiensi kuantum per unit. Efisiensi kuantum internal ( $\eta_{int}$ ) didefinisikan sebagai jumlah foton yang diemisikan dari daerah aktif LED per detik dibagi dengan jumlah elektron yang diinjeksikan dalam LED per detik, dirumuskan sebagai (Schubert, 2006):

$$\eta_{int} = \frac{P_{int} / (hv)}{I / e} \quad (2.9)$$

Dengan  $P_{int}$  adalah daya optikal yang diemisikan dari daerah aktif LED dan  $I$  adalah arus listrik. Efisiensi kuantum eksternal  $\eta_{ext}$  didefinisikan sebagai jumlah foton yang diemisikan ke dalam ruang bebas per detik dibagi dengan jumlah elektron yang diinjeksikan ke dalam LED per detik, dirumuskan sebagai:

$$\eta_{ext} = \frac{P/(h\nu)}{I/e} \quad (2.10)$$

Efisiensi daya  $\eta_{power}$  (*wallplug efficiency*) didefinisikan sebagai:

$$\eta_{power} = \frac{P}{IV} \quad (2.11)$$

Dengan  $IV$  adalah daya listrik yang dimasukkan pada LED

#### 2.4.2. Spektrum Emisi

Mekanisme fisis pancaran cahaya pada semikonduktor LED adalah akibat terjadinya rekombinasi spontan pasangan elektron-*hole* tersebut. Rekombinasi ini mempunyai karakteristik spesifik yang menentukan properti optik suatu LED. Proses rekombinasi elektron-*hole* ditunjukkan secara skematik pada Gambar 2.19. Elektron-elektron dalam pita konduksi dan *hole-hole* pada pita valensi mempunyai persamaan dispersi parabolik sebagai berikut (Schubert, 2006):

$$E_e = E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_e^*} \quad (\text{untuk elektron}) \quad (2.12)$$

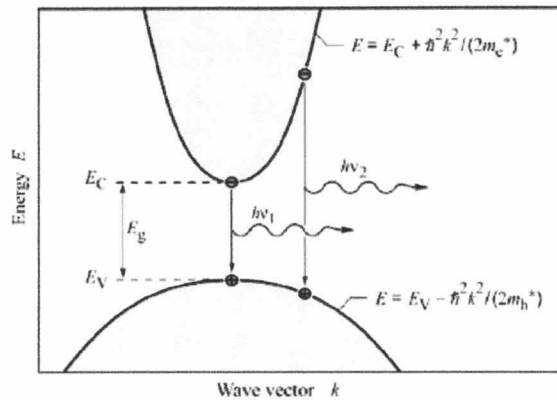
$$E_h = E_v - \frac{\hbar^2 k^2}{2m_h^*} \quad (\text{untuk hole}) \quad (2.13)$$

Dengan  $E_e$  energi elektron dan  $E_h$  energi *hole*,  $E_c$  dan  $E_v$  adalah energi tepi pita konduksi dan pita valensi,  $m_e^*$  dan  $m_h^*$  adalah massa efektif elektron dan *hole*.  $\hbar$  adalah konstanta Planck dibagi  $2\pi$ , dan  $k$  adalah bilangan gelombang.

Menurut prinsip kekekalan energi, energi foton merupakan selisih energi elektron  $E_e$  dan energi *hole*  $E_h$ , sehingga

$$h\nu = E_e - E_h \approx E_g \quad (2.14)$$

dengan  $h$  adalah konstanta Planck yang berharga  $6,63 \times 10^{-34}$  Js,  $\nu$  adalah frekuensi foton yang dipancarkan dan  $E_g$  energi *bandgap* semikonduktor.



Gambar 2.19. Hubungan dispersi parabolik elektron dan hole yang menunjukkan rekombinasi elektron hole dan emisi foton (Schubert, 2006)

Energi foton sebanding dengan energi *bandgap*  $E_g$ , jika energi termalnya lebih kecil jika dibandingkan dengan energi *bandgap* ( $kT \ll E_g$ ). Selanjutnya dengan prinsip kekekalan momentum, energi foton dapat dituliskan menjadi (Schubert, 2006):

$$h\nu = E_c + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_e^*} - E_v + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_h^*} = E_g + \frac{\hbar^2 k^2}{2m_r^*} \quad (2.15)$$

dimana  $m_r^*$  adalah massa tereduksi elektron dan *hole*.

Sehingga rapat energi gabungan elektron dan *hole*  $\rho(E)$  dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\rho(E) = \frac{1}{2\pi^2} \left( \frac{2m_r^*}{\hbar^2} \right)^{3/2} \sqrt{E - E_g} \quad (2.16)$$

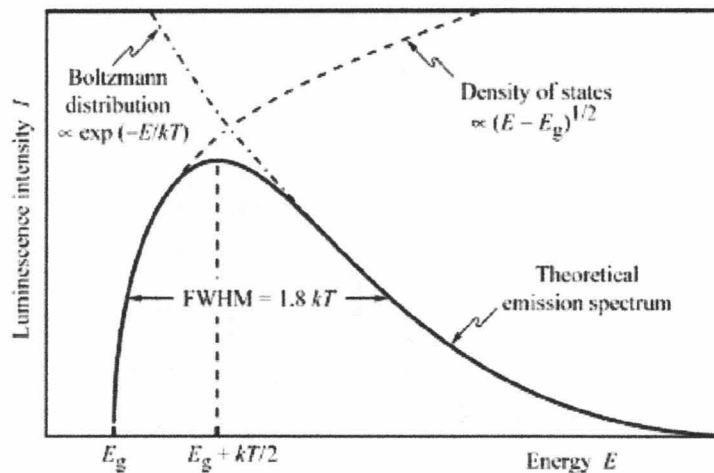
Distribusi *carier* (elektron atau *hole*) di pita yang diperbolehkan  $f_B(E)$  diberikan oleh persamaan Boltzmann:

$$f_B(E) = e^{-E/(kT)} \quad (2.17)$$

Intensitas emisi  $I(E)$  sebagai fungsi energi adalah sebanding dengan hasil persamaan 2.16 dan 2.17 yang dapat dituliskan sebagai:

$$I(E) \propto \sqrt{E - E_g} e^{-E/(kT)} \quad (2.18)$$

Bentuk emisi LED dari persamaan 2.17 ditunjukkan pada Gambar 2.20.



Gambar 2.20. Spektrum emisi sebuah LED. Lebar penuh separuh maksimum (*Full Width at Half Maximum*/FWHM) garis emisi pada  $1,8 kT$  (Schubert, 2006)

Intensitas emisi maksimum terjadi pada:

$$E = E_g + \frac{1}{2} kT \quad (2.19)$$

Lebar penuh separuh maksimum (*Full-Width Half Maximum* /FWHM) adalah:

$$\Delta E = 1.8 kT \quad \text{atau} \quad \Delta \lambda = \frac{1.8 kT \lambda^2}{hc} \quad (2.20)$$

Sebagai contoh, pada temperatur ruang lebar garis LED GaN yang memancarkan panjang gelombang 450 nm (cahaya biru) adalah  $\Delta E = 46 \text{ meV}$  atau  $\Delta\lambda = 47 \text{ nm}$  (Schubert, 2006).

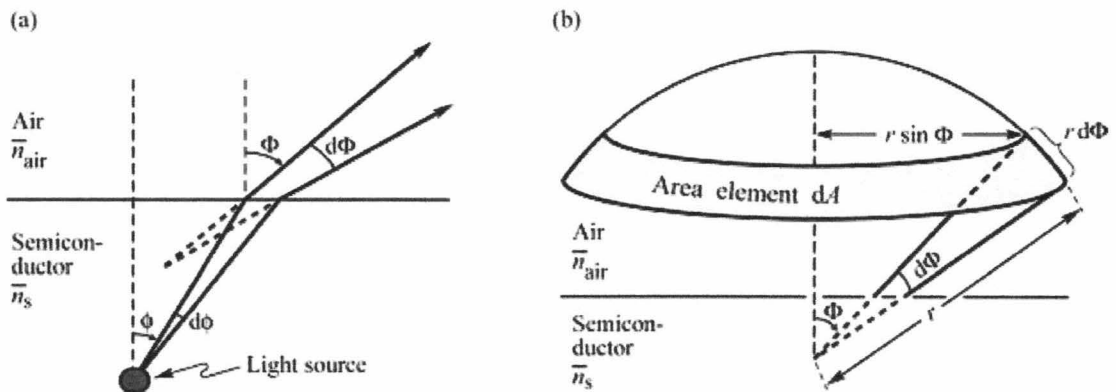
### 2.4.3. Pola Radiasi

Semua LED memiliki pola radiasi tertentu. Intensitas dalam  $\text{W/m}^2$  bergantung pada sudut longitudinal dan azimuth serta jarak LED. Daya optik total yang diemisikan oleh LED adalah:

$$P = \int_A \int_{\lambda} I(\lambda) d\lambda dA \quad (2.21)$$

$I(\lambda)$  adalah intensitas cahaya spektral ( $\text{W/cm}^2$ ) dan  $A$  luas area permukaan bola.

Pola emisi pada LED adalah Lambertian. Gambar 2.21 menunjukkan model geometri yang digunakan untuk mendapatkan pola emisi lambertian.



Gambar 2.21. Model geometri pola emisi lambertian (Schubert, 2006)

- Cahaya mengemisi pada sudut  $d\phi$  dalam semikonduktor yang diemisikan ke dalam sudut  $d\Phi$  pada udara
- Ilustrasi elemen luasan  $dA$

Menurut hukum Snellius:  $\bar{n}_s \phi = \bar{n}_{udara} \sin \Phi \quad (2.22)$



Dengan 
$$d\Phi = \frac{\bar{n}_s}{\bar{n}_{udara}} \frac{1}{\cos\Phi} d\phi \quad (2.23)$$

Emisi daya optik pada sudut  $d\phi$  dalam semikonduktor sama dengan emisi daya optik pada sudut  $d\Phi$  di udara 
$$I_s dA_s = I_{udara} dA_{udara} \quad (2.24)$$

Dengan  $I_s$  dan  $I_{udara}$  adalah intensitas cahaya pada semikonduktor dan udara.

Elemen luas area di udara adalah:

$$dA_{udara} = 2\pi r \sin\Phi r d\Phi = 2\pi r^2 \frac{\bar{n}_s^2}{\bar{n}_{udara}^2} \frac{1}{\cos\Phi} \phi d\phi \quad (2.25)$$

Elemen luas area pada permukaan semikonduktor adalah:

$$dA_s = 2\pi r \sin\phi r d\phi \approx 2\pi r^2 \phi d\phi \quad (2.26)$$

Intensitas cahaya semikonduktor pada jarak  $r$  dari sumber cahaya adalah total daya sumber dibagi dengan luas area permukaan bola radius  $r$ :

$$I_s = \frac{P_{sumber}}{4\pi r^2} \quad (2.27)$$

Sehingga intensitas cahaya di udara dengan pola emisi lambertian adalah:

$$I_{udara} = \frac{P_{sumber}}{4\pi r^2} \frac{\bar{n}_{udara}^2}{\bar{n}_s^2} \cos\Phi \quad (2.28)$$

Besarnya emisi daya total di udara adalah:

$$P_{udara} = \int_{\Phi=0^\circ}^{90^\circ} I_{udara} 2\pi r^2 \sin\Phi r d\Phi \quad (2.29)$$

Dengan menggunakan pola emisi lambertian untuk  $I_{udara}$  pada persamaan 2.29 dan menggunakan  $\cos\Phi \sin\Phi = \sin(1/2)\sin(2\Phi)$ , maka:

$$P_{udara} = \frac{P_{sumber}}{4} \frac{\bar{n}_{udara}^2}{\bar{n}_s^2} \quad (2.30)$$

Pada sebuah LED, tiap elektron yang diinjeksikan dalam daerah aktifnya akan menghasilkan sebuah foton. Dengan prinsip kekekalan energi, dimana

jumlah elektron diinjeksikan sama dengan energi foton, maka tegangan yang diberikan pada LED dikalikan dengan muatan elektron sama dengan energi foton yang dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$eV = hv \quad (2.31)$$

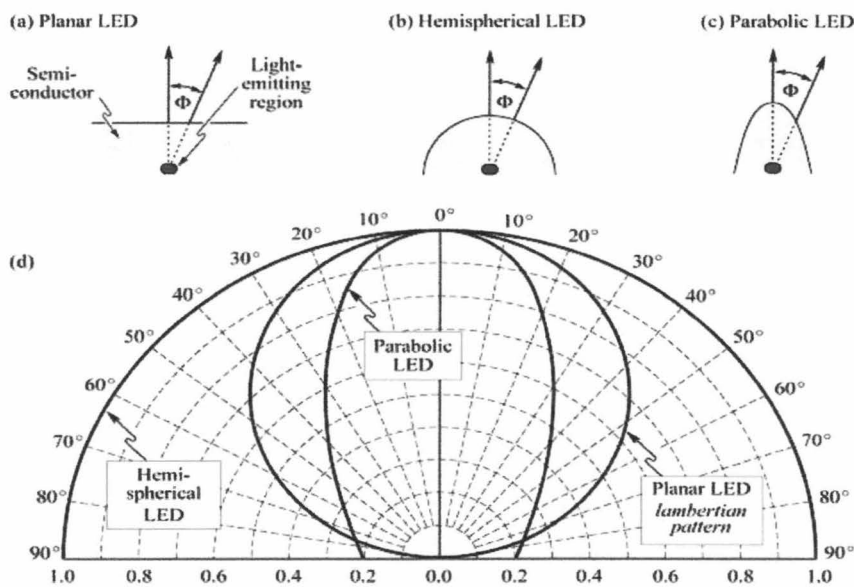
Dengan  $e$  muatan elektron dan  $V$  tegangan yang diberikan pada LED.

Sedangkan daya foton ( $P$ ) yang dibangkitkan oleh LED dengan arus dan tegangan tertentu dapat dituliskan

$$P = IV = I \frac{hc}{e\lambda} \quad (2.32)$$

Dengan  $I$  adalah arus yang diberikan pada LED,  $h$  adalah konstanta Planck,  $c$  adalah kecepatan rambat gelombang cahaya,  $e$  adalah muatan elektron dan  $\lambda$  adalah panjang gelombang LED.

Pola emisi lambertian berbagai bentuk permukaan secara skematik ditunjukkan pada Gambar 2.22.



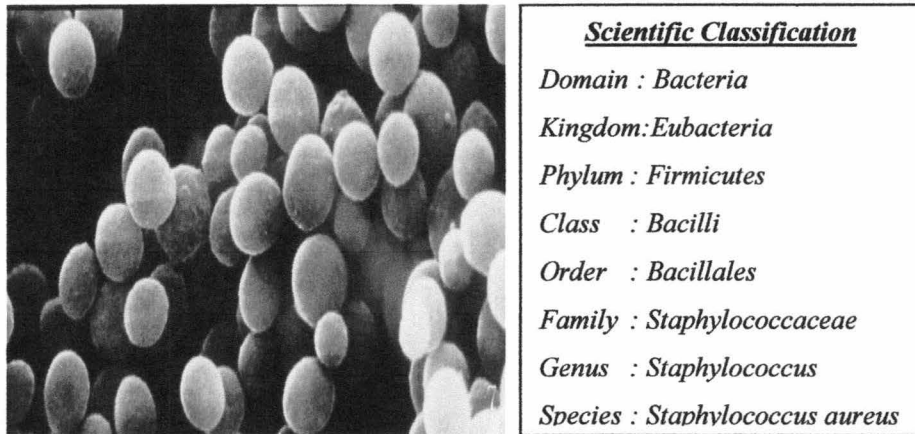
Gambar 2.22. LED dengan permukaan a) planar, b) hemispheric dan c) parabolik dan d) pola emisi berbagai tipe LED. Pada sudut  $\Phi=60^\circ$ , pola emisi lambertian turun 50% dari nilai maksimumnya pada  $\Phi=0^\circ$  (Scubert, 2006)

Permukaan non planar menghasilkan berbagai pola emisi. Pola emisi isotropik bentuk LED hemisphere memiliki daerah emisi cahaya pada pusat bola dan pola emisi kuat secara langsung dipancarkan pada LED dengan bentuk permukaan parabolic (Schubert, 2006), tetapi bentuk permukaan hemisphere dan parabolik sulit untuk fabrikasi.

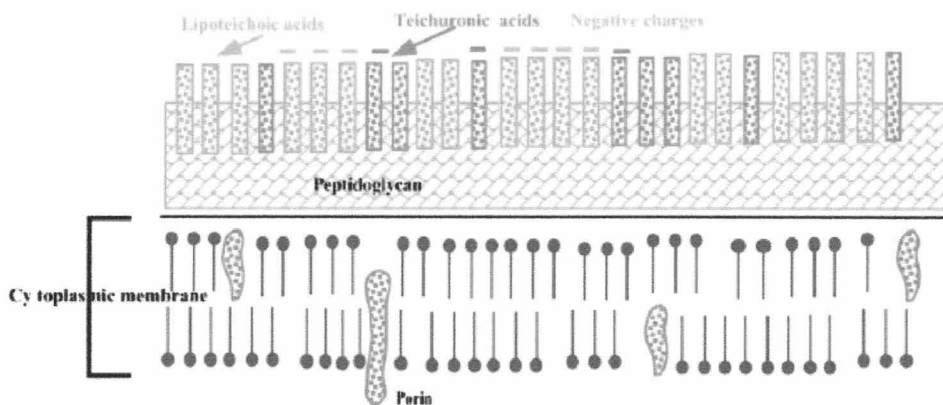
LED biru dibuat dari semikonduktor *gallium nitride* (GaN) dan *indium gallium nitride* (InGaN) yang juga memancarkan cahaya hijau. LED ini pertama kali dibuat tahun 1971 oleh Jacques Pankove. LED memiliki efisiensi penyinaran (*luminous efficiency*) yang tinggi (InGaN LED biru=10 lm/W, InGaN LED hijau=30 lm/W), yaitu sifat penting untuk aplikasi yang memerlukan fluks penyinaran tinggi (Schubert, 2006).

## 2.5. Bakteri *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif, berbentuk bola dengan garis tengah sekitar 1 $\mu$ m, tersusun dalam kelompok tak beraturan yang nampak seperti sekumpulan anggur jika dilihat dengan mikroskop (Gambar 2.23), tidak membentuk spora, tidak berkapsul, dan dinding selnya mengandung dua komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam teikhoat (Gambar 2.24). Metabolisme bakteri secara fakultatif anaerob dan merupakan bakteri golongan mesofil dengan temperatur maksimum pertumbuhan 35-47°C (Irianto, 2007). *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim katalase (mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen) dan enzim koagulase (menggumpalkan plasma yang telah diberi oksalat atau sitrat). Suatu bakteri yang mampu membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Jawetz, 1996).



Gambar 2.23. Gambar dan taksonomi bakteri *Staphylococcus aureus* (Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, 2005)



Gambar 2.24. Struktur dinding sel bakteri Gram positif (Hamblin & Hasan, 2003)

*Staphylococcus aureus* biasanya terdapat pada kulit, hidung atau tenggorokan manusia. Bakteri ini dapat menyebabkan sejumlah penyakit kulit ringan seperti infeksi kulit, *acne vulgaris*, *cellulitis folliculitis* sampai penyakit berat seperti *pneumonia*, *meningitis*, *osteomyelitis* *endocarditis*, *toxic shock syndrome* (TSS), dan *septicemia*. Pada *acne*, lipase *Staphylococcus aureus* melepaskan asam-asam lemak dari lipid dan menyebabkan iritasi jaringan. Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat juga disebabkan oleh kontaminasi langsung pada

luka, misalnya pada infeksi luka pasca bedah atau infeksi setelah trauma. *Staphylococcus aureus* cenderung resistan terhadap antibiotik. Beberapa jenis bakteri ini telah menjadi resistan terhadap antibiotika seperti *penicillin* dan *methicillin* yang dipakai untuk mengobati infeksi (Jawetz, 1996).

# **BAB III**

# **KERANGKA KONSEPTUAL**

# **DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

## BAB III

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka Konseptual

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang hidup komensal pada kulit atau hidung manusia. Pada kondisi abnormal, bakteri ini diketahui berperan sebagai salah satu penyebab infeksi kulit (Jawetz, 1996). Umumnya, dermatolog menggunakan terapi sistemik berupa pemberian antibiotik seperti *methicillin* (Juanda, 2005) untuk mengurangi jumlah populasi bakteri penyebab infeksi, namun metode ini menyebabkan masalah, karena penggunaan dalam jangka waktu lama menyebabkan bakteri menjadi resisten (James, 2007). Sehingga perlu dicari metode alternatif yang bersifat efektif dan selektif membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*.

Dewasa ini berkembang metode *Photodynamic Inactivation* (PDI) yaitu bagian dari fotodinamik terapi untuk aplikasi pada mikroba (Hamblin & Hasan, 2003; Jori *et al.*, 2006). Kombinasi cahaya dan fotosensitizer tertentu pada PDI menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Mekanisme fotoinaktivasi melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh porfirin bakteri yang selanjutnya mengaktifkan terjadinya reaksi kimia lanjutan menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif (Grossweiner, 2005). Fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kuantitas dari porfirin yang berperan sebagai molekul penyerap cahaya (Nitzan *et al.*, 2004) dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum serap fotosensitizer (Papageorgiou, 2000).

Secara alamiah beberapa bakteri menghasilkan porfirin yaitu molekul pengabsorpsi cahaya (fotosensitizer) yang bersifat peka terhadap cahaya, antara lain protoporfirin IX, coproporfirin III dan uroporfirin III (Cornelius *et al.*, 1967). Nitzan *et al.* (2004) melaporkan bahwa porfirin utama pada strain bakteri Gram positif *Staphylococci* adalah jenis coproporfirin (68 - 75) %. Spektrum serap dari masing-masing jenis porfirin bersifat spesifik. Untuk kebanyakan jenis porfirin, absorpsi terjadi pada daerah cahaya tampak dengan panjang gelombang 400-750 nm (Juzenas, 2002). Coproporfirin III mempunyai kemampuan optimal menyerap cahaya pada panjang gelombang cahaya biru (407-450) nm (Nitzan *et al.*, 2004).

Porfirin endogen secara alami disintesis oleh bakteri. *5-aminolevulinic acid* (5-ALA) adalah prekursor biosintetik dari semua porfirin alam (Grossweiner, 2005). Sintesis porfirin pada sel bakteri dimulai dengan pembentukan asam 5-ALA secara endogen dengan mereaksikan asam amino *glycine* dan *succinyl-CoA* dari lingkaran asam sitrat. Dua molekul ALA bergabung menjadi porfobilinogen (PBG) yang mengandung cincin pyrrole. Empat PBG melalui deamilasi bergabung menjadi *hydroxymethyl bilane* (HMB), yang selanjutnya dihidrolisis menjadi *circular tetrapyrrole* uroporfirinogen III. Coproporphyrin III ( $C_{36}H_{38}N_4O_8$ ) adalah produk akhir *tetrapyrrole* dari oksidasi spontan jembatan metilena coproporfirinogen. Molekul ini mengalami modifikasi lebih lanjut sehingga dihasilkan protoporfirin IX ( $C_{34}H_{34}N_4O_4$ ) (HMD, 2008). Hasil akhir protoporfirin IX dikombinasi dengan besi membentuk heme.

Sumber cahaya yang memiliki rentang spektrum absorpsi porfirin tipe fotosensitizer antara lain LED. LED merupakan semikonduktor kompleks yang dapat mengkonversi secara efisien energi listrik menjadi cahaya (Schubert, 2006),

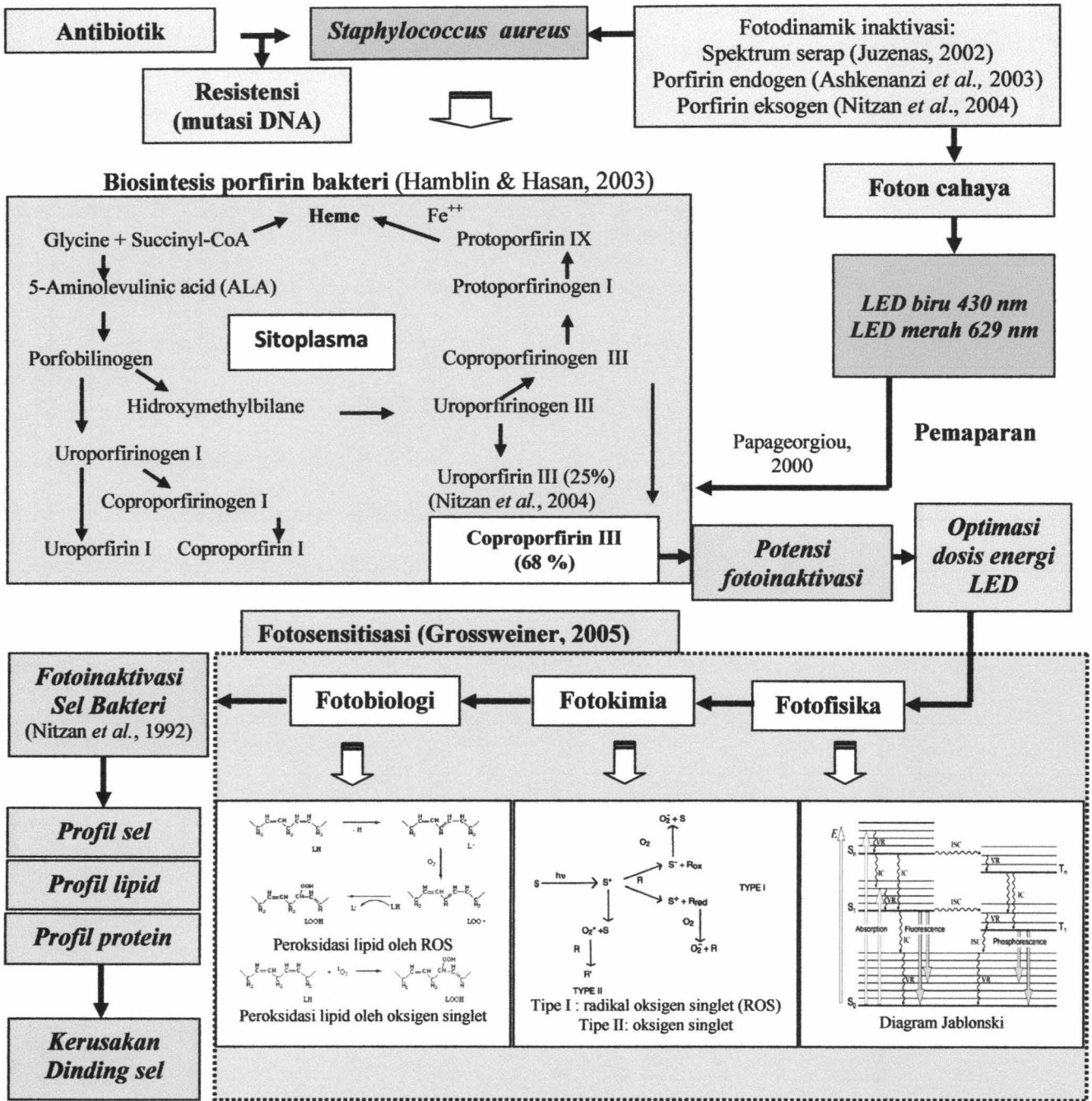


menghasilkan sejumlah kecil panas dalam cahaya yang ditimbulkan dan memiliki *life time* yang cukup lama (Ross, 1979). LED menghasilkan cahaya dengan berbagai warna. Warna cahaya yang diemisikan oleh LED bergantung pada komposisi dan kondisi dari material semikonduktor yang digunakan, baik infra merah, cahaya tampak maupun ultraviolet (Schubert, 2006).

Hasil penelitian Papageorgiou (2000) menunjukkan bahwa penyinaran cahaya yang memiliki spektrum panjang gelombang yang sesuai dengan spektrum serap porfirin fotosensitiser dengan dosis energi penyinaran yang tepat dapat menyebabkan fotoinaktivasi sel bakteri. Fotoinaktivasi adalah penghambatan aktivitas metabolisme sel karena kerusakan membran sitoplasmik akibat peroksidasi oleh oksigen reaktif pada lipid dan protein mengakibatkan lisis sel atau inaktivasi sistem transport membran dan sistem enzim transport membran pada sel bakteri tersebut (Hamblin & Hasan, 2003).

Berbagai penelitian fotodinamik yang telah dilakukan menunjukkan bahwa keberhasilan fotoinaktivasi pada bakteri ditentukan oleh kesesuaian panjang gelombang cahaya dengan spektrum serap porfirin bakteri untuk terjadinya eksitasi molekul porfirin. Faktor penentu yang lain adalah dosis energi penyinaran. Dosis energi penyinaran yang sesuai akan mengaktifkan terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Dosis energi penyinaran umumnya dihitung sebagai rapat energi penyinaran LED ( $J/cm^2$ ) yaitu rapat daya optik kali lama waktu penyinaran dibagi dengan luas area penyinaran (Grossweiner, 2005).

Adapun kerangka konseptual dari penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual penelitian. □ dengan huruf miring adalah hipotesis penelitian, sedang □ dengan huruf miring di dalamnya adalah parameter yang dibuat/diukur/diamati dalam penelitian.

### 3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual, dapat dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Penyinaran LED biru berpotensi fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen
2. Penyinaran LED biru pada berbagai variasi dosis energi penyinaran menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus*
3. Penyinaran LED biru pada dosis energi penyinaran optimal menyebabkan perubahan karakteristik bakteri *Staphylococcus aureus* baik secara fisik maupun kimiawi

# **BAB IV METODE PENELITIAN**

## BAB IV

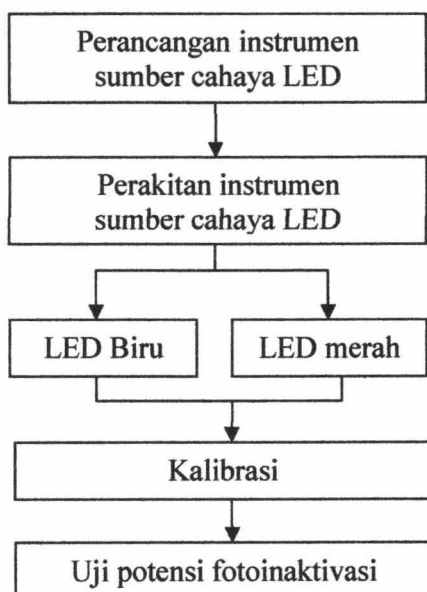
### METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. tahap pertama merupakan studi pendahuluan bertujuan untuk menghasilkan instrumen sumber cahaya *Light Emitting Diode* (LED) yang memiliki ketelitian dan ketepatan pengukuran (performansi) sesuai dengan kalibrator dan berpotensi untuk fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen. Hasil studi pendahuluan ini akan dipakai sebagai dasar penelitian tahap berikutnya yaitu penentuan dosis energi penyinaran LED yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri dan selanjutnya meneliti pengaruh fotoinaktivasi dengan penyinaran LED dosis energi optimal terhadap karakteristik fisik dan kimiawi sel bakteri. Secara lebih rinci masing-masing tahapan penelitian tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut.

#### 4.1. Penelitian Fase I

Penelitian ini merupakan studi pendahuluan bertujuan untuk mewujudkan instrumen LED yang memiliki performansi yang baik sesuai dengan kalibrator dan berpotensi untuk fotoinaktivasi pada bakteri. Langkah penelitian tahap satu secara umum dapat digambarkan pada skema bagan alir di Gambar 4.1.





Gambar 4.1. Kerangka Operasional Penelitian Tahap I

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

#### 4.1.1. Perancangan dan Perakitan serta Karakterisasi Performansi Sumber Cahaya LED

##### 4.1.1.1. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama untuk penelitian ini adalah LEB biru dan merah super bright produk lokal, catu daya, mikrokontroler tipe AVR AT mega 8535, cristal 4 MHz dan 32,768 kHz, driver PWM (*Power Width Modulation*) L293, LCD dan switch, IC DS 1307, driver kipas, driver motor servo, Elco, EEprom, PCB, akrilik, resistor, kapasitor, aneka mur baut, kabel.

Peralatan yang diperlukan adalah osiloskop, solder, obeng, tang, peralatan sablon, peralatan kalibrasi meliputi wavelength meter SR 530 Stanford Research System Inc. dan silicon detektor 818 SL Newport SN 5592 range panjang

gelombang 400-1100 nm dengan kalibrator laser He-Ne 543 nm Newport 811, spektrometer optik, kalibrator durasi waktu dan temperatur penyinaran yaitu dengan stop watch Enko Sport Timer dan termometer *Atech Thermo L87AD*.

#### **4.1.1.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

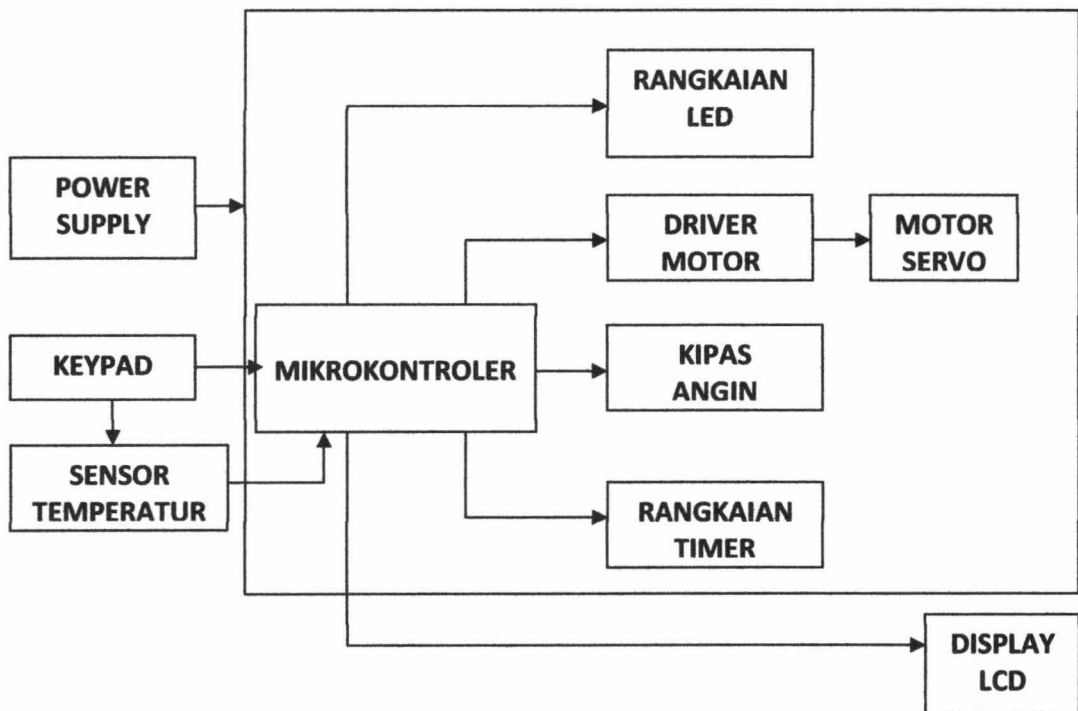
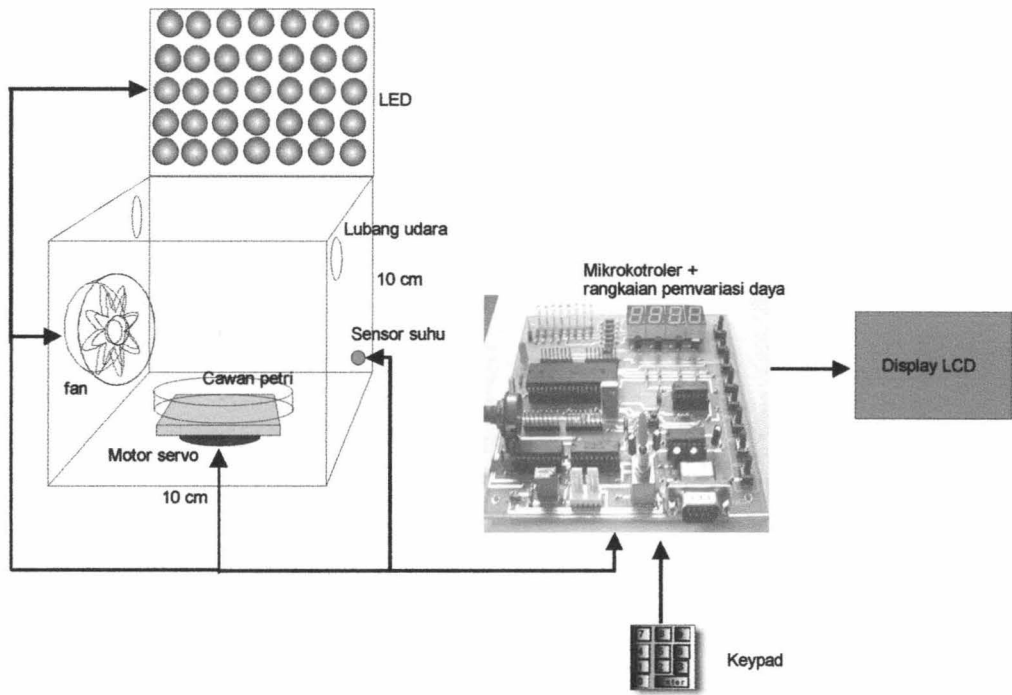
Penelitian rancang bangun, perakitan serta kalibrasi durasi waktu dan temperatur instrumen sumber cahaya LED dilaksanakan di Laboratorium Instrumentasi Biofisika dan Optik Fakultas Saintek Universitas Airlangga. Penelitian pengukuran daya dan panjang gelombang sumber cahaya LED dilaksanakan di Laboratorium Photonics Research Center University of Malaya Kualalumpur Malaysia. Penelitian dilaksanakan pada tahun 2009.

#### **4.1.1.3. Prosedur Kerja**

Untuk mewujudkan instrumen LED sesuai dengan tujuan penelitian, prosedur kerja yang dilakukan antara lain:

##### **A. Perancangan Instrumen**

Tujuan utama tahapan ini adalah tersusunnya rangkaian lengkap instrumen sumber cahaya LED yang memiliki spesifikasi mampu mengontrol *switching* LED, mengendalikan temperatur ruang tetap konstan, memutar holder cawan petri bakteri untuk meratakan penyinaran serta mengatur lama waktu penyinaran dan daya LED. Adapun desain instrumen LED ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2.Desain instrumen LED

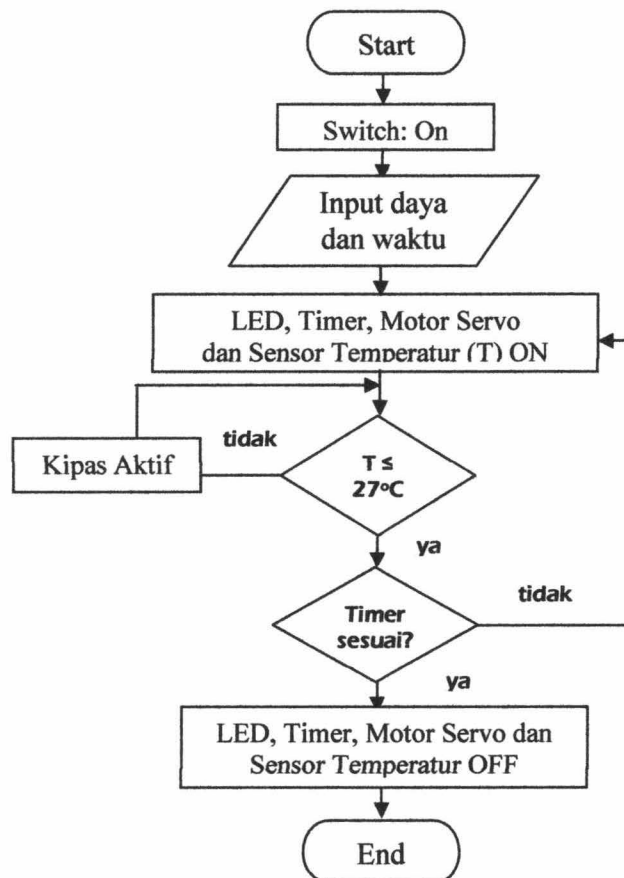


Penjelasan bagian-bagian dari instrumen LED:

1. *Power Supply*, mengubah tegangan listrik bolak-balik dari PLN menjadi tegangan listrik searah dan berfungsi memberikan energi listrik dan membangkitkan beda potensial pada seluruh rangkaian.
2. *Keypad*, berfungsi memberi masukan daya dan durasi atau lama waktu penyinaran.
3. Mikrokontroler, adalah suatu alat elektronika digital yang mempunyai masukan, keluaran serta kendali melalui pemrograman, berfungsi mengendalikan sepenuhnya seluruh rangkaian elektronik yang terhubung pada alat ini, yaitu keypad, rangkaian LED, sensor temperatur, kipas angin, rangkaian timer, driver motor dan display LED. Pada instrumen ini digunakan mikrokontroler tipe AVR 8535.
4. Rangkaian timer, berfungsi untuk mencacah waktu sesuai durasi waktu yang telah ditentukan. Pada instrumen ini digunakan rangkaian timer RTC/DS.
5. Driver motor, berfungsi untuk mengendalikan perputaran motor servo.
6. *Display LCD*, berfungsi untuk menampilkan besaran daya dan durasi waktu penyinaran yang dikehendaki serta temperatur yang terukur oleh sensor temperatur.
7. Tempat sampel berupa kotak akrilik berdimensi 15x15 cm yang dilengkapi dengan:
  - a. Rangkaian LED 20x18 buah, merupakan rangkaian elektronik yang berfungsi untuk menyalakan LED melalui pemberian beda potensial dari power supply.

