

**EFEK PAPARAN LASER DIODA MERAH DENGAN OZON
UNTUK INAKTIVASI BAKTERI BIOFILM**

Staphylococcus aureus

SKRIPSI



AULIA HAIDAR RAHMAN NUGRAHA

**PROGRAM STUDI S1 FISIKA
DEPARTEMEN FISIKA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

**EFEK PAPARAN LASER DIODA MERAH DENGAN OZON
UNTUK INAKTIVASI BAKTERI BIOFILM**

Staphylococcus aureus

SKRIPSI



AULIA HAIDAR RAHMAN NUGRAHA

**PROGRAM STUDI S1 FISIKA
DEPARTEMEN FISIKA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

**EFEK PAPARAN LASER DIODA MERAH DENGAN OZON
UNTUK INAKTIVASI BIOFILM BAKTERI**

Staphylococcus aureus

SKRIPSI

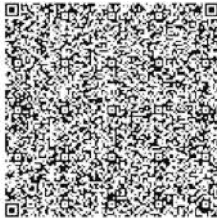
Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Fisika
pada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Aulia Haidar Rahman Nugraha

NIM: 081811333054

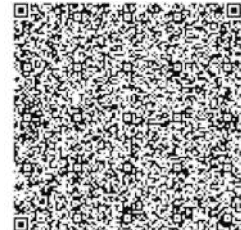
Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Prof. Dr. Suryani Dyah Astuti, S.Si., M.Si.
NIP. 196908041994122001

Pembimbing II,



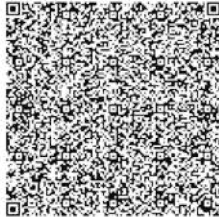
Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.
NIP. 196705071991021001

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : Efek Paparan Laser Dioda Merah dengan Ozon untuk Inaktivasi Bakteri Biofilm *Staphylococcus aureus*.
Penyusun : Aulia Haidar Rahman Nugraha
NIM : 081811333054
Pembimbing I : Prof. Dr. Suryani Dyah Astuti, S.Si., M.Si.
Pembimbing II : Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.
Tanggal Seminar : 5-09-2022 10:40 AM

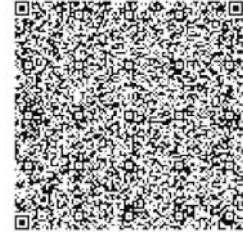
Disetujui

Pembimbing I,



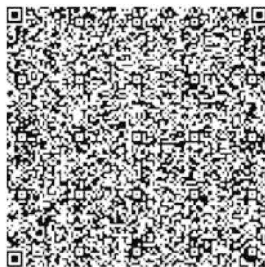
Prof. Dr. Suryani Dyah Astuti, S.Si., M.Si.
NIP. 196908041994122001

Pembimbing II,



Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.
NIP. 196705071991021001

Mengetahui,
Ketua Departemen Fisika
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga



Herri Trilaksana, M.Si., Ph.D.
NIP. 197712282003121003

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan. Namun, tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan digunakan sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penulis dan menyebutkan sumber sesuai kaidah penulisan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aulia Haidar Rahman Nugraha

NIM : 081811333054

Program Studi : Fisika

Fakultas : Sains dan Teknologi

Fakultas : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

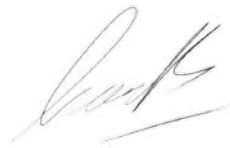
Efek Paparan Laser Dioda Merah dengan Ozon untuk Inaktivasi Bakteri Biofilm *Staphylococcus aureus*.

Apabila dikemudian hari terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 21 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,



Aulia Haidar Rahman N

NIM. 081811333054

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **“Efek Paparan Laser Dioda Merah dengan Ozon untuk Inaktivasi Bakteri Biofilm *Staphylococcus aureus*”**. Sholawat dan salam tercurah kepada rasulullah Muhammad SAW, beserta keluarga serta seluruh sahabatnya.

Skripsi ini disusun demi memenuhi syarat untuk mengambil mata kuliah Skripsi. Dalam penulisan skripsi ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi, khususnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Suryani Dyah Astuti, M.Si selaku dosen pembimbing I proposal skripsi.
2. Bapak Prof. Hery Purnobasuki, M.Si, Ph.D. selaku dosen pembimbing II proposal skripsi.
3. Bapak Herri Trilaksana, S.Si, M.Si, Ph.D selaku Kepala Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
4. Bapak dan Ibu dosen Universitas Airlangga yang banyak memberikan ilmu yang bermanfaat untuk penulis selama menjadi mahasiswa.
5. Kedua orang tua dan keluarga besar yang senantiasa memberi dukungan, semangat, dan doa untuk penulis.
6. Teman-teman prodi Fisika Universitas Airlangga angkatan 2018, dan kakak tingkat KBK Fisika Medis dan Biofisika yang telah memberikan pertolongan, semangat, dan motivasi.
7. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kami sangat terbuka atas kritik dan saran positif bagi Bapak/Ibu

sekalian. Dan penulis berharap supaya skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan Bapak/Ibu sekalian. Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih.

Surabaya, 21 Juli 2022

Penyusun



Aulia Haidar Rahman Nugraha

Aulia Haidar Rahman Nugraha, 2022, Efek Paparan Laser Dioda Merah dengan Ozon untuk Inaktivasi Bakteri Biofilm *Staphylococcus aureus*. Skripsi ini dibawah Prof. Dr. Suryani Dyah Astuti, S.Si., M.Si. dan Prof. Dr. Hery Purnobasuki, M.Si., P.hD., Program Studi S1 Fisika, Departemen Fisika, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian *Photodynamic Inactivation* (PDI) menggunakan laser dioda merah dengan kombinasi ozon pada fotosensitizer endogen bakteri biofilm *Staphylococcus aureus* untuk meningkatkan produksi oksigen reaktif yang menimbulkan kerusakan biologis bakteri. Studi ini bertujuan untuk mempelajari potensial laser dioda merah dengan penambahan ozon untuk mengurangi biofilm bakteri gram positif *S. aureus* yang menyebabkan penyakit infeksi di rumah sakit. Metode yang digunakan adalah penyinaran dengan laser dioda merah, paparan ozon, dan kombinasi laser dengan ozon. Total Plate Count (TPC) digunakan untuk mengetahui jumlah koloni sehingga bisa mengkonversi nilai OD koloni tersebut menjadi CFU/ml dan perhitungan nilai OD dilakukan menggunakan alat ELISA reader. Hasil uji menunjukkan penyinaran dengan laser dioda merah selama 40 detik dengan rapat energi $9,87 \text{ J/cm}^2$ ditambah paparan ozon secara maksimal mampu untuk mereduksi biofilm bakteri *S. Aureus* sebesar 94,33%. Sedangkan pada perlakuan hanya laser biofilm bakteri mampu tereduksi sebesar 76,38 % dan paparan ozon mampu mereduksi sebesar 64,44%.

Kata kunci: Fotoinaktivasi, Laser Dioda, *Staphylococcus aureus*, Biofilm.