- b. Sensor temperatur, berfungsi mendeteksi temperatur selama proses penyinaran berlangsung. Pada instrumen ini digunakan sensor temperatur tipe LM 35.
- c. Kipas angin, berfungsi untuk mengendalikan temperatur agar tetap konstan. Jika temperatur uangan penyinaran  $> 27^{\circ}\text{C}$ , kipas akan menyala dan tetap diam jika temperatur ruangan penyinaran  $\leq 27^{\circ}\text{C}$ .
- d. Motor servo, berfungsi untuk memutar holder tempat cawan petri sampel. Motor servo yang digunakan merk Parallax Continous.

### B. Diagram Alur Kerja Instrumen LED



Gambar 4.3. Diagram alur kerja instrumen LED

Penjelasan Diagram alur kerja instrumen LED (Gambar 4.3):

1. Switch instrumen mulai dihidupkan (ON).
2. Memberi masukan daya dan durasi waktu yang dikehendaki melalui keypad.
3. Rangkaian LED, timer, motor servo dan sensor temperatur mulai bekerja (ON).
4. Jika temperatur  $> 27^{\circ}\text{C}$ , maka kipas aktif, jika temperatur  $\leq 27^{\circ}\text{C}$ , maka kipas berhenti (OFF).
5. Ketika durasi waktu telah terpenuhi, maka timer, rangkaian LED, motor servo dan sensor temperatur berhenti (OFF).
6. Selesai.

### C. Perakitan Alat

Rangkaian lengkap hasil proses perancangan digunakan sebagai landasan untuk mengawali proses perwujudan alat. Proses perwujudan alat dimulai dengan membuat tata jalur dan tata letak komponen elektronik, sesuai dengan rangkaian lengkap yang tersusun. Tata jalur tersebut selanjutnya dicetak pada lembaran PCB menggunakan teknik sablon. Setelah dilakukan proses etching dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  diperoleh lembaran PCB siap rakit.

Tahap perakitan komponen diawali dengan menyusun komponen yang dibutuhkan pada lembaran PCB yang tersedia, sesuai dengan tata letak komponen yang disusun. Setelah komponen yang dibutuhkan tersusun pada PCB, dilakukan penyolderan sedemikian hingga dihasilkan rakitan siap pengukuran.

Sebagai akhir tahap perwujudan alat adalah mengemas rakitan tersebut dalam kotak akrilik supaya diperoleh hasil karya yang lebih bagus, aman, kuat, praktis, dan memudahkan pengoperasiannya.

#### **D. Pengukuran Performansi Instrumen LED**

Pengukuran performansi instrumen LED meliputi pengukuran terhadap spektrum panjang gelombang LED dan daya penyinaran, serta pengukuran kesesuaian antara lama waktu dan temperatur penyinaran dengan kalibrator.

Pengukuran spektrum panjang gelombang LED dilakukan dengan menggunakan wavelength meter SR 530 Stanford Research System Inc., dengan kalibrator laser He-Ne 543 nm Newport 811. Pengukuran daya penyinaran LED biru menggunakan silicon detektor 818 SL Newport SN 5592 range panjang gelombang 400-1100 nm dengan kalibrator laser He-Ne 543 nm Newport 811 dengan maksimum daya output 5 mW.

Pengukuran waktu penyinaran dilakukan untuk mengukur kesesuaian waktu yang dihitung oleh instrumen sumber cahaya LED dengan kalibrator Enko Sport Timer. Pengukuran temperatur penyinaran dilakukan dengan menggunakan kalibrator termometer *Atech Thermo L87AD*. Data hasil pengukuran durasi waktu, temperatur penyinaran, pengukuran daya dan spektrum panjang gelombang LED pada instrumen LED ditampilkan pada lampiran 1. Hasil pengukuran durasi waktu dan temperatur penyinaran instrumen sumber cahaya LED itu selanjutnya dibandingkan dengan hasil pengukuran waktu dan temperatur pada kalibrator dengan menggunakan kurva regresi. Berdasarkan nilai  $R^2$  dapat diketahui kesesuaian alat pengukur instrumen LED dengan kalibrator.

#### **4.1.2. Analisis Porfirin Endogen Bakteri *Staphylococcus aureus***

##### **4.1.2.1. Bahan dan Alat Penelitian**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, media bakteri berupa *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus Agar*, PBS pH 6,5 dan cawan plastik steril diameter 3,5 cm, kapas, aluminium foil, tissue, ose disposable steril, eppendorf, konikel berbagai ukuran. Bahan kimia untuk preparasi dan elusi HPLC meliputi 0,1 M NH<sub>4</sub>OH, pelarut porfirin (*ethanol, dimethyl sulfoxide, acetic acid, 80:20:1; vol/vol/vol*), *ethanol, 10% acetonitrile v/v dalam methanol* (larutan A) dan 10% *acetonitrile dalam 1M ammonium acetate pH 5*. Standar porfirin berupa *Porphyrin chromatographic marker kit* dan *coproporphirin III*.

Peralatan yang diperlukan antara lain neraca analitik Shimadzu, *Autoclave* Ogawa Seiki, *Water bath, Biological safety cabinet* (laminer), spektrofotometer Pharmacia LKB-Novaspech 2 Biotech, dan HPLC Agilent 1100 series.

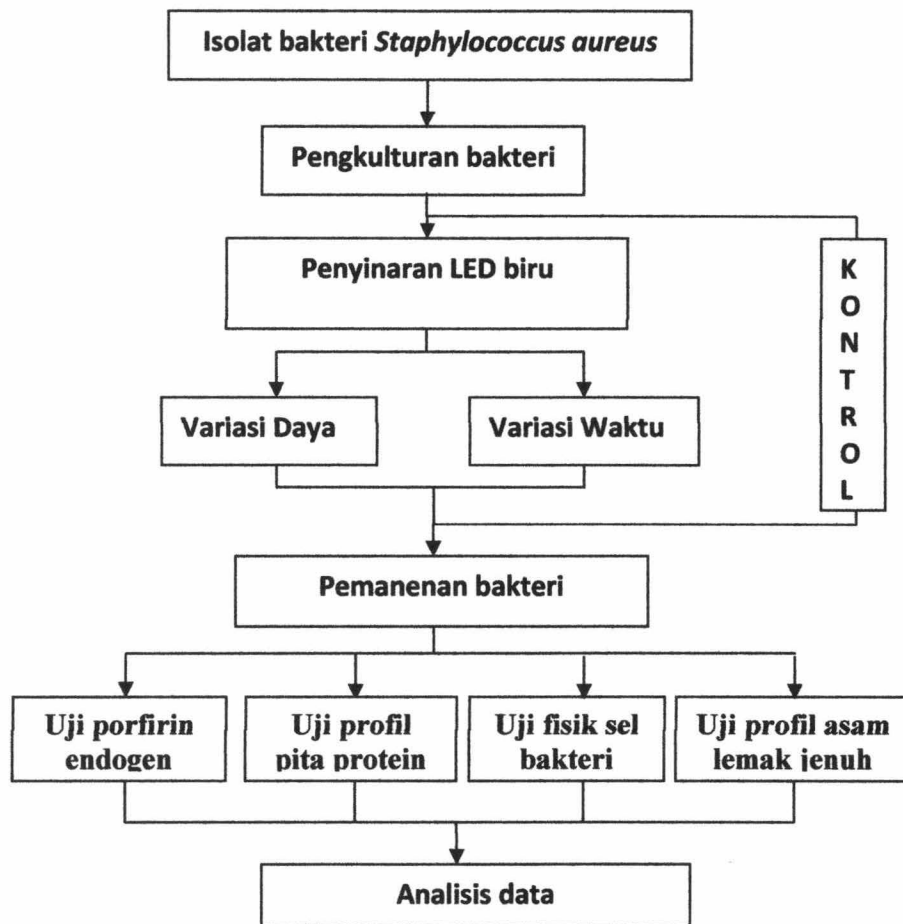
##### **4.1.2.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian pengukuran porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* dilaksanakan di laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Queensland University of Technology Australia pada tahun 2010.

##### **4.1.2.3. Prosedur Kerja**

Prosedur kerja penelitian pengukuran porfirin endogen bakteri dan efek fisik serta kimiawi fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan

penyinaran LED ditunjukkan pada Gambar 4.4. Adapun penjelasannya sebagai berikut:



Gambar 4.4. Prosedur pengukuran porfirin endogen bakteri dan efek fisik serta kimiawi fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan penyinaran LED

Langkah pertama adalah menyiapkan media *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus agar* steril, mengambil isolat dari agar miring dengan ose steril, dimasukkan pada 50 ml media *Nutrient Broth* steril, dihomogenkan dengan pemvortekan sampai diperoleh  $OD_{660\text{ nm}} = 0,20-0,25$  dan diinkubasi pada shaker inkubator temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  sampai di peroleh  $OD_{660\text{ nm}} = 0,46$ . Preparasi porfirin endogen bakteri dengan menggunakan metode Fotinos *et al.* (2008):

1. 50 ml suspensi bakteri  $OD_{660nm} = 0,46$  disentrifugasi 2500 x g selama 10 menit.
2. Pelet diekstraksi dengan 2 ml *larutan ethanol, dimethyl sulfoxide, acetic acid*, 80:20:1; vol/vol/vol.
3. Pemecahan sel bakteri dengan 5 siklus sonikasi masing-masing 5 detik pada temperatur 0°C menggunakan Probe Sonicator (Sonics & Materials Inc.).
4. Sentrifugasi 13,500 x g selama 4 menit, supernatan diambil.
5. Deteksi porfirin dengan HPLC Agilent 1100 series. 1 ml sampel porfirin dipisahkan dengan menggunakan metode Schoenfeld *et al.* (1994), menggunakan kolom LiChro CART@250-4 dan detektor sinar tampak dengan eksitasi 407 nm dan emisi 620 nm. Elusi menggunakan gradien 10% *acetonitrile v/v* dalam *methanol* (larutan A) dan 10% *acetonitrile* dalam 1M *ammonium acetate* pH 5,1 (larutan B). Elusi meliputi 30 menit gradien linear dari 100% B ke 10% B diikuti 12 menit gradien linear dari 35% B ke 10% B, elusi isokratik 5 menit dan penambahan 5 menit untuk kembali ke 100% B pada kecepatan alir 1 ml/menit. Untuk evaluasi digunakan standar *Porfirin Chromatography Marker Kit* (Porfirin Product, Logan UT USA) dan Coproporfirin III.

#### **4.1.3. Pengukuran Potensi Instrumen Sumber Cahaya LED Biru dan Merah Untuk Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen**

##### **4.1.3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan eksperimen murni (*true experiment*) yang dilakukan di laboratorium. Penelitian berupa uji potensi penyinaran sumber cahaya LED biru dan merah untuk fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap

3. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah jenis media pertumbuhan bakteri, lama waktu inkubasi dan jumlah awal sel bakteri yang diukur berdasarkan kerapatan sel bakteri ( $OD=Optical\ Density$ ).

## B. Definisi Operasional Variabel

1. Sumber cahaya LED biru dan merah adalah sumber cahaya dengan spektrum panjang gelombang tertentu, digunakan untuk menyinari bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Persen penurunan jumlah koloni bakteri adalah jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung berdasarkan persamaan:  $|\frac{(\Sigma\ \text{koloni\ perlakuan} - \Sigma\ \text{koloni\ kontrol})}{\Sigma\ \text{koloni\ kontrol}}| \times 100\%$ . Jumlah koloni (CFU/ml) adalah jumlah total koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang dicawakan (TPC=*Total Plate Count*), dihitung dengan menggunakan metode *pour plate*. Dalam teknik ini suspensi bakteri tiap kelompok perlakuan disebar pada media agar, diinkubasi selama 48 jam pada temperatur kamar, dilanjutkan dengan penghitungan koloni bakteri menggunakan *Quebec Colony Counter*, dengan asumsi satu sel bakteri tumbuh menjadi satu koloni bakteri.
3. Media bakteri adalah media untuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berupa media *Nutrient Broth* Pronadisa CAT 1216.00 dan *Staphylococcus Agar* Pronadisa CAT 1032.00.
4. Lama waktu inkubasi adalah durasi waktu inkubasi bakteri pada inkubator temperatur 37°C setelah dilakukan pencawanan.
5. Jumlah awal sel bakteri adalah banyaknya sel bakteri sebelum perlakuan yang diukur berdasarkan kerapatan sel bakterinya (OD).



#### 4.1.3.4. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (hasil pewarnaan Gram pada lampiran 2.2), media bakteri (lampiran 2.4) berupa *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus Agar*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 6,5 dan cawan plastik steril diameter 3,5 cm, kapas, aluminium foil, tissue, ose disposable steril, eppendorf, konikel.

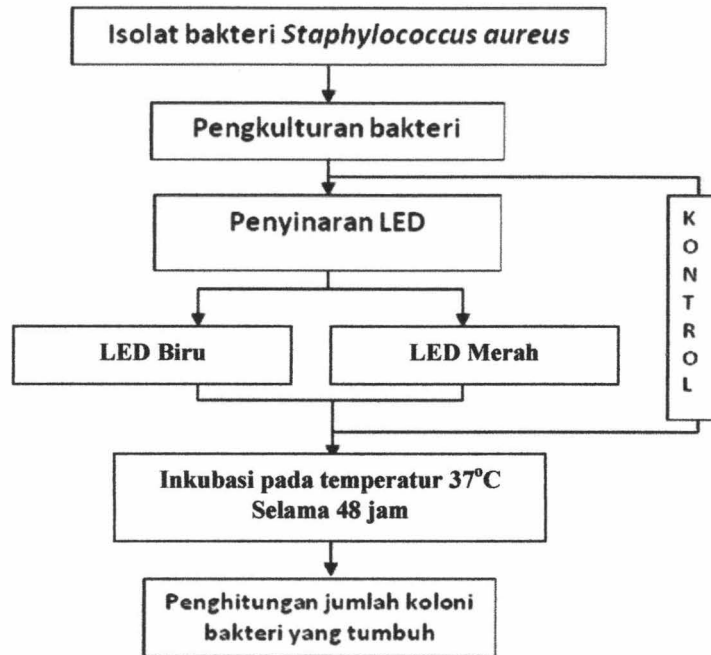
Peralatan yang diperlukan adalah neraca analitik Shimadzu, *Autoclave* Ogawa Seiki, *Water bath*, *Biological safety cabinet* (laminer), spektrofotometer Pharmacia LKB-Novaspech 2 Biotech, Stuart Scientific *Colony counter*, inkubator, cawan petri, *breaker glass*, pipet, tabung reaksi, gelas ukur, bunsen, inkubator dan shaker inkubator, vortek dan seperangkat instrumen sumber cahaya LED untuk penyinaran.

#### 4.1.3.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian uji potensi penyinaran LED biru dan merah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada tahun 2010.

#### 4.1.3.6. Prosedur Kerja

Prosedur kerja untuk uji potensi fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan penyinaran LED ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 . Prosedur kerja penelitian uji potensi penyinaran LED biru dan merah untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen secara in vitro

Penjelasan prosedur penelitian:

#### A. Perhitungan Jumlah Awal Bakteri.

Jumlah sel awal bakteri dapat diketahui secara tidak langsung dengan mengukur nilai absorbansi (OD) kultur *Staphylococcus aureus* melalui pengenceran bertingkat, selanjutnya pada masing-masing pengenceran dihitung jumlah sel bakteri dengan menggunakan *Haemocytometer*. Kurva standar sel (lampiran 2.3) dibuat dengan memasukkan nilai absorbansi pada masing-masing pengenceran pada sumbu x dan jumlah sel bakteri dimasukkan pada sumbu y, sehingga diperoleh grafik linier  $y=a+bx$  dengan b menunjukkan *slope*/kemiringan dari kurva regresi. Dengan asumsi bahwa satu bakteri akan tumbuh menjadi satu koloni, maka jumlah awal bakteri dapat diketahui berdasarkan nilai absorbansinya

dengan mengplotkan pada kurva regresi atau melalui persamaan regresi linier kurva standar sel.

### **B. Pengkulturan bakteri**

1. Menyiapkan media *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus agar* steril.
2. Mengambil isolat dari agar miring dengan ose steril, dimasukkan pada 50 ml media *Nutrient Broth* steril dihomogenkan dengan pemvortekan sampai diperoleh  $OD_{660nm} = 0,20-0,25$  dan diinkubasi pada shaker inkubator temperatur  $37^{\circ}C$  sampai di peroleh  $OD_{660nm} = 0,46$ .
3. 1 ml suspensi bakteri diencerkan 50 kali dengan larutan 0,1 M PBS steril pH 6,5. Mengambil 1 ml suspensi dimasukkan dalam cawan plastik steril diameter 3,5 cm.
4. Sampel siap untuk disinari.

### **C. Penyinaran Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Menggunakan LED Biru dan Merah**

Penyinaran LED biru dan merah dilakukan pada daya PWM 75% dan lama waktu penyinaran 30 menit, disertai kelompok kontrol tanpa penyinaran. Selanjutnya seluruh kelompok bakteri diinkubasi pada temperatur  $37^{\circ}C$  dalam inkubator selama 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dan hasilnya dianalisis. Perlakuan penyinaran yang memiliki potensi fotoinaktivasi terbesar selanjutnya digunakan pada penelitian fase dua yaitu menentukan dosis energi penyinaran yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan karakterisasi fotoinaktivasi secara fisik dan kimiawi.

## 4.2. Penelitian fase II

Penelitian fase II meliputi dua macam penelitian yaitu: (1) Optimasi dosis energi penyinaran LED biru untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen secara in vitro (2) Analisis endogen porfirin bakteri *Staphylococcus aureus* dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), Spektrofotometer UV-Visible dan fluoresense serta pengukuran karakteristik fisik dan kimiawi fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen secara in vitro.

### 4.2.1. Optimasi Dosis Energi Penyinaran LED untuk Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Porfirin Endogen Secara In Vitro

#### 4.2.1.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni yang dilaksanakan di laboratorium. Penelitian disusun menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor, faktor A (daya penyinaran) dengan 5 taraf yaitu PWM (25%, 50%, 75% dan 100%) dan faktor B (lama waktu penyinaran) dengan 5 taraf yaitu (10, 20, 30, 40 dan 50) menit sehingga didapat  $5 \times 4 = 20$  kombinasi perlakuan.

#### 4.2.1.2. Unit Eksperimen dan Replikasi

Sampel berupa kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan penentuan jumlah replikasi menggunakan rumus Federer (Kusriningrum, 2008):  $(t-1)(r-1) \geq 15$ . Jumlah kelompok perlakuan pada penelitian ini sebanyak dua puluh, sehingga replikasi yang diperlukan sebanyak dua kali, tetapi ulangan dua

terlalu banyak risiko seperti bila gagal maka hasil percobaan tidak dapat dianalisis selanjutnya, maka pada penelitian tahap ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pada waktu yang sama.

#### 4.2.1.3. Variabel Penelitian

##### A. Klasifikasi Variabel

Variabel penelitian pada penelitian tahap dua ini dibedakan menjadi:

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah daya PWM sumber cahaya LED dan durasi waktu penyinaran.
2. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah persen penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh.
3. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah jenis media pertumbuhan bakteri, lama waktu inkubasi dan jumlah awal sel bakteri yang diukur berdasarkan kerapatan jumlah sel (*optical density*).

##### B. Definisi Operasional Variabel

1. Rapat energi penyinaran LED ( $J/cm^2$ ) adalah besarnya rapat daya sumber cahaya LED ( $mW/cm^2$ ) dikalikan durasi waktu penyinaran (menit).
2. Dosis optimal fotoinaktivasi adalah dosis energi penyinaran LED yang optimal menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri.
3. Persen penurunan jumlah koloni bakteri adalah jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung berdasarkan persamaan:  $|\frac{(\sum \text{koloni perlakuan} - \sum \text{koloni kontrol})}{\sum \text{koloni kontrol}}| \times 100\%$ .

#### 4.2.1.4. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, media bakteri berupa *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus Agar*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 6,5 dan cawan plastik steril diameter 3,5 cm, kapas, aluminium foil, tissue, ose disposable steril, eppendorf, konikel berbagai ukuran.

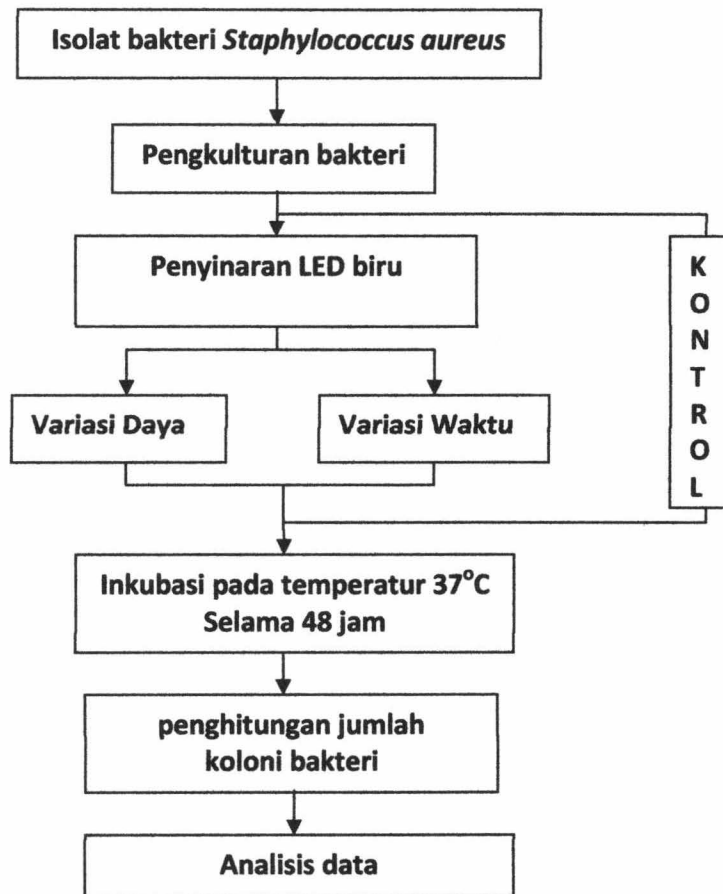
Peralatan yang diperlukan adalah neraca analitik Shimadzu, *Autoclave* Ogawa Seiki, *Water bath*, *Biological safety cabinet* (laminer), spektrofotometer Pharmacia LKB-Novaspech 2 Biotech, Stuart Scientific *Colony counter*, inkubator, cawan petri, *breaker glass*, pipet, tabung reaksi, gelas ukur, bunsen, inkubator dan shaker inkubator, vortek dan seperangkat instrumen sumber cahaya LED untuk penyinaran.

#### 4.2.1.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian optimasi dosis energi penyinaran LED dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada tahun 2010.

#### 4.2.1.6. Prosedur Kerja

Prosedur kerja untuk menentukan dosis optimal fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan penyinaran LED sesuai dengan tujuan penelitian, ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Prosedur penentuan dosis optimal fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan penyinaran LED

Penjelasan prosedur penelitian:

1. Menyiapkan media *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus agar* steril.
2. Mengambil isolat dari agar miring dengan ose steril, dimasukkan pada 50 ml media *Nutrient Broth* steril, dihomogenkan dengan pemvortekan sampai diperoleh  $OD_{660nm} = 0,20-0,25$  dan diinkubasi pada shaker inkubator temperatur  $37^{\circ}C$  sampai di peroleh  $OD_{660nm} = 0,46$ .
3. 1 ml suspensi bakteri diencerkan 50 kali dengan larutan 0,1 M PBS steril pH 6,5. Mengambil 1 ml suspensi dimasukkan dalam cawan plastik steril diameter 3,5 cm.

satu faktor yaitu warna sumber cahaya LED, sedangkan perlakuan berupa penyinaran menggunakan sumber cahaya LED biru dan merah.

#### 4.1.3.2. Unit Eksperimen dan Replikasi

Unit eksperimen dalam penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (sertifikat di lampiran 2.1). Banyaknya replikasi ( $r$ ) untuk tiap kelompok perlakuan ( $t$ ) ditentukan berdasarkan rumus Federer (Kusriningrum, 2008). Pada penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap satu faktor yaitu warna sumber cahaya LED dengan rumus penentuan jumlah replikasi adalah:  $(t-1)(r-1) \geq 15$ . Jumlah kelompok perlakuan pada penelitian ini sebanyak 2 buah, sehingga replikasi yang diperlukan sebanyak enam belas kali. Dalam penelitian ini dilakukan replikasi sebanyak dua puluh kali untuk setiap perlakuan.

#### 4.1.3.3. Variabel Penelitian

##### A. Klasifikasi Variabel

Variabel penelitian pada penelitian tahap dua ini dibedakan menjadi:

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah penyinaran dengan menggunakan sumber cahaya LED biru dan merah.
2. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah persen penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh.



4. Sampel siap untuk disinari.
5. Cawan petri yang berisi bakteri diletakkan pada holder di dalam kotak akrilik di atas platform motor servo yang dilengkapi sensor temperatur untuk mengontrol temperatur agar stabil pada 37°C. Jarak antara LED dengan cawan 2 cm.
6. Optimasi dosis energi penyinaran dilakukan pada variasi daya PWM penyinaran 25%, 50%, 75% dan 100% dan variasi lama waktu penyinaran (10, 20, 30, 40 dan 50) menit, sehingga terdapat 20 kombinasi perlakuan. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan.
7. Setelah selesai satu sesi penyinaran dengan daya dan lama waktu penyinaran sesuai yang dikehendaki, lampu LED otomatis padam, instrumen LED off. Sampel dikeluarkan dari holder.
8. Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah disinari selanjutnya ditumbuhkan pada media *Staphylococcus Agar* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam.
9. Sampel dikeluarkan dari inkubator dan dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan metode pencawanan (TPC) menggunakan *Quebec Colony Counter*.

#### **4.2.2. Pengaruh Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal Terhadap Karakteristik Fotoaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Porfirin Endogen Secara Fisik dan Kimiawi**

##### **4.2.2.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni yang dilaksanakan di laboratorium, meliputi penelitian karakteristik fisik dan kimiawi bakteri

*Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen pada penyinaran LED biru dosis energi optimal.

Penelitian karakteristik kimiawi asam lemak jenuh bakteri *Staphylococcus aureus* disusun menggunakan rancangan acak lengkap untuk mengetahui pengaruh penyinaran LED biru pada daya PWM 0% dan 75% terhadap konsentrasi asam lemak jenuh miristat, palmitat dan laurat. Pada penelitian karakteristik kimiawi pada profil pita protein serta karakteristik fisik dinding sel bakteri merupakan penelitian dengan analisis kualitatif.

#### **4.2.2.2. Unit Eksperimen dan Replikasi**

Sampel berupa kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Replikasi pada penelitian ini sebanyak tiga kali.

#### **4.2.2.3. Variabel Penelitian**

##### **A. Klasifikasi Variabel**

Variabel penelitian pada penelitian tahap dua ini dibedakan menjadi:

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah perlakuan penyinaran LED dengan dosis energi optimal.
2. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah perubahan kimiawi yang terjadi pada asam lemak jenuh dan profil pita protein serta perubahan bentuk dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel kendali pada penelitian ini adalah jenis media pertumbuhan bakteri, lama waktu inkubasi dan jumlah awal sel bakteri yang diukur berdasarkan kerapatan jumlah sel (OD).

## B. Definisi Operasional Variabel

1. Dosis energi optimal ( $J/cm^2$ ) adalah dosis energi penyinaran pada daya PWM 75% dan durasi waktu penyinaran 30 menit yang menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri terbesar.
2. Perubahan profil asam lemak jenuh diukur berdasarkan persen luas area kromatogram asam lemak bakteri adalah persen luas area puncak kromatogram asam lemak bakteri dengan tiga standar asam lemak jenuh (palmitat, miristat dan laurat), diukur menggunakan *Gas Chromatography* (GC).
3. Perubahan profil pita protein dinyatakan dalam jajaran pita protein yang terseparasi berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan teknik elektroforesis gel poli akrilamid (SDS-PAGE = *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), yaitu salah satu metode karakterisasi protein berdasarkan berat molekulnya. Protein dengan berat molekul besar (mobilitas rendah) bergerak pada jarak yang lebih rendah, sedang protein dengan berat molekul kecil (mobilitas tinggi) bergerak pada jarak yang lebih jauh.
4. Perubahan fisik sel bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dari *Image Scanning Microscope Electron* (SEM) yaitu gambar visual hasil analisis permukaan suatu obyek menggunakan mikroskop elektron perbesaran 7000X.

### 4.2.2.4. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, media bakteri berupa *Nutrient Broth* dan

*Staphylococcus Agar*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 6.5, cawan plastik steril diameter 3.5 cm, kapas, aluminium foil, tissue, ose disposable steril, eppendorf, konikel berbagai ukuran. Bahan kimia untuk preparasi asam lemak bakteri yaitu hexane, NaOH, BF<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl. Standar asam lemak jenuh miristat 510 ppm, palmitat 500 ppm, laurat 503 ppm. Bahan untuk elektroforesis: *Stacking gel*, *separating gel*, *running buffer*, larutan *staining* dan *destaining*.

Peralatan yang diperlukan antara lain untuk kultur, perlakuan dan penghitungan koloni bakteri: neraca analitik Shimadzu, *Autoclave* Ogawa Seiki, *Water bath*, *Biological safety cabinet* (laminer), spektrofotometer Pharmacia LKB-Novaspech 2 Biotech, Stuart Scientific *Colony counter*, inkubator, cawan petri, *breaker glass*, pipet, tabung reaksi, gelas ukur, bunsen, inkubator dan shaker inkubator, vortek dan seperangkat instrumen sumber cahaya LED untuk penyinaran. Seperangkat peralatan elektroforesis gel poliakrilamid, Seperangkat peralatan SEM tipe JSM T-100 Jeol Scanning Microscope, dan GC tipe Agilent 6890 Plus GC version A.03.08

#### 4.2.2.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian pengukuran asam lemak dilakukan di laboratorium Analisis Kimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, penelitian uji profil pita protein bakteri dengan elektroforesis dilaksanakan di laboratorium Rekayasa Tumbuhan di Fakultas Saintek Universitas Airlangga dan penelitian fisik bakteri dengan SEM dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Keseluruhan penelitian dilaksanakan pada tahun 2010.

#### 4.2.2.6. Prosedur Kerja

Prosedur kerja penelitian pengukuran porfirin endogen bakteri dan efek fisik serta kimiawi fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan penyinaran LED ditunjukkan pada Gambar 4.4. Penjelasan prosedur penelitian: Langkah pertama adalah menyiapkan media *Nutrient Broth* dan *Staphylococcus agar* steril, mengambil isolat dari agar miring dengan ose steril, dimasukkan pada 150 ml media *Nutrient Broth* steril dan dihomogenkan dengan pemvortekan sampai diperoleh  $OD_{660} = 0,20-0,25$  serta diinkubasi pada shaker inkubator temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  sampai di peroleh  $OD_{660} = 0,46$ . Suspensi bakteri dibagi dalam 3 bagian masing-masing 50 ml. Prosedur penelitian yang dilakukan pada tiap bagian adalah sebagai berikut:

##### **A. Analisis Perubahan Profil Pita Protein Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal**

Analisis profil pita protein bakteri menggunakan SDS-PAGE, yaitu salah satu metode karakterisasi protein berdasarkan berat molekulnya. Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik, dengan kecepatan gerak bergantung pada bentuk dan ukuran molekul. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makro molekul seperti protein dan asam nukleat (Rosenberg, 1996). Tahapan penelitian ini sebagai berikut:

1. Preparasi protein menggunakan metode Pourkomainin (1998):
  - a. 50 ml suspensi bakteri  $OD_{660\text{nm}} = 0.46$ .

- b. Pemanenan bakteri dilakukan dengan sentrifugasi 4°C pada putaran 10.000 rpm selama 1 menit.
  - c. Sel dicuci dengan 50 ml dari 20 mmol/l Tris HCl pH 7.1, pelet diresuspensi dengan 6 ml dari 20 mmol/l Tris HCl EDTA (0.372%) pH 7.1
  - d. Pemecahan sel bakteri dilakukan menggunakan teknik sonikasi 7 x 25 detik dengan 45 detik istirahat.
  - e. Sentrifugasi pada temperatur 4°C putaran 18000 rpm selama 30 menit. Pelet yang merupakan membran protein diambil, supernatan disimpan pada temperatur -20°C.
  - f. Pengukuran konsentrasi protein dengan metode Biuret (Skogg, 2004). Masing-masing sampel dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan 3 ml pereaksi Biuret (Pereaksi Biuret: *Copper sulfate pentahydrate* sebanyak 3 g dan *sodium-potassium tartrate* sebanyak 9 g dilarutkan dalam 500 ml 0.2 NaOH yang mengandung 5 g *potassium iodide*, setelah larut ditambah aquades sampai volume 1000 ml). Sampel protein 1000 µl (10 µl sampel dilarutkan dalam 990 µl NaCl 0,9 %) dimasukkan dalam tabung reaksi. Untuk blanko diisi dengan 1000 µl NaCl 0,9 %. Setelah pemvortekan, diinkubasi dengan temperatur kamar selama 30 menit dan diukur nilai absorbansinya dengan spektroskopi UV-Vis pada  $\lambda = 500$  nm. Berdasarkan nilai absorbansi dapat dihitung kadar protein masing-masing sampel dengan bantuan persamaan garis linier dari kurva standar kadar protein.
2. Tahapan elektroforesis (Rosenberg, 1996) adalah sebagai berikut:

- a. Persiapan sampel. Sampel protein ditambah dengan sampel buffer dengan perbandingan 1:1 dalam tabung eppendorf, dan dipanaskan pada 100°C selama 5 menit, dan dibiarkan dingin.
- b. Persiapan *separating* dan *stacking gel* (Bollag, 1991). Langkah pertama adalah merangkai 2 plat kaca berjarak kurang lebih 1 mm. Pembuatan *separating gel* 12,5 % (3,125 ml stok poli akrilamid dan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8 dalam kondisi tabung ditutup dan digoyang. Aquabides 1,505 ml, 75 µl SDS 10%, 75 µl APS 10%, 6,25 µl TEMED) dimasukkan dengan cara yang sama. Larutan dituang dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml sampai batas plate, dipasang sisir untuk membuat sumuran dalam *stacking gel* dan ditambah aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit, air yang menutup *separating* dibuang. Membuat *stacking gel* 3% (30% akrilamid-bis 0,45 ml, 1 M Tris pH 6.8 0,38 ml, aquabides 2,11 ml, 10% SDS 30 µl, TEMED 5 µl dan 10% APS 30 µl) dengan cara yang sama dengan pembuatan *separating gel*.
- c. Memasukkan sampel pada sumur gel. Plate yang telah berisi gel dimasukkan dalam chamber elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- d. *Running*. Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan power supply. Anoda dihubungkan dengan reservoir atas (*upper reservoir*) dan katoda dihubungkan dengan reservoir bawah (*lower reservoir*). *Running* dilakukan dengan arus konstan 20 mA, 150 Volt selama kurang lebih 40-

50 menit atau telah sampai  $\pm 0,5$  cm dari dasar gel. Setelah selesai *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*.

3. Tahap pewarnaan gel. Pewarnaan dapat dilakukan dengan menggunakan *Comassie blue* yang dapat mendeteksi 1-10  $\mu\text{g}$  protein dalam satu band, sedang untuk mendeteksi protein dengan kadar yang sangat kecil (10-100 ng) menggunakan pewarnaan perak nitrat yang 100 kali lebih peka. Untuk tahap ini diperlukan larutan *staining* untuk mewarnai protein pada gel dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas band protein yang terbentuk. Pewarnaan dengan *Coomassie brilliant blue* (CBB):
  - a. mempersiapkan larutan *staining* (*Coomassie Blue* R-250 1 g, methanol 450 ml, aquades 450 ml, asam asetat glasial 100 ml) dan larutan *destaining* (methanol 100 ml, asam asetat glasial 100 ml dan aquades 800 ml).
  - b. Gel direndam dalam 20 ml larutan *staining* sambil digoyang dalam shaker putaran lambat selama kurang lebih 15 menit dan larutan *staining* diambil.
  - c. Setelah dicuci berulang kali dengan air, gel direndam dalam 50 ml larutan *destaining* sambil digoyang dengan shaker putaran lambat selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita-pita protein dengan berat molekul yang berbeda-beda terlihat jelas.
4. Penentuan berat molekul protein. Berat molekul protein dapat ditentukan dengan mengukur mobilitas protein dalam gel poli akrilamid, berdasarkan kurva standar berat molekul dari protein standar (marker). Prosedur penentuan berat molekul adalah:
  - a. *Mobilitas rate* ( $M_r$  atau  $R_f$ ) diukur dengan menggunakan persamaan:  $R_f = \frac{\text{jarak pergerakan pita protein}}{\text{jarak pergerakan warna}}$



- pelacak dari tempat awal. Protein dengan berat molekul tertentu memiliki  $R_f$  tertentu.
- b. Nilai  $R_f$  dimasukkan sebagai sumbu x dalam persamaan garis linier  $y = a + bx$ , dengan sumbu y adalah berat molekul standar, sehingga diperoleh kurva standar mobilitas relatif ( $R_f$ ) terhadap berat molekul protein marker.
  - c. Berat molekul protein dapat diketahui dengan mengplotkan secara langsung pada kurva standar berat molekul. Dengan membandingkan profil pita protein kelompok perlakuan dengan kontrol dapat diketahui protein dengan berat molekul tertentu yang terdegradasi akibat penyinaran LED biru ( $430 \pm 4$ ) nm.

### **C. Analisis Perubahan Profil Asam Lemak Jenuh Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal**

Pada penelitian ini analisis profil asam lemak jenuh bakteri menggunakan kromatografi gas (*Gas Chromatography*) Agilent 6890 Plus GC Version A.0308 dengan metode *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME-ULP), pelarut hexane dan tiga standar asam lemak jenuh yaitu miristat 510 ppm, palmitat 500 ppm dan laurat 503 ppm. Tiga standar asam lemak jenuh masing-masing diambil 2 ml dan dipekatkan dengan dialiri gas  $N_2$  untuk meningkatkan konsentrasi asam lemak. Tahapan preparasi sampel adalah sebagai berikut (White & Frerman, 1967):

1. Menumbuhkan 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus* untuk tiap 100 ml media *Nutrient Broth* steril dan diinkubasi selama 18 jam pada shaker inkubator temperatur  $37^\circ C$ . Kultur di buat pada 5 x 100 ml media *Nutrient Broth*, untuk 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Pemanenan dilakukan

sentrifugasi dingin, selanjutnya pelet bakteri tiap kelompok diresuspensi dengan 5 ml garam fisiologis.

2. Sampel bakteri kelompok perlakuan disinari dengan LED pada berbagai daya PWM masing-masing dengan waktu penyinaran 30 menit. Setelah perlakuan penyinaran, dilakukan sentrifugasi dingin untuk mendapatkan pelet bakteri.
3. Pelet ditimbang untuk mendapatkan berat sampel yang sama.
4. Sampel dan standar diresuspensi dan divortek dengan penambahan 1.5 ml NaOH 0,5 dan dipanaskan dalam water bath suhu 90° selama 10 menit dan didinginkan.
5. Penambahan 2 ml BF<sub>3</sub> dalam methanol dan dipanaskan dalam water bath suhu 80-90°C selama 10 menit dan didinginkan.
6. Sampel dan standar diekstraksi dengan 1 ml hexane dan disentrifugasi, fase hexane diambil.
7. Fase hexane dicuci dengan 2 ml NH<sub>4</sub>Cl, disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit, fase hexane diambil.
8. Membuat larutan standar campuran dari 500 µl masing-masing larutan standar sehingga jumlah volum 1500 µl. Selanjutnya dilakukan pemekatan dengan dialiri N<sub>2</sub> sampai volum 500 µl.
9. Membuat larutan standar dengan 300 µl hexane dan 10 µl larutan standar
10. Kontrol dibuat dari 300 µl larutan kontrol (tanpa perlakuan penyinaran) dicampurkan dengan 10 µl larutan standar.
11. Sampel dibuat dari 300 µl larutan sampel (setelah dilakukan penyinaran LED biru dosis optimal) dicampurkan dengan 10 µl larutan standar
11. Sampel dan standar siap *dirunning* dengan GC.

#### **D. Analisis Perubahan Fisik Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal**

Pengukuran fisik fotoinaktivasi dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscop*) tipe JSM T-160 Jeol Scanning Microscope. Sebelum dilakukan *scanning* dengan SEM, terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel bakteri sebagai berikut:

1. Pelet bakteri baik kelompok kontrol maupun perlakuan dimasukkan dalam larutan fiksasi *glutaraldehyde* 2% selama 2-3 jam, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan rendah 15 menit suhu 4°C.
2. Bakteri dicuci dengan larutan buffer fosfat pH 7,4 selama 5 menit dan diulang 3 kali dan selanjutnya di sentrifugasi kecepatan rendah selama 15 menit 4°C.
3. Fiksasi dengan larutan *osmic acid* 1% selama 1-2 jam dan disentrifugasi dengan kecepatan rendah selama 15 menit suhu 4°C.
4. Pencucian dengan larutan *phosphate* pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.
5. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat 30%, 50% dan 70% masing-masing selama 15-20 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan rendah selama 15 menit suhu 4°C.
6. Dehidrasi dengan alkohol 80%, 90% dan larutan absolut 2 kali selama 15 menit, disentrifugasi dengan kecepatan rendah selama 15 menit suhu ruang.
7. Pengawetan dengan *amyl acetate absolut* sambil menunggu pengeringan
8. Bakteri dipipet dengan pipet Pasteur dan diteteskan pada obyek gelas dengan luas 16 mm<sup>2</sup> yang telah dibersihkan dengan alkohol.
9. Pengeringan sampel dengan *Critical Point Drying* (CPD).
10. Penempelan sampel pada stub (holder) dengan menggunakan lem khusus

11. Pelapisan dengan emas murni atau karbon menggunakan vacuum evaporator.
12. Pemotretan dengan SEM pada perbesaran yang dipilih.

#### 4.3. Analisis Statistik

Analisis data penelitian menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Package For Social Science*) *Window Release* 14.0. Uji statistik yang digunakan:

1. Pada penelitian fase I tentang kinerja instrumen LED digunakan analisis regresi linear sederhana untuk menguji kesesuaian antara alat pengukur temperatur dan durasi waktu penyinaran dengan kalibrator. Pada penelitian potensi fotoinaktivasi penyinaran sumber cahaya LED biru dan merah pada bakteri *Staphylococcus aureus*, menggunakan uji t dua sampel bebas, untuk mengetahui perbedaan penyinaran dengan sumber cahaya LED biru dan merah.
2. Pada penelitian fase II tentang optimasi dosis energi penyinaran sumber cahaya LED menggunakan uji anava faktorial untuk mengetahui pengaruh masing-masing faktor dan interaksi antar faktor. Uji anava satu arah digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Untuk melihat pasangan kelompok perlakuan mana yang berbeda maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda. Pada SPSS menggunakan *Multiple Comparison* metode Tukey.
3. Pada penelitian fase II tentang karakteristik kimiawi asam lemak jenuh bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan uji manova Hotteling's trace, untuk mengetahui pengaruh penyinaran sumber cahaya LED biru dosis energi optimal pada asam lemak jenuh bakteri.

# **BAB V HASIL DAN ANALISIS DATA**

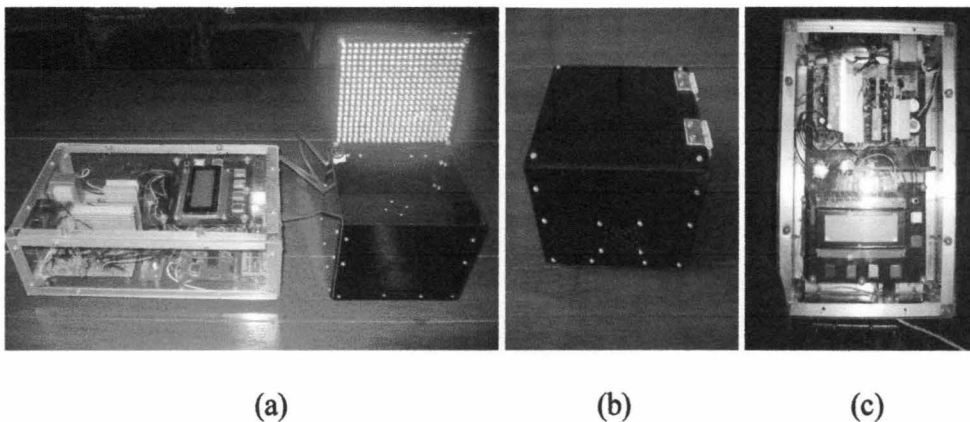
## BAB V

### HASIL DAN ANALISIS DATA

#### 5.1. Penelitian Fase I.

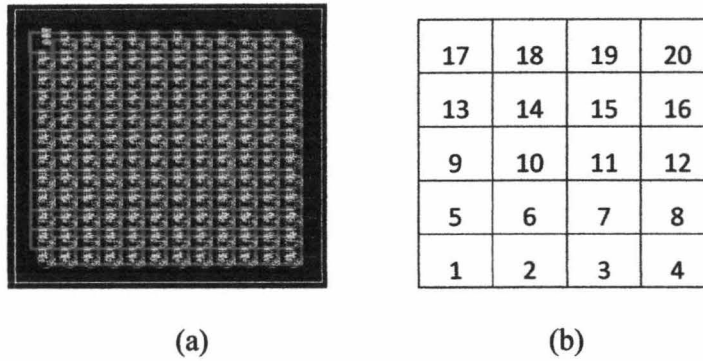
##### 5.1.1. Pengukuran Performansi Instrumen Sumber Cahaya LED

Instrumen LED untuk penyinaran hasil rakitan dilengkapi dengan rangkaian sumber cahaya LED biru dan merah *super bright* produk lokal dengan spesifikasi arus 15 mA, tegangan tiap LED 3-5 V dan hambatan 330 $\Omega$ . Rangkaian LED terdiri dari 20 x 18 buah LED, dengan puncak emisi rata-rata dari 30 kali pengukuran adalah (430,05  $\pm$  0,13) nm dan (629,03  $\pm$  0,18) nm serta bandwidth 65 nm dan 30 nm yang diukur menggunakan Wavelength Meter SR 530 Stanford Research System Inc, kalibrator He-Ne laser 543 nm Newport 811. Hasil pengukuran performansi sumber cahaya LED terdapat pada lampiran 1. Instrumen sumber cahaya LED hasil rakitan ditunjukkan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. (a) Rangkaian instrumen LED, (b) holder tempat sampel, (c) rangkaian elektronika instrumen LED

Pada pengukuran distribusi rapat daya, rangkaian LED dibagi menjadi 20 sel. Rangkaian resistor, LED dan pembagian sel-sel ditunjukkan oleh Gambar 5.2:



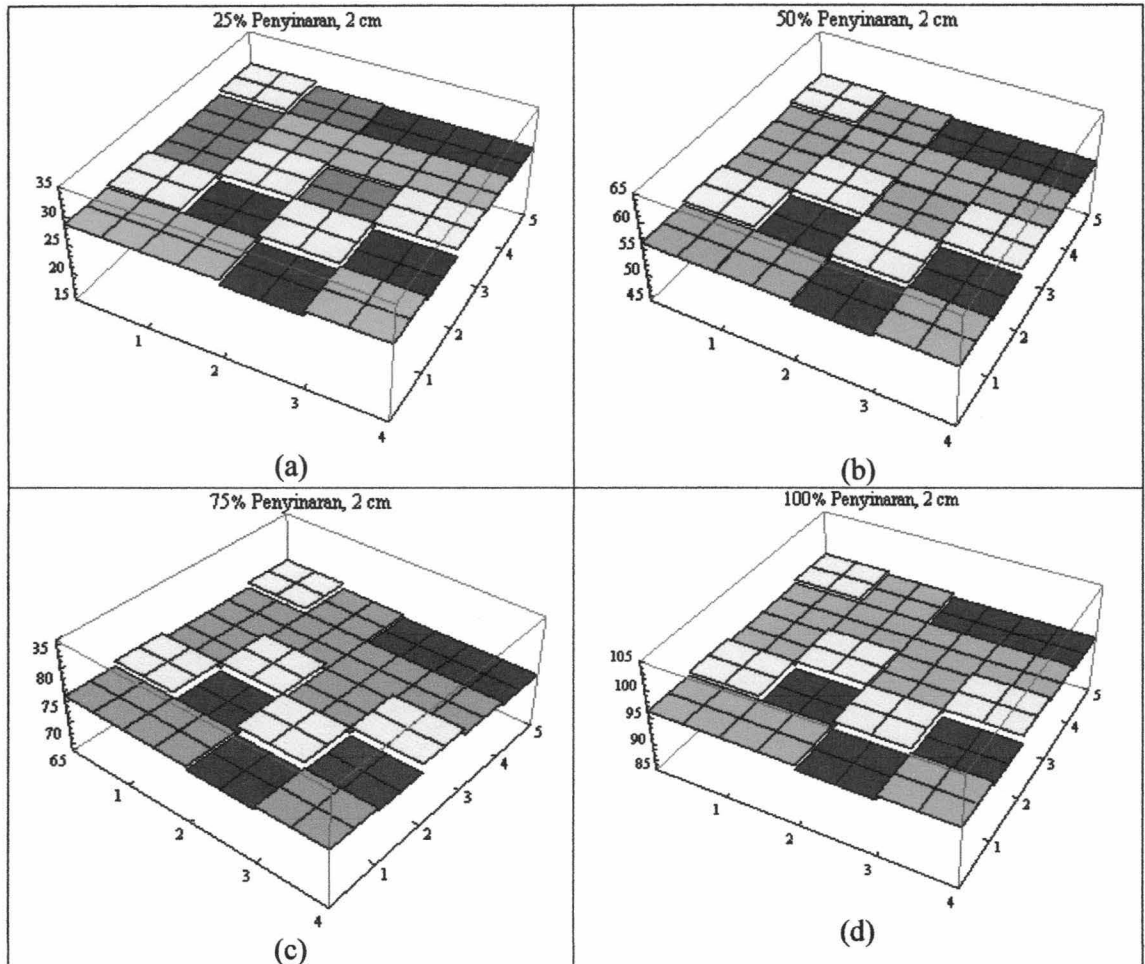
Gambar 5.2. (a) Rangkaian LED, (b) Urutan pembagian sel-sel pada plat rangkaian LED

Pada penelitian ini masing-masing sel diukur rapat dayanya dengan alat ukur Silicon detector 818 SL Newport SN 5592 range panjang gelombang 400-1100 nm dengan kalibrator He-Ne laser 543 nm Newport 811 pada berbagai *Pulse Width Modulation* (PWM) sebanyak 100 kali pengukuran dengan jarak pengukuran 2, 3, 4 dan 5 cm dari sumber cahaya LED. Hasil pengukuran daya penyinaran instrumen sumber cahaya LED pada berbagai *Pulse Width Modulation* (PWM) dan jarak penyinaran ditunjukkan oleh Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Distribusi rapat daya LED biru 430 nm daya *Power Width Modulation* (PWM) 25%, 50%, 75% dan 100% pada plat holder

Jarak Penyinaran	Rapat daya rata-rata ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ )							
	PWM 25%	% error	PWM 50%	% error	PWM 75%	% error	PWM 100%	% error
5 cm	$28,04 \pm 0,49$	1,75	$56,00 \pm 0,59$	1,00	$75,07 \pm 0,68$	0,91	$96,00 \pm 0,72$	0,75
4 cm	$28,15 \pm 0,48$	1,71	$56,04 \pm 0,55$	0,98	$75,12 \pm 0,62$	0,83	$96,01 \pm 0,67$	0,70
3 cm	$28,25 \pm 0,47$	1,67	$56,06 \pm 0,50$	0,89	$75,22 \pm 0,58$	0,77	$96,02 \pm 0,61$	0,64
2 cm	$28,39 \pm 0,47$	1,66	$56,12 \pm 0,49$	0,87	$75,27 \pm 0,57$	0,76	$96,06 \pm 0,58$	0,60
Rerata		1,70		0,94		0,82		0,67

Distribusi rapat daya yang terukur di plat holder pada jarak penyinaran 2 cm dengan berbagai nilai PWM dengan menggunakan program Wolfram Mathematica 7.0 ditunjukkan oleh Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Distribusi rapat daya pada plat holder jarak penyinaran 2 cm dengan *Power Width Modulation* (PWM) (a) 25%, (b) 50%, (c) 75% dan (d) 100%.

Gambar 5.3 menunjukkan pola distribusi rapat daya penyinaran LED pada plat holder sampel dengan jarak 2 cm dari LED. Perbedaan warna menunjukkan adanya perbedaan besarnya rapat daya penyinaran terkait dengan kualitas LED yang digunakan. Pengukuran rapat daya pada berbagai daya PWM dengan jarak



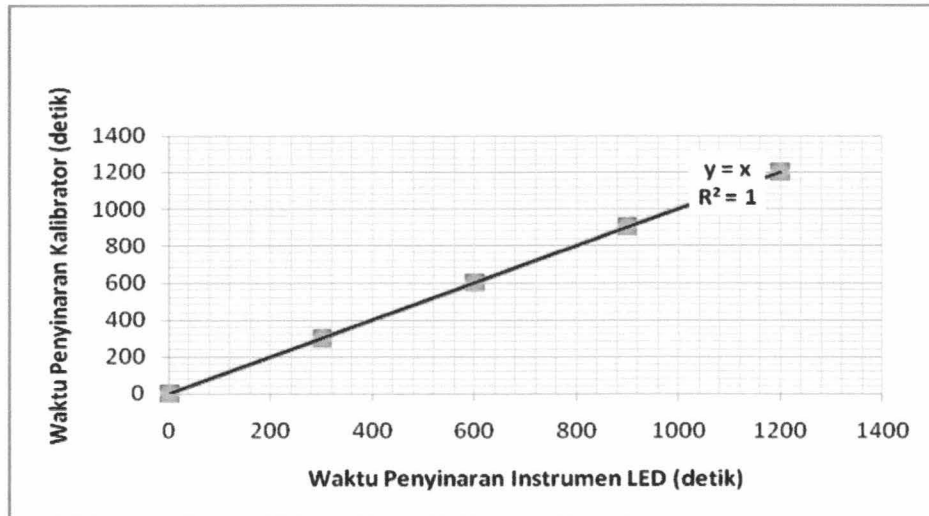
penyinaran sama menunjukkan adanya kekonsistenan pola distribusi rapat daya penyinarannya. Pada penelitian, adanya perbedaan besarnya rapat daya penyinaran ini dapat diatasi dengan memutar plat holder sampel menggunakan motor servo putaran rendah dengan kecepatan 0,73 cm/detik agar tiap sampel mendapatkan rapat daya penyinaran yang sama (Johansen *et al.*, 2003). Data dan analisis statistik pengaruh putaran terhadap pertumbuhan koloni bakteri ditunjukkan pada lampiran 3.1 dan 3.2. Ringkasan hasil uji statistik ditunjukkan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil uji t dua sampel bebas untuk mengetahui perbedaan pengaruh putaran terhadap pertumbuhan koloni bakteri

Kelompok	N	Persen Penurunan Koloni Bakteri (%)		Uji t	
		Rerata	SD	Signifikansi	Kesimpulan
Tanpa Putaran	20	231,40	8,88	p=0,943	Tidak ada beda bermakna
Dengan Putaran	20	231,60	8,65		
Total	40	231,50	24,32		

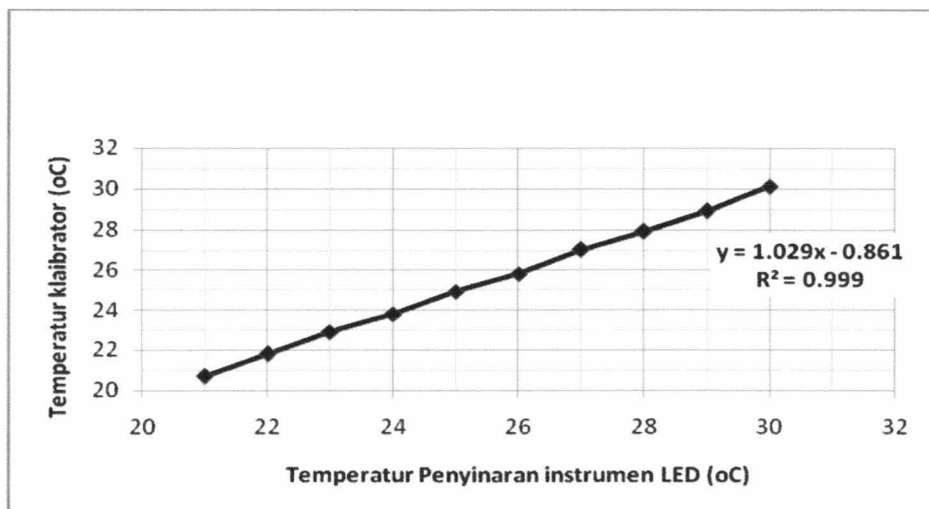
Pada output *Independent Samples t Test* menunjukkan bahwa data persentase penurunan jumlah koloni bakteri memiliki distribusi normal dan variansi homogen yang ditunjukkan pada *Levene's test for equality of variances* (uji homogenitas varian) dengan  $p = 0.905 (>0.05)$ . Hasil uji *Independent Samples Test* menunjukkan signifikansi  $p = 0,943 (<0.05)$  yang berarti bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok sampel yang diputar dengan kelompok kontrol tanpa putaran.

Data hasil pengukuran durasi waktu penyinaran LED dengan data waktu yang terukur pada kalibrator dibuat grafik regresi (Gambar 5.4) dengan  $R^2 = 1$  (persamaan garis regresi  $Y=X$ ) yang menunjukkan bahwa alat pengukur durasi waktu penyinaran instrumen LED memiliki kesesuaian dengan kalibrator.



Gambar 5.4. Grafik regresi durasi waktu penyinaran instrumen LED dengan kalibrator

Data hasil pengukuran temperatur penyinaran LED dengan data temperatur yang terukur pada kalibrator dibuat grafik regresi (Gambar 5.5) dengan  $R^2 = 0,999$  (persamaan garis regresi  $Y=1,029X-0,861$ ) yang menunjukkan bahwa alat pengukur temperatur penyinaran instrumen LED memiliki kesesuaian dengan kalibrator, dengan faktor koreksi pengukuran  $1,029X-0,861$  ( $X$ = hasil pengukuran temperatur instrumen LED).



Gambar 5.5. Grafik regresi temperatur penyinaran instrumen LED dengan kalibrator

### 5.1.2. Analisis Porfirin Endogen Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil pengukuran porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan HPLC merk Agilent 1100 series, kolom LiChro CART@250-4 dan detektor sinar tampak dengan eksitasi 407 nm dan emisi 620 nm ditunjukkan pada Tabel 5.3. Sebagai standar digunakan *Porfirin Standard Chromatography marker kit* yang terdiri dari  $(10 \pm 1)$   $\eta$ mol 8, 7, 6, 5, 4 carboxyl porfirin dan mesoporfirin IX yang dilarutkan dalam 1 ml 1M NH<sub>4</sub>OH serta 100  $\mu$ l standar Coproporfirin III dilarutkan dalam 1 ml ethanol. Data lengkap hasil pengukuran HPLC dan spesifikasi standar ditunjukkan pada lampiran 4.

Tabel 5.3. Hasil pengukuran standar porfirin, standar coproporfirin III (CP III) dan porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* dengan HPLC

Nama	Luas Area							
	Retention Time							
	4.77	9.86	10.36	13.56	16.45	21.90	43.22	47.01
standar porfirin	121,14	33,07	90,83	13,25	135,71	139,47	-	-
Standar CP III	-	-	-	-	-	-	2216,00	387,18
Sampel	7,43	2,03	8,71	2,10	16,03	17,84	142,34	49,65
Persentase	3,02	0,83	3,54	0,85	6,51	7,25	57,83	20,17

Hasil pegujian porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa bakteri ini mengakumulasi porfirin endogen terbesar tipe coproporfirin III, berdasarkan kesesuaian dengan *retention time* pada standar coproporfirin III. Porsi porfirin endogen tipe coproporfirin III yang terukur sebesar 57,83% dan 20,17%.

### 5.1.3. Pengukuran Potensi Instrumen Sumber Cahaya LED Biru dan Merah Untuk Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen

Data jumlah koloni bakteri yang tumbuh baik untuk kelompok kontrol tanpa penyinaran LED dan kelompok perlakuan penyinaran LED biru dan merah

pada daya penyinaran 75% dan lama waktu penyinaran 30 menit ditunjukkan pada lampiran 3.3. Penghitungan persentase penurunan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada tiap perlakuan dengan menggunakan persamaan:

$$|(\Sigma \text{ koloni perlakuan} - \Sigma \text{ koloni kontrol}) / \Sigma \text{ koloni kontrol}| \times 100\% \quad 5.1)$$

Analisis data menggunakan statistik Uji t dua sampel bebas, untuk mengetahui perbedaan penyinaran dengan LED biru dan merah. Syarat uji t dua sampel bebas adalah data berskala interval atau rasio serta terdistribusi normal.

Pada output *Independent Samples Test* menunjukkan bahwa data persentase penurunan jumlah koloni bakteri memiliki distribusi normal dan variansi homogen yang ditunjukkan pada *Levene's test for equality of variances* (uji homogenitas varian) dengan  $p = 0,083 (>0.05)$ . Hasil uji *Independent Samples Test* menunjukkan signifikansi  $p = 0,000 (<0.05)$  yang berarti bahwa ada perbedaan bermakna antara penyinaran dengan LED biru 430 nm dan merah 629 nm terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil uji statistik pada lampiran 3.4. Hasil analisis statistik ditunjukkan oleh Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil uji t dua sampel bebas untuk mengetahui perbedaan penyinaran dengan LED biru 430 nm dan merah 629 nm

Kelompok	N	Persen Penurunan Koloni Bakteri (%)		Uji t	
		Rerata	SD	Signifikansi	Kesimpulan
LED biru 430 nm	20	70,10	1,37	p=0,000	Ada beda bermakna
LED merah 629 nm	20	22,17	2,06		
Total	40	46,13	24,32		

Berdasarkan Tabel 5.3 menunjukkan bahwa penyinaran dengan LED biru 430 nm menghasilkan penurunan jumlah koloni bakteri sebesar 70,10 % dengan simpangan baku 1,37 sedangkan penyinaran LED merah 629 nm menghasilkan

penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 22,17 % dengan simpangan baku 2,06. Jadi dapat disimpulkan bahwa penyinaran LED biru memiliki potensi besar untuk *fotoinaktivasi* bakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan besarnya persentase penurunan jumlah koloni bakteri.

## 5.2. Penelitian fase II

### 5.2.1. Optimasi Dosis Energi Penyinaran LED Biru untuk Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Porfirin Endogen

Penelitian ini disusun menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial. Analisis data menggunakan uji anova faktorial, untuk mengetahui pengaruh masing-masing faktor dan interaksi antar faktor. Syarat dari uji anova faktorial adalah data berskala interval dan rasio serta terdistribusi normal. Uji normalitas data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov satu sampel  $\alpha=0.05$ , sebagai *goodness-of fit-test*, yaitu membandingkan distribusi dari sampel hasil pengamatan dengan distribusi teoritis (distribusi normal). Data dan hasil uji statistik pada lampiran 3.5 dan 3.6. Ringkasan hasil uji statistik pada Tabel 5.5.

Hasil uji menunjukkan signifikansi ( $p = 0,915$  yaitu  $> \alpha (0,05)$ ), yang berarti data jumlah koloni bakteri pada penyinaran LED biru terdistribusi normal. Hasil uji anova faktorial menunjukkan bahwa faktor daya dan waktu serta interaksi daya-waktu penyinaran LED biru memiliki tingkat signifikansi ( $p=0,000$  yaitu  $< 0,05$  yang berarti bahwa faktor daya dan lama waktu penyinaran serta interaksi daya-lama waktu penyinaran LED biru ( $430\pm 4$ ) nm berpengaruh terhadap persentase penurunan jumlah koloni bakteri.

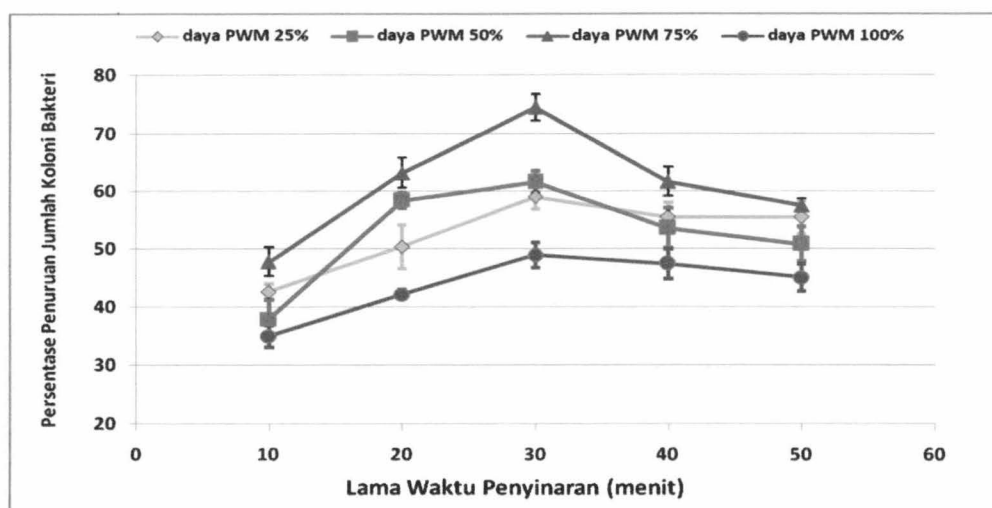
Tabel 5.5. Hasil uji anova faktorial untuk mencari dosis optimal penyinaran dengan LED biru 430 nm

Faktor	Kelompok	N	Persen Penurunan Koloni Bakteri (%)		Anova	
			Rerata	SD	signifikansi	Kesimpulan
Daya	daya 25% <sup>(b)</sup>	15	52,63	6,31	p=0,000	Ada beda bermakna
	daya 50% <sup>(b)</sup>	15	52,49	8,76		
	daya 75% <sup>(c)</sup>	15	60,95	9,15		
	daya 100% <sup>(a)</sup>	15	43,72	5,39		
	Total	60	52,45	9,60		
Waktu	10 menit <sup>(a)</sup>	12	40,86	5,43	p=0,000	Ada beda bermakna
	20 menit <sup>(b)</sup>	12	53,54	8,62		
	30 menit <sup>(c)</sup>	12	61,04	9,68		
	40 menit <sup>(b)</sup>	12	54,56	5,83		
	50 menit <sup>(b)</sup>	12	52,25	5,43		
	Total	60	52,45	9,60		
Interaksi	daya 25% waktu 10 menit <sup>(bc)</sup>	3	42,67	1,26	p=0,000	Ada beda bermakna
	daya 25% waktu 20 menit <sup>(defg)</sup>	3	50,39	3,81		
	daya 25% waktu 30 menit <sup>(hij)</sup>	3	59,09	2,16		
	daya 25% waktu 40 menit <sup>(fghi)</sup>	3	55,53	2,47		
	daya 25% waktu 50 menit <sup>(fghi)</sup>	3	55,49	2,93		
	daya 50% waktu 10 menit <sup>(ab)</sup>	3	37,98	3,19		
	daya 50% waktu 20 menit <sup>(hij)</sup>	3	58,40	1,25		
	daya 50% waktu 30 menit <sup>(ij)</sup>	3	61,67	1,95		
	daya 50% waktu 40 menit <sup>(efgh)</sup>	3	53,55	3,49		
	daya 50% waktu 50 menit <sup>(defg)</sup>	3	50,86	2,93		
	daya 75% waktu 10 menit <sup>(cde)</sup>	3	47,77	2,48		
	daya 75% waktu 20 menit <sup>(ij)</sup>	3	63,21	2,58		
	daya 75% waktu 30 menit <sup>(i)</sup>	3	74,48	2,24		
	daya 75% waktu 40 menit <sup>(ij)</sup>	3	61,72	2,49		
	daya 75% waktu 50 menit <sup>(ghij)</sup>	3	57,56	1,15		
	daya 100% waktu 10 menit <sup>(a)</sup>	3	35,01	1,90		
	daya 100% waktu 20 menit <sup>(abc)</sup>	3	42,14	0,80		
	daya 100% waktu 30 menit <sup>(cdef)</sup>	3	48,94	2,24		
	daya 100% waktu 40 menit <sup>(cde)</sup>	3	47,45	2,60		
	daya 100% waktu 100 menit <sup>(bcd)</sup>	3	45,08	2,32		
Total	60	52,45	9,60			

Keterangan : N=besar sampel. SD=simpangan baku. *Superscript* yang sama menunjukkan beda tidak bermakna dari hasil uji Tukey

Uji anova satu arah digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan, dengan asumsi data berskala interval dan rasio, terdistribusi normal dan variansi data homogen. Untuk menguji asumsi variansi data homogen menggunakan *Levene's test* dengan  $\alpha = 0,05$ . Hasil uji menunjukkan data persentase penurunan jumlah koloni bakteri memiliki variansi homogen dengan  $p = 0,734$  yaitu  $> 0,05$ , yang berarti data persentase penurunan jumlah koloni bakteri pada penyinaran LED biru 430 nm memiliki variansi homogen. Hasil uji anova satu arah menunjukkan bahwa interaksi antar kelompok perlakuan penyinaran LED biru memiliki taraf signifikansi  $p = 0,000$  yaitu  $< 0,05$  yang berarti bahwa ada perbedaan antar kelompok perlakuan dengan penyinaran LED biru 430 nm.

Untuk melihat pasangan kelompok perlakuan mana yang berbeda maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda menggunakan *Post Hoc Multiple Comparison* Tukey. Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan variasi daya PWM 75% ( $75 \text{ mW/cm}^2$ ) dengan jarak penyinaran 2 cm dari sumber cahaya LED biru dan durasi waktu penyinaran 30 menit (rapat energi  $135 \text{ J/cm}^2$ ) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar  $(75 \pm 2)\%$  yang berbeda nyata terhadap kelompok perlakuan yang lain. Gambar 5.6 menunjukkan grafik persentase penurunan koloni bakteri pada berbagai variasi daya dan lama waktu penyinaran.



Gambar 5.6. Diagram persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada penyinaran LED biru 430 nm

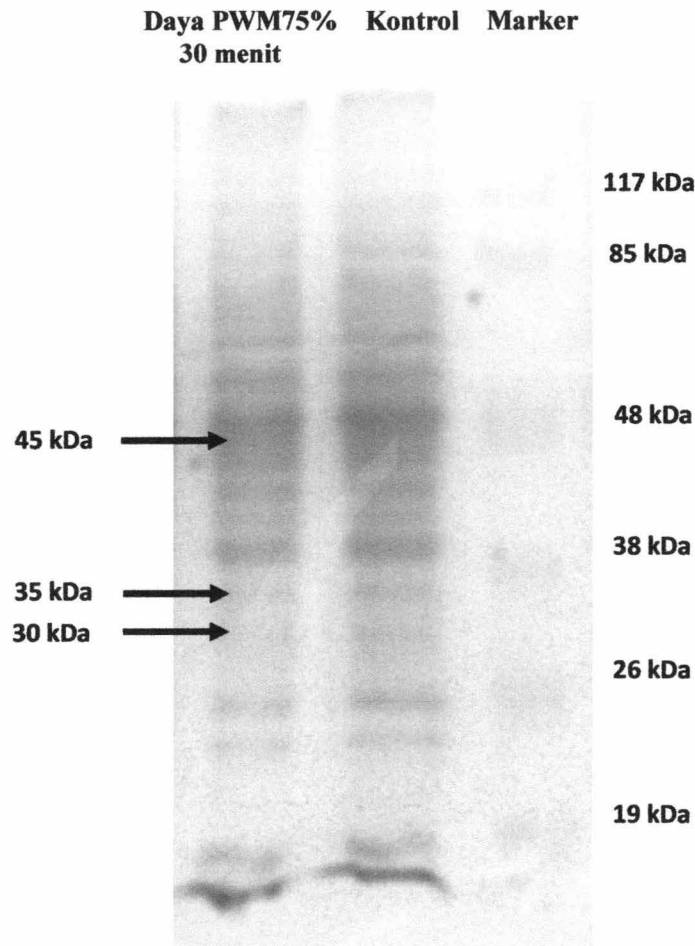
Berdasarkan Gambar 5.6 menunjukkan bahwa pada daya PWM 75% (intensitas  $75 \text{ mW/cm}^2$ ) dan durasi waktu penyinaran 30 menit (rapat energi  $135 \text{ J/cm}^2$ ) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* terbesar.

## 5.2.2. Pengaruh Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal Terhadap Karakteristik Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Porfirin Endogen Secara Fisik dan Kimiawi

### 5.2.2.1. Analisis Profil Pita Protein Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal

Hasil penelitian profil pita protein untuk protein marker, kelompok kontrol dan perlakuan ditunjukkan pada Gambar 5.7. Berdasarkan Gambar 5.7 menunjukkan adanya perubahan pada pita protein 45 kDa, 35 kDa dan 30 kDa.





Gambar 5.7. Profil pita protein bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelompok kontrol dan penyinaran LED biru dosis energi optimal

Hasil pengukuran densitometer CAMAG TLC scanner 3 pada elektrogram SDS-PAGE bakteri *Staphylococcus aureus* untuk kelompok kontrol dan penyinaran LED biru daya PWM 75% durasi waktu penyinaran 30 menit ditampilkan pada Tabel 5.6.

Metode SDS-PAGE adalah salah satu metode karakterisasi protein berdasarkan berat molekulnya. Pada penelitian ini digunakan akrilamid 15% untuk melihat fraksi protein dengan BM 10-95 kDa, sedangkan untuk pembuatan kurva linear antara log BM dan Rf digunakan protein standar pada BM 95-11

kDa. Penghitungan log berat molekul (BM), jarak migrasi dan relative of mobility (Rf) dari protein standar terdapat pada lampiran 5.

Tabel 5.6. Pita-pita protein bakteri *Staphylococcus aureus* pada elektrogram SDS-PAGE dengan pengukuran densitometer

No	Pita protein pada elektrogram SDS-PAGE			
	Kontrol		Penyinaran LED biru	
	Rf max	% area	Rf max	% area
1	-0.01	2,74	-0.01	4,16
2	0.01	3,99	0.02	3,24
3	0.04	6,25	-	-
4	0.09	2,22	0.08	2,02
5	0.15	6,05	0.14	3,92
6	0.20	6,71	0.19	4,71
7	0.27	4,05	0.26	5,49
8	0.29	2,30	0.28	2,00
9	0.31	3,80	0.31	3,47
10	0.36	7,24	0.36	6,31
11	0.39	3,61	0.39	3,25
12	0.43	4,90	0.43	4,41
13	0.46	3,96	-	-
14	0.50	8,96	0.50	10,33
15	0.55	6,03	0.54	6,04
16	0.59	4,54	0.59	4,92
17	0.63	3,01	0.62	4,63
18	0.64	3,39	0.64	4,13
19	0.68	2,68	0.68	3,60
20	0.70	1,93	0.70	2,66
21	0.73	1,36	-	-
22	0.74	2,34	0.74	4,22
23	0.77	1,68	0.77	3,67
24	0.82	1,58	0.81	4,45
25	0.86	3,68	0.85	5,80
26	0.88	0,74	0.87	2,57
27	0.91	0,26	-	-

#### 5.2.2.2. Analisis Profil Asam Lemak Jenuh Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal

Pada penelitian ini digunakan uji kromatografi gas Agilent 6890 Plus GC Version A.0308 dengan metode *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME-ULP), pelarut

hexane dan tiga standar asam lemak jenuh yaitu miristat 510 ppm, palmitat 500 ppm dan laurat 503 ppm. Hasil pengamatan profil asam lemak bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada lampiran 6. Data konsentrasi asam lemak jenuh dalam % luas area yang terukur ditunjukkan pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7. Porsi asam lemak miristat, palmitat dan laurat bakteri *Staphylococcus aureus* pada kelompok kontrol dan kelompok penyinaran LED biru dosis energi optimal

Nama sampel	% Luas Area		
	Miristat	Palmitat	Laurat
Kontrol + standar	99,33 ± 0,93	103,65 ± 6,81	209,23 ± 15,40
Sampel + standar	47,36 ± 0,55	50,90 ± 0,15	109,57 ± 2,56
<b>% perubahan</b>	<b>-52,33</b>	<b>-50,90</b>	<b>-47,63</b>

Penelitian efek fotoinaktivasi pada asam lemak bakteri *Staphylococcus aureus* ini disusun menggunakan rancangan acak lengkap untuk mengetahui pengaruh penyinaran LED biru pada daya PWM 0% dan 75% terhadap proporsi asam lemak jenuh miristat, palmitat dan laurat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum untuk seluruh jenis standar asam lemak jenuh yang diamati terjadi penurunan proporsi asam lemak jenuh pada daya PWM penyinaran LED biru 75% dibandingkan dengan daya PWM 0%.

Hasil uji statistik asam lemak jenuh bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada lampiran 6. Analisis data menggunakan uji manova *Hotteling's trace*. Syarat dari uji manova adalah data berskala interval dan rasio serta terdistribusi normal. Hasil uji normalitas data *Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa data konsentrasi ketiga jenis asam lemak jenuh terdistribusi normal. Kesimpulan hasil uji statistik pada Tabel 5.8.

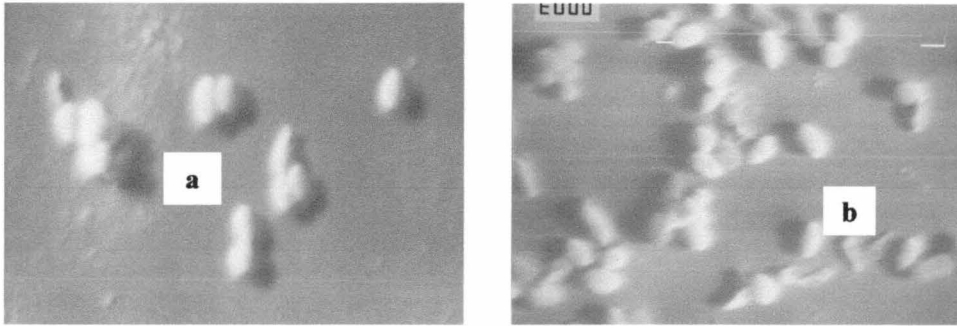
Tabel 5.8. Hasil uji *Hotteling's trace* pada proporsi asam lemak jenuh bakteri *Staphylococcus aureus* akibat penyinaran LED biru dosis energi optimal

Jenis asam Lemak	Daya Penyinaran	N	% luas area		Uji <i>Hotteling's Trace</i>	
			Rata-rata	SD	Signifikansi	Kesimpulan
Miristat	Daya PWM 0%	3	99,333	0,933	p=0,000	Ada beda bermakna
	Daya PWM 75%	3	47,356	0,553		
	Total	6	73,345	28,477		
Palmitat	Daya PWM 0%	3	103,648	6,811	p=0,005	Ada beda bermakna
	Daya PWM 75%	3	50,895	0,146		
	Total	6	77,272	29,213		
Laurat	Daya PWM 0%	3	209,232	15,401	p=0,007	Ada beda bermakna
	Daya PWM 75%	3	109,571	2,563		
	Total	6	159,402	55,473		

Hasil uji *Hotteling's trace* menunjukkan adanya perbedaan bermakna dari proporsi asam lemak jenuh miristat, palmitat dan laurat antara daya PWM penyinaran LED biru 0% dan 75%.

### 5.2.2.3. Analisis Fisik Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal

Mikroskop elektron yang digunakan dalam penelitian ini adalah type JSM T-160 JEOL Scanning Microscope. Hasil pemotretan SEM untuk kelompok kontrol dan perlakuan ditunjukkan pada Gambar 5.8. Berdasarkan Gambar 5.8 terlihat adanya kerusakan sel bakteri pada kelompok penyinaran LED biru dosis energi optimal (rapat energi 135 J/cm<sup>2</sup>).



(a) sel normal

(b) kerusakan dinding sel

Gambar 5.8. Hasil pemotretan SEM sel bakteri *Staphylococcus aureus* pada (a) kelompok kontrol dan (b) perlakuan penyinaran LED dosis optimal

# **BAB VI PEMBAHASAN**

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1. Penelitian Fase I.