Aulia Haidar Rahman Nugraha, 2022, Photodynamic Effectiveness of Red Laser Diode Combined with Ozone to Reduce *Staphylococcus aureus* Biofilm. This thesis is under the guidance of Prof. Dr. Suryani Dyah Astuti, M. Si dan Prof. Dr. Hery Purnobasuki, M.Si., P.hD, S1 Physics Study Program, Department of Physics, Faculty of Sains and Technology, Airlangga University, Surabaya

ABSTRACT

Research has been done *Photodynamic Inactivation* (PDI) using red diode laser combined with ozone on endogen photosensitizer for *Staphylococcus aureus* biofilm bacteria to increase to production of reactive oxygen that cause biological damage on the bacteria. The goal of this research is to study the red diode laser potential with ozone to reduce *S. aureus* positive gram bacteri which is the one of the cause for nosocomial infection,. Method that will be used on this research is red diode laser irradiation, ozone exposure, and ozone lazer combination. Total Plate Count (TPC) is used to count the total of bacteria colony so that we can convert OD value of the colony into CFU/ml and the calculation of OD value is done by using ELISA reader. The experiment results showed red diode laser irradiation for 40 seconds with energy density of 9,87 J/cm² with ozone exposure can maximally reduce *S.aureus* bacteria biofilm with a death percentage of 94,33%. Meanwhile with laser irradiation only the bacteria death percentage is 76,38% and only ozone exposure is able to give a death percentage of 64,44%.

Kata kunci: Fotoinaktivasi, Laser Dioda, *Staphylococcus aureus*, Biofilm

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI.....	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	iv
SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS	v
KATA PENGANTAR.....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
BAB I.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Masalah	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	2
2.1 Sterilisasi	2
2.2 Photodynamic Inactivation	8
2.2.1 Fotosensitiser Endogen (Porfirin).....	9
2.2.2 Sumber Cahaya.....	10
2.2.3 Interaksi Cahaya Terhadap Jaringan.....	13
2.2.4 Mekanisme Fotosensitisasi	15
2.3 Ozon	18
2.3.2 Mekanisme Ozon Merusak Mikroorganisme	21
2.4 Bakteri	22
2.4.1 Bakteri Staphylococcus Aureus.....	23
2.4.3 Biofilm.....	24
2.4.3.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm	26
BAB III.....	29
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	29

3.2 Alat dan Bahan	29
3.2.1 Alat Penelitian	29
3.2.2 Bahan Penelitian.....	29
3.3 Rancangan Penelitian	30
3.4 Definisi Operasional Variabel	32
3.4.1 Waktu Paparan.....	32
3.4.2 Optical Density	32
3.4.3 Jumlah Koloni Bakteri.....	32
3.4.4 Kultur Bakteri	32
3.4.5 Medium TSA	33
3.5 Prosedur Penelitian	33
3.5.1 Tahap Persiapan.....	34
3.5.1.1 Karakterisasi Laser Dioda Merah	34
3.5.1.2. Pembuatan Diagram Standar McFarland.....	36
3.4.1.3 Pengkulturan Bakteri dalam Mikroplate	37
3.5.2 Treatment.....	38
3.5.3 Analisis Statistik.....	38
3.5.4. Analisis	39
BAB IV	30
4.1 Hasil Penelitian.....	30
4.1.1 Karakterisasi Sumber Cahaya.....	30
4.1.2 Konsentrasi sumber ozon.....	43
4.1.3 Hasil Uji Standar Mc Farland dan Standar Pengenceran Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.1.4 Hasil Analisis Perlakuan Biofilm Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.2 Pembahasan	47
BAB V	53
5.1 Kesimpulan.....	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Komponen Biofilm	25
4.1	Rapat Energi Keluaran Laser Dioda	42
4.2	Konsentrasi Ozon	43
4.3	Tabel Hasil Analisis Statistik	46
4.4	Penelitian fotodinamik inaktivasi bakteri <i>S. aureus</i>	50

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Diagram Jablonski	9
2.2	Bahan Pembentukan Laser	10
2.3	Sifat Cahaya Laser	11
2.4	Pemetaan Interaksi Cahaya dengan Jaringan	15
2.5	Jalur fotokimia	17
2.6	Dinding sel bakteri	18
2.7	Pembentukan ozon proses tumbukan	20
2.8	Prinsip alat pembangkit ozon	20
2.9	Ilustrasi pembentukan ozon secara parsial	21
2.10	Struktur dinding sel bakteri gram positif	23
2.11	Siklus biofilm	28
3.1	Skema Definisi Operasional Variabel	31
3.2	Diagram alir penelitian	32
3.3	Skema Tahap Perlakuan	33
3.4	Skema karakterisasi temperatur	34
3.5	Skema karakterisasi intensitas cahaya laser	34
4.1	Karakterisasi Panjang Gelombang Laser Dioda	40
4.2	Karakterisasi Intensitas terhadap Waktu	41
4.3	Karakterisasi Temperatur terhadap Waktu	42
4.4	Kurva McFarland	43
4.5	Penurunan Viabilitas Biofilm Bakteri <i>S. aureus</i>	44

4.6	Perbandingan Presentase Reduksi	45
4.7	Ilustrasi Mekanisme Pertumbuhan Biofilm	47
4.8	Ilustrasi Mekanisme Inaktivasi pada Treatment	48
4.9	Perbandingan Dinding Sel Jenis Bakteri	49

BAB I**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Permasalahan utama yang dialami di daerah tropis adalah penyakit infeksi. Masalah ini ditimbulkan oleh mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh, berkembang biak dan menimbulkan penyakit. Terdapat empat kelompok besar hama penyakit, yaitu bakteri, jamur, virus, dan parasit (Brooks *et al*, 2012). Bakteri masuk ke dalam tubuh melalui tempat selaput lendir bertemu dengan kulit, yaitu saluran pernafasan, gastrointestinal (terutama mulut), alat kelamin, dan saluran kemih (Brooks *et al*, 2012). Sekitar 1 dari 10 orang yang masuk di rumah sakit berhadapan dengan kasus nosokomial. Infeksi ini timbul sekurang-kurangnya dalam waktu 3 x 24 jam sejak mulai dirawat. Bakteri yang sering menyebabkan infeksi nosokomial antara lain adalah *Staphylococcus aureus*. Mikroba ini menular melalui makanan, obat, alat kesehatan, atau kontak langsung tangan medis, paramedis, atau personel rumah sakit lainnya (Konoralma, 2019). *Staphylococcus* berasal dari kata *staphylo* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti bulat. *Staphylococcus* tergolong bakteri gram positif. Bakteri ini apabila diamati dibawah mikroskop memiliki bentuk bulat serta bergerombol seperti buah anggur. Bakteri ini juga mencakup mikroba tanah dan dapat ditemui di seluruh dunia.

Solusi yang selama ini diambil untuk mengurangi infeksi, pihak rumah sakit memiliki fasilitas untuk melakukan sterilisasi. Sterilisasi adalah proses menghancurkan semua bentuk mikrobakteri pada permukaan termasuk spora-spora (Neville, 2020). Pada proses sterilisasi, spora bakteri merupakan organisme yang paling resisten diantara semua organisme hidup. Efektifitas sterilisasi tergantung pada jumlah dan jenis mikroorganisme, jumlah dan jenis kontaminasi oleh zat lain, serta ada tidaknya tempat-tempat perlindungan mikroorganisme pada alat (misalkan dengan alat yang bergigi) (Adji, 2007). Sterilisasi harus dilakukan untuk alat-alat kedokteran gigi atau alat lain yang ada kontak langsung dengan darah atau jaringan pada tubuh. Metode sterilisasi yang biasa digunakan

salah satunya adalah sterilisasi panas kering (*dry heat*) (Sunarjo, 2007). Kelemahan dari metode sterilisasi panas kering adalah waktu yang diperlukan tergolong lama, penetrasi materi lambat dan tidak merata, membutuhkan oven dan sumber listrik secara terus menerus, instrumen yang memiliki bahan non-logam seperti plastik dan karet tidak dapat disterilisasi dengan panas kering dan memiliki harga yang mahal (Tietjen *et al*, 2016). Metode lain yang sering digunakan untuk sterilisasi alat adalah autoklaf. Autoklaf menggunakan uap bersuhu dan bertekanan tinggi. Kekurangan dari autoklaf adalah harus menggunakan air mendidih karena uapnya yang memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Autoklaf memerlukan sumber panas yang terus menerus. Autoklaf membutuhkan peralatan yang butuh perawatan terus menerus (Fardiaz, 1992).

Bakteri *S. aureus* memiliki kecenderungan untuk membentuk biofilm pada peralatan medis. Biofilm merupakan kumpulan dari sel-sel mikroba yang melekat secara ireversibel pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks *extracellular polymeric substances* (EPS) yang dihasilkannya sendiri serta memperlihatkan adanya perubahan fenotip seperti perubahan tingkat pertumbuhan dan perubahan transkripsi gen dari sel planktonik atau sel bebasnya (Donlan, 2002). Adanya biofilm mengakibatkan bakteri mampu bertahan dari ancaman fisis, kimiawi, atau biologis. Biofilm bekerja dengan menolak aktivitas sistem imun dan menciptakan resistensi terhadap antibiotik (Sthepens & Sumner, 2002). Permasalahan resistensi akibat biofilm membutuhkan penanganan yang lebih tepat, salah satunya dengan metode *Photodynamic Inactivation* (PDI).

Photodynamic Inactivation (PDI) memiliki tiga komponen utama, yakni cahaya, fotosensitiser serta oksigen (Rusdi *et al*, 2002). Proses fotoinaktivasi bakteri diawali dengan proses fotosensitisasi. Pada fotoinaktivasi cahaya akan diserap oleh porfirin selanjutnya mengaktifasi terjadinya reaksi kimia yang menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif bergantung pada jenis dan kuantitas dari porfirin yang berperan sebagai molekul pengabsorpsi cahaya (Nitzan *et al*, 2004). Fotoinaktivasi merupakan bagian dari terapi fotodinamik,

dikenal sebagai a-PDT (antimikroba-terapi fotodinamik), bertujuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba patogen yang menyebabkan infeksi dalam tubuh manusia terapi fotodinamik antimikroba (a-PDT) dianggap sebagai sarana yang menjanjikan (Vatansever *et al*, 2013).

Mekanisme fotosensitisasi melibatkan proses fotofisika, fotokimia dan fotobiologi (Astuti *et al*, 2011) Pada proses fotofisika terjadi penyerapan cahaya oleh elektron di dalam molekul dan mengalami perubahan keadaan energi. Porphirin (molekul yang peka terhadap cahaya) mampu menyerap foton dari sumber cahaya yang spektrum serapnya sesuai hingga tereksitasi dari tingkat vibrasi dasar dalam keadaan singlet (S_0) menuju tingkat yang lebih tinggi ($S_1, S_2, S_3, \text{dll}$). Ketika proses perubahan tingkat vibrasi tersebut energi molekul berkurang atau hilang menjadi energi panas (kalor) karena antar reaksinya dengan molekul-molekul lain. Interaksi antara cahaya dengan fotosensitiser terjadi jika adanya kesesuaian antara panjang gelombang serap fotosensitiser dan panjang gelombang sumber cahaya. Interaksi antara keduanya mampu menyebabkan elektron pada fotosensitiser tereksitasi dan menjadi tidak stabil. Elektron yang tidak stabil memiliki kecenderungan untuk kembali ke kondisi semula. Jika molekul fotosensitiser berinteraksi dengan oksigen menyebabkan terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mampu memicu kematian sel bakteri. Secara alamiah, bakteri mempunyai porfirin sebagai fotosensitiser endogen yang peka terhadap cahaya.

Penelitian Papageorgiou *et al* (2000) menunjukkan bahwa penyinaran oleh cahaya dengan spektrum panjang gelombang yang sesuai dengan spektrum serap fotosensitiser porfirin serta dosis energi penyinaran yang tepat mampu menyebabkan fotoinaktivasi sel bakteri. Laser dioda merah digunakan karena pada penelitian yang dilakukan oleh (Astuti, 2020) dapat diketahui bahwa dengan panjang gelombang ($658 \pm 0,05$) nm digabungkan dengan eksogen biru mampu untuk menginaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Molekul ozon merupakan bagian terkecil dari atmosfer bumi (hanya 0,03% dari seluruh total volume pada atmosfer) (Slamet, 2010). Sinar ultraviolet dari pancaran matahari mampu menguraikan gas oksigen (O_2) di udara bebas. Molekul oksigen jadi terurai menjadi dua buah atom oksigen (O^*), proses ini dinamakan photolysis. Kemudian atom oksigen tersebut akan bertumbukan secara alami dengan molekul gas oksigen yang ada disekitarnya, sehingga terbentuknya ozon (O_3) (McConnell & Jin, 2008). Penambahan ozon dilakukan untuk meningkatkan kerusakan pada bakteri karena ozon mempunyai kemampuan membunuh bakteri, virus dan jamur, memperbaiki sirkulasi jaringan, mempercepat epitelisasi jaringan, dan merangsang regenerasi sel (Maslennikov *et al*, 2008) yang bisa mendifusi biofilm di sitoplasma sehingga biofilm mengalami pengikisan. Ozon mampu memberikan reaksi kontinyu sehingga menghasilkan oksigen reaktif dengan memproduksi H_2O_2 (Tanasattha, 2019). Konsentrasi ozon efektif yaitu pada konsentrasi 0,010 mg/L dengan waktu alir 60s dan presentasi reduksi bakteri sebesar (37,78±2,38) %. Kombinasi antara ozon dan fotodinamik memberikan potensi reduksi lebih besar terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* yaitu pada konsentrasi ozon 0,010 mg/L, dosis energi laser 28,45 J/cm² dan efektivitas (71,96±4,15) % dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain dengan dosis yang sama besar (Anwar, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Astuti *et al* (2019) menggunakan laser dioda pada panjang gelombang 399,81 ± 15,11 nm dengan ozon output 400mg/h menunjukkan bahwa waktu paparan memiliki pengaruh pada tingkat reduksi bakteri. Perlakuan kombinasi laser dioda dengan ozon mampu memberi tingkat reduksi paling tinggi selama 40 detik pada rentang 20-60 detik karena terbentuknya H_2O_2 dan rapat energi optimal pada waktu tersebut.