##### 6.1.1. Pengukuran Performansi Instrumen Sumber Cahaya LED

Penelitian pendahuluan telah menghasilkan instrumen sumber cahaya LED untuk penyinaran yang dilengkapi dengan rangkaian sumber cahaya LED biru dan merah *super bright* produk lokal ukuran 5 mm yang terdiri dari 20 x 18 buah LED, dengan puncak emisi rata-rata dari 30 kali pengukuran adalah  $(430,05 \pm 0,13)$  nm dan  $(629,03 \pm 0,18)$  nm serta bandwidth 65 nm dan 30 nm.

Sumber cahaya LED yang dihasilkan memiliki spektrum pada panjang gelombang tampak. Hasil penelitian Papageorgiou *et al.* (2000) menunjukkan bahwa spektrum serap porfirin tipe fotosensitizer berada pada panjang gelombang 400 nm sampai 650 nm. Hal ini diperkuat oleh penelitian Nitzan *et al.* (2004) yang melaporkan bahwa porfirin utama pada strain bakteri Gram positif *Staphylococci* adalah jenis coproporfirin III (68.3 - 74.6%) dengan spektrum serap pada cahaya biru. Penyinaran cahaya yang memiliki spektrum panjang gelombang yang sesuai dengan spektrum serap fotosensitizer dengan dosis energi penyinaran yang tepat dapat menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri (Papageorgiou *et al.*, 2000). Jadi sumber cahaya LED yang dihasilkan dapat diaplikasikan untuk fotoinaktivasi pada bakteri dengan porfirin endogen.

Pengukuran intensitas daya penyinaran LED menghasilkan daya penyinaran yang berada pada rentang mW. Pada aplikasi *Photodynamic*

*Inactivation* (PDI), cahaya dengan rapat daya dan durasi waktu penyinaran tertentu memegang peran penting pada jenis interaksinya dengan target. Interaksi fotokimia pada PDI terjadi pada durasi waktu pemaparan  $> 1$  s dengan rapat daya optik rendah yang berada berada pada rentang mW (Niemz, 2007), sehingga instrumen LED yang dirancang telah memenuhi persyaratan untuk terjadinya mekanisme fotodinamik pada bakteri.

Hasil pengukuran distribusi intensitas LED menunjukkan persentasi error yang semakin mengecil untuk daya PWM yang semakin besar. Hal ini menunjukkan bahwa ketelitian pengukuran intensitas dari kalibrator semakin baik pada daya PWM besar. Distribusi intensitas yang terukur di plat holder pada jarak penyinaran 2 cm dengan berbagai nilai PWM menggunakan program Wolfram Mathematica 7.0 pada gambar 5.3 menunjukkan adanya ketidakteraturan pola distribusi intensitas penyinaran yang konsisten pada jarak penyinaran sama. Ketidakteraturan distribusi intensitas ini terutama disebabkan oleh bahan LED yang memiliki kualitas yang tidak sama satu dengan lainnya. Pada penelitian, adanya perbedaan besarnya intensitas penyinaran ini diatasi dengan memutar plat holder sampel 5 putaran/detik dengan motor servo agar tiap sampel mendapatkan intensitas penyinaran yang sama (Johansen *et al.*, 2003).

Pengukuran performansi alat pengukur temperatur dengan kalibrator termometer digital *Atech Thermo L87AD* menghasilkan kurva regresi dengan nilai  $R^2 = 0.9995$  dan lama waktu penyinaran dengan kalibrator *Stopwatch Digital Enko Sport Timer* menghasilkan nilai  $R^2 = 1$ . Hasil data pengukuran temperatur pada instrumen LED dan kalibrator diperoleh persamaan garis regresi  $Y = 1,029X - 0,861$  yang menunjukkan bahwa alat pengukur temperatur penyinaran instrumen

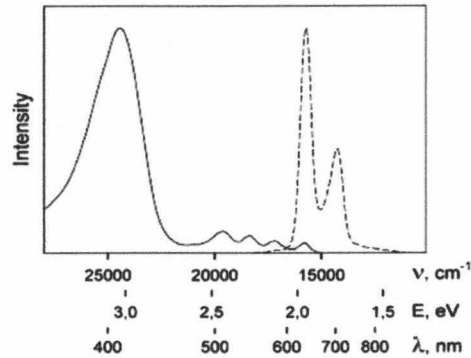


LED memiliki kesesuaian dengan kalibrator, dengan faktor koreksi pengukuran  $1,029X-0,861$  ( $X$ = hasil pengukuran temperatur instrumen LED. Jika temperatur yang terukur pada instrumen LED sebesar  $27^{\circ}\text{C}$ , maka berdasarkan kalibrasi nilainya adalah  $26,92^{\circ}\text{C}$ . Jadi instrumen LED yang dirancang memiliki performansi yang baik berdasarkan ketepatan nilai pengukur temperatur dan durasi waktu penyinaran dengan kalibrator.

### 6.1.2. Pembahasan jenis Porfirin Endogen Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pengukuran menggunakan HPLC pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* mengakumulasi porfirin endogen tipe Coproporfirin III pada *retention time* yang sesuai dengan standar Coproporfirin III. Hasil ini sesuai dengan penelitian Nitzan (2004) yang menunjukkan bahwa Gram positif *Staphylococci* mengakumulasi porfirin jenis coproporfirin III (68.3 - 74.6%) dengan spektrum serap pada cahaya biru.

Ada berbagai macam porfirin yang dihasilkan oleh bakteri (Bruce *et al.*, 2009; Wainwright, 2009). Masing-masing bakteri mengakumulasi jenis porfirin tertentu dengan spektrum serap yang bersifat spesifik (Ramberg & Johnsson, 2004). Gambar 6.1 menunjukkan karakteristik spektrum absorpsi dan fluoresensi porfirin tipe fotosensitiser. Pergeseran spektrum panjang gelombang dari spektrum absorpsi ke fluoresensi disebabkan karena adanya mekanisme transisi non radiatif seperti *internal conversion*, *vibrational relaxation* atau *intersystem crossing* dengan melepaskan panas ke lingkungan sehingga terjadi pengurangan energi foton saat terjadi transisi radiatif baik melalui fluoresensi pada eksitasi singlet dan fosforesensi pada eksitasi triplet.

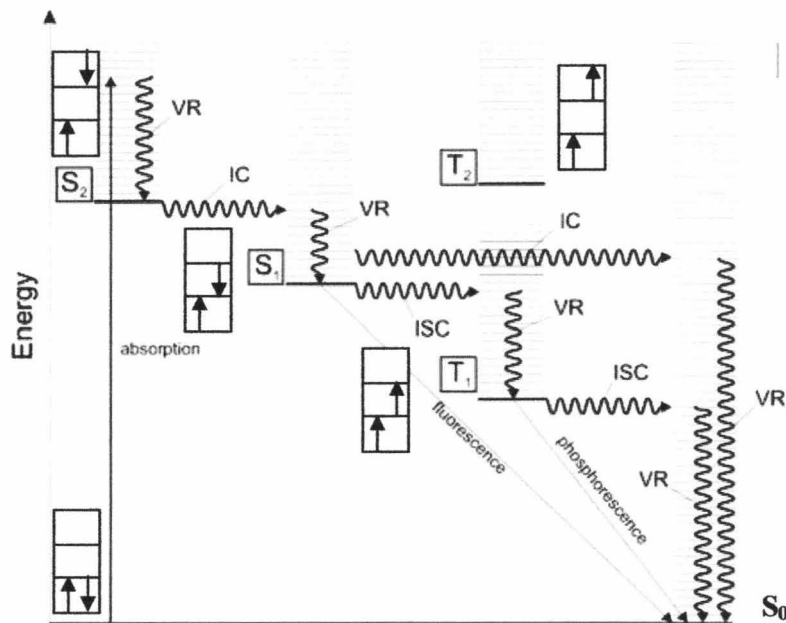


Gambar 6.1. Karakteristik spektrum absorpsi (garis tebal) dan fluoresensi (garis putus-putus) porfirin tipe fotosensitiser (Juzenas, 2002)

Gambar 6.2 menunjukkan mekanisme fotofisika yang menginisiasi terjadinya mekanisme fotokimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Absorpsi radiasi oleh molekul akan mengeksitasi molekul tersebut dari tingkat vibrasional dasar singlet elektronik  $S_0$  ke salah satu tingkat vibrasional eksitasi elektronik. Eksitasi molekul menuju keadaan energi yang lebih tinggi ini cenderung kembali ke keadaan dasar, baik melalui reaksi kimia atau berubah menjadi panas yang dilepas ke lingkungan dalam proses *internal conversion* atau *vibrational relaxation*.

Spin sebuah elektron yang tereksitasi singlet  $S_n$  dapat terbalik, meninggalkan molekul pada keadaan eksitasi triplet  $T_n$ , yang disebut dengan *intersystem crossing*. Probabilitas terjadinya *intersystem crossing* meningkat jika tingkat vibrasional singlet terendah mengalami overlap dengan satu dari tingkat vibrasional yang lebih tinggi dari keadaan triplet. Sebuah molekul pada tingkat vibrasional tinggi dari keadaan eksitasi triplet dapat kehilangan energi saat bertumbukan dengan molekul lain, meninggalkannya pada tingkat vibrasional paling rendah dari keadaan triplet, dan selanjutnya molekul dapat mengalami *intersystem crossing* kedua pada tingkat vibrasional yang lebih rendah. Molekul

tersebut akhirnya kembali ke tingkat vibrasional paling rendah dari keadaan dasar elektronik  $S_0$  oleh relaksasi vibrasi.



Gambar 6.2. Mekanisme fotofisika.  $S_0$  adalah keadaan ground state.  $S_1 \dots S_n$  adalah keadaan singlet ditandai dengan spin elektron berpasangan;  $T_1 \dots T_n$  adalah keadaan triplet ditandai spin elektron tidak berpasangan; Tingkat vibrasi ditunjukkan oleh garis horisontal, transisi non radiatif oleh panah bergelombang, yang terdiri atas *vibrational relaxation* (VR), *internal conversion* (IC), dan *intersystem crossing* (ISC), Panah ke bawah meunjukkan transisi radiatif (Plaetzer, 2009).

Molekul pada keadaan eksitasi triplet tidak selalu kembali ke keadaan dasar melalui *intersystem crossing*, tetapi dapat kehilangan energi melalui emisi sebuah foton. Emisi dari transisi triplet-singlet disebut fosforesensi.

### 6.1.3. Pembahasan Potensi Instrumen Sumber Cahaya LED Biru dan Merah Untuk Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen

Pada saat penyinaran, terjadi interaksi antara cahaya dengan target. Cahaya dengan rapat daya dan durasi waktu penyinaran tertentu memegang peran penting

pada jenis interaksinya dengan target. Interaksi fotokimia (PDT) terjadi pada rapat daya optik rendah dan reaksi terjadi pada keadaan eksitasi (Prasad, 2005). Absorpsi foton cahaya merupakan interaksi yang paling dominan dalam proses ini (Plaetzer, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan penyinaran dengan LED biru menghasilkan penurunan jumlah koloni bakteri sebesar yaitu 70%, lebih besar jika dibandingkan dengan penyinaran LED merah yang menghasilkan penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* sekitar 22%. Hasil penelitian ini diperkuat oleh penelitian Papageorgiou (2000) dan Bonaficio (2007) yang menunjukkan bahwa Pita Soret, pita absorpsi yang intens untuk porfirin berada pada range 390 – 430 nm. Jadi LED biru 430 nm berpotensi fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

## **6.2. Penelitian fase II**

### **6.2.1. Pembahasan Optimasi Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED biru 430 nm**

Keberhasilan fotoinaktivasi pada bakteri ditentukan oleh kesesuaian panjang gelombang cahaya dengan spektrum serap porfirin bakteri untuk terjadinya eksitasi molekul porfirin. Faktor penentu lain adalah dosis energi penyinaran. Dosis energi yang sesuai akan mengaktivasi terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Dosis energi penyinaran LED tiap luas area penyinaran (rapat energi dengan satuan  $J/cm^2$ ) adalah besarnya energi penyinaran (daya kali lama waktu penyinaran) dibagi dengan luas penyinaran.

Hasil uji statistik pada data penelitian menunjukkan bahwa faktor daya, waktu dan interaksi daya-waktu penyinaran LED biru berpengaruh terhadap persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok perlakuan dengan variasi daya PWM 75% dan jarak penyinaran 2 cm dari sumber cahaya LED biru dengan lama waktu penyinaran 30 menit (rapat energi penyinaran  $135 \text{ J/cm}^2$ ) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* 75%, memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok perlakuan yang lain.

Berbagai penelitian mengenai fotoinaktivasi bakteri antara lain dilaporkan oleh Grinholtz *et al.* (2007) yang meneliti peran konsentrasi porfirin pada fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* resisten *methicillin* (40 MRSA) dan sensitif *methicillin* (40 MSSA) dengan penambahan eksogen fotosensitizer ALA dan protoporfirin IX dengan penyinaran lampu biostimul 624 nm dosis  $0,2 \text{ J/cm}^2$  tiap menit. Lipovsky *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada strain 101 (sensitif *methicillin*) dan strain 500 (resisten *methicillin*) dengan penyinaran lampu halogen 415 nm, dosis energi optimal pada rapat energi  $120 \text{ J/cm}^2$  (intensitas  $100 \text{ mW/cm}^2$  dan lama waktu penyinaran 20 menit) menghasilkan penurunan koloni bakteri 90%. Pada panjang gelombang 455 nm dengan rapat energi yang sama menghasilkan penurunan 50%. Penelitian Maclean *et al.* (2008) pada fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan lampu xenon yang optimal pada 205 nm dengan dosis  $23,5 \text{ J/cm}^2$  (intensitas  $3,27 \text{ mW/cm}^2$  selama 2 hari) menghasilkan persentase penurunan bakteri 24% serta menggunakan LED biru 405 nm dosis  $36 \text{ J/cm}^2$

(intensitas  $10 \text{ mW/cm}^2$  selama 60 menit) menghasilkan persentasi penurunan koloni bakteri 14% (Maclean *et al.*, 2009).

Jika dibandingkan dengan hasil penelitian tersebut di atas, maka penggunaan LED biru 430 nm *super bright* bahan baku lokal pada penelitian ini optimal menurunkan jumlah koloni bakteri sebesar 75% pada dosis energi  $135 \text{ J/cm}^2$  (intensitas  $75 \text{ mW/cm}^2$  dan lama waktu penyinaran 30 menit). Optimasi fotoinaktivasi ini dapat ditingkatkan dengan pemberian eksogen fotosensitizer  $\delta$ -ALA untuk meningkatkan konsentrasi porfirin endogen bakteri sehingga penyerapan foton cahaya lebih efektif dan produksi oksigen reaktif lebih meningkat (Nitzan *et al.*, 2004).

Keberhasilan fotoinaktivasi bakteri melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh porfirin yang selanjutnya mengaktifkan terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif. Fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kuantitas dari porfirin yang berperan sebagai molekul penyerap cahaya (Nitzan *et al.*, 2004) dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum serap fotosensitizer (Papageorgiou *et al.*, 2000).

Mekanisme awal fotosensitisasi berupa penyerapan foton. Absorpsi foton oleh molekul fotosensitizer akan mengeksitasi molekul tersebut dari tingkat vibrasional dalam keadaan dasar singlet elektronik ke salah satu tingkat vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik. Ada tiga proses utama interaksi cahaya dengan materi yang dapat menginduksi perpindahan elektron dari dua keadaan energi terkuantisasi, yaitu (Wardle, 2009):

1. Absorpsi cahaya, yaitu penyerapan cahaya oleh atom/molekul organik diikuti dengan eksitasi atom/molekul molekul dari level vibrasional dalam keadaan

dasar singlet elektronik  $S_0$  ke salah satu level vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik. Peristiwa absorpsi primer ini berlangsung sangat cepat (sekitar  $10^{-15}$  s). Dua prinsip dasar pada peristiwa absorpsi cahaya adalah:

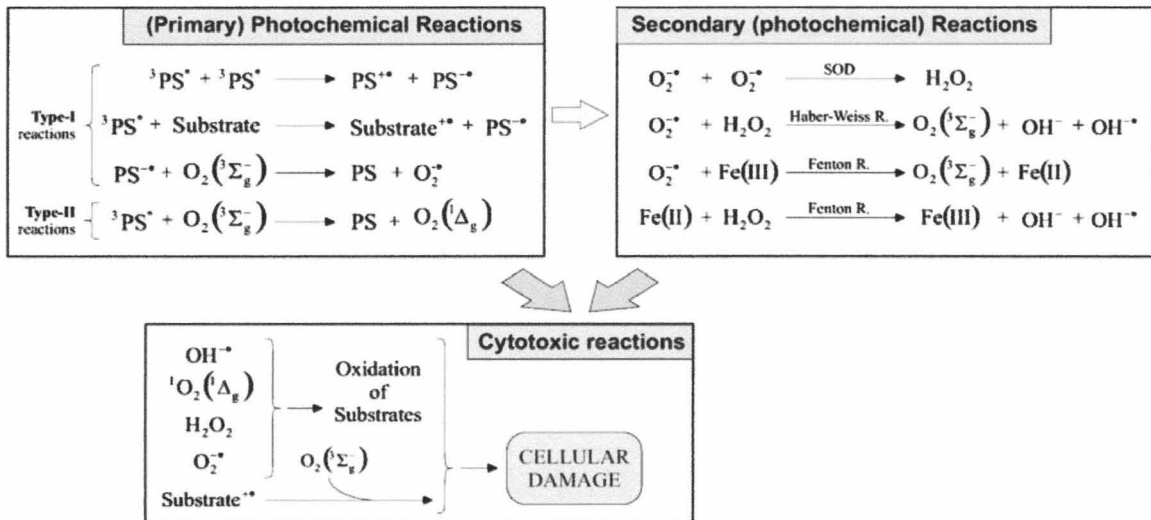
- a) Hukum Grotthuss-Draper menyatakan hanya cahaya yang diabsorpsi oleh molekul kimia yang dapat menghasilkan perubahan reaksi kimia.
- b) Hukum Stark-Einstein menyatakan bahwa absorpsi cahaya oleh molekul adalah proses satu kuantum. Satu foton akan diabsorpsi satu molekul.

Eksitasi molekul menuju keadaan energi yang lebih tinggi ini tidak stabil sehingga akan kembali ke keadaan dasar, baik secara langsung maupun melibatkan terjadinya reaksi kimia (fotokimia). Perpindahan molekul dari keadaan eksitasi ke keadaan *ground state* dapat terjadi melalui (Wardle, 2009):

2. Emisi spontan terjadi ketika atom atau molekul yang tereksitasi mengemisikan foton yang memiliki energi sebanding dengan energi dari dua keadaan elektronik tanpa mempengaruhi atom/molekul lain.
3. Emisi terangsang (umumnya pada eksitasi triplet) terjadi ketika satu foton yang memiliki energi sebanding dengan energi dari dua keadaan elektronik berinteraksi dengan sebuah atom/molekul yang tereksitasi. Pada keadaan eksitasi triplet ini, molekul porfirin tidak serta merta bertransisi ke *ground state* karena dilarang oleh aturan Pauli (Grossweiner, 2005), sehingga memiliki life time yang cukup lama (sekitar  $10^{-2}$  –  $10^2$  detik). Molekul ini selanjutnya mentransfer energinya ke molekul oksigen (reaksi fotokimia) menyebabkan perpindahan molekul oksigen dari eksitasi triplet ke eksitasi singlet di atas *ground state* (Karotki *et al.*, 2001).

Fotokimia merupakan perubahan kimia yang disebabkan oleh cahaya (Coyle, 1991), dan hanya terjadi jika cahaya diabsorpsi oleh sistem (Wardle, 2009). Perubahan kimia merupakan peristiwa yang muncul pada tingkatan molekuler akibat absorpsi oleh foton. Proses fotokimia memiliki kaitan erat dengan proses fotofisika, yang berperan dalam perubahan energi dan struktur elektronik akibat eksitasi molekul setelah peristiwa absorpsi. Reaksi fotokimia yang dimediasi oleh porfirin paling banyak terjadi dari keadaan triplet tereksitasi.

Mekanisme reaksi fotokimia pada molekul fotosensitizer umumnya terjadi melalui dua tipe (Gambar 6.3) yaitu:



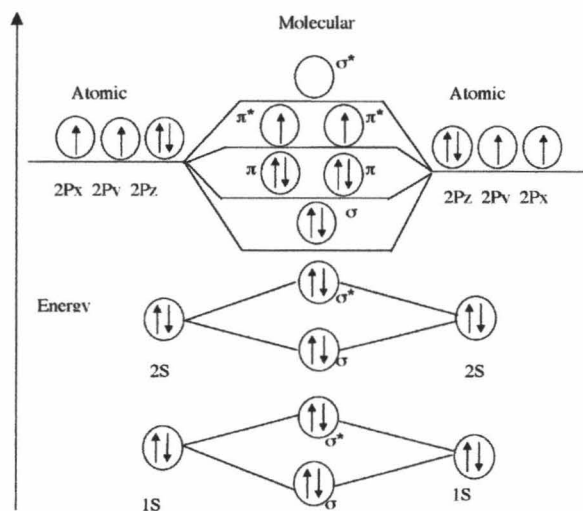
Gambar 6.3. Reaksi fotokimia selama PDI, PS adalah fotosensitizer,  $\text{H}_2\text{O}_2$  hidrogen peroksida,  $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$  oksigen singlet,  $\text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$  triplet oksigen,  $\text{O}_2^*$  superoksida anion,  $\text{OH}^*$  hidroksil radikal, SOD superoksida dismutase,  $X^-/+$  anion/kation spesies,  $X^*$  radikal spesies (Plaetzer,2009)

Tipe 1, molekul fotosensitif yang tereksitasi secara optis bereaksi secara langsung dengan substrat seperti membran sel atau molekul, dan mentransfer sebuah proton atau elektron untuk membentuk anion atau kation radikal. Radikal ini selanjutnya akan bereaksi dengan oksigen menghasilkan jenis oksigen reaktif



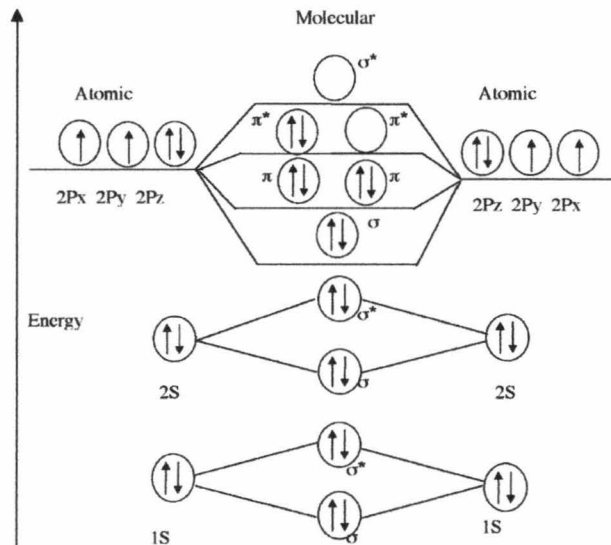
(ROS). Superoksida anion yang terbentuk akan bereaksi dengan substrat menghasilkan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Pada konsentrasi tinggi hidrogen peroksida bereaksi dengan superoksida anion membentuk hidroksil radikal (reaksi Haber Weiss) yang juga dihasilkan dari ion logam seperti besi dan tembaga melalui reaksi Fenton. Hidroksil radikal dengan mudah berdifusi melalui membran dan merusak sel (Plaetzer, 2009).

Tipe 2, fotosensitizer triplet dapat mentransfer energinya secara langsung pada molekul oksigen yang berada pada keadaan eksitasi triplet membentuk oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) tereksitasi. Pada keadaan dasar, kebanyakan molekul organik memiliki semua pasangan spin elektron. Selama transisi elektronik, ketika elektron mengalami eksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi, elektron menjadi orbital yang tidak berpasangan. Spin mereka diorientasikan dalam bentuk anti paralel atau paralel yang lain (Juzenas, 2002). Gambar 6.4 dan 6.5 menunjukkan molekul orbital dari oksigen triplet dan oksigen singlet.



Gambar 6.4. Molekuler orbital dari oksigen triplet (Min & Lee, 1999)

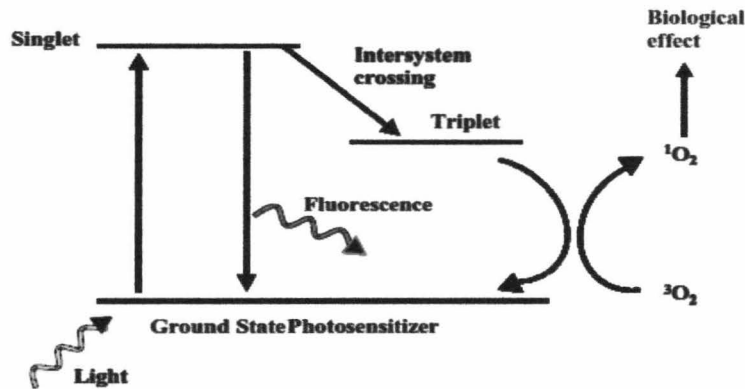
Berdasarkan Gambar 6.4 pada keadaan eksitasi triplet, molekul oksigen memiliki dua elektron tak berpasangan dengan spin paralel yang membangkitkan dua orbital antibonding. Oksigen singlet merepresentasikan keadaan eksitasi singlet yang ditunjukkan oleh pasangan elektron dengan spin terbalik pada orbital luar (Gambar 6.5).



Gambar 6.5. Molekuler orbital dari oksigen singlet (Min & Lee, 1999)

Molekul oksigen dapat berada pada keadaan eksitasi triplet, sehingga dapat bereaksi secara langsung dengan fotosensitizer triplet menghasilkan oksigen singlet seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 6.6. Fotosensitizer untuk aplikasi fotodinamik umumnya memiliki medan kuantum sekitar 0,3 sampai 0,5 yang menentukan keberhasilan pembentukan oksigen singlet (Juzeniene *et al.*, 2006). Medan kuantum adalah ukuran efisiensi dari banyaknya foton yang diabsorpsi. Medan kuantum ( $\Phi$ ) secara umum adalah banyaknya molekul fotosensitizer dibagi

jumlah foton yang diabsorpsi oleh fotosensitizer. Berdasarkan hukum Stark Einstein, maka nilai maksimum  $\Phi = 1$  (Wardle, 2009).



Gambar 6.6. Diagram level energi reaksi fotokimia tipe II (Wilson, 2005)

Oksigen singlet sangat reaktif dengan bio molekul, memiliki life time  $< 1\mu\text{s}$  dan dalam sel atau jaringan dengan jarak difusi yang sangat kecil  $<< \mu\text{m}$  sehingga letak fotosensitiser sangat menentukan lokasi kerusakan akibat reaksi fotokimia yang menghasilkan respon biologi. Umumnya porfirin fotosensitiser berlokasi pada membran sel, mitokondria, membran plasma dan lisosom (Wilson, 2005).

## 6.2.2. Pengaruh Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal Terhadap Karakteristik Fisik dan Kimiawi Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Porfirin Endogen

### 6.2.2.1. Pembahasan Profil Pita Protein Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal

Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik, dengan kecepatan gerak bergantung pada muatan dan ukuran

molekul, sehingga metode ini dapat digunakan untuk separasi makro molekul seperti protein dan asam nukleat (Rosenberg, 1996). Protein terdiri dari rangkaian dan kombinasi 20 asam amino. Setiap jenis protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas. Dalam sel, protein terdapat baik pada dinding sel, membran plasma, maupun membran internal yang menyusun organel sel dengan fungsi yang berbeda-beda (Michaeli & Feitelson, 1997).

Oksigen singlet bersifat elektrofilik dan bereaksi cepat dengan 5 asam amino yaitu triptofan, histidin, tirosin, metionin dan sistein untuk membentuk peroksida. Kecepatan reaksi oksigen singlet dan protein sangat tergantung pada jumlah dan jenis asam amino yang mempunyai ikatan rangkap atau atom sulfur kaya elektron. Triptofan, histidin, tirosin mempunyai ikatan rangkap sedang metionin dan sistein mempunyai atom sulfur dengan 4 elektron tidak berikatan. Asam amino lain bereaksi dengan oksigen singlet dengan kecepatan 2 - 3 kali lebih rendah daripada triptofan, histidin, tirosin, metionin atau sistein (Min & Boff, 2002).

Hasil penelitian profil pita protein membran menunjukkan adanya perubahan pada pita protein 45 kDa, 30 kDa dan 35 kDa (Gambar 5.7). Pourkomialian (1998) melaporkan bahwa pita protein 35 kDa berhubungan dengan sistem transport sel bakteri. Hasil pengukuran ketebalan pita protein dengan densitometer pada elektrogram pita-pita protein SDS-PAGE (Tabel 5.6) menunjukkan adanya perubahan ketebalan pita dan hilangnya 4 pita protein pada profil pita protein yang mengalami penyinaran LED dengan dosis energi optimum (135 J). Perubahan profil pita protein membran ini mengindikasikan bahwa

protein membran merupakan salah satu target ROS dan oksigen singlet yang dihasilkan dari mekanisme fotosensitisasi dengan penyinaran LED biru.

Hasil penelitian ini diperkuat oleh Bhandari & Sharma (2007) yang melaporkan adanya perubahan profil pita protein membran 45 dan 50 kDa pada *cyanobacteria* (*Nostoc spongiaeform* dan *Phormidium corium*) akibat paparan sinar matahari secara terus menerus. Grossweiner (2005) juga melaporkan bahwa oksigen singlet  $^1\text{O}_2$  hasil reaksi fotokimia teridentifikasi berpengaruh pada membran sitoplasma dan membran intraselular, terutama pada fosfolipid, kolesterol dan protein membran. Penelitian Ehrenberg, *et.al* (1993) menunjukkan adanya efek depolarisasi listrik yang menyebabkan kerusakan protein membran dan selanjutnya menyebabkan kematian sel.

#### **6.2.2.2. Pembahasan Profil Asam Lemak Jenuh Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal**

Pada penelitian ini digunakan asam lemak jenuh miristat, palmitat dan laurat sebagai marker karena asam lemak jenuh bersifat stabil. Pada asam lemak jenuh, oksidasi oleh radikal merupakan salah satu reaksi yang sangat mungkin terjadi, sedangkan pada asam lemak tak jenuh bersifat tidak stabil dan mudah berubah oleh faktor luar seperti temperatur, kelembaban maupun oksidasi. Jadi perubahan pada profil asam lemak tak jenuh tidak bisa dijadikan marker karena perubahan yang terjadi tidak hanya disebabkan oleh radikal.

Radikal oksigen singlet dan oksigen triplet hasil reaksi fotokimia menginisiasi perubahan pada asam lemak tak jenuh seperti linolenat, linoleat dan oleat membentuk hidropiroksida. Proses selanjutnya, radikal oksigen singlet dan

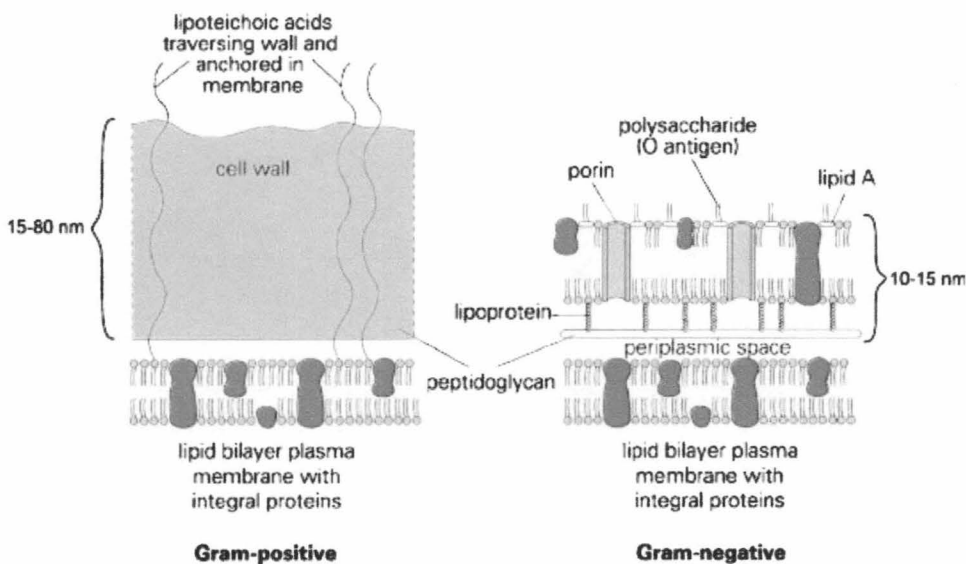
oksigen triplet mempengaruhi formasi asam lemak jenuh yang lebih stabil dengan memutuskan ikatan hidrogen menghasilkan hidropiroksida lipid yang bersifat racun. Hidroperoksida lipid ini selanjutnya memediasi terjadinya kerusakan membran sel (Wilson, 2005). 90% oksigen singlet bereaksi pada lipid bilayer sel (Hoebeke, 1998), dengan *life time* 13-35  $\mu$ s, bergantung pada tipe lipid (Ehrenburg, *et.al*, 1998). Hal ini dapat dilihat dari hasil penelitian pada Tabel 5.7 yang menunjukkan adanya perubahan profil dari asam lemak jenuh miristat, palmitat maupun laurat yang mengindikasikan bahwa penyinaran LED biru daya PWM 75% berpengaruh terhadap asam lemak jenuh pada bakteri.

Hasil ini diperkuat oleh penelitian Bhandari & Sharma (2007) yang melaporkan pengaruh pemaparan sinar matahari secara terus menerus pada *cyanobacteria* (*Nostoc spongiaeform* dan *Phormidium corium*) pada membran sel yang disebabkan oleh penurunan kandungan asam lemak jenuh dan sistem transport membran. Paardekooper *et al.* (1992) juga melaporkan kerusakan fotodinamik yang terjadi pada plasma dan membran sel yang disebabkan oleh depolarisasi listrik yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran dan kerusakan membran dan selanjutnya terjadi lisis sel bakteri.

#### **6.2.2.3. Pembahasan Profil Fisik Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Porfirin Endogen Pada Penyinaran LED Biru Dosis Energi Optimal**

Hasil pemotretan SEM dengan mikroskop elektron type JSM T-160 JEOL Scanning Microscope pada Gambar 5.8 menunjukkan adanya kerusakan dinding sel akibat penyinaran LED biru dosis energi penyinaran optimal ( $135 \text{ J/cm}^2$ ).

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif ditunjukkan pada Gambar 6.7. Dinding luar bakteri gram positif memiliki ketebalan 15-80 nm terdiri dari 100 lapis peptidoglikan (lipid) yang terbuat dari asam *lipoteichoic* dan *teichuronic* (Jori *et al.*, 2006). Dinding ini memiliki derajat porositas tinggi untuk difusi berbagai makromolekul seperti glikopeptida dan polisakarida dengan berat molekul 30.000-60.000 ke dalam membran plasma.



Gambar 6.7. Dinding bakteri Gram positif dan negatif (Jori *et al.*, 2006)

Oksigen singlet dan radikal hidroksil memiliki reaktivitas tinggi (Juzeniene *et al.*, 2006) dan *life-time* ( $\tau$ ) pendek yaitu dalam air  $3 \times 10^{-6}$  s dan dalam sitoplasma adalah  $1 \times 10^{-7}$  s (Moan & Berg, 1991). Oksigen singlet dapat berdifusi dengan cepat melalui sitoplasma dan membran sel (Kerotki *et al.*, 2001). Konstanta difusi D untuk oksigen singlet dalam sel adalah  $1.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  dengan

radius reaktif maksimum ( $\delta$ ) adalah 30 nm yang dihitung dari persamaan (Moan & Berg, 1991):

$$\delta = \sqrt{6D\tau}$$

Peroksidasi oleh oksigen singlet pada membran sel menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel.

Membran biologi adalah penting untuk kehidupan. Membran meregulasi aliran material dan informasi antar sel dan antara sel dengan lingkungannya. Kerusakan pada membran sitoplasma mengakibatkan lisis sel dan menginaktivasi sistem transport membran dan sistem enzim transport membran (Valduga *et al.*, 1999) dan Bertoloni *et al.*, 1990), menyebabkan gangguan sintesis dinding sel dan munculnya struktur multilamelar disisi sekat sel-sel yang membelah seiring dengan bocornya ion-ion kalium dari dalam sel (Demidova & Hamblin, 2005).



# **BAB VII PENUTUP**

## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1. Kesimpulan

Penelitian ini telah menghasilkan seperangkat instrumen LED dengan spesifikasi sebagai berikut:

1. Sumber cahaya LED biru 430 nm dan merah 629 nm dengan *bandwidth* 65 nm dan 30 nm yang memiliki ketepatan pengukuran durasi waktu dan temperatur penyinaran dengan kalibrator.
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P mengakumulasi porfirin endogen tipe coproporfirin III (CP III).
3. Sumber cahaya LED biru berpotensi fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.
4. Dosis energi penyinaran LED biru yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P adalah pada daya *Power Width Modulation* (PWM) 75% (rapat daya 75 mW/cm<sup>2</sup>) dan durasi waktu penyinaran 30 menit (rapat energi penyinaran 135 J/cm<sup>2</sup>).
5. Penyinaran LED biru dosis energi optimal berpengaruh terhadap perubahan profil pita protein, profil asam lemak jenuh (palmitat, miristat, laurat) dan fisik dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

## 7.2. Saran

Dengan terwujudnya instrumen LED membuka peluang untuk dilakukan penelitian lebih lanjut meliputi:

1. Penelitian untuk meningkatkan efektivitas fotoinaktivasi pada bakteri dengan:
  - a) penggunaan sumber cahaya LED putih yang mencakup keseluruhan spektrum serap bakteri.
  - b) penggunaan filter untuk memperoleh berkas cahaya yang homogen sesuai spektrum serap porfirin bakteri.
  - c) pemberian eksogen fotosensitiser *aminolevulinic acid* (ALA) sebagai prekursor alami biosintesis porfirin dalam bakteri atau eksogen fotosensitiser yang lain untuk meningkatkan konsentrasi porfirin fotosensitiser.
2. Aplikasi metode fotodinamik dalam bidang klinis dalam bidang dermatologis.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Ashkenanzi H., Malik Z., Harth Y., Nitzan Y., 2003, Eradication of *Propionibacterium acnes* by its Endogenic Porphyrin after Illumination with High Intensity Blue Light, *FEMS Immunology Med. Microbiology*, 35: 684-688
- Astuti SD., Robiyati E., Supriyanto A., 2010, Photodinamik Inaktivasi Bakteri Gram Positif (*Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*) Dengan Endogen Photosensitizer Pada Penyinaran LED biru ( $429,8 \pm 3,7$ ) nm, *Seminar Nasional Fisika II*, Universitas Airlangga, Surabaya
- Astuti SD., 2010, Potensi Photodinamik Inaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Endogen Photosensitizer Pada Penyinaran LED biru ( $429,8 \pm 3,7$ ) nm dan merah ( $628.7 \pm 6.3$ ) nm, *Seminar Nasional Basic Science VII*, Universitas Brawijaya, Malang
- Astuti, S.D., Puspitasari A.T., Supriyanto A., 2009, The Optimal Lethal Dose of Blue Light (454 nm) Exposure with Light Emitting Diodes (LED) Device in *Staphylococcus Aureus* Bacteria, *Second International conference and Workshops on Basic and Applied Sciences & Regional Annual Fundamental Science Seminar*, UTM
- Bhandari R. & Sharma P.K., 2007, Effect of UV-B and High Visual Radiation on Photosynthesis in Freshwater (*Nostoc spongiaeforme*) and Marine (*Phormidium corium*) Cyanobacteria, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 44:231-239
- Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier J, 1990, Photosensitizing Activity of Water and Lipid Soluble Pthalocyanines on *E.coli*, *FEMS Microbiol. Letter* 59, 149-155
- Bollag D.M., Edelstein S.J., 1991, *Protein Methods*, John Wiley & sons Inc., USA
- Bonaficio, A., 2006, Resonance Raman Spectroscopy of Human Cytochrome P450 2D6: in Solution and on Nanostructured Biocompatible Metal Surfaces. *Vrije Universiteit Thesis*

- Bruce-Micah R., Huttenberger D., Freitag L., Cullun J., Foth H-J., 2009, Pharmacokinetic of ALA and h-ALA Induced Porphyrins in the Models *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 97, 1-7
- Capra, F., 2007, *Titik Balik Peradaban: Sains, Masyarakat dan Kebangkitan Kebudayaan (terjemahan dari The Turning Point: Science, Society, and The Rising Culture)*, Penerbit Jejak, Yogyakarta
- Cornelius, CE and Ludwi, GD, 1967, Red Fluorescence of Comedoes: Production of Porphyrins by *Corynebacterium acnes*, *Journal Inv Dermatol*, 49 (4), 368-370
- Coyle, John D. 1991. *Introduction to Organic Photochemistry*. John Willey Sons: London
- Demidova, T.N., Hamblin, M.R., 2005, Effect of cell-Photosensitizer Binding cell Density on Microbial Photoinactivation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2329-2335
- Ehrenberg, B., E. Gross, Y. Nitzan, and Z. Malik. 1993, Electric Depolarization of Photosensitized Cells: Lipid vs. Protein Alterations. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Acta*. 1151:257-264
- Ehrenberg, B., J. L. Anderson, and C. S. Foote. 1998, Kinetics and Yield of Singlet Oxygen Photosensitized by Hypericin in Organic and Biological Media. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 68:135-140
- Fotinos N., Convert M., Piffaretti J.C., Gurny R., Lange N., 2008, Effects on Gram- Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5-Aminolevulinic Acid and 5-Aminolevulinic Acid Derivatives, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1366-1373
- Grinholc m., Szramka B., Kurlenda J., Geaczyk A., Bielawski K.P., 2007, Bactericidal Effect of Photodynamic Inactivation Against Methicillin-Resistant and Methicillin-Suseptible *Staphylococcus aureus* is Strain Dependent, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 90:57-63

- Grossweiner, L.I. 2005, *The Science of Phototherapy: An Introduction*, Springer: USA
- Guffey J.S., Wilborn J., 2006, In Vitro Bactericidal Effect of 405 nm and 470 nm Blue Light, *Photomedicine. Laser Surgery*, 24(6), 684-688
- Hamblin, M.R., Hasan, T., 2003, Photodynamic Therapy: a New Antimicrobial Approach to Infectious Disease?, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Science*, 3,436-450
- Harris, T, 2008, *How Light Emitting Diode Work*, <http://electronics.howstuffworks.com> (31 Mei 2008)
- Hass BS., Webb RB., 1981, Photodynamic Effect of Dyes on Bacteria. IV. Lethal Effect of Acridine Orange and 460 or 500 nm Monochromatic Light in Strains of *Escherichia coli* That Differ in Repair Capability, *Mutant. Res.* 81, 277-28
- HMD, 2008, *Human Metabolome Database Coproporphyrin III and Protoporphyrin IX*
- Hoebeke, M., J. Piette, and A. Vandevorst, 1998, Photosensitized Production of Singlet Oxygen by Merocyanine 540 Bound to Liposomes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology* 9:281-294
- Imray FP., MacPhee DG., 1973, The Role of DNA Polymerase I and the Rec System in Survival of Bacteria and Bacteriophages Damaged by the Photodynamic Action of Acridine Orange, *Mol. Gen. Genet.*, 123, 289-298
- Irianto K., 2007, *Mikrobiologi: Mengungkap Dunia Mikroorganisme*, Yrama Widya Bandung
- James, W.D., 2007, Acne, *New England Journal of Medicine*, 49:218-226
- Jawetz E., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran* edisi 20, EGC, Jakarta

- Johansen Y, Widerøe H.C, Krane J, Johnsson A., 2003, Proton Magic Angle Spinning NMR Reveals New Features in Photodynamically Treated Bacteria, *Z. Naturforsch*, 58c, 401-407
- Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppelotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G., 2006, Photodynamic Therapy in The Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications, *Laser in Surgery and Medicine* 38: 468-481
- Juanda, A., 2005, *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*. Jakarta: FKUI
- Juzeniene A., Nielsen K.P., Moan J., 2006, Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy, *Journal of Environmental Pathology Toxicology Oncology*, 25:7-28
- Juzenas P., 2002, *Investigation of Endogenous Photosensitizer Protoporphyrin IX in Hairless Mouse Skin by Means of Fluorescence Spectroscopy*, Group of Photodynamic Therapy Departement of Biophysics, Institute for Cancer Research The Norwegian Radium Hospital
- Karotki A., Kruk M., Drobizhev M., Rebane A., Nickel E., Spangler CW., 2001, Efficient Singlet Oxygen Generation Upon Two-photon Excitation of new Porphyrin with Enhanced Non Linear Absorption, *IEEE Journal Sel Top Quantum Electron*, 7:971-975
- Karu, Tiina, 2003, *Low Power Laser Therapy* CRC Press LLC: New York
- Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, 2005, *Bacteriology*
- Kjeldstad B., Johnsson a., 1986, An Action Spectrum for Blue and Near Ultraviolet Inactivation of *Propionibacterium acnes*: with Emphasis on a Possible Porphyrin Photosensitization, *Journal of Photochemistry and Photobiology P: Physics*, Elsevier, 43(1986) 67-70
- Krane, S. K., 1992, *Modern Physics: The Particle Theory of Light*, John Wiley and Son Inc.



- Kusriningrum R.S., 2008, *Perancangan Percobaan*, Airlangga University Press, Surabaya
- Lanzani G., 2006, *Photophysics of Molecular Materials From Single Molecules to Single Crystals*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co
- Lipovsky A., Nitzan Y., Friedmann H., Lubart R., 2009, Sensitivity of *Staphylococcus aureus* Strains to Broadband Visible Light, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 85: 255-260
- Maclean M., Macgregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A., 2008, The Role of Oxygen in The visible Light Inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier, 92: 180-184
- Maclean M., Macgregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A., 2008, High Intensity Narrow spectrum Light inactivation and Wavelength Sensitivity of *Staphylococcus aureus*, research letter, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier, 285: 227-232
- MacLean M., MacGregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A., 2009, Inactivation of bacterial Pathogens Following exposure to light from a 405 nm Light Emitting Diode Array, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1932-1937
- Makarska, M. & Radzki S., 2002, *Water-soluble Porphyrins and Their Metal Complexes*. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklowdoska Lublin, Polonia. 57:17
- Menezes S., Capella MA., Caldas LR., 1990, Effect of Glucose on Photodynamic action of Methylene Blue: Repair and Mutation in *Escherichia coli*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier, 5 (1990) 505-517.
- Michaeli A. and Feitelson J., 1997, Reactivity of Singlet Oxygen Toward Proteins: The effect of Structure in Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor and Ribonuclease A., *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Chemistry*, 65:309-315

- Min D.B. and Boff J.M., 2002, Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Food, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol.1
- Min, D.B., Lee,, Horstein I H.O., 1999, Chemistry of lipid Oxidation, Flavor Chemistry: thirty years of progress, Plenum Publishers, New York, 175-187
- Moan J., Berg K., 1991, The Photodegradation of Porphyrin in Cells Can Be Used to Estimate The Lifetime of Singlet Oxygen, *Journal of Photochemistry and Photobiology P: Physics*, Elsevier, 53: 549-553
- Niemz M.H., 2007, *Laser-Tissue Interaction, Fundamentals and Applications*, Third enlarged edition, Springer-Verlag Berlin
- Nitzan Y., Divon M.S., Shporen E., Malik Z., 2004, ALA Induced Photodynamic Effect on Gram Positive and Negative Bacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology P: Physics.*, 3: 430-435
- Nitzan, Y., Ashkenazi H., 2001, Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli B* by a Cationic Hydrophilic Porphyrin at Various Light Wavelengths, *Current Microbiology*, 42: 408–414
- Nitzan, Y., Guttermann, Z., Malik and Ehrenberg, B., 1992, Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Photosensitized Porphyrins, *Journal of Photochemistry and Photobiology P: Physics*, 55:89-96
- Papageorgiu, Katsambas A., Chu A.. 2000, Phototherapy with Blue (415nm) and Red (660nm) Light in The Treatment of Acne Vulgaris, *British Journal of Dermatology* 142:973-978
- Paardekooper, M., P. J. Van den Broek, A. W. De Bruijne, J. G. Elferink, T. M. A. R. Dubbelman, and J. Van Steveninck. 1992. Photodynamic Treatment of Yeast Cells with The Dye Toluidine Blue: All-or-None Loss of Plasma Membrane Barrier Properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1108: 86–90
- Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., 2009, Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects, *Journal of Laser Medical Sciences*, 24: 259-268

- Pourkomainlin B., 1998, Possible Link Between a 35 kDa Protein and Osmolyte Transport in *Staphylococcus aureus*, *Letters in Applied Microbiology*, 26:149-152
- Prasad P.N., 2005, Photobiology for Biophotonics: *Advances In Biophotonics*, IOS Press, 123-147
- Ramberg K., Meló T.B., Johnsson A., 2004, In Situ Assesment of Porphyrin Photosensitizer in *P.acnes*, *Z.Naturforsch*, 59C: 93-98
- Ramstad S., Futsaether C., Johnsson A., 1997, Porphyrin Sensitization and Intracellular Calcium Changes in the Procaryote *Propionibacterium acnes*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Res.*, 40: 141-148
- Rosenberg I.M., 1996, *Protein Analysis and Purification Benchhtop Techniques*, Birkhauser, Boston, USA
- Ross, D.A., 1979, *Optoelectronic Devices and Optical Imaging Techniques*, The Macmillan Press Ltd, 11-19
- Schafer M., Schmitz C., Hornect G., 1998, High sensitivity of *Deinococcus Radiodurans* to Photodynamically produced singlet oxygen, *Int. Journal Radiation Biology*, 74: 249-253
- Schoenfeld N., Mamet R., Nordenberg Y., Shafran M., Babushkin T., Malik Z., 1994, Photoporphyrin Biosynthesis in Melanoma B16 Cells Characterization of Photodynamic Inactivation Stimulated by 5-Aminolevulinic acid and Chemical Inducers, *Int. Journal Cancer* 56: 106-112
- Schubert E.F., 2006, *Light Emitting Diodes*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press, USA
- Skogg D.A., 2004, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Thomsons Brooks

- Soares B.M., da Silva D.L., Sousa G.R., Amorim J.C.F., de Resende M.A., Pinotti M., Cisalpino P.S., 2009, In vitro Photodynamic Inactivation of *Candida* spp. Growth and Adhesion Buccal Epithelial Cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier, 94: 65-70
- Strauss, John S. 1999. *Sebaceous Glands: Acne Vulgaris*, Dermatology in General Medicine, Vol I. USA: McGraw-Hill Inc
- Sze, S.M., 1985, *Semiconductor Devices: Physics and Technology*, John Wiley & Sons, 70 -109
- Valduga G, Breda B, Giacometri G.M, Jori G, Reddi E, 1999, Photosensitization of Wild and Mutant Strains of *E.coli* by Meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl) Porphine, *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 256: 84-88
- Wainwright M., 2009, *Photosensitizers in Biomedicines*, John Wiley & Sons Ltd.
- Wardle B., 2009, *Principles and Applications of Photochemistry*, John Wiley & sons Ltd
- Webster, G.F.,2002. Acne Vulgaris. *British Medical Journal*, 325: 475-479
- White D.C. & Frerman F.E., 1967, Extraction, Characterization, and Cellular Localization of Lipids of *Staphylococcus aureus*, *Journal of bacteriology*, 94(6), 1854-67
- Wilson, B.C., 2005, *Photodynamic Therapy: Advances in Biophotonics*, IOS Press, 241-266

# LAMPIRAN

**LAMPIRAN I.1****PENGUKURAN SPEKTRUM PANJANG GELOMBANG LED BIRU**

Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui spektrum panjang gelombang LED biru sebagai sumber cahaya. Alat yang digunakan untuk mengkalibrasi instrumen ini adalah wavelength meter tipe SR 530.

**SPEKIFIKASI ALAT KALIBRASI**

Nama : Wavelength Meter SR 530 Stanford Research System Inc.

Kalibrator : He-Ne laser 543 nm Newport 811

Power : 5 mW

**Data pengukuran spektrum panjang gelombang 360 buah LED biru**

No.	Panjang gelombang (nm)	No.	Panjang gelombang (nm)
1	430,18	16	430,1
2	430,15	17	430,13
3	429,97	18	430,00
4	430,12	19	430,11
5	430,21	20	430,09
6	429,99	21	430,00
7	429,97	22	429,99
8	430,15	23	429,88
9	430,24	24	429,89
10	430,13	25	429,78
11	429,89	26	430,18
12	429,86	27	430,19
13	429,95	28	430,15
14	429,79	29	430,22
15	430,00	30	430,15
$\lambda$ rata-rata		430,05	
$\Delta\lambda$		0,13	

**LAMPIRAN I.2****PENGUKURAN SPEKTRUM PANJANG GELOMBANG LED MERAH**

Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui spektrum panjang gelombang LED merah sebagai sumber cahaya. Alat yang digunakan untuk mengkalibrasi instrumen ini adalah wavelength meter tipe SR 530.

**SPEKTRUM ALAT KALIBRASI**

Nama : Wavelength Meter SR 530 Stanford Research System Inc.

Kalibrator : He-Ne laser 543 nm Newport 811

Power : 5 mW

**Data pengukuran spektrum panjang gelombang 360 buah LED merah**

No.	Panjang gelombang (nm)	No.	Panjang gelombang (nm)
1	629,01	16	629,01
2	629,00	17	629,00
3	628,99	18	628,99
4	628,98	19	628,99
5	628,99	20	629,00
6	629,01	21	629,00
7	629,00	22	629,01
8	628,99	23	629,01
9	629,00	24	629,03
10	628,99	25	629,02
11	629,01	26	629,01
12	628,97	27	629,00
13	629,00	28	629,01
14	628,98	29	629,98
15	628,99	30	628,99
$\lambda$ rata-rata			629,03
$\Delta\lambda$			0,18

**LAMPIRAN I.3****PENGUKURAN DAYA PENYINARAN LED BIRU**

Pengukuran ini bertujuan untuk mengetahui daya penyinaran sumber cahaya LED biru. Alat yang digunakan untuk mengukur daya penyinaran LED biru adalah Silicon detector 818 SL, Newport SN 5592, panjang gelombang 400 nm -1100 nm.

**SPEKIFIKASI ALAT KALIBRASI**

Nama : Silicon Detector 818 SL, Newport SN 5592  
 Kalibrator : He-Ne laser 543 nm Newport 811  
 Power : 5 mW

**Data pengukuran rapat daya penyinaran LED biru pada daya PWM 25%**

No.	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 2 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 3 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 4 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 5 cm
1	28,58	28,58	28,58	28,58
2	28,58	28,58	28,58	28,58
3	27,79	27,79	27,79	27,79
4	28,58	28,58	28,58	28,58
5	29,00	28,58	28,58	28,58
6	27,79	27,79	27,79	27,79
7	29,00	28,58	28,58	28,58
8	27,79	27,43	27,79	27,79
9	28,10	28,10	28,10	28,10
10	29,00	28,58	27,83	27,83
11	28,10	28,10	28,10	28,10
12	29,00	29,00	27,83	27,83
13	28,10	28,10	27,83	27,83
14	28,58	28,58	28,58	28,58
15	28,58	28,58	28,58	28,58
16	28,58	28,58	27,43	27,43
17	29,00	28,58	26,88	26,88
18	28,10	28,10	28,10	28,10
19	27,79	27,43	27,79	27,79
20	27,79	27,43	27,43	27,43
P rerata	28,39	28,25	28,15	28,04
ΔP	0,47	0,47	0,48	0,49



**Data pengukuran rapat daya penyinaran LED biru pada daya PWM 50%**

No.	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 2 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 3 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 4 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 5 cm
1	56,68	56,03	56,03	56,23
2	56,68	56,06	56,06	56,23
3	55,58	55,58	55,58	55,58
4	56,23	56,23	56,23	56,23
5	56,68	56,68	56,68	56,68
6	55,58	55,58	55,58	54,83
7	56,68	56,68	56,68	56,68
8	55,58	54,83	54,83	54,83
9	56,06	56,06	56,06	56,06
10	56,68	56,68	56,68	56,68
11	55,58	56,03	56,03	56,06
12	56,68	56,68	56,68	56,68
13	55,58	56,03	56,03	56,06
14	56,23	56,23	56,23	56,23
15	56,23	56,23	56,23	56,23
16	56,23	56,23	56,06	56,06
17	56,68	56,68	56,68	56,23
18	55,58	55,58	56,03	56,06
19	55,58	55,58	55,58	55,58
20	55,58	55,58	54,83	54,83
P rerata	56,12	56,06	56,04	56,00
$\Delta P$	0,49	0,50	0,55	0,59

**Data pengukuran rapat daya penyinaran LED biru pada daya PWM 75%**

No.	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 2 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 3 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 4 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 5 cm
1	75,16	75,08	75,08	75,08
2	75,16	75,08	75,08	75,08
3	74,59	74,59	74,06	74,06
4	75,16	75,08	75,08	75,08
5	76,14	76,14	76,14	76,14
6	75,16	75,08	75,08	75,08
7	76,14	76,14	76,14	76,14
8	74,66	74,66	74,66	74,66
9	75,16	75,08	75,08	75,08
10	76,14	76,14	76,14	76,14
11	75,16	75,08	75,08	75,08
12	76,14	76,14	76,14	76,14
13	75,16	75,08	75,08	75,08
14	74,59	74,59	74,06	74,06
15	75,16	75,08	75,08	75,08
16	75,16	75,08	75,08	75,08
17	76,14	76,14	75,16	75,16
18	75,16	75,08	75,08	75,08
19	74,59	74,59	74,59	74,06
20	74,59	74,59	74,59	74,06
P rerata	75,27	75,22	75,12	75,07
ΔP	0,57	0,58	0,62	0,68

**Data pengukuran rapat daya penyinaran LED biru pada daya PWM 100%**

No.	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 2 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 3 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 4 cm	Rapat daya LED (mW/cm <sup>2</sup> ) pada jarak 5 cm
1	96,56	96,56	96,56	96,56
2	96,56	96,56	96,56	96,56
3	95,33	94,80	94,80	94,80
4	96,56	96,56	96,70	96,56
5	96,70	96,73	96,70	96,70
6	95,33	95,39	94,80	95,33
7	96,73	96,73	96,70	96,73
8	95,33	95,33	95,33	95,33
9	96,56	96,08	96,08	96,56
10	96,56	96,56	96,70	96,73
11	96,08	96,08	96,08	96,08
12	96,56	96,73	96,70	96,73
13	96,08	96,08	96,08	96,08
14	95,39	95,39	95,39	95,39
15	96,08	96,08	96,08	96,08
16	96,08	96,08	96,08	96,08
17	96,70	96,56	96,70	96,73
18	95,39	95,39	95,39	95,39
19	95,33	95,33	95,33	94,80
20	95,33	95,33	95,33	94,80
P rerata	96,06	96,02	96,01	96,00
ΔP	0,58	0,61	0,67	0,72

**LAMPIRAN I.4****KALIBRASI DURASI WAKTU PENYINARAN**

Kalibrasi waktu penyinaran dilakukan untuk menguji kesesuaian waktu yang dihitung oleh alat atau instrumen pemaparan cahaya LED biru. Alat yang digunakan untuk mengkalibrasi instrumen ini adalah Stopwatch Digital.

**SPEKIFIKASI ALAT KALIBRASI**

Name : Enko Sport Timer  
 Precision : 1/100 second with split counter (for first 30 minutes)  
 Power : battery LR44

**Data durasi waktu penyinaran pada instrumen LED dan kalibrator**

Durasi waktu (t)	Pengukuran durasi waktu (t) (detik)										t <sub>Rata-rata</sub>	waktu kalibrator (detik)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900
1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200

## LAMPIRAN I.5

## KALIBRASI TEMPERATUR PENYINARAN

Kalibrasi suhu dilakukan untuk menguji kesesuaian temperatur yang dihitung oleh alat atau instrumen pemaparan cahaya LED biru. Alat yang digunakan untuk mengkalibrasi instrumen ini adalah termometer digital *Atech Thermo L87AD*.

## SPESIFIKASI ALAT KALIBRASI

Name : *Atech Thermo L87AD*.

Measured Range : -10°C to +50°C (Indoor)  
-50°C to +70°C (Outdoor)

## Data temperatur penyinaran pada instrumen LED dan kalibrator

Temperatur (°C)	Pengukuran Temperatur (T) (°C)										T rata- rata	$\Delta T$	Temperatur pada kalibrator
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
21	20	20	20	21	21	21	21	21	21	21	20,7	0,48	21
22	22	22	21	21	22	22	22	22	22	22	21,8	0,42	22
23	23	23	22	24	22	23	23	23	23	23	22,9	0,57	23
24	23	23	24	24	24	24	24	24	24	24	23,8	0,67	24
25	25	25	25	25	24	25	25	25	25	25	24,9	0,32	25
26	26	26	26	25	25	26	26	26	26	26	25,8	0,42	26
27	27	27	27	28	27	27	26	27	27	27	27	0,47	27
28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	27,9	0,32	28
29	29	29	28	28	29	29	29	29	29	30	28,9	0,57	29
30	30	30	30	30	30	30	30	31	30	30	30,1	0,32	30



Home / Optical Measurement / Calibrated Optical Detectors / Low-Cost Photodetectors, Entry level 818-xx-L Series / 818-SL-L

## Silicon Low Power Detector, 400 to 1100 nm, BNC Connector, No Attenuator



\$280.49 Qty 1 [ADD TO CART](#)

Model: **818-SL-L** Availability: **In Stock Now**

Zoom  
 Enlarge

Series Info: **Low-Cost Photodetectors, Entry level 818-xx-L Series**

The LABasix™ Collection. [Learn More](#)

[Contact Us](#) [Print View](#) [Feedback](#)

The 818-SL-L Low-Power Silicon (Si) Photodetector is supplied with a NIST traced calibration report that details individual detector responsivity over the 400 to 1100 nm wavelength range. The standard BNC connector allows flexible interfacing with oscilloscopes, lock-in amplifiers or current meters. Also available are a variety of accessories such as collimating lens assemblies, fiber optic adapters, a bare fiber adapter and a 1 inch optic holder. An 883-SL OD3 attenuator can be separately purchased to attenuate the input beam intensity.

For more details on Newport's calibrated detectors, please refer to our [Calibrated Detector Selection Guide](#).



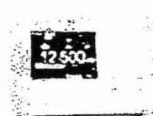
[View All Newport Products & Systems](#)

[Related Products: View All](#)

<b>Model</b>	<b>818-SL-L</b>
Detector Type	Semiconductor
Spectral Range	400 to 1100 nm
Active Diameter	1.13 cm
Detector Active Area	1 cm <sup>2</sup>
Material	Silicon
Power Density, Average Maximum w/o Attenuator	2 mW/cm <sup>2</sup>
Pulse Energy, Maximum - w/o Attenuator	1 nJ/cm <sup>2</sup>
Uniformity	±2 %
Shunt Resistance	≥10 MΩ
Calibration Uncertainty	1% @ 400-940nm, 4% @ 941-1100 nm
NEP	0.2 pW/√Hz
Reverse Bias, Maximum	3 V
Linearity	±0.5 %
Connector Type	BNC



818 Photodetector, Silicon, 400 - 1100 nm, BNC Connector  
Model: **818-SL**

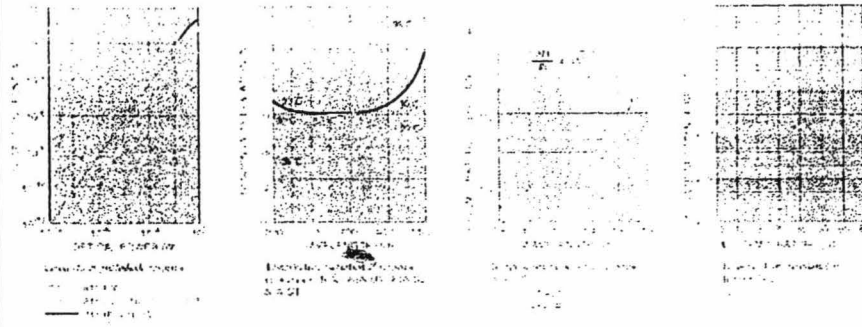
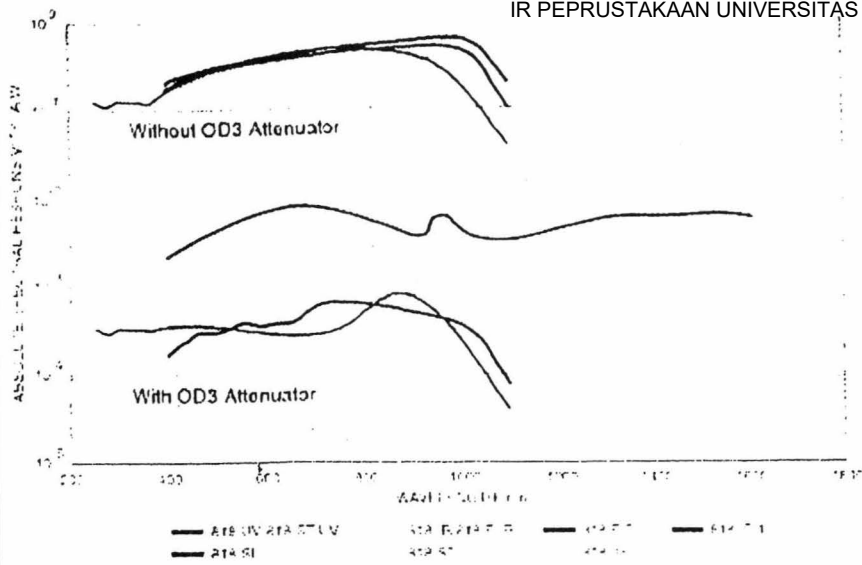


Optical Power Meter/ Energy Meter, High-Performance Hand-Held  
Model: **1918-C**



Bare Fiber Holder for Photodiode Detector  
Model: **FP3-FH1**

[View All Related Products](#)



Learn More About Low-Cost Photodetectors, Entry level 818-xx-L Series

- Opto-Mechanics
- Optics
- Lasers
- Motion
- Manual Positioning
- Vibration Control
- Optical Measurement
- Light Sources
- Optical Filters
- Fiber Optics
- Spectroscopy Instruments
- Application Solutions

- Corion®
- Oriel® Instruments
- New Focus™
- Newport®
- Richardson Gratings™
- Spectra-Physics®

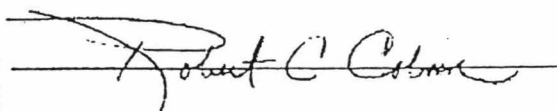
- Application Notes
- Catalog Request
- Media Resources
- Newport Videos
- Newsletters
- Press Releases
- Software & Drivers
- Technical References
- Technical Publications

- Careers at Newport Company
- Overview
- Investor Information
- Quality Commitments



Sign-up to receive Newport News and special offers delivered to your inbox!

**SIGN-UP**

<p><b>MicroBiologics®</b>                  Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release</p>																																																																																									
<p><b>Specifications</b></p> <p>Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>                  Catalog Number: 0827                  Lot Number: 82787                  Reference Number: ATCC® 6538P™*                  Purity: Pure                  Recovery: &gt; 1000 CFUs per Pellet                  Passage from Reference: 4                  Expiration Date: 2011/01</p>	<p><b>Additional Information</b></p> <p><b>Release Information:</b>                  Quality Control Technologist: Theresa Iverson                  Release Date: 2009-04-15                  Disclaimer:                  Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.</p>																																																																																								
<p><b>Performance</b></p> <p><b>Macroscopic Features:</b>                  Medium to large, convex, pale yellow and some gold, creamy, opaque, beta hemolytic</p> <p><b>Microscopic Features:</b>                  Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters</p> <p><b>Medium:</b>                  SBAP</p> <p><b>Method:</b>                  Gram Stain</p>																																																																																									
<p><b>Vitek GP</b></p> <table border="0"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 1</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>POLYMXIN B RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td>-</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PULLULAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RAFFINOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrlo.)</td><td>+</td></tr> <tr><td>SALICIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 2</td><td>-</td></tr> <tr><td>OPTOCHIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	D-AMYGDALIN	-	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	D-XYLOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE 1	+	BETA-GALACTOSIDASE	-	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	-	CYCLODEXTRIN	-	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-	ALPHA-MANNOSIDASE	-	PHOSPHATASE	+	Leucine ARYLAMIDASE	-	L-Proline ARYLAMIDASE	-	BETA GLUCURONIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+	BETA-GLUCURONIDASE	-	Alanine ARYLAMIDASE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	D-SORBITOL	-	UREASE	-	POLYMXIN B RESISTANCE	+	D-GALACTOSE	+	D-RIBOSE	+	L-LACTATE alkalization	+	LACTOSE	-	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	D-MALTOSE	-	BACITRACIN RESISTANCE	+	NOVOBIOCIN RESISTANCE	-	GROWTH IN 6.5% NaCl	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	-	PULLULAN	-	D-RAFFINOSE	-	O/129 RESISTANCE (comp.vibrlo.)	+	SALICIN	-	SACCHAROSE/SUCROSE	+	D-TREHALOSE	+	ARGININE DIHYDROLASE 2	-	OPTOCHIN RESISTANCE	+	<p><b>Other Features/Challenges: Results</b></p> <p>Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive                  Coagulase (rabbit plasma-tube): positive                  Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative</p> <p>                  AUTHORIZED SIGNATURE</p>
Phenotypic Features	Results																																																																																								
D-AMYGDALIN	-																																																																																								
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-																																																																																								
D-XYLOSE	-																																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 1	+																																																																																								
BETA-GALACTOSIDASE	-																																																																																								
ALPHA-GLUCOSIDASE	-																																																																																								
Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	-																																																																																								
CYCLODEXTRIN	-																																																																																								
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-																																																																																								
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-																																																																																								
ALPHA-MANNOSIDASE	-																																																																																								
PHOSPHATASE	+																																																																																								
Leucine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																																								
BETA GLUCURONIDASE	-																																																																																								
ALPHA-GALACTOSIDASE	-																																																																																								
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+																																																																																								
BETA-GLUCURONIDASE	-																																																																																								
Alanine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
D-SORBITOL	-																																																																																								
UREASE	-																																																																																								
POLYMXIN B RESISTANCE	+																																																																																								
D-GALACTOSE	+																																																																																								
D-RIBOSE	+																																																																																								
L-LACTATE alkalization	+																																																																																								
LACTOSE	-																																																																																								
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+																																																																																								
D-MALTOSE	-																																																																																								
BACITRACIN RESISTANCE	+																																																																																								
NOVOBIOCIN RESISTANCE	-																																																																																								
GROWTH IN 6.5% NaCl	+																																																																																								
D-MANNITOL	+																																																																																								
D-MANNOSE	+																																																																																								
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	-																																																																																								
PULLULAN	-																																																																																								
D-RAFFINOSE	-																																																																																								
O/129 RESISTANCE (comp.vibrlo.)	+																																																																																								
SALICIN	-																																																																																								
SACCHAROSE/SUCROSE	+																																																																																								
D-TREHALOSE	+																																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 2	-																																																																																								
OPTOCHIN RESISTANCE	+																																																																																								



**MicroBiologics®****Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release****Specifications**

Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus  
 Catalog Number: 0827  
 Lot Number: 82787  
 Reference Number: ATCC® 6538P™  
 Purity: Pure  
 Recovery: > 1000 CFUs per Pellet  
 Passage from Reference: 4  
 Expiration Date: 2011/01

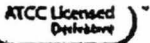
**Additional Information****Release Information:**

Quality Control Technologist: Theresa Iverson  
 Release Date: 2009-04-15

**Disclaimer:**

Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.

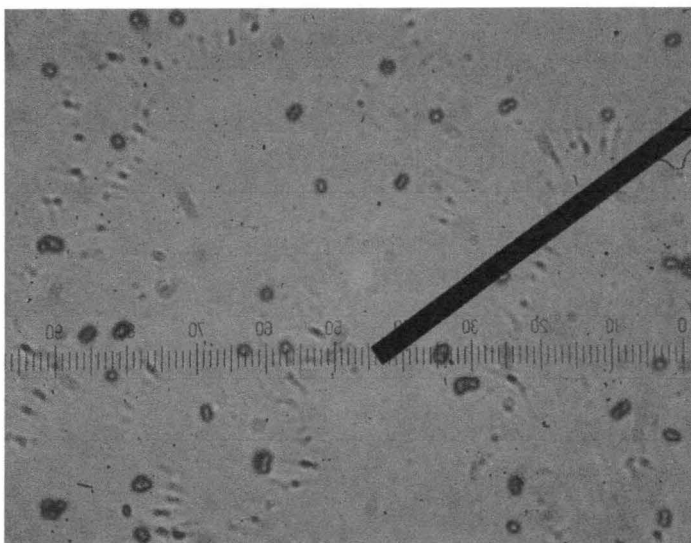
**Note For Vitek®:** Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.



The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2009 MicroBiologics, Inc. All Rights Reserved.  
 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml

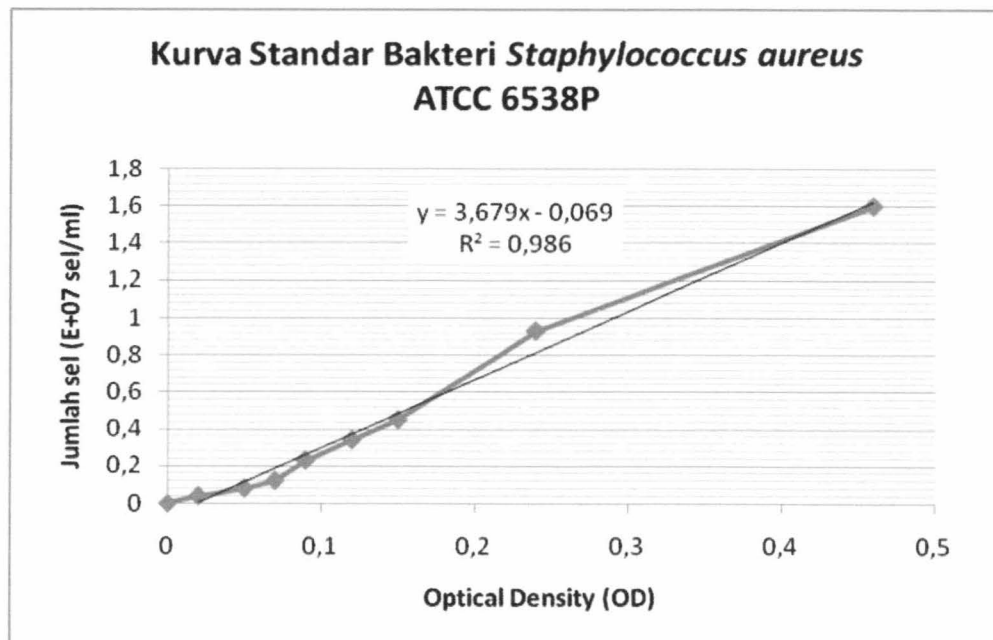
**LAMPIRAN II.2****HASIL PEWARNAAN BAKTERI *Staphylococcus aureus***

**Keterangan: Penghitungan bakteri dengan Hemocytometer pada pengenceran  $10^{-7}$  perbesaran 400X**

## LAMPIRAN II.3

KURVA STANDAR BAKTERI *Staphylococcus aureus*1. Data Kurva standar bakteri *Staphylococcus aureus*

Optical density (OD) 660 nm	Jumlah sel bakteri x 10 <sup>7</sup> (sel/ml)
0	0
0,02	0,04
0,05	0,08
0,07	0,12
0,09	0,23
0,12	0,34
0,15	0,45
0,24	0,93
0,46	1,6

2. Kurva Standar bakteri *Staphylococcus aureus*

**LAMPIRAN II.4****KOMPOSISI MEDIA *Staphylococcus aureus*****1. *Staphylococcus Agar***

Ekstrakt produk Pronadisa CAT 1032.00, tiap 100 ml pH  $7.0 \pm 0.2$  terdiri dari:

NaCl	7,5 g
D-Manitol	1 g
Casein peptone	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Yeast Extract	0,25 g
Lactose	0,2 g
Gelatin	0,3 g
Agar	1,5 g

**2. *Nutrient Broth***

Ekstrakt produk Pronadisa CAT 1216.00, tiap 100 ml (pH  $6.8 \pm 0.2$  pada 25°C)

terdiri dari:

Beef extract	0,5 g
Gelatin peptone	0,3 g

## LAMPIRAN III.1

## DATA JUMLAH KOLONI BAKTERI

*Staphylococcus aureus* DENGAN DAN TANPA PUTARAN HOLDER SAMPEL

No	Jumlah Koloni (CFU/ml)			
	Kontrol tanpa putaran	Rerata±STD	Dengan putaran holder	Rerata±STD
1	229	231,40±8,88	229	231,60±8,65
2	225		227	
3	228		226	
4	231		235	
5	216		218	
6	245		245	
7	237		237	
8	243		240	
9	223		220	
10	237		239	
11	229		229	
12	225		228	
13	228		228	
14	231		232	
15	216		215	
16	245		246	
17	237		235	
18	243		242	
19	223		225	
20	237		236	

## LAMPIRAN III.2

**ANALISIS STATISTIK JUMLAH KOLONI BAKTERI**  
***Staphylococcus aureus* DENGAN DAN TANPA PUTARAN HOLDER SAMPEL**

## NPar Tests

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah Koloni Bakteri
N		40
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	231,5000
	Std. Deviation	8,65285
Most Extreme Differences	Absolute	,114
	Positive	,114
	Negative	-,087
Kolmogorov-Smirnov Z		,719
Asymp. Sig. (2-tailed)		,679

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## T-Test

## Group Statistics

Interaksi	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Jumlah Koloni Bakteri tanpa putaran	20	231,4000	8,87575	1,98468
dengan putaran	20	231,6000	8,65357	1,93500

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Jumlah Koloni Bakteri	Equal variances assumed	,014	,905	-,072	38	,943	-,20000	2,77185	-5,81132	5,41132
	Equal variances not assumed			-,072	37,976	,943	-,20000	2,77185	-5,81144	5,41144

## LAMPIRAN III.3

**DATA JUMLAH KOLONI BAKTERI *Staphylococcus aureus*  
PADA PENYINARAN LED BIRU DAN MERAH**

**A. LED BIRU**

No	Daya	Waktu	Jumlah Koloni (CFU/ml)				% penurunan CFU	Rerata±STD
			kontrol	Rerata±STD	Perlakuan	Rerata±STD		
1	75%	30 menit	232	232,45±4,45	68	69,50±2,89	70,69	70,09±1,37
2	75%	30 menit	235		69		70,64	
3	75%	30 menit	228		72		68,42	
4	75%	30 menit	230		68		70,43	
5	75%	30 menit	228		68		70,18	
6	75%	30 menit	238		70		70,59	
7	75%	30 menit	237		77		67,51	
8	75%	30 menit	243		67		72,43	
9	75%	30 menit	230		73		68,26	
10	75%	30 menit	230		68		70,43	
11	75%	30 menit	230		71		69,13	
12	75%	30 menit	228		71		68,86	
13	75%	30 menit	231		68		70,56	
14	75%	30 menit	229		73		68,12	
15	75%	30 menit	239		72		69,87	
16	75%	30 menit	236		66		72,03	
17	75%	30 menit	228		67		70,61	
18	75%	30 menit	231		70		69,70	
19	75%	30 menit	229		66		71,18	
20	75%	30 menit	237		66		72,15	

**B. LED MERAH**

No	Daya	Waktu	Jumlah Koloni (CFU/ml)				% penurunan CFU	Rerata±STD
			kontrol	Rerata±STD	Perlakuan	Rerata±STD		
1	75%	30 menit	232	232,45±4,45	179	180,85±3,69	22,84	22,17±2,06
2	75%	30 menit	235		180		23,40	
3	75%	30 menit	228		185		18,86	
4	75%	30 menit	230		186		19,13	
5	75%	30 menit	228		177		22,37	
6	75%	30 menit	238		179		24,79	
7	75%	30 menit	237		188		20,68	
8	75%	30 menit	243		179		26,34	
9	75%	30 menit	230		176		23,48	
10	75%	30 menit	230		184		20,00	
11	75%	30 menit	230		182		20,87	
12	75%	30 menit	228		178		21,93	
13	75%	30 menit	231		185		19,91	
14	75%	30 menit	229		176		23,14	
15	75%	30 menit	239		179		25,10	
16	75%	30 menit	236		184		22,03	
17	75%	30 menit	228		178		21,93	
18	75%	30 menit	231		185		19,91	
19	75%	30 menit	229		177		22,71	
20	75%	30 menit	237		180		24,05	

LAMPIRAN III.4

ANALISIS STATISTIK UJI POTENSI PENYINARAN LED BIRU DAN MERAH  
UNTUK FOTOINAKTIVASI BAKTERI *Staphylococcus aureus*

NPar Tests LED BIRU

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Persen Penurunan
N		20
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	70,0904
	Std. Deviation	1,36933
Most Extreme Differences	Absolute	,149
	Positive	,131
	Negative	-,149
Kolmogorov-Smirnov Z		,668
Asymp. Sig. (2-tailed)		,764

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

NPar Tests LED MERAH

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Persen Penurunan
N		20
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	22,1743
	Std. Deviation	2,05833
Most Extreme Differences	Absolute	,105
	Positive	,105
	Negative	-,103
Kolmogorov-Smirnov Z		,468
Asymp. Sig. (2-tailed)		,981

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

T-Test

Group Statistics

	Kelompok penyinaran	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persen Penurunan	LED Biru	20	70,0904	1,36933	,30619
	LED merah	20	22,1743	2,05833	,46026

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Persen Penurunan	3,163	,083	86,679	38	,000	47,91610	,55280	46,79702	49,03519
			86,679	33,063	,000	47,91610	,55280	46,79150	49,04070



## LAMPIRAN III.5

**DATA JUMLAH KOLONI BAKTERI *Staphylococcus aureus*  
PADA PENYINARAN LED BIRU**

No	Daya (%)	Waktu (menit)	Jumlah Koloni (CFU/ml)				% penurunan CFU	Rerata±STD
			kontrol	Rerata±STD	Perlakuan	Rerata±STD		
1	25	10	112	111,67±2,52	63	64,00±1,00	43,75	42,67±1,3
2	25	10	114		65		42,98	
3	25	10	109		64		41,28	
4	25	20	112	111,67±2,52	56	55,33±3,06	50,00	50,39±3,81
5	25	20	114		52		54,39	
6	25	20	109		58		46,79	
7	25	30	112	111,67±2,52	48	45,67±2,08	57,14	59,09±2,15
8	25	30	114		44		61,40	
9	25	30	109		45		58,72	
10	25	40	112	111,67±2,52	53	49,67±3,06	52,68	55,53±2,47
11	25	40	114		49		57,18	
12	25	40	109		47		56,88	
13	25	50	112	111,67±2,52	47	49,67±2,52	58,04	55,49±2,93
14	25	50	114		50		56,14	
15	25	50	109		52		52,29	
16	50	10	114	111,33±2,89	67	69,00±2,00	41,23	37,98±3,19
17	50	10	109		71		34,86	
18	50	10	111		69		37,84	
19	50	20	114	111,33±2,89	49	46,33±2,31	57,02	58,40±1,25
20	50	20	109		45		58,72	
21	50	20	111		45		59,46	
22	50	30	114	111,33±2,89	42	42,67±2,08	63,16	61,67±1,95
23	50	30	109		41		62,39	
24	50	30	111		45		59,46	
25	50	40	114	111,33±2,89	51	51,67±3,06	55,26	53,55±3,49
26	50	40	109		55		49,54	
27	50	40	111		49		55,86	
28	50	50	114	111,33±2,89	53	54,67±2,08	53,51	50,86±2,93
29	50	50	109		57		47,71	
30	50	50	111		54		51,35	
31	75	10	112	112,33±0,58	59	58,67±2,52	47,32	47,77±2,48
32	75	10	112		61		45,54	
33	75	10	113		56		50,44	
34	75	20	112	112,33±0,58	42	41,33±3,06	62,50	63,21±2,58
35	75	20	112		38		66,07	
36	75	20	113		44		61,06	
37	75	30	112	112,33±0,58	26	28,67±2,52	76,79	74,48±2,24
38	75	30	112		31		72,32	
39	75	30	113		29		74,34	
40	75	40	112	112,33±0,58	42	43,00±2,65	62,50	61,72±2,49

No	Daya (%)	Waktu (menit)	Jumlah Koloni (CFU/ml)				% penurunan CFU	Rerata±STD
			kontrol	Rerata±STD	Perlakuan	Rerata±STD		
41	75	40	112		46		58,93	
42	75	40	113		41		63,72	
43	75	50	112	112,33±0,58	47	47,67±1,15	58,04	57,56±1,15
44	75	50	112		49		56,25	
45	75	50	113		47		58,41	
46	100	10	113	112,33±2,08	71	73,00±2,00	37,17	35,01±1,90
47	100	10	114		75		34,21	
48	100	10	110		73		33,64	
49	100	20	113	112,33±2,08	65	65,00±2,00	42,48	42,14±0,80
50	100	20	114		67		41,23	
51	100	20	110		63		42,73	
52	100	30	113	112,33±2,08	56	57,33±1,53	50,44	48,94±2,24
53	100	30	114		57		50,00	
54	100	30	110		59		46,36	
55	100	40	113	112,33±2,08	57	59,00±2,00	49,56	47,45±2,60
56	100	40	114		59		48,25	
57	100	40	110		61		44,55	
58	100	50	113	112,33±2,08	62	61,67±1,53	45,13	45,08±2,32
59	100	50	114		60		47,37	
60	100	50	110		63		42,73	

LAMPIRAN III.6.