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa kombinasi sumber cahaya laser dioda merah dengan ozon memiliki potensi mereduksi bakteri lebih besar dibandingkan dengan penggunaan laser dioda atau ozon saja. Sehingga, penelitian ini menggunakan laser dioda merah dan kombinasi aktivasi ozon.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah penambahan ozon pada fotodinamik inaktivasi dengan laser dioda merah dapat mereduksi bakteri ?
2. Pada rapat energi laser dioda merah berapa yang optimal untuk mereduksi biofilm bakteri *S. aureus* ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Perlakuan terhadap bakteri dengan menggunakan laser dioda merah dengan ozon dan tanpa aktivasi ozon. Dengan variasi waktu paparan 10 detik, 20 detik, 30 detik, dan 40 detik.
2. Panjang gelombang dari laser dioda merah adalah $663,85 \pm 0,022$ nm.
3. Metode yang digunakan adalah menghitung nilai OD dengan ELISA *reader* lalu mengkonversi dari nilai OD ke CFU/mL.
4. Jarak pemaparan berjarak 1 cm sesuai dari dimensi dari alat tersedia.
5. Fotosensitiser yang digunakan adalah fotosensitiser endogen (porfirin)

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh penambahan ozon untuk pemaparan laser dioda merah terhadap presentase reduksi bakteri
2. Mengetahui nilai kerapatan energi terbaik untuk mereduksi biofilm dengan penambahan ozon.

1.5 Manfaat Masalah

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi ilmiah terkait penelitian pengembangan aplikasi ozon untuk inaktivasi biofilm *Staphylococcus aureus* menggunakan laser dioda merah.

2. Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan mampu dimanfaatkan praktisi untuk sterilisasi peralatan medis

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sterilisasi

Sterilisasi adalah proses menghancurkan semua bentuk mikrobakteri termasuk spora-spora pada permukaan suatu benda atau dalam sebuah cairan (Neville, 2020). Sterilisasi merupakan salah satu metode pengawetan makanan yang paling efektif dan telah banyak digunakan di hampir semua area manufaktur makanan. Sterilisasi dicapai dengan menerapkan panas intensitas tinggi (biasanya antara 121°C dan 140 °C) untuk produk makanan. Sterilisasi dibagi menjadi dua macam, yaitu sterilisasi konvensional (metode termal) dan non-konvensional. Sterilisasi metode termal masih mendominasi di bidang industri. Metode sterilisasi yang sering dilakukan terdiri dari beberapa macam metode diantaranya adalah sterilisasi panas kering (*dry heat*). Masing-masing metode tersebut mempunyai keuntungan dan kerugian serta membutuhkan waktu dan prosedur yang berbeda-beda (Sunarjo, 2007).

Sterilisasi panas kering (*dry heat*) dilakukan dengan proses konduksi panas. Panas diabsorpsi oleh permukaan luar dari sebuah instrumen dan kemudian dikirimkan ke lapisan berikutnya, pada akhirnya keseluruhan objek mencapai suhu yang dibutuhkan untuk sterilisasi. Kerugian metode sterilisasi panas kering diantaranya adalah: 1) proses sterilisasi berlangsung lebih lama; 2) panas kering menembusi materi secara lambat dan tidak merata; 3) membutuhkan oven dan sumber listrik secara terus menerus; 4) instrumen plastik dan karet tidak dapat di sterilisasi dengan panas kering; 5) harga mahal (Tietjen *et al*, 2016).

Metode sterilisasi yang lain adalah autoklaf yaitu suatu alat yang memanfaatkan panas dan tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan adalah 15

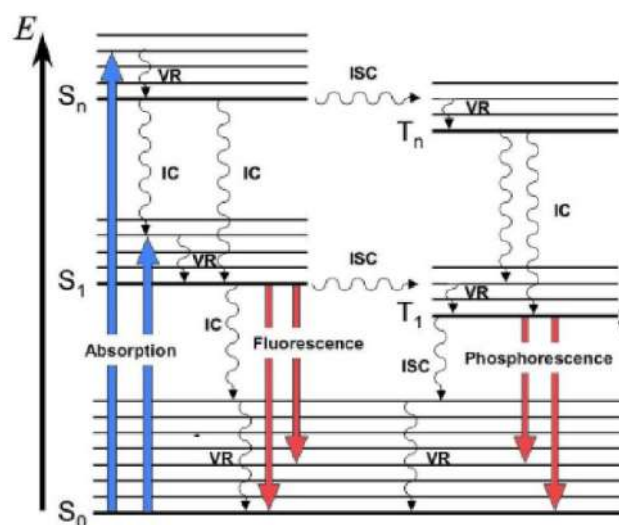
pon tiap inchi² yang dilakukan kurang lebih 15 menit. Autoklaf digunakan terutama untuk membunuh endospora, yaitu sel resisten yang diproduksi oleh bakteri. Sel ini tahan terhadap pemanasan, kekeringan, dan antibiotik. Endospora mati pada suhu 100 °C, yang merupakan titik didih air pada tekanan atmosfer normal. Pada suhu 121°C, endospora dapat dibunuh dalam waktu 4-5 menit, dimana sel vegetatif bakteri dapat dibunuh hanya dalam waktu 6-30 detik. Kekurangan yang dimiliki autoklaf adalah harus menggunakan air mendidih karena uapnya yang memenuhi kompartmen dan terdesak keluar dari klep pengaman. Autoklaf memerlukan sumber panas yang terus menerus. Autoklaf membutuhkan peralatan yang butuh perawatan terus menerus (Fardiaz, 1992).

2.2 Photodynamic Inactivation

Photodynamic Inactivation (PDI) adalah metode inaktivasi mikroorganisme berdasarkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) (radikal bebas dan oksigen tunggal). Teknologi ini membutuhkan aksi gabungan oksigen, cahaya dan fotosensitiser, yang menyerap dan menggunakan energi dari cahaya untuk menghasilkan ROS. Oleh karena itu, efek *photodynamic* tergantung pada beberapa variabel termasuk fitur struktural fotosensitiser, konsentrasi fotosensitiser dan oksigen molekuler, dan sifat-sifat cahaya yang digunakan (Costa *et al*, 2012). Peran dari fotosensitiser sangat berpengaruh pada keberhasilan fotodinamik karena interaksi oksigen dan fotokimia bergantung pada fotosensitiser (Cellamare *et al*, 2013). Tingkat keberhasilan fotosensitiser ketika menyerap cahaya dipengaruhi beberapa faktor diantaranya jenis dan kualitas pengabsorpsi cahaya (Nitzan *et al*, 2004), spektrum panjang gelombang dari cahaya yang digunakan, intensitas cahaya per satuan luas penyinaran dan energi penyinaran (Grossweiner, 2005).

Pada interaksi sumber cahaya dengan molekul fotosensitiser diawali dengan proses fotofisika, molekul fotosensitiser memiliki peran sebagai molekul penyerap cahaya yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil (*ground*

state). Setelah proses absorpsi cahaya selesai, konfigurasi elektron akan berubah dari keadaan stabil (tidak ada interaksi kimiawi) menjadi keadaan dinamik. Proses selanjutnya ketika molekul pada keadaan dinamik, molekul mampu berinteraksi secara kimiawi dengan oksigen konfigurasi elektron stabil. Interaksi ini akan menyebabkan konfigurasi elektron dari oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen dalam keadaan tereksitasi cenderung akan kembali ke keadaan semula atau stabil, sehingga oksigen yang tereksitasi melakukan interaksi dengan sistem biologi. Interaksi ini akan merusak sistem biologi tersebut. Penerapan fotoinaktivasi bakteri secara klinis dijadikan sebagai pendekatan alternatif untuk mengobati penyakit dan penggunaannya semakin meningkat (De Freitas *et al*, 2017). Mekanisme *Photodynamic Inactivation* terdapat proses fotofisika, fotokimia, dan fotobiologi yang dijelaskan dalam diagram Jablonski (Gambar 2.1).