ANALISIS STATISTIK OPTIMASI DOSIS ENERGI PENYINARAN LED BIRU

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Prosentase Penurunan
N		60
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	52,44827794
	Std. Deviation	9,600081088
Most Extreme Differences	Absolute	,072
	Positive	,054
	Negative	-,072
Kolmogorov-Smirnov Z		,558
Asymp. Sig. (2-tailed)		,915

a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Daya Penyinaran	1,00	25%	15
	2,00	50%	15
	3,00	75%	15
	4,00	100%	15
Lama Waktu Penyinaran	1,00	10 menit	12
	2,00	20 menit	12
	3,00	30 menit	12
	4,00	40 menit	12
	5,00	50 menit	12

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Prosentase Penurunan

Daya Penyinaran	Lama Waktu Penyinaran	Mean	Std. Deviation	N
25%	10 menit	42,67229	1,261723096	3
	20 menit	50,39165	3,813600295	3
	30 menit	59,08732	2,154512093	3
	40 menit	55,52562	2,466561995	3
	50 menit	55,48988	2,925810247	3
	Total		52,63335	6,313950195
50%	10 menit	37,97610	3,185093844	3
	20 menit	58,39753	1,251643343	3
	30 menit	61,66756	1,950895516	3
	40 menit	53,55343	3,487237203	3
	50 menit	50,85552	2,932781327	3
	Total		52,49003	8,755838294
75%	10 menit	47,76654	2,483480529	3
	20 menit	63,21113	2,579341174	3
	30 menit	74,48114	2,235665406	3
	40 menit	61,71513	2,488741555	3
	50 menit	57,56426	1,153233163	3
	Total		60,94764	9,152889532
100%	10 menit	35,00501	1,895195960	3
	20 menit	42,14441	,803307934	3
	30 menit	48,93537	2,238149360	3
	40 menit	47,44953	2,599137818	3
	50 menit	45,07615	2,321091748	3
	Total		43,72209	5,391296954
Total	10 menit	40,85498	5,425022370	12
	20 menit	53,53618	8,620855127	12
	30 menit	61,04285	9,681707739	12
	40 menit	54,56093	5,826966372	12
	50 menit	52,24645	5,428869414	12
	Total		52,44828	9,600081088

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Prosentase Penurunan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5200,665 <sup>a</sup>	19	273,719	46,223	,000
Intercept	165049,312	1	165049,312	7872,138	,000
Daya	2226,322	3	742,107	125,321	,000
Waktu	2567,504	4	641,876	108,395	,000
Daya * Waktu	406,840	12	33,903	5,725	,000
Error	236,866	40	5,922		
Total	170486,843	60			
Corrected Total	5437,532	59			

Levene's Test of Equality of Error Variances

Dependent Variable: Prosentase Penurunan

F	df1	df2	Sig.
,762	19	40	,734

Tests the null hypothesis that the error variance of dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Daya+Waktu+Daya \* Waktu

a. R Squared = ,956 (Adjusted R Squared = ,936)

Post Hoc Tests Daya Penyinaran

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Prosentase Penurunan

Tukey HSD

(I) Daya Penyinaran	(J) Daya Penyinaran	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
25%	50%	,14332390	,888568853	,998	-2,23841323	2,52506102
	75%	-8,3142888*	,888568853	,000	-10,69602590	-5,93255165
	100%	8,91125850*	,888568853	,000	6,52952137	11,29299563
50%	25%	-,14332390	,888568853	,998	-2,52506102	2,23841323
	75%	-8,4576127*	,888568853	,000	-10,83934980	-6,07587554
	100%	8,76793461*	,888568853	,000	6,38619748	11,14967173
75%	25%	8,31428877*	,888568853	,000	5,93255165	10,69602590
	50%	8,45761267*	,888568853	,000	6,07587554	10,83934980
	100%	17,225547*	,888568853	,000	14,84381015	19,60728440
100%	25%	-8,9112585*	,888568853	,000	-11,29299563	-6,52952137
	50%	-8,7679346*	,888568853	,000	-11,14967173	-6,38619748
	75%	-17,225547*	,888568853	,000	-19,60728440	-14,84381015

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

Prosentase Penurunan

Tukey HSD a,b

Daya Penyinaran	N	Subset		
		1	2	3
100%	15	43,72209		
50%	15		52,49003	
25%	15		52,63335	
75%	15			60,94764
Sig.		1,000	,998	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5,922.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15,000.

b. Alpha = ,05.

## Lama Waktu Penyinaran

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Prosentase Penurunan

Tukey HSD

(I) Lama Waktu Penyinaran	(J) Lama Waktu Penyinaran	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
10 menit	20 menit	-12,681195*	,993450179	,000	-15,51857977	-9,84381097
	30 menit	-20,187864*	,993450179	,000	-23,02524876	-17,35047997
	40 menit	-13,705943*	,993450179	,000	-16,54332758	-10,86855879
	50 menit	-11,391468*	,993450179	,000	-14,22885224	-8,55408344
20 menit	10 menit	12,681195*	,993450179	,000	9,84381097	15,51857977
	30 menit	-7,5066690*	,993450179	,000	-10,34405339	-4,66928460
	40 menit	-1,0247478	,993450179	,839	-3,86213221	1,81263658
	50 menit	1,28972753	,993450179	,694	-1,54765687	4,12711193
30 menit	10 menit	20,187864*	,993450179	,000	17,35047997	23,02524876
	20 menit	7,50666900*	,993450179	,000	4,66928460	10,34405339
	40 menit	6,48192118*	,993450179	,000	3,64453678	9,31930558
	50 menit	8,79639653*	,993450179	,000	5,95901213	11,63378092
40 menit	10 menit	13,705943*	,993450179	,000	10,86855879	16,54332758
	20 menit	1,02474782	,993450179	,839	-1,81263658	3,86213221
	30 menit	-6,4819212*	,993450179	,000	-9,31930558	-3,64453678
	50 menit	2,31447535	,993450179	,157	-,52290905	5,15185974
50 menit	10 menit	11,391468*	,993450179	,000	8,55408344	14,22885224
	20 menit	-1,2897275	,993450179	,694	-4,12711193	1,54765687
	30 menit	-8,7963965*	,993450179	,000	-11,63378092	-5,95901213
	40 menit	-2,3144753	,993450179	,157	-5,15185974	,52290905

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

## Homogeneous Subsets

### Prosentase Penurunan

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Lama Waktu Penyinaran	N	Subset		
		1	2	3
10 menit	12	40,85498		
50 menit	12		52,24645	
20 menit	12		53,53618	
40 menit	12		54,56093	
30 menit	12			61,04285
Sig.		1,000	,157	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5,922.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = ,05.

**Oneway**

**Descriptives**

Prosentase Penurunan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
25% 10'	3	42,67229	1,261723096	,728456169	39,53799268	45,80658053	41,28440	43,75000
25% 20'	3	50,39165	3,813600295	2,201783157	40,91814360	59,86516022	46,78899	54,38596
25% 30'	3	59,08732	2,154512093	1,243908137	53,73521601	64,43942549	57,14286	61,40351
25% 40'	3	55,52562	2,466561995	1,424070232	49,39833674	61,65289608	52,67857	57,01754
25% 50'	3	55,48988	2,925810247	1,689217334	48,22176548	62,75799662	52,29358	58,03571
50% 10'	3	37,97610	3,185093844	1,838914788	30,06388605	45,88830951	34,86239	41,22807
50% 20'	3	58,39753	1,251643343	,722636621	55,28827879	61,50678765	57,01754	59,45946
50% 30'	3	61,66756	1,950895516	1,126350051	56,82126531	66,51385156	59,45946	63,15789
50% 40'	3	53,55343	3,487237203	2,013357338	44,89065527	62,21621016	49,54128	55,85586
50% 50'	3	50,85552	2,932781327	1,693242088	43,57008241	58,14094779	47,70642	53,50877
75% 10'	3	47,76654	2,483480529	1,433638152	41,59723261	53,93584788	45,53571	50,44248
75% 20'	3	63,21113	2,579341174	1,489183321	56,80368647	69,61856384	61,06195	66,07143
75% 30'	3	74,48114	2,235665406	1,290762024	68,92744127	80,03484276	72,32143	76,78571
75% 40'	3	61,71513	2,488741555	1,436875607	55,53275178	67,89750528	58,92857	63,71681
75% 50'	3	57,56426	1,153233163	,665819477	54,69947466	60,42905464	56,25000	58,40708
100% 10'	3	35,00501	1,895195960	1,094191898	30,29708276	39,71293827	33,63636	37,16814
100% 20'	3	42,14441	,803307934	,463790052	40,14887881	44,13993387	41,22807	42,72727
100% 30'	3	48,93537	2,238149360	1,292196135	43,37550018	54,49524264	46,36364	50,44248
100% 40'	3	47,44953	2,599137818	1,500612919	40,99291396	53,90614651	44,54545	49,55752
100% 50'	3	45,07615	2,321091748	1,340082945	39,31023417	50,84205726	42,72727	47,36842
Total	60	52,44828	9,600081088	1,239365139	49,96831402	54,92824185	33,63636	76,78571

**Test of Homogeneity of Variances**

Prosentase Penurunan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,762	19	40	,734

**ANOVA**

Prosentase Penurunan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5200,665	19	273,719	46,223	,000
Within Groups	236,866	40	5,922		
Total	5437,532	59			

**Robust Tests of Equality of Means**

Prosentase Penurunan

	Statistic <sup>a</sup>	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	46,223	19	29,588	,000

a. Asymptotically F distributed.

**Post Hoc Tests**

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Prosentase Penurunan  
Tukey HSD

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
25% 10'	25% 20'	-7,719365310(*)	1,986900357	,039	-15,24640502	-,19232560
	25% 30'	-16,415034143(*)	1,986900357	,000	-23,94207386	-8,88799443
	25% 40'	-12,853329807(*)	1,986900357	,000	-20,38036952	-5,32629009
	25% 50'	-12,817594447(*)	1,986900357	,000	-20,34463416	-5,29055473
	50% 10'	4,696188823	1,986900357	,682	-2,83085089	12,22322854
	50% 20'	-15,725246613(*)	1,986900357	,000	-23,25228633	-8,19820690
	50% 30'	-18,995271830(*)	1,986900357	,000	-26,52231154	-11,46823212
	50% 40'	-10,881146113(*)	1,986900357	,000	-18,40818583	-3,35410640
	50% 50'	-8,183228497(*)	1,986900357	,021	-15,71026821	-,65618878
	75% 10'	-5,094253643	1,986900357	,547	-12,62129336	2,43278607
	75% 20'	-20,538838553(*)	1,986900357	,000	-28,06587827	-13,01179884
	75% 30'	-31,808855413(*)	1,986900357	,000	-39,33589513	-24,28181570
	75% 40'	-19,042841927(*)	1,986900357	,000	-26,56988164	-11,51580221
	75% 50'	-14,891978043(*)	1,986900357	,000	-22,41901776	-7,36493833
	100% 10'	7,667276087(*)	1,986900357	,042	,14023637	15,19431580
	100% 20'	,527880263	1,986900357	1,000	-6,99915945	8,05491998
	100% 30'	-6,263084810	1,986900357	,210	-13,79012452	1,26395490
	100% 40'	-4,777243633	1,986900357	,655	-12,30428335	2,74979608
	100% 50'	-2,403859110	1,986900357	,999	-9,93089882	5,12318060
	25% 20'	25% 10'	7,719365310(*)	1,986900357	,039	,19232560
25% 30'		-8,695668833(*)	1,986900357	,010	-16,22270855	-1,16862912
25% 40'		-5,133964497	1,986900357	,533	-12,66100421	2,39307522
25% 50'		-5,098229137	1,986900357	,545	-12,62526885	2,42881058
50% 10'		12,415554133(*)	1,986900357	,000	4,88851442	19,94259385
50% 20'		-8,005881303(*)	1,986900357	,027	-15,53292102	-,47884159
50% 30'		-11,275906520(*)	1,986900357	,000	-18,80294623	-3,74886681
50% 40'		-3,161780803	1,986900357	,984	-10,68882052	4,36525891
50% 50'		-,463863187	1,986900357	1,000	-7,99090290	7,06317653
75% 10'		2,625111667	1,986900357	,998	-4,90192805	10,15215138
75% 20'		-12,819473243(*)	1,986900357	,000	-20,34651296	-5,29243353
75% 30'		-24,089490103(*)	1,986900357	,000	-31,61652982	-16,56245039
75% 40'		-11,323476617(*)	1,986900357	,000	-18,85051633	-3,79643690
75% 50'		-7,172612733	1,986900357	,077	-14,69965245	,35442698
100% 10'		15,386641397(*)	1,986900357	,000	7,85960168	22,91368111
100% 20'		8,247245573(*)	1,986900357	,019	,72020586	15,77428529
100% 30'		1,456280500	1,986900357	1,000	-6,07075921	8,98332021
100% 40'		2,942121677	1,986900357	,992	-4,58491804	10,46916139
100% 50'		5,315506200	1,986900357	,472	-2,21153351	12,84254591
25% 30'		25% 10'	16,415034143(*)	1,986900357	,000	8,88799443
	25% 20'	8,695668833(*)	1,986900357	,010	1,16862912	16,22270855
	25% 40'	3,561704337	1,986900357	,951	-3,96533538	11,08874405
	25% 50'	3,597439697	1,986900357	,947	-3,92960002	11,12447941

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
25% 40'	50% 10'	21,111222967(*)	1,986900357	,000	13,58418325	28,63826268
	50% 20'	,689787530	1,986900357	1,000	-6,83725218	8,21682724
	50% 30'	-2,580237687	1,986900357	,998	-10,10727740	4,94680203
	50% 40'	5,533888030	1,986900357	,401	-1,99315168	13,06092774
	50% 50'	8,231805647(*)	1,986900357	,020	,70476593	15,75884536
	75% 10'	11,320780500(*)	1,986900357	,000	3,79374079	18,84782021
	75% 20'	-4,123804410	1,986900357	,850	-11,65084412	3,40323530
	75% 30'	-15,393821270(*)	1,986900357	,000	-22,92086098	-7,86678156
	75% 40'	-2,627807783	1,986900357	,998	-10,15484750	4,89923193
	75% 50'	1,523056100	1,986900357	1,000	-6,00398361	9,05009581
	100% 10'	24,082310230(*)	1,986900357	,000	16,55527052	31,60934994
	100% 20'	16,942914407(*)	1,986900357	,000	9,41587469	24,46995412
	100% 30'	10,151949333(*)	1,986900357	,001	2,62490962	17,67898905
	100% 40'	11,637790510(*)	1,986900357	,000	4,11075080	19,16483022
	100% 50'	14,011175033(*)	1,986900357	,000	6,48413532	21,53821475
	25% 10'	12,853329807(*)	1,986900357	,000	5,32629009	20,38036952
	25% 20'	5,133964497	1,986900357	,533	-2,39307522	12,66100421
	25% 30'	-3,561704337	1,986900357	,951	-11,08874405	3,96533538
	25% 50'	,035735360	1,986900357	1,000	-7,49130435	7,56277507
	25% 50'	50% 10'	17,549518630(*)	1,986900357	,000	10,02247892
50% 20'		-2,871916807	1,986900357	,994	-10,39895652	4,65512291
50% 30'		-6,141942023	1,986900357	,236	-13,66898174	1,38509769
50% 40'		1,972183693	1,986900357	1,000	-5,55485602	9,49922341
50% 50'		4,670101310	1,986900357	,691	-2,85693840	12,19714102
75% 10'		7,759076163(*)	1,986900357	,037	,23203645	15,28611588
75% 20'		-7,685508747(*)	1,986900357	,041	-15,21254846	-,15846903
75% 30'		-18,955525607(*)	1,986900357	,000	-26,48256532	-11,42848589
75% 40'		-6,189512120	1,986900357	,226	-13,71655183	1,33752759
75% 50'		-2,038648237	1,986900357	1,000	-9,56568795	5,48839148
100% 10'		20,520605893(*)	1,986900357	,000	12,99356618	28,04764561
100% 20'		13,381210070(*)	1,986900357	,000	5,85417036	20,90824978
100% 30'		6,590244997	1,986900357	,150	-,93679472	14,11728471
100% 40'		8,076086173(*)	1,986900357	,024	,54904646	15,60312589
100% 50'		10,449470697(*)	1,986900357	,001	2,92243098	17,97651041
25% 10'		12,817594447(*)	1,986900357	,000	5,29055473	20,34463416
25% 20'		5,098229137	1,986900357	,545	-2,42881058	12,62526885
25% 30'		-3,597439697	1,986900357	,947	-11,12447941	3,92960002
25% 40'		-,035735360	1,986900357	1,000	-7,56277507	7,49130435
50% 10'		17,513783270(*)	1,986900357	,000	9,98674356	25,04082298
50% 20'	-2,907652167	1,986900357	,993	-10,43469188	4,61938755	
50% 30'	-6,177677383	1,986900357	,228	-13,70471710	1,34936233	
50% 40'	1,936448333	1,986900357	1,000	-5,59059138	9,46348805	
50% 50'	4,634365950	1,986900357	,703	-2,89267376	12,16140566	
75% 10'	7,723340803(*)	1,986900357	,039	,19630109	15,25038052	
75% 20'	-7,721244107(*)	1,986900357	,039	-15,24828382	-,19420439	
75% 30'	-18,991260967(*)	1,986900357	,000	-26,51830068	-11,46422125	



(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
50% 10'	75% 40'	-6,225247480	1,986900357	,218	-13,75228719	1,30179223
	75% 50'	-2,074383597	1,986900357	1,000	-9,60142331	5,45265612
	100% 10'	20,484870533(*)	1,986900357	,000	12,95783082	28,01191025
	100% 20'	13,345474710(*)	1,986900357	,000	5,81843500	20,87251442
	100% 30'	6,554509637	1,986900357	,156	-,97253008	14,08154935
	100% 40'	8,040350813(*)	1,986900357	,026	,51331110	15,56739053
	100% 50'	10,413735337(*)	1,986900357	,001	2,88669562	17,94077505
	25% 10'	-4,696188823	1,986900357	,682	-12,22322854	2,83085089
	25% 20'	-12,415554133(*)	1,986900357	,000	-19,94259385	-4,88851442
	25% 30'	-21,111222967(*)	1,986900357	,000	-28,63826268	-13,58418325
	25% 40'	-17,549518630(*)	1,986900357	,000	-25,07655834	-10,02247892
	25% 50'	-17,513783270(*)	1,986900357	,000	-25,04082298	-9,98674356
	50% 20'	-20,421435437(*)	1,986900357	,000	-27,94847515	-12,89439572
	50% 30'	-23,691460653(*)	1,986900357	,000	-31,21850037	-16,16442094
	50% 40'	-15,577334937(*)	1,986900357	,000	-23,10437465	-8,05029522
	50% 50'	-12,879417320(*)	1,986900357	,000	-20,40645703	-5,35237761
	75% 10'	-9,790442467(*)	1,986900357	,002	-17,31748218	-2,26340275
	75% 20'	-25,235027377(*)	1,986900357	,000	-32,76206709	-17,70798766
	75% 30'	-36,505044237(*)	1,986900357	,000	-44,03208395	-28,97800452
	75% 40'	-23,739030750(*)	1,986900357	,000	-31,26607046	-16,21199104
75% 50'	-19,588166867(*)	1,986900357	,000	-27,11520658	-12,06112715	
50% 20'	100% 10'	2,971087263	1,986900357	,992	-4,55595245	10,49812698
	100% 20'	-4,168308560	1,986900357	,839	-11,69534827	3,35873115
	100% 30'	-10,959273633(*)	1,986900357	,000	-18,48631335	-3,43223392
	100% 40'	-9,473432457(*)	1,986900357	,003	-17,00047217	-1,94639274
	100% 50'	-7,100047933	1,986900357	,084	-14,62708765	,42699178
	25% 10'	15,725246613(*)	1,986900357	,000	8,19820690	23,25228633
	25% 20'	8,005881303(*)	1,986900357	,027	,47884159	15,53292102
	25% 30'	-,689787530	1,986900357	1,000	-8,21682724	6,83725218
	25% 40'	2,871916807	1,986900357	,994	-4,65512291	10,39895652
	25% 50'	2,907652167	1,986900357	,993	-4,61938755	10,43469188
	50% 10'	20,421435437(*)	1,986900357	,000	12,89439572	27,94847515
	50% 30'	-3,270025217	1,986900357	,978	-10,79706493	4,25701450
	50% 40'	4,844100500	1,986900357	,633	-2,68293921	12,37114021
	50% 50'	7,542018117(*)	1,986900357	,049	,01497840	15,06905783
	75% 10'	10,630992970(*)	1,986900357	,001	3,10395326	18,15803268
	75% 20'	-4,813591940	1,986900357	,643	-12,34063165	2,71344777
	75% 30'	-16,083608800(*)	1,986900357	,000	-23,61064851	-8,55656909
	75% 40'	-3,317595313	1,986900357	,974	-10,84463503	4,20944440
	75% 50'	,833268570	1,986900357	1,000	-6,69377114	8,36030828
	50% 30'	100% 10'	23,392522700(*)	1,986900357	,000	15,86548299
100% 20'		16,253126877(*)	1,986900357	,000	8,72608716	23,78016659
100% 30'		9,462161803(*)	1,986900357	,003	1,93512209	16,98920152
100% 40'		10,948002980(*)	1,986900357	,000	3,42096327	18,47504269
100% 50'		13,321387503(*)	1,986900357	,000	5,79434779	20,84842722
25% 10'		18,995271830(*)	1,986900357	,000	11,46823212	26,52231154

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
50% 40'	25% 20'	11,275906520(*)	1,986900357	,000	3,74886681	18,80294623	
	25% 30'	2,580237687	1,986900357	,998	-4,94680203	10,10727740	
	25% 40'	6,141942023	1,986900357	,236	-1,38509769	13,66898174	
	25% 50'	6,177677383	1,986900357	,228	-1,34936233	13,70471710	
	50% 10'	23,691460653(*)	1,986900357	,000	16,16442094	31,21850037	
	50% 20'	3,270025217	1,986900357	,978	-4,25701450	10,79706493	
	50% 40'	8,114125717(*)	1,986900357	,023	,58708600	15,64116543	
	50% 50'	10,812043333(*)	1,986900357	,000	3,28500362	18,33908305	
	75% 10'	13,901018187(*)	1,986900357	,000	6,37397847	21,42805790	
	75% 20'	-1,543566723	1,986900357	1,000	-9,07060644	5,98347299	
	75% 30'	-12,813583583(*)	1,986900357	,000	-20,34062330	-5,28654387	
	75% 40'	-,047570097	1,986900357	1,000	-7,57460981	7,47946962	
	75% 50'	4,103293787	1,986900357	,855	-3,42374593	11,63033350	
	100% 10'	26,662547917(*)	1,986900357	,000	19,13550820	34,18958763	
	100% 20'	19,523152093(*)	1,986900357	,000	11,99611238	27,05019181	
	100% 30'	12,732187020(*)	1,986900357	,000	5,20514731	20,25922673	
	100% 40'	14,218028197(*)	1,986900357	,000	6,69098848	21,74506791	
	100% 50'	16,591412720(*)	1,986900357	,000	9,06437301	24,11845243	
	50% 50'	25% 10'	10,881146113(*)	1,986900357	,000	3,35410640	18,40818583
		25% 20'	3,161780803	1,986900357	,984	-4,36525891	10,68882052
25% 30'		-5,533888030	1,986900357	,401	-13,06092774	1,99315168	
25% 40'		-1,972183693	1,986900357	1,000	-9,49922341	5,55485602	
25% 50'		-1,936448333	1,986900357	1,000	-9,46348805	5,59059138	
50% 10'		15,577334937(*)	1,986900357	,000	8,05029522	23,10437465	
50% 20'		-4,844100500	1,986900357	,633	-12,37114021	2,68293921	
50% 30'		-8,114125717(*)	1,986900357	,023	-15,64116543	-,58708600	
50% 50'		2,697917617	1,986900357	,997	-4,82912210	10,22495733	
75% 10'		5,786892470	1,986900357	,326	-1,74014724	13,31393218	
75% 20'		-9,657692440(*)	1,986900357	,003	-17,18473215	-2,13065273	
75% 30'		-20,927709300(*)	1,986900357	,000	-28,45474901	-13,40066959	
75% 40'		-8,161695813(*)	1,986900357	,022	-15,68873553	-,63465610	
75% 50'		-4,010831930	1,986900357	,876	-11,53787164	3,51620778	
100% 10'		18,548422200(*)	1,986900357	,000	11,02138249	26,07546191	
100% 20'		11,409026377(*)	1,986900357	,000	3,88198666	18,93606609	
100% 30'		4,618061303	1,986900357	,708	-2,90897841	12,14510102	
100% 40'		6,103902480	1,986900357	,245	-1,42313723	13,63094219	
100% 50'		8,477287003(*)	1,986900357	,014	,95024729	16,00432672	
50% 40'		25% 10'	8,183228497(*)	1,986900357	,021	,65618878	15,71026821
	25% 20'	,463863187	1,986900357	1,000	-7,06317653	7,99090290	
	25% 30'	-8,231805647(*)	1,986900357	,020	-15,75884536	-,70476593	
	25% 40'	-4,670101310	1,986900357	,691	-12,19714102	2,85693840	
	25% 50'	-4,634365950	1,986900357	,703	-12,16140566	2,89267376	
	50% 10'	12,879417320(*)	1,986900357	,000	5,35237761	20,40645703	
	50% 20'	-7,542018117(*)	1,986900357	,049	-15,06905783	-,01497840	
	50% 30'	-10,812043333(*)	1,986900357	,000	-18,33908305	-3,28500362	
	50% 40'	-2,697917617	1,986900357	,997	-10,22495733	4,82912210	

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
75% 10'	75% 10'	3,088974853	1,986900357	,987	-4,43806486	10,61601457
	75% 20'	-12,355610057(*)	1,986900357	,000	-19,88264977	-4,82857034
	75% 30'	-23,625626917(*)	1,986900357	,000	-31,15266663	-16,09858720
	75% 40'	-10,859613430(*)	1,986900357	,000	-18,38665314	-3,33257372
	75% 50'	-6,708749547	1,986900357	,132	-14,23578926	,81829017
	100% 10'	15,850504583(*)	1,986900357	,000	8,32346487	23,37754430
	100% 20'	8,711108760(*)	1,986900357	,010	1,18406905	16,23814847
	100% 30'	1,920143687	1,986900357	1,000	-5,60689603	9,44718340
	100% 40'	3,405984863	1,986900357	,967	-4,12105485	10,93302458
	100% 50'	5,779369387	1,986900357	,328	-1,74767033	13,30640910
	25% 10'	5,094253643	1,986900357	,547	-2,43278607	12,62129336
	25% 20'	-2,625111667	1,986900357	,998	-10,15215138	4,90192805
	25% 30'	-11,320780500(*)	1,986900357	,000	-18,84782021	-3,79374079
	25% 40'	-7,759076163(*)	1,986900357	,037	-15,28611588	-,23203645
	25% 50'	-7,723340803(*)	1,986900357	,039	-15,25038052	-,19630109
	50% 10'	9,790442467(*)	1,986900357	,002	2,26340275	17,31748218
	50% 20'	-10,630992970(*)	1,986900357	,001	-18,15803268	-3,10395326
	50% 30'	-13,901018187(*)	1,986900357	,000	-21,42805790	-6,37397847
	50% 40'	-5,786892470	1,986900357	,326	-13,31393218	1,74014724
	50% 50'	-3,088974853	1,986900357	,987	-10,61601457	4,43806486
75% 20'	75% 20'	-15,444584910(*)	1,986900357	,000	-22,97162462	-7,91754520
	75% 30'	-26,714601770(*)	1,986900357	,000	-34,24164148	-19,18756206
	75% 40'	-13,948588283(*)	1,986900357	,000	-21,47562800	-6,42154857
	75% 50'	-9,797724400(*)	1,986900357	,002	-17,32476411	-2,27068469
	100% 10'	12,761529730(*)	1,986900357	,000	5,23449002	20,28856944
	100% 20'	5,622133907	1,986900357	,374	-1,90490581	13,14917362
	100% 30'	-1,168831167	1,986900357	1,000	-8,69587088	6,35820855
	100% 40'	,317010010	1,986900357	1,000	-7,21002970	7,84404972
	100% 50'	2,690394533	1,986900357	,997	-4,83664518	10,21743425
	25% 10'	20,538838553(*)	1,986900357	,000	13,01179884	28,06587827
	25% 20'	12,819473243(*)	1,986900357	,000	5,29243353	20,34651296
	25% 30'	4,123804410	1,986900357	,850	-3,40323530	11,65084412
	25% 40'	7,685508747(*)	1,986900357	,041	,15846903	15,21254846
	25% 50'	7,721244107(*)	1,986900357	,039	,19420439	15,24828382
	50% 10'	25,235027377(*)	1,986900357	,000	17,70798766	32,76206709
	50% 20'	4,813591940	1,986900357	,643	-2,71344777	12,34063165
	50% 30'	1,543566723	1,986900357	1,000	-5,98347299	9,07060644
	50% 40'	9,657692440(*)	1,986900357	,003	2,13065273	17,18473215
	50% 50'	12,355610057(*)	1,986900357	,000	4,82857034	19,88264977
	75% 10'	15,444584910(*)	1,986900357	,000	7,91754520	22,97162462
75% 30'	-11,270016860(*)	1,986900357	,000	-18,79705657	-3,74297715	
75% 40'	1,495996627	1,986900357	1,000	-6,03104309	9,02303634	
75% 50'	5,646860510	1,986900357	,367	-1,88017920	13,17390022	
100% 10'	28,206114640(*)	1,986900357	,000	20,67907493	35,73315435	
100% 20'	21,066718817(*)	1,986900357	,000	13,53967910	28,59375853	
100% 30'	14,275753743(*)	1,986900357	,000	6,74871403	21,80279346	

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
75% 30'	100% 40'	15,761594920(*)	1,986900357	,000	8,23455521	23,28863463
	100% 50'	18,134979443(*)	1,986900357	,000	10,60793973	25,66201916
	25% 10'	31,808855413(*)	1,986900357	,000	24,28181570	39,33589513
	25% 20'	24,089490103(*)	1,986900357	,000	16,56245039	31,61652982
	25% 30'	15,393821270(*)	1,986900357	,000	7,86678156	22,92086098
	25% 40'	18,955525607(*)	1,986900357	,000	11,42848589	26,48256532
	25% 50'	18,991260967(*)	1,986900357	,000	11,46422125	26,51830068
	50% 10'	36,505044237(*)	1,986900357	,000	28,97800452	44,03208395
	50% 20'	16,083608800(*)	1,986900357	,000	8,55656909	23,61064851
	50% 30'	12,813583583(*)	1,986900357	,000	5,28654387	20,34062330
	50% 40'	20,927709300(*)	1,986900357	,000	13,40066959	28,45474901
	50% 50'	23,625626917(*)	1,986900357	,000	16,09858720	31,15266663
	75% 10'	26,714601770(*)	1,986900357	,000	19,18756206	34,24164148
	75% 20'	11,270016860(*)	1,986900357	,000	3,74297715	18,79705657
75% 40'	75% 40'	12,766013487(*)	1,986900357	,000	5,23897377	20,29305320
	75% 50'	16,916877370(*)	1,986900357	,000	9,38983766	24,44391708
	100% 10'	39,476131500(*)	1,986900357	,000	31,94909179	47,00317121
	100% 20'	32,336735677(*)	1,986900357	,000	24,80969596	39,86377539
	100% 30'	25,545770603(*)	1,986900357	,000	18,01873089	33,07281032
	100% 40'	27,031611780(*)	1,986900357	,000	19,50457207	34,55865149
	100% 50'	29,404996303(*)	1,986900357	,000	21,87795659	36,93203602
	25% 10'	19,042841927(*)	1,986900357	,000	11,51580221	26,56988164
	25% 20'	11,323476617(*)	1,986900357	,000	3,79643690	18,85051633
	25% 30'	2,627807783	1,986900357	,998	-4,89923193	10,15484750
	25% 40'	6,189512120	1,986900357	,226	-1,33752759	13,71655183
	25% 50'	6,225247480	1,986900357	,218	-1,30179223	13,75228719
	50% 10'	23,739030750(*)	1,986900357	,000	16,21199104	31,26607046
	50% 20'	3,317595313	1,986900357	,974	-4,20944440	10,84463503
	50% 30'	,047570097	1,986900357	1,000	-7,47946962	7,57460981
	50% 40'	8,161695813(*)	1,986900357	,022	,63465610	15,68873553
	50% 50'	10,859613430(*)	1,986900357	,000	3,33257372	18,38665314
	75% 10'	13,948588283(*)	1,986900357	,000	6,42154857	21,47562800
	75% 20'	-1,495996627	1,986900357	1,000	-9,02303634	6,03104309
	75% 30'	-12,766013487(*)	1,986900357	,000	-20,29305320	-5,23897377
	75% 50'	4,150863883	1,986900357	,843	-3,37617583	11,67790360
	75% 50'	100% 10'	26,710118013(*)	1,986900357	,000	19,18307830
100% 20'		19,570722190(*)	1,986900357	,000	12,04368248	27,09776190
100% 30'		12,779757117(*)	1,986900357	,000	5,25271740	20,30679683
100% 40'		14,265598293(*)	1,986900357	,000	6,73855858	21,79263801
100% 50'		16,638982817(*)	1,986900357	,000	9,11194310	24,16602253
25% 10'		14,891978043(*)	1,986900357	,000	7,36493833	22,41901776
25% 20'		7,172612733	1,986900357	,077	-,35442698	14,69965245
25% 30'		-1,523056100	1,986900357	1,000	-9,05009581	6,00398361
25% 40'		2,038648237	1,986900357	1,000	-5,48839148	9,56568795
25% 50'		2,074383597	1,986900357	1,000	-5,45265612	9,60142331
50% 10'		19,588166867(*)	1,986900357	,000	12,06112715	27,11520658

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
100% 10'	50% 20'	-.833268570	1,986900357	1,000	-8,36030828	6,69377114
	50% 30'	-4,103293787	1,986900357	,855	-11,63033350	3,42374593
	50% 40'	4,010831930	1,986900357	,876	-3,51620778	11,53787164
	50% 50'	6,708749547	1,986900357	,132	-.81829017	14,23578926
	75% 10'	9,797724400(*)	1,986900357	,002	2,27068469	17,32476411
	75% 20'	-5,646860510	1,986900357	,367	-13,17390022	1,88017920
	75% 30'	-16,916877370(*)	1,986900357	,000	-24,44391708	-9,38983766
	75% 40'	-4,150863883	1,986900357	,843	-11,67790360	3,37617583
	100% 10'	22,559254130(*)	1,986900357	,000	15,03221442	30,08629384
	100% 20'	15,419858307(*)	1,986900357	,000	7,89281859	22,94689802
	100% 30'	8,628893233(*)	1,986900357	,011	1,10185352	16,15593295
	100% 40'	10,114734410(*)	1,986900357	,001	2,58769470	17,64177412
	100% 50'	12,488118933(*)	1,986900357	,000	4,96107922	20,01515865
	25% 10'	-7,667276087(*)	1,986900357	,042	-15,19431580	-,14023637
	25% 20'	-15,386641397(*)	1,986900357	,000	-22,91368111	-7,85960168
	25% 30'	-24,082310230(*)	1,986900357	,000	-31,60934994	-16,55527052
	25% 40'	-20,520605893(*)	1,986900357	,000	-28,04764561	-12,99356618
	25% 50'	-20,484870533(*)	1,986900357	,000	-28,01191025	-12,95783082
	50% 10'	-2,971087263	1,986900357	,992	-10,49812698	4,55595245
	50% 20'	-23,392522700(*)	1,986900357	,000	-30,91956241	-15,86548299
50% 30'	-26,662547917(*)	1,986900357	,000	-34,18958763	-19,13550820	
50% 40'	-18,548422200(*)	1,986900357	,000	-26,07546191	-11,02138249	
50% 50'	-15,850504583(*)	1,986900357	,000	-23,37754430	-8,32346487	
75% 10'	-12,761529730(*)	1,986900357	,000	-20,28856944	-5,23449002	
75% 20'	-28,206114640(*)	1,986900357	,000	-35,73315435	-20,67907493	
75% 30'	-39,476131500(*)	1,986900357	,000	-47,00317121	-31,94909179	
75% 40'	-26,710118013(*)	1,986900357	,000	-34,23715773	-19,18307830	
75% 50'	-22,559254130(*)	1,986900357	,000	-30,08629384	-15,03221442	
100% 20'	-7,139395823	1,986900357	,080	-14,66643554	,38764389	
100% 30'	-13,930360897(*)	1,986900357	,000	-21,45740061	-6,40332118	
100% 40'	-12,444519720(*)	1,986900357	,000	-19,97155943	-4,91748001	
100% 50'	-10,071135197(*)	1,986900357	,001	-17,59817491	-2,54409548	
100% 20'	25% 10'	-,527880263	1,986900357	1,000	-8,05491998	6,99915945
	25% 20'	-8,247245573(*)	1,986900357	,019	-15,77428529	-,72020586
	25% 30'	-16,942914407(*)	1,986900357	,000	-24,46995412	-9,41587469
	25% 40'	-13,381210070(*)	1,986900357	,000	-20,90824978	-5,85417036
	25% 50'	-13,345474710(*)	1,986900357	,000	-20,87251442	-5,81843500
	50% 10'	4,168308560	1,986900357	,839	-3,35873115	11,69534827
	50% 20'	-16,253126877(*)	1,986900357	,000	-23,78016659	-8,72608716
	50% 30'	-19,523152093(*)	1,986900357	,000	-27,05019181	-11,99611238
	50% 40'	-11,409026377(*)	1,986900357	,000	-18,93606609	-3,88198666
	50% 50'	-8,711108760(*)	1,986900357	,010	-16,23814847	-1,18406905
	75% 10'	-5,622133907	1,986900357	,374	-13,14917362	1,90490581
	75% 20'	-21,066718817(*)	1,986900357	,000	-28,59375853	-13,53967910
	75% 30'	-32,336735677(*)	1,986900357	,000	-39,86377539	-24,80969596
	75% 40'	-19,570722190(*)	1,986900357	,000	-27,09776190	-12,04368248

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
100% 30'	75% 50'	-15,419858307(*)	1,986900357	,000	-22,94689802	-7,89281859
	100% 10'	7,139395823	1,986900357	,080	-,38764389	14,66643554
	100% 30'	-6,790965073	1,986900357	,120	-14,31800479	,73607464
	100% 40'	-5,305123897	1,986900357	,475	-12,83216361	2,22191582
	100% 50'	-2,931739373	1,986900357	,993	-10,45877909	4,59530034
	25% 10'	6,263084810	1,986900357	,210	-1,26395490	13,79012452
	25% 20'	-1,456280500	1,986900357	1,000	-8,98332021	6,07075921
	25% 30'	-10,151949333(*)	1,986900357	,001	-17,67898905	-2,62490962
	25% 40'	-6,590244997	1,986900357	,150	-14,11728471	,93679472
	25% 50'	-6,554509637	1,986900357	,156	-14,08154935	,97253008
	50% 10'	10,959273633(*)	1,986900357	,000	3,43223392	18,48631335
	50% 20'	-9,462161803(*)	1,986900357	,003	-16,98920152	-1,93512209
	50% 30'	-12,732187020(*)	1,986900357	,000	-20,25922673	-5,20514731
	50% 40'	-4,618061303	1,986900357	,708	-12,14510102	2,90897841
	50% 50'	-1,920143687	1,986900357	1,000	-9,44718340	5,60689603
100% 40'	75% 10'	1,168831167	1,986900357	1,000	-6,35820855	8,69587088
	75% 20'	-14,275753743(*)	1,986900357	,000	-21,80279346	-6,74871403
	75% 30'	-25,545770603(*)	1,986900357	,000	-33,07281032	-18,01873089
	75% 40'	-12,779757117(*)	1,986900357	,000	-20,30679683	-5,25271740
	75% 50'	-8,628893233(*)	1,986900357	,011	-16,15593295	-1,10185352
	100% 10'	13,930360897(*)	1,986900357	,000	6,40332118	21,45740061
	100% 20'	6,790965073	1,986900357	,120	-,73607464	14,31800479
	100% 40'	1,485841177	1,986900357	1,000	-6,04119854	9,01288089
	100% 50'	3,859225700	1,986900357	,906	-3,66781401	11,38626541
	25% 10'	4,777243633	1,986900357	,655	-2,74979608	12,30428335
	25% 20'	-2,942121677	1,986900357	,992	-10,46916139	4,58491804
	25% 30'	-11,637790510(*)	1,986900357	,000	-19,16483022	-4,11075080
	25% 40'	-8,076086173(*)	1,986900357	,024	-15,60312589	-,54904646
	25% 50'	-8,040350813(*)	1,986900357	,026	-15,56739053	-,51331110
	50% 10'	9,473432457(*)	1,986900357	,003	1,94639274	17,00047217
	50% 20'	-10,948002980(*)	1,986900357	,000	-18,47504269	-3,42096327
	50% 30'	-14,218028197(*)	1,986900357	,000	-21,74506791	-6,69098848
	50% 40'	-6,103902480	1,986900357	,245	-13,63094219	1,42313723
	50% 50'	-3,405984863	1,986900357	,967	-10,93302458	4,12105485
	75% 10'	-,317010010	1,986900357	1,000	-7,84404972	7,21002970
	75% 20'	-15,761594920(*)	1,986900357	,000	-23,28863463	-8,23455521
	75% 30'	-27,031611780(*)	1,986900357	,000	-34,55865149	-19,50457207
	75% 40'	-14,265598293(*)	1,986900357	,000	-21,79263801	-6,73855858
	75% 50'	-10,114734410(*)	1,986900357	,001	-17,64177412	-2,58769470
	100% 10'	12,444519720(*)	1,986900357	,000	4,91748001	19,97155943
100% 20'	5,305123897	1,986900357	,475	-2,22191582	12,83216361	
100% 30'	-1,485841177	1,986900357	1,000	-9,01288089	6,04119854	
100% 50'	2,373384523	1,986900357	,999	-5,15365519	9,90042424	
100% 50'	25% 10'	2,403859110	1,986900357	,999	-5,12318060	9,93089882
	25% 20'	-5,315506200	1,986900357	,472	-12,84254591	2,21153351
	25% 30'	-14,011175033(*)	1,986900357	,000	-21,53821475	-6,48413532

(I) Interaksi daya waktu	(J) Interaksi daya waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
	25% 40'	-10,449470697(*)	1,986900357	,001	-17,97651041	-2,92243098
	25% 50'	-10,413735337(*)	1,986900357	,001	-17,94077505	-2,88669562
	50% 10'	7,100047933	1,986900357	,084	-,42699178	14,62708765
	50% 20'	-13,321387503(*)	1,986900357	,000	-20,84842722	-5,79434779
	50% 30'	-16,591412720(*)	1,986900357	,000	-24,11845243	-9,06437301
	50% 40'	-8,477287003(*)	1,986900357	,014	-16,00432672	-,95024729
	50% 50'	-5,779369387	1,986900357	,328	-13,30640910	1,74767033
	75% 10'	-2,690394533	1,986900357	,997	-10,21743425	4,83664518
	75% 20'	-18,134979443(*)	1,986900357	,000	-25,66201916	-10,60793973
	75% 30'	-29,404996303(*)	1,986900357	,000	-36,93203602	-21,87795659
	75% 40'	-16,638982817(*)	1,986900357	,000	-24,16602253	-9,11194310
	75% 50'	-12,488118933(*)	1,986900357	,000	-20,01515865	-4,96107922
	100% 10'	10,071135197(*)	1,986900357	,001	2,54409548	17,59817491
	100% 20'	2,931739373	1,986900357	,993	-4,59530034	10,45877909
	100% 30'	-3,859225700	1,986900357	,906	-11,38626541	3,66781401
	100% 40'	-2,373384523	1,986900357	,999	-9,90042424	5,15365519

\* The mean difference is significant at the .05 level.

### Homogeneous Subsets

Prosentase Penurunan

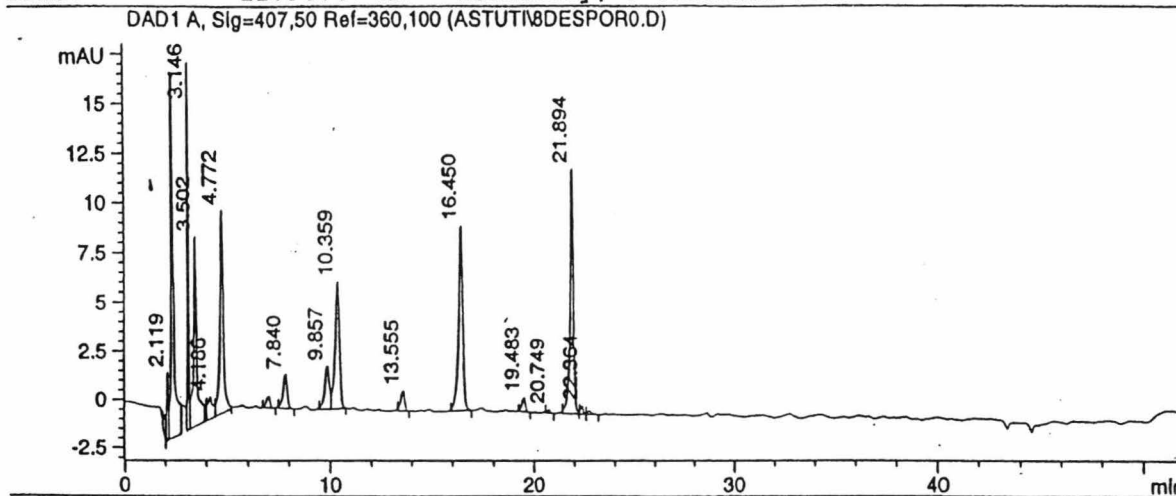
Tukey HSD

Interaksi daya waktu	N	Subset for alpha = .05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
100% 10'	3	35,00501										
50% 10'	3	37,97610	37,97610									
100% 20'	3	42,14441	42,14441	42,14441								
25% 10'	3		42,67229	42,67229								
100% 50'	3		45,07615	45,07615	45,07615							
100% 40'	3			47,44953	47,44953	47,44953						
75% 10'	3			47,76654	47,76654	47,76654						
100% 30'	3			48,93537	48,93537	48,93537	48,93537					
25% 20'	3				50,39165	50,39165	50,39165	50,39165				
50% 50'	3				50,85552	50,85552	50,85552	50,85552				
50% 40'	3					53,55343	53,55343	53,55343	53,55343			
25% 50'	3						55,48988	55,48988	55,48988	55,48988		
25% 40'	3							55,52562	55,52562	55,52562		
75% 50'	3								57,56426	57,56426	57,56426	
50% 20'	3									58,39753	58,39753	58,39753
25% 30'	3										59,08732	59,08732
50% 30'	3											61,66756
75% 40'	3											61,71513
75% 20'	3											63,21113
75% 30'	3											74,48114
Sig.		,080	,084	,120	,328	,245	,150	,077	,401	,218	,367	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Sample Name: standar  
 File: C:\HF\HEM\1\DATA\ASTUTI\8DESPOR0.D  
 Method: C:\HF\HEM\1\METHODS\ASTUTI.M  
 Operator(s): astuti  
 Vial: 1  
 Time: 11:34:47 AM Wednesday, 8 December 2010

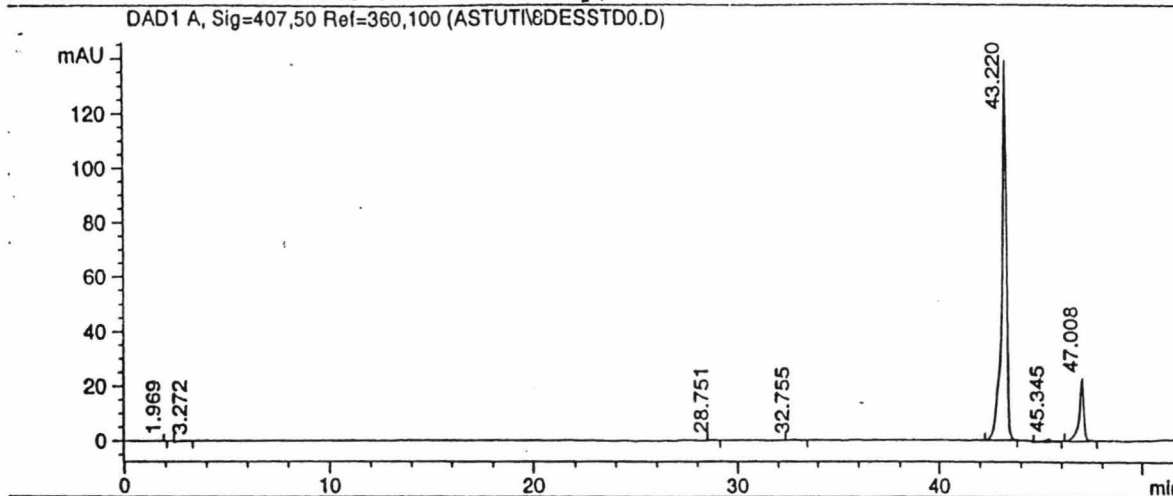


Peak No.	Retention Time (minutes)	Area
1	1.975	7.938
2	2.119	19.832
3	2.348	156.307
4	3.146	62.664
5	3.502	114.259
6	4.186	20.945
7	4.772	121.141
8	7.007	7.136
9	7.840	22.840
10	9.857	33.073
11	10.359	90.827
12	13.555	13.250
13	16.450	135.707
14	19.483	8.083
15	20.749	1.892
16	21.894	139.467
17	22.364	3.973
18	22.733	2.939

Colom: LiChro CART@250-4  
 injection: 10 micro liter  
 Gradient:  
 time 0 30 42 47 52  
 %B 100 35 10 10 100



Sample Name  
 File: C:\HPCHEM\1\DATA\ASTUTI\8DESSTD0.D  
 Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ASTUTI.M  
 Operator(s): astuti  
 Vial: 1  
 Time: 10:40:43 AM Wednesday, 8 December 2010

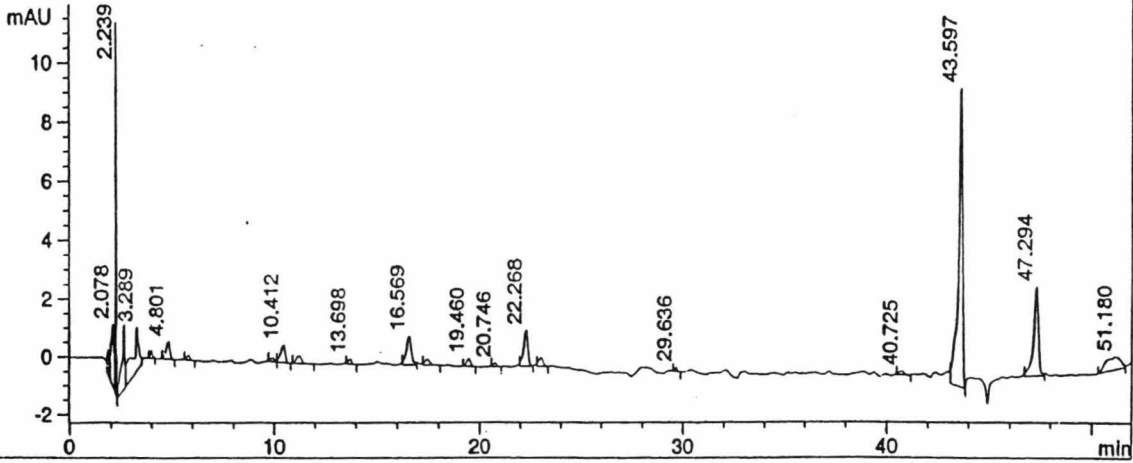


Peak No.	Retention Time (minutes)	Area
1	1.969	0.952
2	3.272	2.751
3	28.751	4.901
4	32.755	5.035
5	43.220	2216.002
6	45.345	45.669
7	47.008	387.184

Colom: LiChro CART@250-4  
 injection: 10 micro liter  
 Gradient:  
 time 0 30 42 47 52  
 %B 100 35 10 10 100

=====  
 Sample Name: IR PEPRUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
 File: C:\HPCHEM\1\DATA\ASTUTI\8DESSA50.D  
 Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ASTUTI.M  
 Operator(s): astuti  
 Vial: 2  
 Time: 12:58:35 PM Wednesday, 8 December 2010

DAD1 A, Sig=407,50 Ref=360,100 (ASTUTI\8DESSA50.D)



Peak No.	Retention Time (minutes)	Area
1	1.847	5.760
2	2.078	21.191
3	2.239	36.331
4	2.636	21.569
5	3.289	34.757
6	3.981	1.926
7	4.801	7.429
8	5.766	2.451
9	9.920	2.026
10	10.412	8.707
11	11.190	5.097
12	13.698	2.101
13	16.569	16.028
14	17.450	3.956
15	19.460	3.287
16	20.746	1.478
17	22.268	17.844
18	23.017	4.416
19	29.636	1.391
20	40.725	1.900
21	43.597	142.338
22	47.294	49.645
23	51.180	21.646

Colom: LiChro CART@250-4  
 injection: 10 micro liter  
 Gradient:

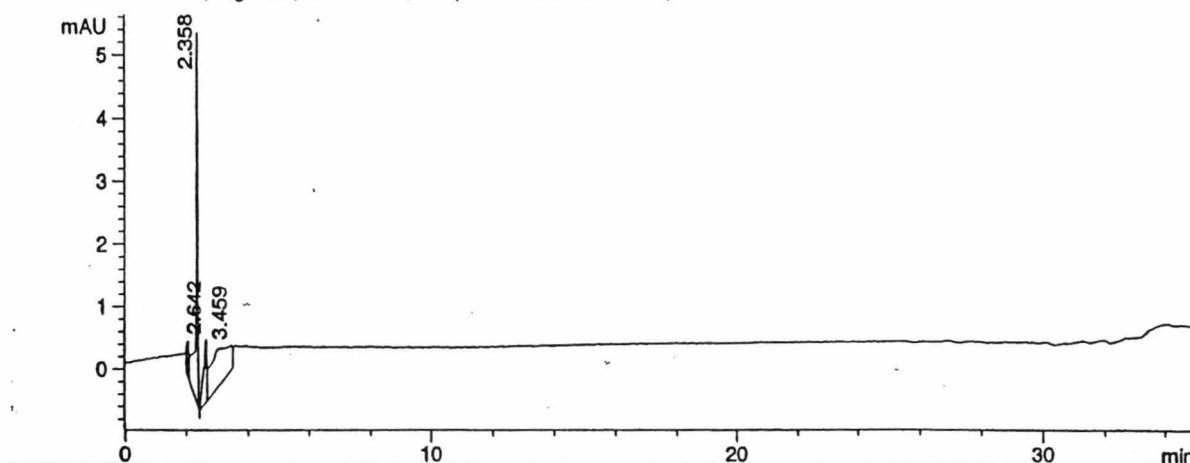
413, 274

time	0	30	42	47	52
%B	100	35	10	10	100

**Lampiran 4.4. Hasil Rekaman Data HPLC Pelarut Coproporfirin III** 160

=====  
 Sample Name:  
 File: C:\HPCHEM\1\DATA\ASTUTI\9DESSOLO.D  
 Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ASTUTI.M  
 Operator(s): astuti  
 Vial: 1  
 Time: 2:36:10 PM Thursday, 9 December 2010

DAD1 A, Sig=407,50 Ref=360,100 (ASTUTI\9DESSOLO.D)



Peak No.	Retention Time (minutes)	Area
1	2.045	2.365
2	2.358	24.687
3	2.642	6.738
4	3.459	25.044

Colom: LiChro CART@250-4

injection: 10 micro liter

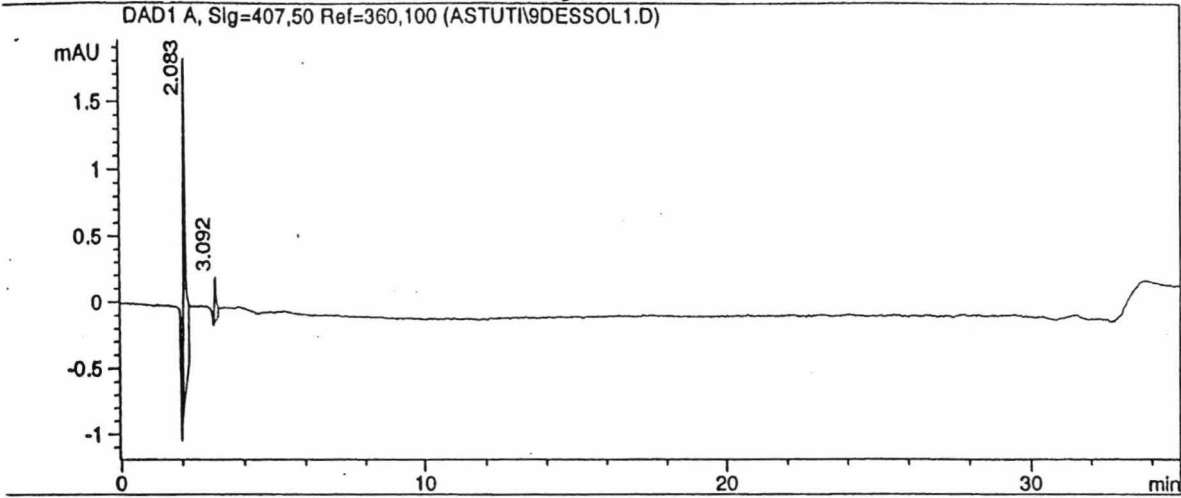
Gradient:

time	0	30	42	47	52
%B	100	35	10	10	100

**Lampiran 4.5. Hasil Rekaman Data HPLC Pelarut Porfirin kit**

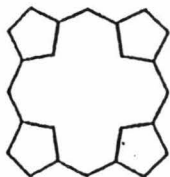
IR PEPRUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Sample Name: SOLVEN POLYPHYLLIN  
 File: C:\HPCHEM\1\DATA\ASTUTI\9DESSOL1.D  
 Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ASTUTI.M  
 Operator(s): astuti  
 Vial: 2  
 Time: 3:18:27 PM Thursday, 9 December 2010



Peak No.	Retention Time (minutes)	Area
1	2.083	13.464
2	3.092	1.483

Colom: LiChro CART@250-4  
 injection: 10 micro liter  
 Gradient:  
 time 0 30 42 47 52  
 %B 100 35 10 10 100



Product Number CMK-1A

## PORPHYRIN ACID CHROMATOGRAPHIC MARKER KIT

### PORPHYRIN PRODUCTS

P.O. BOX 31 FAX: 435-753-6731  
Logan, UT 84323-0031 Phone: 435-753-1901  
Email: porphym@porphyrin.com

The porphyrin markers are designed to be useful in any chromatographic system employed for the separation of porphyrins in the free acid, or non-esterified form. They will also be useful in recovery studies. Because of the wide application of this material we prefer not to discuss specific applications pertaining to any particular problem. The user must refer to the literature for discussions of the subject.

#### PRINCIPLE OF THE PROCEDURE:<sup>1,2,3,4,5</sup>

Each vial contains  $10 \pm 1$  nmole each of 8,7,6,5,4, and 2 carboxyl porphyrin in dry form.

When dissolved in one milliliter of suitable solvent, e.g. 3 M HCl, or 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , the concentration of each porphyrin is, therefore, 10 n mole/ml. This is suitable for either injection into an HPLC, or spotting a TLC plate (using about 5-10 ul in each case).

Porphyrins are conveniently detected by their fluorescence in long wavelength uv light in TLC systems and by their absorption near 400 nm (the Soret band) in HPLC systems.

#### SPECIMENS AND SPECIMEN COLLECTION:<sup>3,4,5</sup>

Collection and treatment of the specimen to be analyzed will vary according to the nature of the specimen and the information being sought by the investigator. Thus, treatment of the specimen, i.e. isolation of the porphyrins and their subsequent manipulations, is beyond the scope of these discussions. The literature provides an adequate number of specific examples and procedures.

#### REAGENT CONTENTS:

Each vial contains  $10 \pm 1$  nmole each of:  
8 carboxyl porphyrin  
7 carboxyl porphyrin  
6 carboxyl porphyrin  
5 carboxyl porphyrin  
4 carboxyl porphyrin  
Mesoporphyrin IX

#### MATERIALS REQUIRED:

1. Ultra pure organic solvent
2. HPLC instrument or TLC plates.

#### NOTES AND PRECAUTIONS:

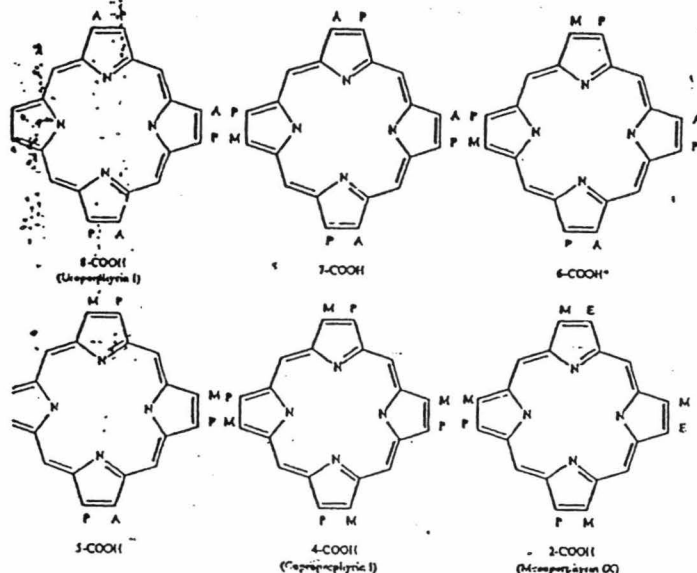
1. All porphyrins and porphyrin esters should be protected from the light as much as practical.
2. All solvents should be ultra pure. Particular attention must be given to the possibility of trace metal contamination.<sup>4</sup>
3. When samples are left in solution for any extended period, significant deterioration can be observed, particularly in basic solution. We urge caution in interpreting results obtained with marker solutions not freshly prepared.

#### REFERENCES:

1. Lim and Peters (Clin. Chem. Acta, 1984, 55-63).
2. Doss, M., *Prog. In Thin Layer Chromatography III*, 145 (1972).
3. *High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry*, P.F. Dixon, C.H. Gray, C.K. Lim and M.S. Stoll (editors), Academic Press, New York (1976).
4. Evans, N. Jackson, A.H., Matin, S.A., and Towill, R., *J. Chromatog.*, 125, 345 (1976).
5. Edwin Elbert, Jr., Anthony W. Wayne, Eugene E. Wales, Jr. and Richard C. Straight, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 570 (1979).

#### PRODUCT DESCRIPTIONS AND USE:

This porphyrin kit contains quantitated amounts of porphyrin of the Type I series. The structures of the compounds are shown:



Mesoporphyrin IX is included as a representative dicarboxylic porphyrin.

This material is intended for use as a chromatographic marker to aid in the identification of unknown porphyrins.

\*Structure shows one of the two possible isomers.

Abbreviations:

A -  $\text{CH}_2 - \text{COOH}$       M -  $\text{CH}_3$   
P -  $\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$       E -  $\text{CH}_2 - \text{CH}_3$

#### INTRODUCTION AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE:

Porphyrins occur, albeit often in very low concentrations, in almost all biological specimens. Increased deposition in a tissue, or excretion by an organism, is almost always the result of some metabolic aberration. As a consequence, the identification of the "pattern" of deposition or excretion is of some use in the identification of the metabolic aberration. The "pattern" refers to both the qualitative and quantitative identification of the various porphyrins in any sample.

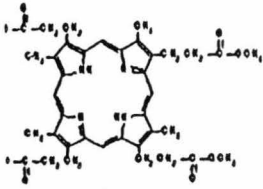
me Products Order Center Custom Products Support MSDS

Search Advanced Search

-> Site Search

Ask A Scientist

Image



1 of 1

#### Useful Links & Tools

MSDS

Specification Sheet

Certificate of Analysis

Enter Lot No. Search

Certificate of Origin

Enter Lot No. Search

T-IR Condensed Phase

Bulk Quote

Similar Products

#### Related Categories

Enzyme Inhibitors > Enzyme  
Inhibitors by Type > Chelators

5 Products Viewed

C7157 (Sigma)

C4529 (Sigma)

## C7157 Coproporphyrin III tetramethyl ester

Sigma

≥85% (HPLC)

### Price and Availability

Click For Pricing and Availability

Synonym: Tetramethyl 3,8,13,17-tetramethyl-21H,23H-porphine-2,7,12,18-tetrapropionate  
 CAS Number: 5522-63-4  
 Linear Formula: C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>  
 Molecular Weight: 710.82  
 EC Number: 226-869-8  
 MDL number: MFCD00213501  
 PubChem Substance ID: 24892941

Details

Related Products

References

Reviews

### Description

Preparation Note Enzymatically prepared

### Properties

assay ≥85% (HPLC)  
 mp 168-170 °C (lit.)  
 storage temp. -20°C

### Safety

WGK Germany 3

**SIGMA-ALDRICH**

Terms | Terms and Conditions of Sale | Privacy | Contact Us | Site Map

© 2009 Sigma-Aldrich Co. All Rights Reserved. Reproduction of any materials from the site is strictly forbidden without permission. Sigma-Aldrich brand products are sold exclusively through Sigma-Aldrich, Inc.

# ABSTRACT

## Human Metabolome Database

**METABOCARD** Coproporphyrin III

Accession Number HMDB00570

Created at 2005-11-16 15:48:42

Updated at 2008-02-04 12:18:33

Common Name Coproporphyrin III

## Description

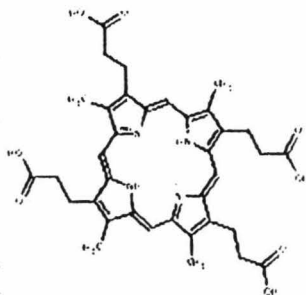
Coproporphyrin III is a porphyrin metabolite arising from heme synthesis. Porphyrins are pigments found in both animal and plant life. Coproporphyrin III is a tetrapyrrole dead-end product from the spontaneous oxidation of the methylene bridges of coproporphynogen, arising from heme synthesis and secreted in feces and urine. Increased levels of coproporphyrins can indicate congenital erythropoietic porphyria or sideroblastic anaemia. Porphyria is a pathological state characterised by abnormalities of porphyrin metabolism and results in the excretion of large quantities of porphyrins in the urine and in extreme sensitivity to light. A large number of factors are capable of increasing porphyrin excretion, owing to different and multiple causes and etiologies: 1) the main site of the chronic hepatic porphyria disease process concentrates on the liver, 2) a functional and morphologic liver injury is almost regularly associated with this chronic porphyria, 3) the toxic form due to occupational and environmental exposure takes mainly a subclinical course. Hepatic factors includes disturbance in coproporphyrinogen metabolism, which results from inhibition of coproporphyrinogen oxidase as well as from the rapid loss from, and diminished utilization of coproporphyrinogen in the hepatocytes, which may also explain why coproporphyrin, its autoxidation product, predominates physiologically in the urine; decreased biliary excretion of coproporphyrin leading to a compensatory urinary excretion, so that the coproporphyrin ring isomer ratio (I:III) becomes a sensitive index for impaired liver function and intrahepatic cholestasis; and disturbed activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. In itself, secondary coproporphyrinuria is not associated with porphyria symptoms of a hepatologic-gastroenterologic, neurologic, or dermatologic order, even though coproporphyrinuria can occur with such symptoms. (PMID: 3327428)

Chemical IUPAC Name 3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,7,12,18-tetrapropanoic acid

Chemical Formula  $C_{36}H_{38}N_4O_8$



## Chemical Structure



## Chemical Taxonomy

Kingdom: Organic  
 Class: Porphyrins  
 Family:  
 Mammalian Metabolite  
 Species:  
 carboxylic acid  
 aromatic compound  
 heterocyclic compound

## Chemical Source

Endogenous

## Molecular Weight

Monoisotopic: 654.26898  
 Average: 654.70892

## Smiles (Isomeric)

CC1=C(CCC(O)=O)/C2=C/C3=N/C(=CC4=C(C)C(CCC(O)=O)=C(N4)C=C4/N=C(/C=C1N2)C(C)=C/4CCC(O)=O)/C(CCC(O)=O)=C3C

## Smiles (Canonical)

CC1=C(CCC(O)=O)C2=CC3=NC(=CC4=C(C)C(CCC(O)=O)=C(N4)C=C4N=C(C=C1N2)C(C)=C4CCC(O)=O)C(CCC(O)=O)=C3C

## KEGG Compound ID

C03263

## METLIN ID

5553

## PubChem Compound ID

114935

## PubChem Substance ID(s)

691877 ; 7590369 ; 8065 ; 622240

## ChEBI ID

27609

## CAS Registry Number

14643-66-4

## InChI Identifier

InChI=1/C36H38N4O8/c1-17-21(5-9-33(41)42)29-14-27-19(3)22(6-10-34(43)44)30(39-27)15-28-20(4)24(8-12-36(47)48)32(40-28)16-31-23(7-11-35(45)46)18(2)26(38-31)13-25(17)37-29/h13-16,37,40H,5-12H2,1-4H3,(H,41,42)(H,43,44)(H,45,46)(H,47,48)/b25-13-,26-13-,27-14-,28-15-,29-14-,30-15-,31-16-,32-16-

## Synthesis Reference

Minoda, Taiji; Takada, Toshihiro; Horii, Shinichi. Coproporphyrin III. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1979), 3 pp.

## LAMPIRAN V.1

## KURVA BAKU UNTUK PENENTUAN BERAT MOLEKUL PROTEIN

1. Tabel penghitungan log berat molekul (BM), jarak migrasi dan Relatif of mobility (Rf) dari protein standar

No	Berat molekul (kDa)	Log BM	jarak migrasi sesudah pewarnaan (cm)	Rf
1	117	2,07	0,9	0,15
2	85	1,93	1,4	0,23
3	48	1,68	2,6	0,43
4	34	1,53	3,5	0,57
5	26	1,42	4,4	0,72
6	19	1,28	5,2	0,85

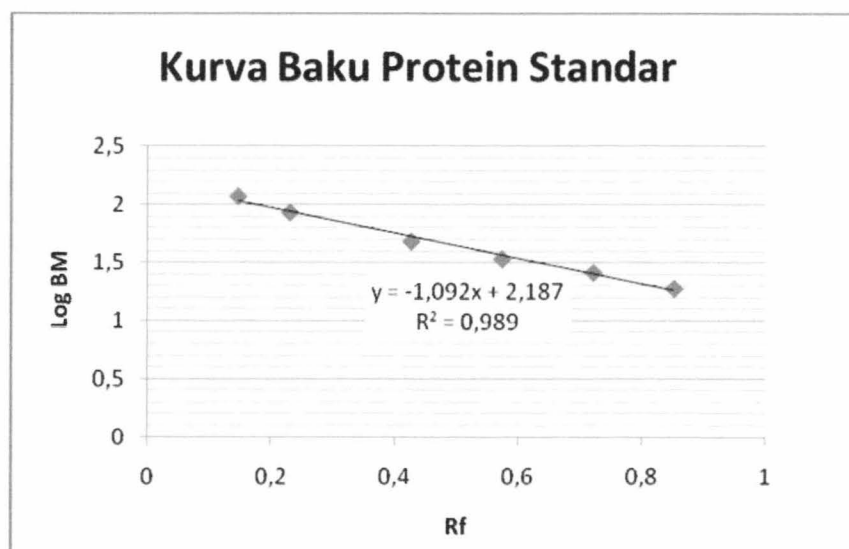
Panjang akrilamid beku setelah pewarnaan = 6 cm

Panjang akrilamid beku sebelum pewarnaan = 6,6 cm

Jarak warna cat = 6,6 cm

$$Rf = \frac{\text{jarak migrasi sesudah pewarnaan}}{\text{panjang akrilamid beku sesudah pewarnaan}} \times \frac{\text{panjang akrilamid beku sebelum pewarnaan}}{\text{jarak warna cat}}$$

Kurva garis regresi relatif of mobility terhadap log BM adalah sebagai berikut:



Dari kurva di atas diperoleh persamaan:  $Y = -1,092X + 2,187$

Dengan  $Y = \log \text{BM}$

$$X = R_f$$

Selanjutnya dari persamaan di atas digunakan untuk menghitung berat molekul fraksi protein bakteri yang ditunjukkan oleh tabel berikut:

2. Tabel penghitungan berat molekul fraksi protein bakteri *Staphylococcus aureus*

No.	Jarak migrasi (cm)	R <sub>f</sub>	log BM	BM (kDa)
1	0,6	0,10	2,08	119,62
2	0,8	0,13	2,04	110,00
3	0,9	0,15	2,02	105,49
4	1	0,17	2,01	101,16
5	1,2	0,20	1,97	93,03
6	1,4	0,23	1,93	85,55
7	1,8	0,30	1,86	72,34
8	2,1	0,35	1,80	63,80
9	2,3	0,38	1,77	58,67
10	2,4	0,40	1,75	56,26
11	2,5	0,42	1,73	53,95
12	2,6	0,43	1,71	51,74
13	2,7	0,45	1,70	49,61
14	2,8	0,47	1,68	47,58
15	2,9	0,48	1,66	45,62
16	3	0,50	1,64	43,75
17	3,3	0,55	1,59	38,58
18	3,4	0,57	1,57	37,00
19	3,5	0,58	1,55	35,48
20	3,6	0,60	1,53	34,03
21	3,9	0,65	1,48	30,01
22	4,4	0,73	1,39	24,33
23	4,7	0,78	1,33	21,46
24	5,4	0,90	1,20	16,00

# Lampiran 5.2. Hasil Pengukuran Densitometer Pada Elektrogram SDS-PAGE

### Information

Application position 10.0 mm  
Solvent front position 75.0 mm

### Instrument

CAMAG TLC Scanner 3 "Scanner3 141101" S/N 141101 (1.14.28)  
Executed by unair kampus b 26 Januari 2011 14:27:30  
Number of tracks 2  
Position of first track X 30.0 mm  
Distance between tracks 10.0 mm  
Scan start pos. Y 5.0 mm  
Scan end pos. Y 70.0 mm  
Slit dimensions 4.00 x 0.30 mm, Micro  
Optimize optical system Light  
Scanning speed: 20 mm/s  
Data resolution: 100 µm/step

### Measurement Table

Wavelength 575  
Lamp D2 & W  
Measurement Type Remission  
Measurement Mode Absorption  
Optical filter Second order  
Detector mode Automatic  
PM high voltage 289 V

### Detector properties

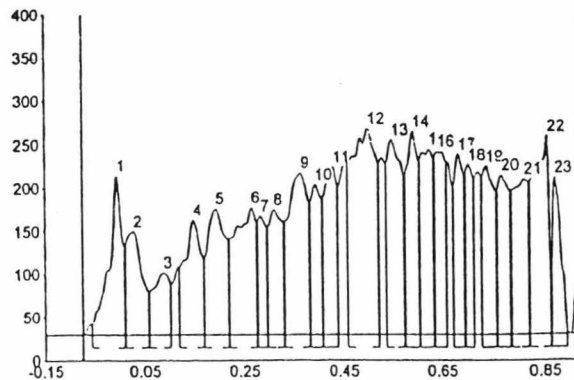
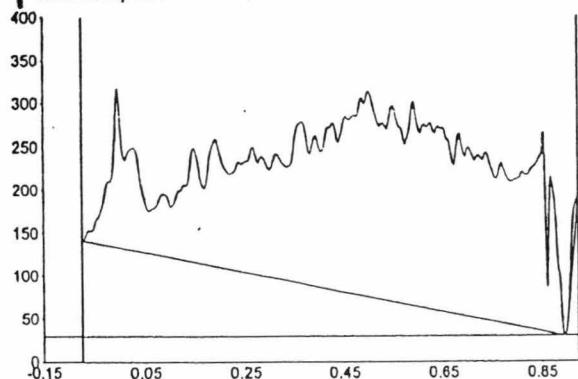
Y-position for 0 adjust 5.0 mm  
Track # for 0 adjust 0  
Analog Offset 10%  
Sensitivity Automatic (9)

### Integration

#### Properties

Data filtering Savitsky-Golov 7  
Baseline correction Lowest Slope  
Peak threshold min. slope 5  
Peak threshold min. height 10 AU  
Peak threshold min. area 50  
Peak threshold max. height 990 AU  
Track start position 5.0 mm  
Track end position 70.0 mm  
Display scaling Automatic