Gambar 2.1 Diagram Jablonski (Yankovsky, 2016).

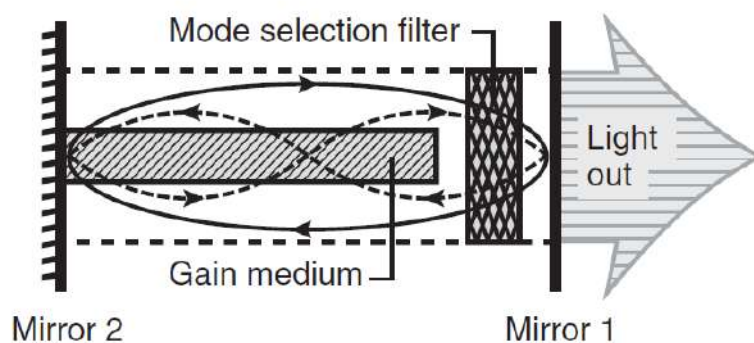
2.2.1 Fotosensitisier Endogen (Porfirin)

Secara alamiah, beberapa bakteri menghasilkan endogen porfirin. Porfirin merupakan senyawa organik yang memiliki fungsi sebagai molekul penangkap cahaya (Rizkia, 2014). Fungsi dari porfirin endogen dalam absorpsi cahaya pada

proses fotofisika. Secara biologi, porfirin merupakan senyawa makrosiklik penting yang relatif stabil dikarenakan adanya kemampuan untuk memperluas struktur aromatik ke transisi kompleks. Daya serap dari porfirin mampu memproduksi oksigen reaktif (ROS) yang memiliki kontribusi pada kematian sel. Porphirin sebagai fotosensitizer pada proses antibakteri pada umumnya dapat mengurangi sitotoksitas sel eukariotik tanpa keberadaan cahaya (Astuti *et al*, 2011).

2.2.2 Sumber Cahaya

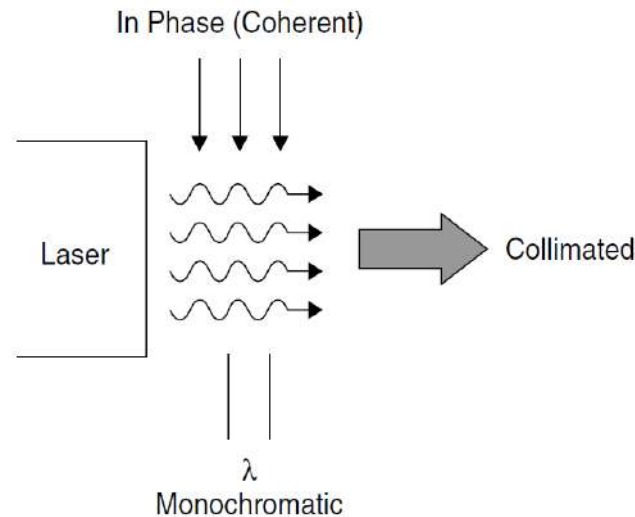
Laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) adalah suatu peralatan yang menghasilkan berkas cahaya monokromatik, terarah dan memiliki intensitas yang tinggi (Prasad, 2004). Laser memiliki tiga komponen utama yaitu bahan aktif, sistem pemompa dan resonator optik. Bahan aktif (*gain medium*) terdiri dari bahan yang mampu menyerap radiasi dengan rentang panjang gelombang tertentu (Coldren *et al*, 2012). Sistem pemompa dapat berupa energi listrik yang cukup untuk memicu terjadinya lasing medium. Resonator optik terdiri dari dua cermin yang berfungsi untuk memantulkan cahaya sehingga cahaya akan lebih diperkuat oleh bahan aktif (*gain medium*) (Prasad, 2004).



Gambar 2.2 Bahan pembentukan laser (Coldren *et al*, 2012)

Laser dioda memancarkan foton secara koheren dengan panjang gelombang tertentu dan berbahan aktif semikonduktor. Kelebihan laser dioda

dibandingkan dengan cahaya konvensional lain adalah sifat laser dioda yang koheren, monokromatis, dan cahayanya yang sejajar (*collimation*).



Gambar 2.3 Sifat cahaya laser (Csele, 2004)

Kekoherenan laser membuat semua foton yang dipancarkan oleh laser dalam keadaan yang sama, seperti gelombang yang memiliki puncak dan lembah yang sama pada waktu yang sama. Kekohherenan disebabkan adanya mekanisme di dalam laser itu sendiri, yakni foton mengalami pengkopian. Agar berada pada keadaan yang sama, semua pancaran foton harus memiliki panjang gelombang yang sama. Monokromatis merupakan kemampuan laser untuk menghasilkan cahaya pada satu panjang gelombang. Sedangkan *collimation* merupakan sifat dari laser yang membutuhkan kerapatan cahaya, cahaya akan sejajar pada jarak yang besar (Csele, 2004). Laser terbentuk dari pemompaan atom-atom dari keadaan dasar kedalam eksitasi dengan energi luar berupa energi listrik atau energi cahaya sehingga terbentuk inversi populasi. Populasi atom-atom pada tingkat energi yang lebih tinggi lebih banyak sehingga saat atom-atom meluruh ketingkat energi yang lebih rendah menimbulkan pancaran foton. Foton yang dihasilkan terpantul 100% pada cermin dan terjadi emisi terstimulasi atom-atom pada zat aktif laser. Ketika foton yang dihasilkan semakin banyak ditambah dengan adanya 80% output coupler menghasilkan cahaya yang bersifat koheren.

Warna pada laser dipengaruhi oleh panjang gelombang yang dimiliki oleh laser, panjang gelombang juga menentukan karakteristik dan aplikasi laser. Panjang gelombang laser dioda berkisar diantara violet hingga inframerah. Kisaran panjang gelombang yang lebar merupakan keuntungan dari penggunaan laser dioda dibandingkan laser dengan tipe lain (Sun, 2012). Panjang gelombang laser merah berkisar pada 630-680 nm, panjang gelombang yang panjang memberikan kemampuan laser untuk menembus struktur dengan lapisan yang sedikit tebal, hal tersebut berkaitan dengan difraksi cahaya. Panjang gelombang laser dioda menunjukkan besar energi foton yang dikeluarkan, dapat dihubungkan dengan menggunakan persamaan:

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

dengan λ = panjang gelombang laser dioda (m)

h = konstanta planck ($6,62 \times 10^{-34}$ Js)

c = kecepatan cahaya (3×10^8 m/s)