#### Track 2, ID:



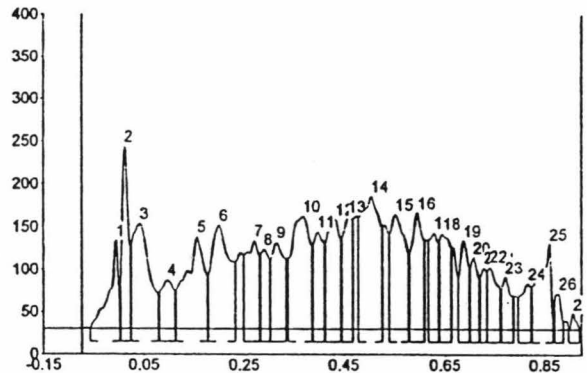
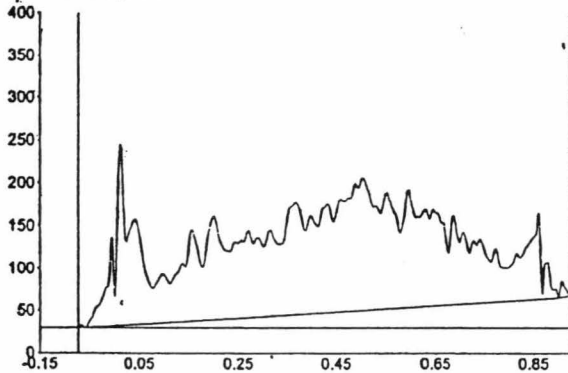
User : unair kampus b  
26 Januari 2011 14:27:47

Approved : .....  
Report ID : 07DB011A040E1B2D

SN 1412W016. V1.4.3  
Page 1 of 5

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	-0.06	12.4	-0.01	185.0	4.46	0.01	102.8	3572.9	4.16	unknown *
2	0.01	103.7	0.02	119.9	2.89	0.05	49.5	2786.0	3.24	unknown *
3	0.06	49.6	0.08	72.0	1.73	0.10	58.9	1735.1	2.02	unknown *
4	0.12	79.0	0.14	133.2	3.21	0.16	87.7	3366.4	3.92	unknown *
5	0.17	87.7	0.19	146.7	3.54	0.22	111.0	4045.8	4.71	unknown *
6	0.22	111.2	0.26	147.8	3.56	0.27	129.9	4718.5	5.49	unknown *
7	0.27	131.1	0.28	137.8	3.32	0.29	124.3	1715.1	2.00	unknown *
8	0.29	124.4	0.31	145.2	3.50	0.33	130.8	2978.8	3.47	unknown *
9	0.33	131.2	0.36	188.1	4.53	0.38	152.5	5419.5	6.31	unknown *
10	0.38	152.6	0.39	174.0	4.19	0.40	157.7	2792.0	3.25	unknown *
11	0.40	158.7	0.43	194.6	4.69	0.44	171.8	3791.1	4.41	unknown *
12	0.46	200.8	0.50	238.6	5.75	0.52	199.0	8872.6	10.33	unknown *
13	0.53	197.6	0.54	225.3	5.43	0.57	184.7	5187.9	6.04	unknown *
14	0.57	185.7	0.59	235.1	5.67	0.60	200.8	4223.8	4.92	unknown *
15	0.60	202.4	0.62	214.9	5.18	0.63	203.8	3979.1	4.63	unknown *
16	0.63	205.2	0.64	212.6	5.12	0.66	200.3	3543.8	4.13	unknown *
17	0.67	172.3	0.68	208.7	5.03	0.69	184.9	3089.8	3.60	unknown *
18	0.70	187.3	0.70	196.8	4.74	0.71	181.9	2285.8	2.66	unknown *
19	0.73	184.2	0.74	195.1	4.70	0.76	166.3	3622.4	4.22	unknown *
20	0.76	167.7	0.77	185.1	4.46	0.78	166.6	3149.1	3.67	unknown *
21	0.79	166.6	0.81	180.5	4.35	0.82	177.8	3822.6	4.45	unknown *
22	0.82	178.2	0.85	229.3	5.53	0.86	52.4	4980.2	5.80	unknown *
23	0.86	63.4	0.87	181.8	4.38	0.89	1.5	2203.0	2.57	unknown *

Track 3, ID:



User : unair kampus b  
26 Januari 2011 14:27:47

Approved : .....  
Report ID : 07DB011A040E1B2D

SN 1412W016, V1.4.3  
Page 4 of 5

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	-0.06	0.5	-0.01	103.6	3.69	-0.00	35.2	1383.1	2.74	unknown *
2	0.00	53.2	0.01	213.7	7.61	0.02	97.4	2010.1	3.99	unknown *
3	0.02	99.9	0.04	123.8	4.41	0.08	42.0	3152.5	6.25	unknown *
4	0.08	42.7	0.09	57.6	2.05	0.11	45.3	1117.8	2.22	unknown *
5	0.11	45.7	0.15	108.3	3.85	0.17	63.2	3049.4	6.05	unknown *
6	0.18	63.2	0.20	121.7	4.33	0.23	79.0	3382.9	6.71	unknown *
7	0.25	87.4	0.27	103.9	3.70	0.28	86.4	2041.9	4.05	unknown *
8	0.28	87.6	0.29	93.9	3.34	0.30	82.1	1159.0	2.30	unknown *
9	0.30	82.3	0.31	102.1	3.63	0.33	83.2	1918.7	3.80	unknown *
10	0.34	84.0	0.36	132.9	4.73	0.38	98.2	3652.0	7.24	unknown *
11	0.38	98.9	0.39	114.8	4.09	0.41	101.6	1820.2	3.61	unknown *
12	0.41	101.9	0.43	129.1	4.60	0.44	106.2	2473.1	4.90	unknown *
13	0.44	107.4	0.46	132.7	4.73	0.47	129.9	1999.3	3.96	unknown *
14	0.48	132.3	0.50	156.1	5.56	0.52	120.8	4519.3	8.96	unknown *
15	0.54	112.6	0.55	135.3	4.82	0.58	88.0	3040.3	6.03	unknown *
16	0.58	89.1	0.59	137.0	4.88	0.61	104.9	2291.4	4.54	unknown *
17	0.62	104.6	0.63	113.9	4.06	0.64	102.3	1515.6	3.01	unknown *
18	0.64	104.3	0.64	112.9	4.02	0.66	96.5	1707.5	3.39	unknown *
19	0.67	60.8	0.68	104.4	3.72	0.70	72.8	1351.0	2.68	unknown *
20	0.70	73.1	0.70	84.7	3.02	0.72	59.7	971.9	1.93	unknown *
21	0.72	60.3	0.73	73.5	2.62	0.73	67.4	685.8	1.36	unknown *
22	0.73	67.8	0.74	74.8	2.66	0.76	47.9	1179.6	2.34	unknown *
23	0.76	48.0	0.77	62.1	2.21	0.79	40.2	848.6	1.68	unknown *
24	0.80	39.4	0.82	54.3	1.93	0.82	50.5	796.3	1.58	unknown *
25	0.82	50.9	0.86	100.5	3.58	0.87	6.2	1857.5	3.68	unknown *
26	0.87	32.5	0.88	43.0	1.53	0.89	10.5	373.2	0.74	unknown *
27	0.90	2.9	0.91	18.0	0.64	0.92	2.4	130.2	0.26	unknown *

User : unair kampus b  
 26 Januari 2011 14:27:47

Approved : .....  
 Report ID : 07DB011A040E1B2D

SN 1412W016, V1.4.3  
 Page 5 of 5

## LAMPIRAN VI.1

**DATA PROPORSI ASAM LEMAK**  
**BAKTERI *Staphylococcus aureus* DENGAN GC-FID**

Metode : Fatty Acid Methyl Ester (FAME-ULP)  
 Pelarut : Hexane  
 Standart : Miristat, palmitat, laurat  
 Sampel : Bakteri *Staphylococcus aureus*

Nama sampel	% Luas Area			Retention time		
	Miristat	Palmitat	Laurat	Miristat	Palmitat	Laurat
Standart 1	52,1931	45,7568	68,4509	4,537	7,077	11,924
Standart 2	58,6421	43,7554	65,6851	4,541	7,082	11,929
Standart 3	50,4594	45,1952	69,4292	4,542	7,088	11,944
Mean	53,7649 ± 4,3118	44,9025 ± 1,0323	67,8551 ± 1,9419			
kontrol 1+ standar	98,3579	109,2993	219,2891	4,533	7,078	11,944
kontrol 2+ standar	99,4254	96,0851	191,5025	4,537	7,081	11,939
kontrol 3+ standar	100,2168	105,5582	216,9058	4,524	7,08	11,945
Mean	99,3334±0,9329	103,6475±6,8112	209,2325±15,4008			
SA75%30' 1+ standar	47,8842	51,0011	111,5211	4,533	7,078	11,941
SA 75%30' 2+ standar	47,4031	50,7293	110,5246	4,527	7,067	11,916
SA 75%30' 3+ standar	46,7809	50,956	106,6679	4,532	7,073	11,923
Mean	47,3561±0,5532	50,8955±0,1457	109,5712±2,5632			
% perubahan	-52,3261	-50,8956	-47,6318			

## LAMPIRAN VI.2

**ANALISIS STATISTIK UJI ASAM LEMAK JENUH  
BAKTERI *Staphylococcus aureus***

## MANOVA HOTTELING'S TRACE

## NPar Tests

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		% area Miristat	% area Palmitat	% area Laurat
N		6	6	6
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	73,3447	77,2715	159,4018
	Std. Deviation	28,47740	29,21300	55,47262
Most Extreme Differences	Absolute	,314	,316	,306
	Positive	,314	,316	,306
	Negative	-,310	-,240	-,219
Kolmogorov-Smirnov Z		,770	,773	,749
Asymp. Sig. (2-tailed)		,594	,588	,628

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## General Linear Model

## Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Daya Penyinaran	1,00	3
	2,00	3

## Descriptive Statistics

	Daya Penyinaran	Mean	Std. Deviation	N
% area Miristat	Daya 0%	99,3334	,93286	3
	Daya 75%	47,3561	,55315	3
	Total	73,3447	28,47740	6
% area Palmitat	Daya 0%	103,6475	6,81115	3
	Daya 75%	50,8955	,14566	3
	Total	77,2715	29,21300	6
% area Laurat	Daya 0%	209,2325	15,40077	3
	Daya 75%	109,5712	2,56322	3
	Total	159,4018	55,47262	6



Multivariate Tests<sup>b</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1,000	168617,2 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	168617,2 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
	Hotelling's Trace	252925,9	168617,2 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
	Roy's Largest Root	252925,9	168617,2 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
Daya	Pillai's Trace	1,000	22755,610 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	22755,610 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
	Hotelling's Trace	34133,416	22755,610 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000
	Roy's Largest Root	34133,416	22755,610 <sup>a</sup>	3,000	2,000	,000

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+Daya

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>§</sup>

	F	df1	df2	Sig.
% area Miristat	,665	1	4	,461
% area Palmitat	8,822	1	4	,041
% area Laurat	10,260	1	4	,033

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Daya

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	% area Miristat	4052,460 <sup>a</sup>	1	4052,460	6890,727	,000
	% area Palmitat	4174,171 <sup>b</sup>	1	4174,171	179,871	,000
	% area Laurat	14898,552 <sup>c</sup>	1	14898,552	122,243	,000
Intercept	% area Miristat	32276,685	1	32276,685	54882,673	,000
	% area Palmitat	35825,308	1	35825,308	1543,763	,000
	% area Laurat	152453,667	1	152453,667	1250,882	,000
Daya	% area Miristat	4052,460	1	4052,460	6890,727	,000
	% area Palmitat	4174,171	1	4174,171	179,871	,000
	% area Laurat	14898,552	1	14898,552	122,243	,000
Error	% area Miristat	2,352	4	,588		
	% area Palmitat	92,826	4	23,206		
	% area Laurat	487,508	4	121,877		
Total	% area Miristat	36331,497	6			
	% area Palmitat	40092,305	6			
	% area Laurat	167839,727	6			
Corrected Total	% area Miristat	4054,812	5			
	% area Palmitat	4266,997	5			
	% area Laurat	15386,060	5			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,999)

b. R Squared = ,978 (Adjusted R Squared = ,973)

c. R Squared = ,968 (Adjusted R Squared = ,960)

**t-test**

**NPar Tests**

**Jenis asam Lemak = Miristat**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		% Area
N		6
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	73,3447
	Std. Deviation	28,47740
Most Extreme Differences	Absolute	,314
	Positive	,314
	Negative	-,310
Kolmogorov-Smirnov Z		,770
Asymp. Sig. (2-tailed)		,594

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Jenis asam Lemak = Miristat

**Group Statistics<sup>a</sup>**

Daya Penyerapan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
% Area	Daya 0%	3	99,3334	,93286	,53859
	Daya 75%	3	47,3561	,55315	,31936

- a. Jenis asam Lemak = Miristat

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
% Area	Equal variances assumed	,665	,461	83,010	4	,000	51,97730	,62615	50,23882	53,71578
	Equal variances not assumed			83,010	3,252	,000	51,97730	,62615	50,06907	53,88553

- a. Jenis asam Lemak = Miristat

**Jenis asam Lemak = Palmitat**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		% Area
N		6
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	77,2715
	Std. Deviation	29,21300
Most Extreme Differences	Absolute	,316
	Positive	,316
	Negative	-,240
Kolmogorov-Smirnov Z		,773
Asymp. Sig. (2-tailed)		,588

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Jenis asam Lemak = Palmitat

**Group Statistics<sup>a</sup>**

Daya Penyerapan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
% Area	Daya 0%	3	103,6475	6,81115	3,93242
	Daya 75%	3	50,8955	,14566	,08410

- a. Jenis asam Lemak = Palmitat

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
% Area	Equal variances assumed	8,822	,041	13,412	4	,000	52,75207	3,93332	41,83143	63,67271
	Equal variances not assumed			13,412	2,002	,005	52,75207	3,93332	35,84318	69,66096

- a. Jenis asam Lemak = Palmitat

**Jenis asam Lemak = Laurat**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		% Area
N		6
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	159,4018
	Std. Deviation	55,47262
Most Extreme Differences	Absolute	,306
	Positive	,306
	Negative	-,219
Kolmogorov-Smirnov Z		,749
Asymp. Sig. (2-tailed)		,628

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Jenis asam Lemak = Laurat

**Group Statistics<sup>a</sup>**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
% Area	Daya 0%	3	209,2325	15,40077	8,89164
	Daya 75%	3	109,5712	2,56322	1,47988

- a. Jenis asam Lemak = Laurat

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
% Area									Lower	Upper
Equal variances assumed		10,260	,033	11,056	4	,000	99,66127	9,01395	74,63453	124,68801
	Equal variances not assumed			11,056	2,111	,007	99,66127	9,01395	62,76314	136,55939

- a. Jenis asam Lemak = Laurat

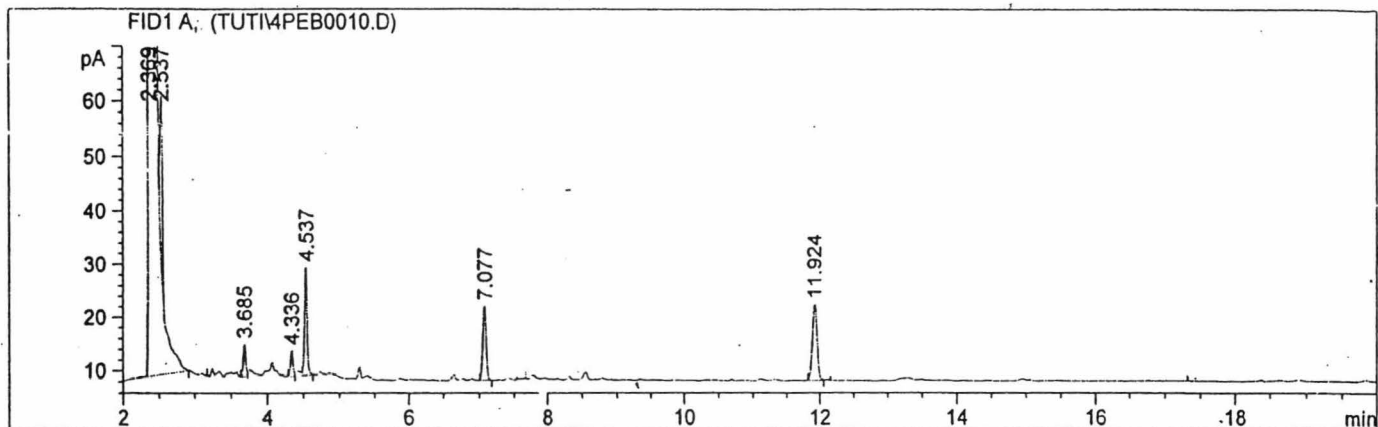
Lampiran 6.3. Hasil rekaman GC-FID Standar Asam Lemak Jenuh

```

=====
Injection Date   : 2/3/10 2:12:11 PM
Sample Name     : blanko 1
Acq. Operator   : tuti
Location        : Vial 1
Inj             : 1
Inj Volume      : Manually

Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed    : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed    : 2/12/10 10:20:17 AM by tuti
                  (modified after loading)

Method for cooling
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.369	BB S	0.0470	1.86614e6	6.79941e5	99.98577
2	2.537	BB X	0.0380	73.78981	33.11995	0.00395
3	3.685	VV	0.0363	13.91689	5.95036	0.00075
4	4.336	BV	0.0385	11.52253	4.72473	0.00062
5	4.537	VB	0.0400	52.19306	20.26745	0.00280
6	7.077	BB	0.0516	45.75681	13.82926	0.00245
7	11.924	BP	0.0734	68.45097	14.16630	0.00367

Totals : 1.86641e6 6.80034e5

Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

10 mikroLiter

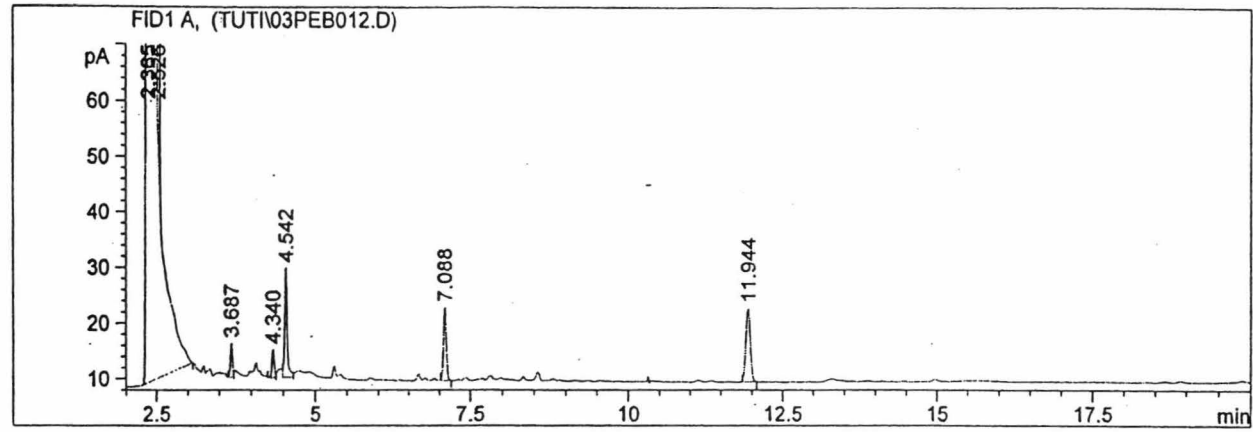
```

=====
Injection Date : 2/3/10 2:34:57 PM
Sample Name    : blanko 2
Acq. Operator  : tuti
Location       : Vial 1
Inj            : 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 2/3/10 1:45:28 PM by tuti
                (modified after loading)

Method for cooling

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.365	PB S	0.0503	2.08330e6	7.07585e5	99.98685
2	2.526	BB X	0.0446	77.84801	27.88626	0.00374
3	3.687	VV	0.0381	14.67905	6.09235	0.00070
4	4.340	VV	0.0417	13.30483	5.04802	0.00064
5	4.542	VV	0.0458	58.64207	19.64635	0.00281
6	7.088	BB	0.0528	43.75540	13.16583	0.00210
7	11.944	BB	0.0773	65.68510	13.15098	0.00315

```
Totals :                2.08357e6  7.07670e5
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

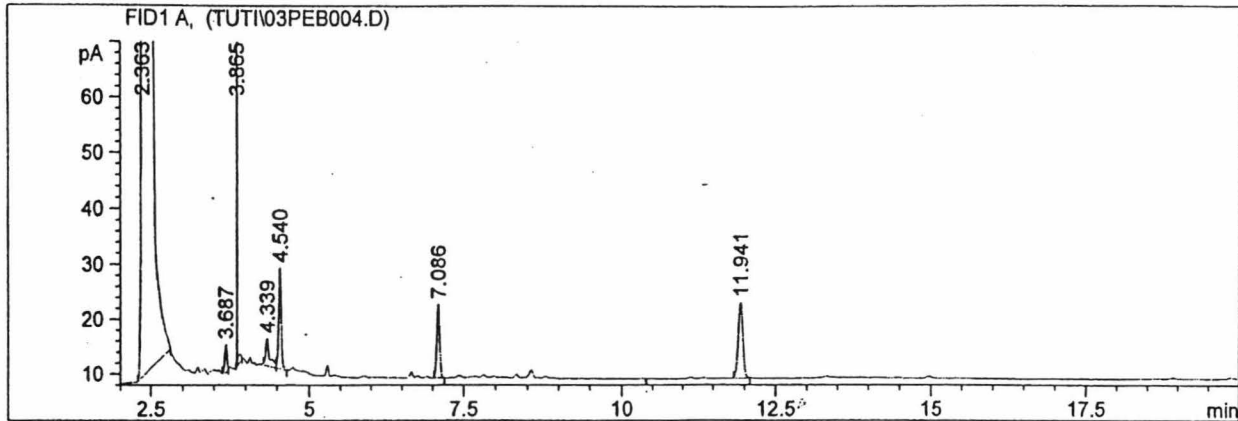
10 mikroLiter

```

=====
Injection Date : 2/3/10 11:22:25 AM
Sample Name    : blanko 3
Acq. Operator : tuti
Location      : Vial 1
Inj          : 1
Inj Volume   : Manually

Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed  : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed  : 2/3/10 1:13:17 PM by tuti
                (modified after loading)

Method for cooling
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.363	PB S	0.0505	2.04971e6	6.92438e5	99.98835
2	3.687	VV	0.0408	12.95288	5.07140	0.00063
3	3.865	PB	5.79e-3	38.72196	161.70627	0.00189
4	4.339	BV	0.0626	22.02130	4.98135	0.00107
5	4.540	VP	0.0432	50.45942	18.29868	0.00246
6	7.086	BB	0.0521	45.19523	13.49786	0.00220
7	11.941	BB	0.0809	69.42916	13.75514	0.00339

Totals : 2.04995e6 6.92656e5

Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

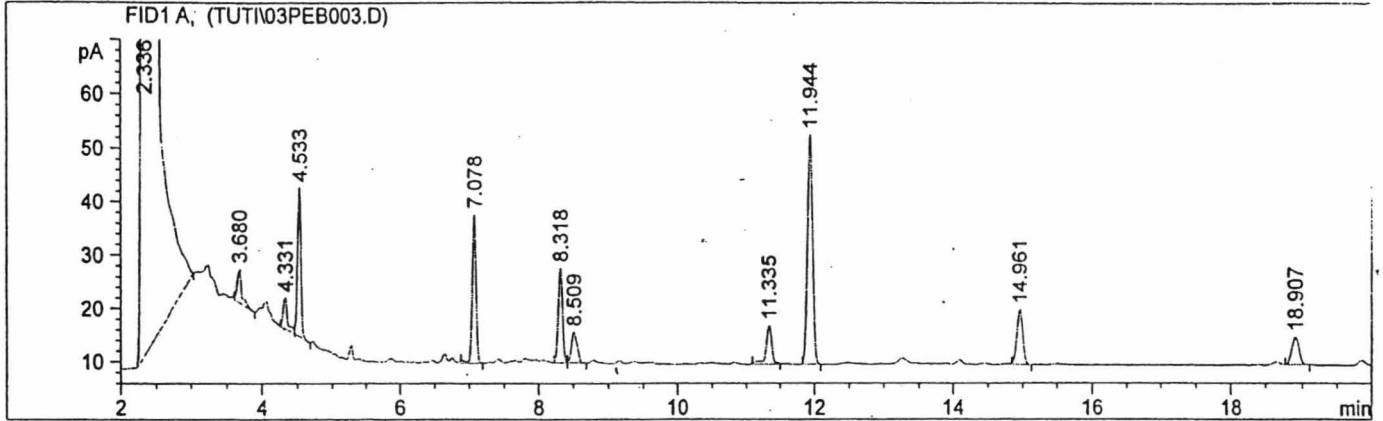
**Lampiran 6.3. Hasil rekaman GC-FID Asam Lemak Bakteri  
*Staphylococcus Aureus* Kontrol**

```

=====
Injection Date   : 2/3/10 12:35:08 PM
Sample Name     : SA control+Std 1
Acq. Operator   : tuti
Location        : Vial 1
Inj             : 1
Inj Volume      : Manually

Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed    : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\CUCI-KOL.M
Last changed    : 3/26/10 12:47:11 PM by imam
                  (modified after loading)

Method for cooling
    
```



=====  
Area Percent Report  
=====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.336	PB S	0.0629	3.40815e6	8.48588e5	99.97890
2	3.680	VP	0.0576	26.67243	6.39634	0.00078
3	4.331	VV	0.0664	24.87662	5.87093	0.00073
4	4.533	VP	0.0580	98.35796	27.99799	0.00289
5	7.078	BB	0.0596	109.29926	27.97900	0.00321
6	8.318	PV	0.0674	73.87077	17.78995	0.00217
7	8.509	VB	0.0796	31.44706	5.76732	0.00092
8	11.335	BB	0.0869	41.63265	7.15011	0.00122
9	11.944	BB	0.0795	219.28912	43.02483	0.00643
10	14.961	BB	0.0930	59.87804	10.27754	0.00176
11	18.907	PB	0.0998	34.07451	5.10766	0.00100

Totals : 3.40887e6 8.48746e5

Results obtained with enhanced integrator!

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*



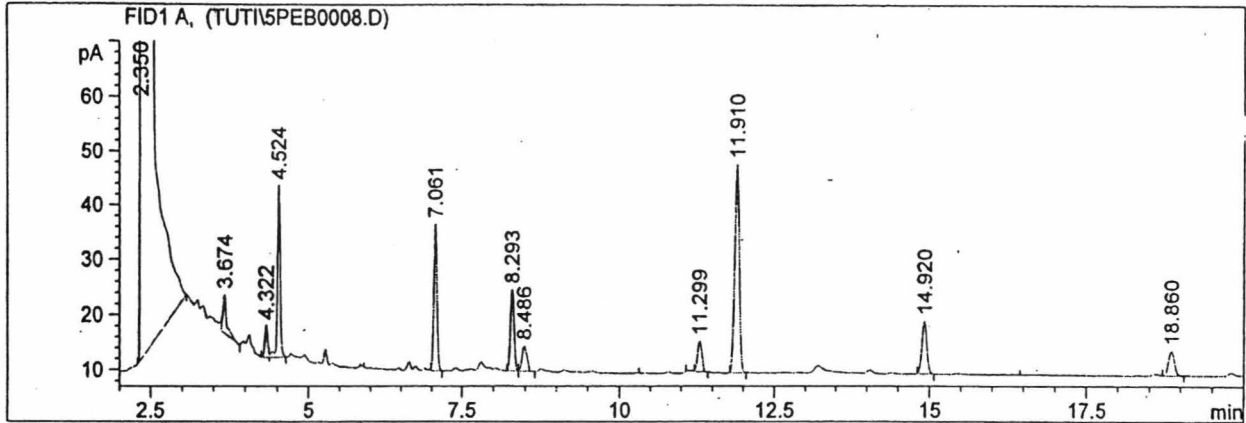
10 mikroLiter

```

=====
Injection Date   : 2/3/10 10:39:45 AM
Sample Name     : SA control+Std 2
Acq. Operator   : tuti
Location        : Vial 1
Inj             : 1
Inj Volume      : Manually

Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed    : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed    : 2/3/10 12:55:34 PM by tuti
                  (modified after loading)
    
```

Method for cooling



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.350	PB S	0.0602	2.82015e6	8.17529e5	99.97791
2	3.674	VP	0.0569	26.70034	6.93367	0.00095
3	4.322	VV	0.0450	16.65841	5.88464	0.00059
4	4.524	VB	0.0489	99.42545	31.41324	0.00352
5	7.061	BB	0.0549	96.08507	26.78486	0.00341
6	8.293	PV	0.0641	58.37951	14.77722	0.00207
7	8.486	VB	0.0767	24.19147	4.57236	0.00086
8	11.299	BB	0.0731	26.13327	5.53528	0.00093
9	11.910	BB	0.0794	191.50253	38.23875	0.00679
10	14.920	BB	0.0875	54.20517	9.66185	0.00192
11	18.860	PB	0.1066	29.94726	4.44336	0.00106

Totals : 2.82077e6 8.17677e5

Results obtained with enhanced integrator!

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*

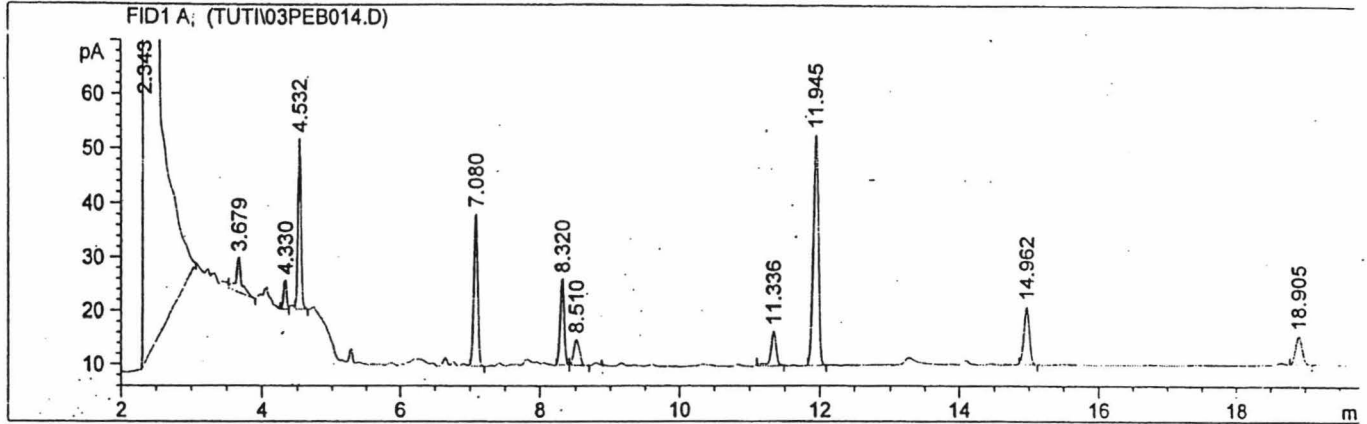
10 mikroLiter

```

=====
Injection Date : 2/3/10 1:23:50 PM
Sample Name    : SA control+Std 3
Acq. Operator  : tuti
Location       : Vial 1
Inj            : 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 2/4/10 10:17:16 AM by tuti
                (modified after loading)
    
```

Method for cooling



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.343	PB S	0.0653	3.10316e6	8.36997e5	99.97753
2	3.679	VB	0.0760	34.92520	6.57430	0.00113
3	4.330	VV	0.0477	16.38894	5.50970	0.00053
4	4.532	VB	0.0510	100.21675	31.62886	0.00323
5	7.080	BB	0.0581	105.55820	28.58562	0.00340
6	8.320	PV	0.0618	63.49473	16.16870	0.00205
7	8.510	VB	0.0816	26.74219	4.90623	0.00086
8	11.336	BB	0.0803	35.43362	6.52663	0.00114
9	11.945	BB	0.0801	216.90584	42.82510	0.00699
10	14.962	BB	0.0886	62.30385	10.91718	0.00201
11	18.905	PP	0.1025	35.33105	5.39046	0.00114

Totals : 3.10385e6 8.37156e5

Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

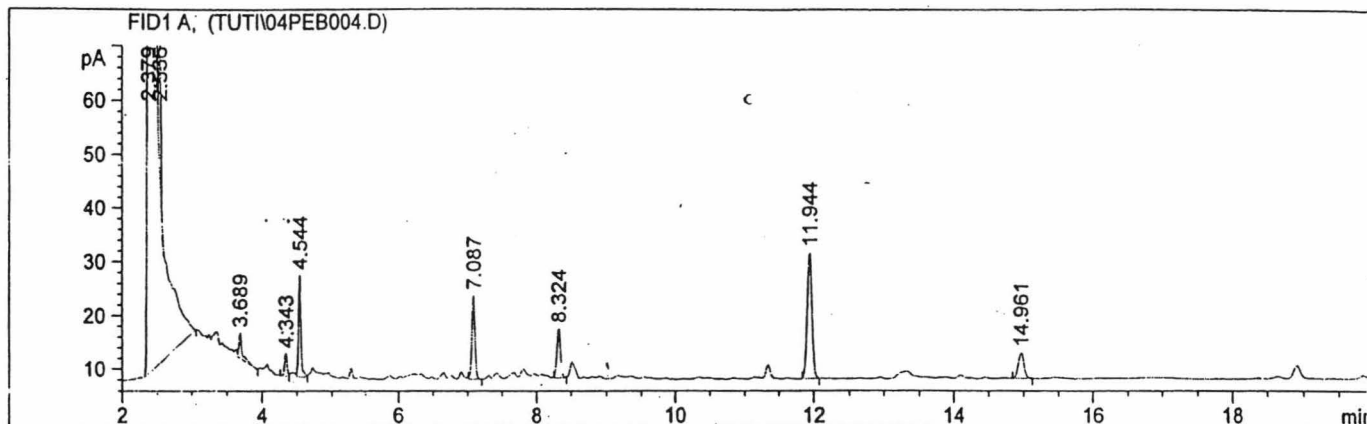
**Lampiran 6.3. Hasil rekaman GC-FID Asam Lemak Bakteri  
Staphylococcus Aureus Penyinaran LED Biru  
Dosis Optimal**

```

=====
Injection Date : 2/3/10 11:46:50 AM
Sample Name    : SA 75%30+Std 1
Acq. Operator  : tuti
Location       : Vial 1
Inj            : 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\CUCI-KOL.M
Last changed   : 3/26/10 1:20:59 PM by imam
                (modified after loading)
    
```

Method for cooling



=====  
Area Percent Report  
=====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.379	PB S	0.0416	1.44357e6	5.89872e5	99.97580
2	2.536	BB X	0.0341	52.82776	25.55345	0.00366
3	3.689	VP	0.0445	14.44075	4.74379	0.00100
4	4.343	VV	0.0390	10.53809	4.23527	0.00073
5	4.544	VV	0.0396	47.88417	18.89948	0.00332
6	7.087	VB	0.0502	51.00109	15.59456	0.00353
7	8.324	PB	0.0546	33.74261	9.24712	0.00234
8	11.944	BB	0.0745	111.51999	23.43346	0.00772
9	14.961	PB	0.0904	27.52767	4.83621	0.00191

Totals : 1.44392e6 5.89978e5

Results obtained with enhanced integrator!

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

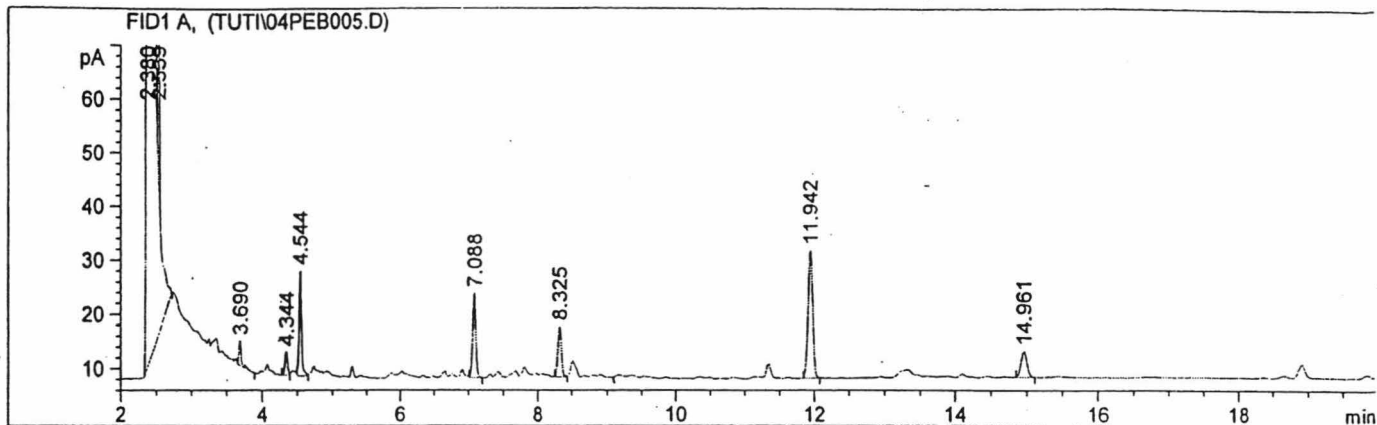
10 mikroLiter

```

=====
Injection Date   : 2/3/10 2:57:52 PM
Sample Name     : SA 75%30+std 2
Acq. Operator  : tuti
Location       : Vial 1
Inj           : 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 11/11/09 11:16:36 AM by Riеста
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 2/3/10 1:45:28 PM by tuti
                (modified after loading)
    
```

Method for cooling



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.380	PB S	0.0383	1.38375e6	5.90340e5	99.97497
2	2.539	BB X	0.0320	55.89252	28.40648	0.00404
3	3.690	VP	0.0362	11.05465	4.56649	0.00080
4	4.344	BV	0.0382	10.54136	4.36693	0.00076
5	4.544	VB	0.0376	47.40310	19.33734	0.00342
6	7.088	VB	0.0501	50.72931	15.54693	0.00367
7	8.325	PB	0.0551	33.31181	9.23154	0.00241
8	11.942	BB	0.0709	110.52458	23.49185	0.00799
9	14.961	PB	0.0851	26.92645	4.82234	0.00195

Totals : 1.38410e6 5.90450e5

Results obtained with enhanced integrator!

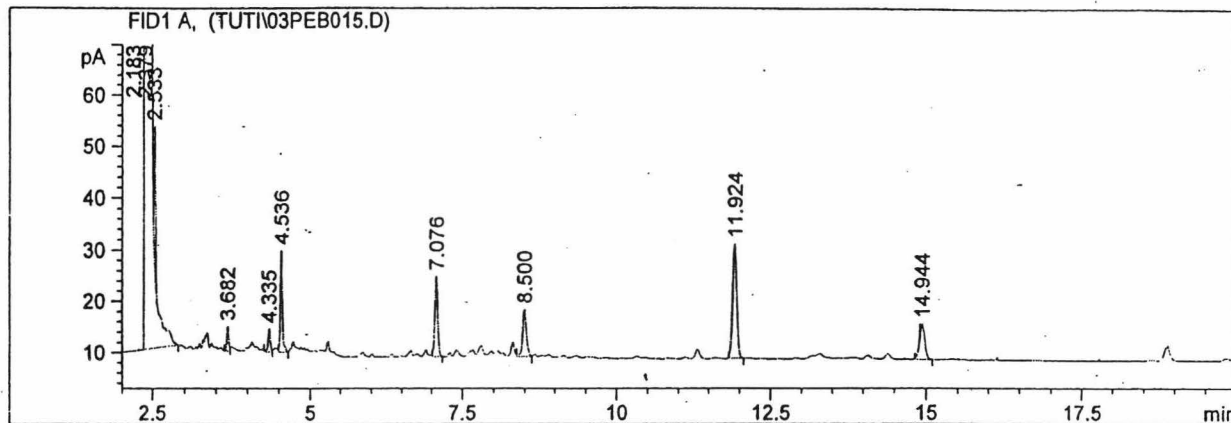
\*\*\* End of Report \*\*\*

10 mikroLiter

```

=====
Injection Date   : 2/3/10 9:30:50 AM
Sample Name     : SA 75%30+Std 3
Acq. Operator  : tuti
Location       : Vial 1
Inj           : 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 11/11/09 11:16:36 AM by Riesta
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\FAME-ULP.M
Last changed   : 2/4/10 9:50:16 AM by tuti
                (modified after loading)
Method for cooling
    
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.183	PV	0.2899	1.86974e4	765.60126	1.58049
2	2.379	VB S	0.0366	1.16396e6	5.29648e5	98.38972
3	2.533	BB X	0.0285	48.41344	27.52802	0.00409
4	3.682	VV	0.0308	9.73553	4.77882	0.00082
5	4.335	VV	0.0382	11.24824	4.48729	0.00095
6	4.536	VP	0.0365	46.78087	19.86635	0.00395
7	7.076	BB	0.0505	50.95601	15.86369	0.00431
8	8.500	VP	0.0627	39.51674	9.28478	0.00334
9	11.924	BB	0.0738	106.66791	22.29808	0.00902
10	14.944	BB	0.0797	39.13565	6.94631	0.00331

Totals : 1.18301e6 5.30525e5

Results obtained with enhanced integrator!

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*