Cahaya keluaran laser dioda berbentuk elips dengan difraksi yang terbatas. Dimensi yang lebih kecil memiliki perbedaan yang paling tinggi yang dalam peningkatan yang menuju lintasan photon primer yang mana dibatasi oleh bagian atas dan bawah lapisan dari struktur dan telah dipantulkan berkali-kali. Bagian yang lebih lebar dari *device* berarti memiliki pantulan yang lebih sedikit dan karenanya memiliki lebih sedikit perbedaan pada arah (Csele, 2004). Sedangkan energi yang dipancarkan oleh laser dioda dapat diketahui dengan menggunakan persamaan:

$$E = P \times t \quad (2.2)$$

dengan P = daya yang dikeluarkan oleh laser dioda (W)

t = waktu pemaparan (s)

Kerapatan energi pemaparan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$D = I \times t \quad (2.3)$$

dengan D = Kerapatan energi (J/cm²)

I = intensitas cahaya (W/cm²)

t = Waktu pemaparan (s)

Intensitas cahaya laser diperoleh dari daya dibagi oleh luas paparan:

$$I = \frac{P}{A} \quad (2.4)$$

Jika daya yang terpancar diketahui setelah dilakukan uji karakterisasi laser dengan menggunakan variasi jarak untuk mengetahui daya keluaran laser dan luas berkas keluaran diketahui maka nilai kerapatan energi ditentukan oleh lama waktu paparan. Jumlah foton yang dikeluarkan oleh sumber cahaya akan sama dengan jumlah energi yang dikeluarkan:

$$nh \frac{c}{\lambda} = Pt \quad (2.5)$$

Dengan h adalah konstanta Planck sebesar $6,62 \times 10^{-34}$ Js, c adalah kecepatan cahaya sebesar 3×10^8 m/s, λ adalah panjang gelombang sumber cahaya, P adalah daya keluaran, t adalah waktu emisi dan n adalah jumlah foton yang dikeluarkan.

2.2.3 Interaksi Cahaya Terhadap Jaringan

Jenis dan kuantitas porfirin sebagai molekul penyerap cahaya menjadi penentu pada proses fotosensitasi ini (Nitzan *et al*, 2004). Tingkat keberhasilan dari fotoinaktivasi bakteri juga ditentukan oleh kesesuaian panjang gelombang cahaya dengan spektrum serap porfirin bakteri dan dosis energi penyinaran. Apabila dosis energi sesuai maka akan terjadi aktivasi reaksi kimia lanjutan yang menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif dan menyebabkan fotoinaktivasi bakteri (Astuti *et al*, 2011).

Diawali dengan tahap fotofisika pada fotoinaktivasi yang meliputi proses fotosensitasi, yaitu proses perambatan cahaya dalam jaringan, dimana terdapat beberapa proses yang terjadi, yaitu refraksi, refleksi, hamburan, dan absorpsi. Fotosensitasi sangat bergantung pada fenomena absorpsi cahaya dengan panjang gelombang yang sesuai dengan fotosensitiser. Proses absorpsi cahaya merupakan konversi sebagian energi cahaya menjadi gerak panas atau getaran tertentu molekul dari bahan pengabsorpsi atau fotosensitiser. Kemampuan yang dimiliki fotosensitiser sebagai medium absorpsi penyerapan radiasi elektromagnetik bergantung pada beberapa parameter, diantaranya adalah keadaan elektronik atom dan molekul, panjang gelombang radiasi, dan konsentrasi medium absorpsi, serta parameter internal lainnya. Fenomena absorpsi cahaya tersebut merupakan penerapan dari hukum Lambert-Beer yang ditulis sebagai berikut (Niemz, 2007) :

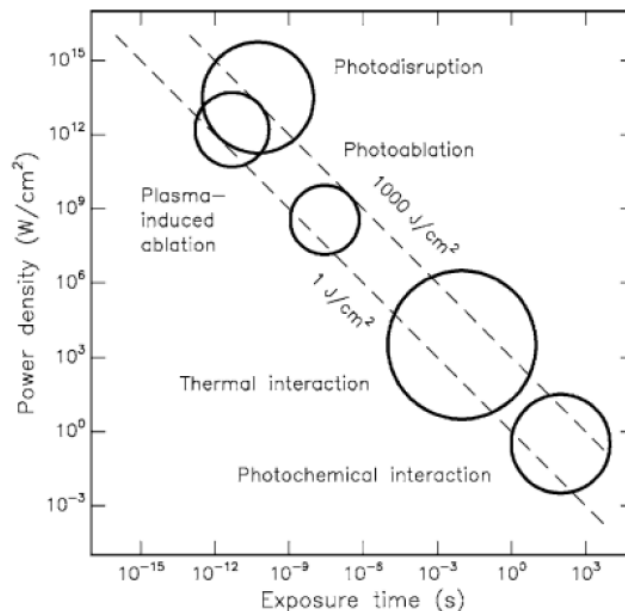
$$I_{(z)} = I_0 e^{-\alpha z} \quad (2.6)$$

Dimana z adalah ketebalan, $I_{(z)}$ adalah intensitas absorpsi, I_0 adalah intensitas awal, dan α adalah koefisien penyerapan medium. Pada jaringan biologi, proses absorpsi terjadi pada molekul air atau makromolekul seperti protein dan pigmen, hal ini bergantung pada wilayah spektrum cahaya. Absorpsi untuk wilayah spektrum inframerah terutama terjadi pada molekul air, sedangkan untuk rentang spektrum cahaya tampak dan ultraviolet terutama terjadi pada protein serta pigmen. Pada rentang spektrum cahaya tampak, foton memiliki kemampuan untuk membangkitkan elektron valensi dalam atom dan molekul ke keadaan energi yang

lebih tinggi. Interaksi cahaya dengan materi yang paling efisien adalah ketika energi foton sebanding dengan perbedaan antara energi akhir dan awal atom atau molekul. Energi foton bergantung juga pada frekuensi dan dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\Delta E_n = E_i - E_o = hf \quad (2.7)$$

dengan h adalah konstanta Planck yaitu $6,62 \times 10^{-34} \text{Js}$, E (J) adalah energi foton dan f adalah frekuensi (Hz).



Gambar 2.4 Pemetaan Interaksi Cahaya dengan Jaringan (Niemz, 2007).

Pada penelitian ini akan berfokus pada interaksi *photochemical* atau fotokimia. Fotokimia terjadi pada paparan laser daya rendah dan waktu paparan yang panjang (*continuous wave*). Interaksi fotokimia dengan sel menyebabkan terjadinya transfer elektron terluar dan membentuk radikal bebas.

2.2.4 Mekanisme Fotosensitisasi

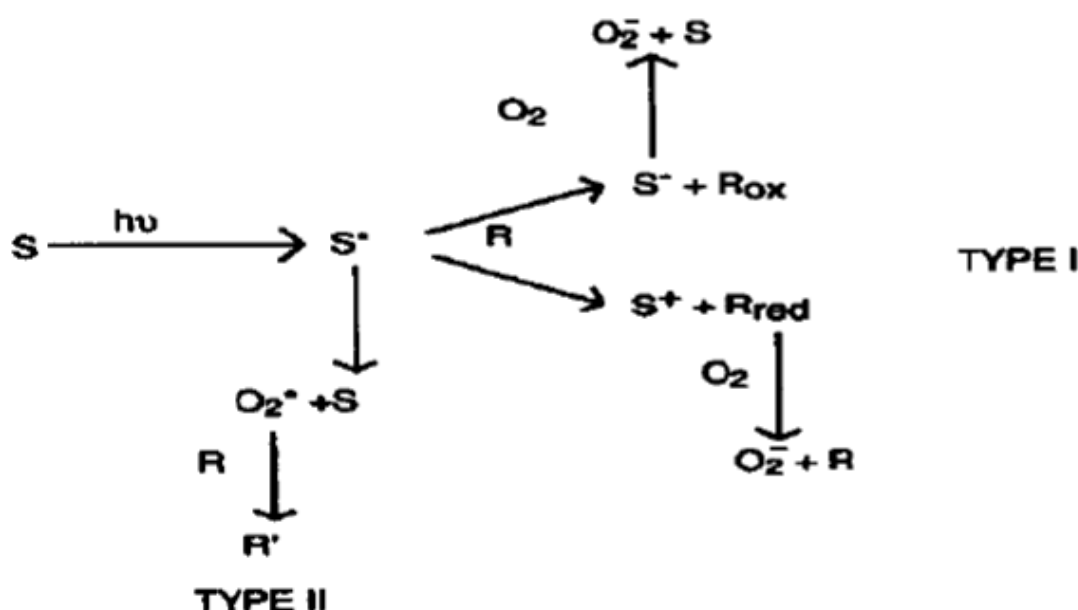
Proses fotofisika adalah penyerapan energi foton oleh fotosensitiser yang berlangsung sangat cepat sekitar 10^{-15} detik. Penyerapan ini mengakibatkan eksitasi elektron ketingkat energi yang lebih tinggi (Lanzani, 2006) yaitu terjadinya eksitasi singlet dan eksitasi triplet. Keadaan singlet dilambangkan S_0 , S_1 , S_2 dan seterusnya berturut-turut sesuai dengan orde energinya (Grossweiner, 2005). Besarnya energi eksitasi bergantung pada besarnya energi foton yang diserap oleh fotosensitiser. Disaat keadaan eksitasi, molekul fotosensitiser ini bersifat tidak stabil dan berusaha menuju kembali ke keadaan *groundstate*.

Beberapa proses mungkin terjadi selama molekul dalam keadaan eksitasi menuju keadaan stabil. Pertama, molekul dengan tingkat vibrasi lebih tinggi pada keadaan eksitasi singlet S_n turun ke keadaan terendah dari keadaan eksitasi singlet S_n yang dinamakan dengan peristiwa relaksasi vibrasi. Proses kedua yaitu molekul dengan keadaan eksitasi singlet lebih tinggi misal S_n akan kembali menuju keadaan eksitasi singlet pertama S_1 melalui proses *internal conversion*. Proses vibrasi dan *internal conversion* adalah proses transfer energi tanpa radiasi, kelebihan energi tidak dilepaskan dalam bentuk emisi foton, melainkan dalam bentuk panas. Proses ketiga molekul tereksitasi mengalami proses radiasi, yaitu pelepasan kelebihan energi dari keadaan singlet S_1 menuju keadaan dasar S_0 yang dinamakan dengan proses fluoresensi. Proses keempat yaitu spin dan elektron yang tereksitasi dapat berputar arah dan menyebabkan molekul membentuk keadaan triplet T_1 , T_2 , ... T_n , peristiwa ini disebut dengan *intersystem crossing*.

Probabilitas terjadinya *intersystem crossing* meningkat bila tingkat vibrasi dari dua keadaan mengalami keadaan *overlap*, yaitu tingkat vibrasi singlet terendah bertumpang tindih dengan tingkat vibrasi tertinggi pada keadaan triplet. Molekul pada keadaan triplet tidak hanya kembali menuju keadaan dasar melalui *intersystem crossing* tetapi juga memancarkan emisi foton. Peristiwa ini disebut *fosforesensi*. Probabilitas transisi singlet triplet cukup kecil jika dibandingkan dengan transisi singlet singlet (Grossweiner, 2005). Namun *lifetime* keadaan eksitasi triplet lebih lama dibandingkan dengan *lifetime* keadaan eksitasi singlet

yang akan menyebabkan elektron bertumbukan dengan molekul substrat lebih lama.

Proses selanjutnya yaitu terjadinya fotokimia yang memiliki dua proses melalui tipe 1 dan tipe 2 (Gambar 2.5).

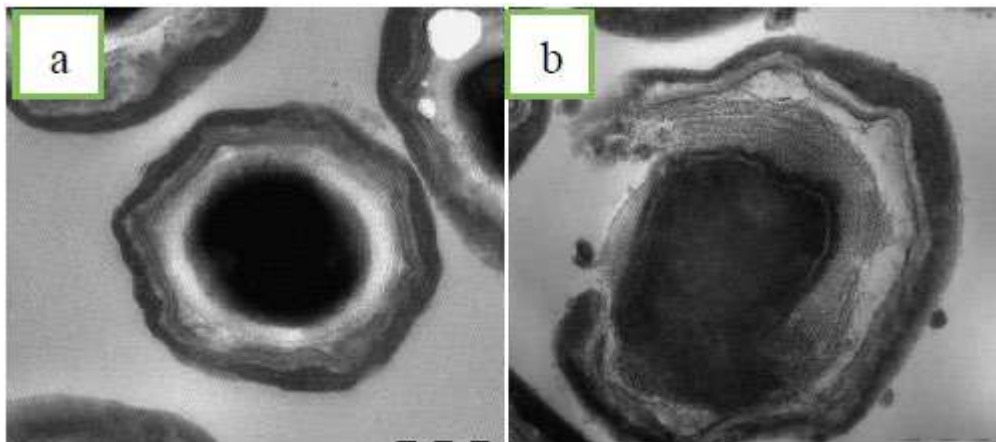


Gambar 2.5 Jalur fotokimia (Grossweiner, 2005).

Reaksi fotokimia dapat terjadi secara langsung menghasilkan spesies oksigen relatif (ROS) yang disebut dengan reaksi tipe I dan secara tidak langsung melalui transfer energi menuju oksigen molekular yang mengarahkan ke pembentukan singlet oksigen yang disebut tipe II (Costa *et al*, 2012). Pada tipe 1 fotosensitiser (S*) sesudah menyerap energi foton yang berada pada keadaan eksitasi triplet akan mereduksi dan mengoksidasi substrat (R). Gabungan antara substrat yang telah teroksidasi dengan fotosensitiser pada keadaan triplet jika bereaksi dengan oksigen maka akan menghasilkan perioksida atau superoksida (O₂⁻), kemudian gabungan antara fotosensitiser triplet dengan substrat yang tereduksi akan menghasilkan superoksida (O₂⁻) dan substrat (R). Pada tipe 2, fotosensitiser yang tereksitasi pada keadaan triplet akan langsung berikatan dengan oksigen

menghasilkan radikal singlet oksigen (R^*). Radikal oksigen singlet dan superoksida akan mengoksidasi lipid dan protein yang berada di dalam membran sel sehingga menghasilkan tipe radikal hidrogen peroksida yang bersifat racun yang akan merusak lipid dan protein di dalam membran sehingga akan terjadi kebocoran sel yang akan mengakibatkan sel mengalami lisis atau kematian (Astuti *et al*, 2019).

Fotobiologi adalah proses peroksidasi lipid oleh ROS dan oksigen singlet. Pada fotobiologi terjadi proses pro-oksidan radikal bebas atau spesies, namun bukan radikal yang menyerang lipid. Peroksidasi lipid mampu merusak organisasi pada membran sel dengan cara membentuk rantai yang semakin panjang dan mempengaruhi *cross-linking* membran, fluiditas membran, serta fungsi dan struktur membran. Kerusakan yang diakibatkan oleh fotobiologi adalah kerusakan DNA, protein, dan membran (Astuti *et al*, 2011). Pada membran sel kerusakan yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Dinding sel bakteri sebelum (a) dan setelah (b) proses *photodynamic inactivation* (Eichner *et al*, 2015).

2.3 Ozon

Ozon (O_3) dikenal sebagai gas yang tidak memiliki warna, memiliki molekul gas yang terdiri dari tiga buah atom oksigen, mempunyai berat molekul 48 gram, dan tidak stabil karena akan cepat sekali terurai kembali menjadi

oksigen normal yang mempunya 2 atom (O_2) dan satu atom oksigen bebas atau Onasen (O_n). Ozon pada saat ini digunakan untuk membunuh *algae* dan mengoksidasi bahan organik, sehingga dapat menghilangkan rasa, bau, dan warna yang tidak diinginkan akibat reaksi bahan organik. Ozon dapat mengoksidasi besi dan mangan, menguraikan sulfit, menguraikan surfaktan dan menghilangkan kekeruhan. Ozon mempunyai sifat membunuh jasad renik yang kuat, sehingga sesuai dengan tujuan sterilisasi (Katz, 1980). Dalam menginaktivasi bakteri, ozon lebih kuat dibandingkan khlorin, dan lebih menguntungkan karena tidak meninggalkan residu dan tidak merubah rasa (Rusdi *et al*, 2002).

Penggunaan ozon menurut Scrollavezza *et al* (1997) lebih menguntungkan daripada menggunakan antibiotik karena:

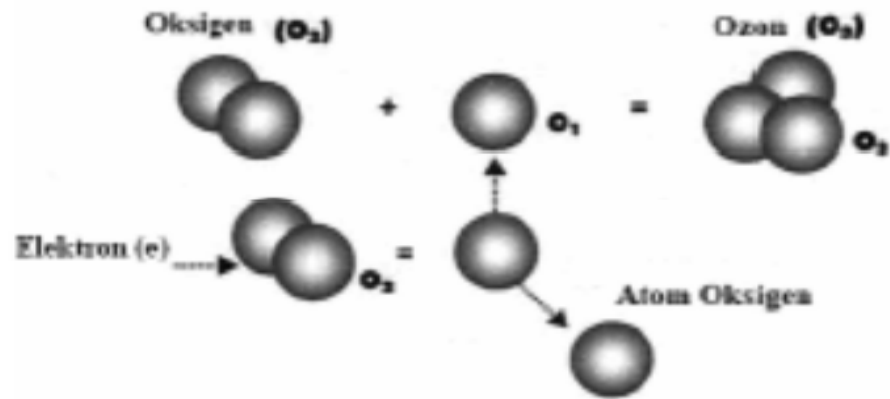
1. Ozon dapat mensterilkan semua jenis organisme patogen (bakteria, virus, mycetes, dan ragi) dan bekerja melawan toksin.
2. Sifat antibakterial dari ozon tetap sama meskipun dicampur air susu
3. Antibiotik mampu mensterilkan (tidak selalu) hanya pada salah satu jenis bakteri atau jamur, tetapi tidak berfungsi untuk melawan virus dan ragi, juga tidak dapat berfungsi terhadap toksin organisme.
4. Fungsi antibiotik akan menurun bila dicampur dengan susu.
5. Penggunaan ozon untuk pengobatan dapat meningkatkan produksi susu (5-30%) sedangkan antibiotik tidak.

Pembentukan ozon dapat terjadi dengan dua macam cara, yaitu:

1. Secara Alamiah

Ozon terbentuk melalui radiasi sinar ultra violet (UV) pancaran dari sinar matahari. Sinar UV dari pancaran sinar matahari mampu menguraikan gas oksigen di udara bebas. Molekul oksigen terurai menjadi dua buah atom oksigen, proses ini kemudian dikenal dengan nama fotolisis. Kemudian atom oksigen

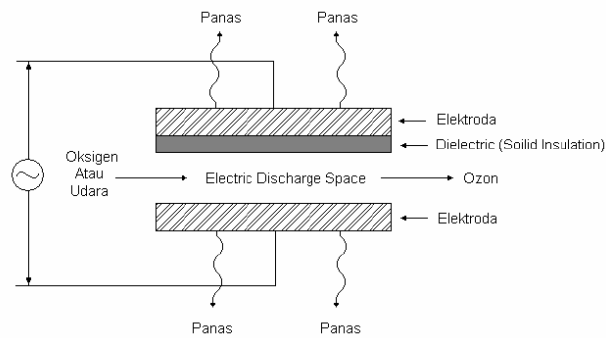
tadi secara alamiah akan bertumbukan dengan molekul gas oksigen sekitarnya, lalu terbentuknya ozon (Gambar 2.7). Ozon terdapat pada lapisan stratosfer yang biasa dikenal dengan *ozone layer* (lapisan ozon) merupakan ozon yang terjadi pada proses alamiah.



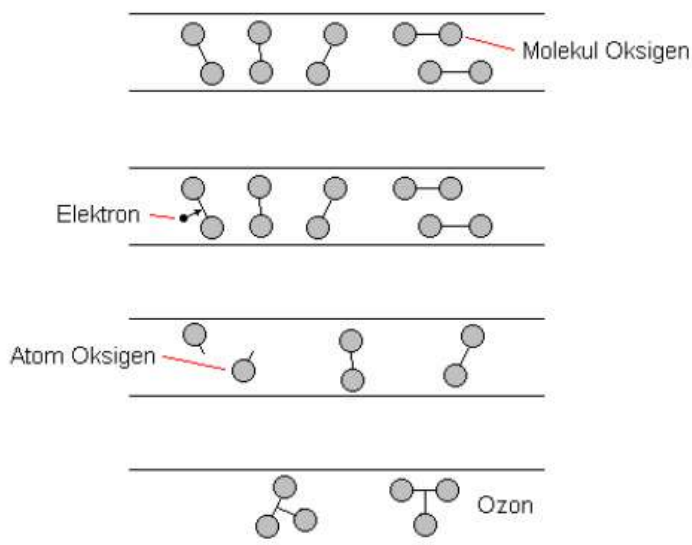
Gambar 2.7 Pembentukan ozon melalui proses tumbukan oksigen (Agung, 2011).

2. Secara Buatan

Terdapat dua cara untuk membuat ozon buatan, metode *electrical discharge* dan sinar radioaktif. Pada *electrical discharge* tumbukan (Gambar 2.8) dari elektron yang dihasilkan dengan molekul oksigen menghasilkan dua buah atom oksigen. Selanjutnya atom oksigen ini secara alamiah akan bertumbukan kembali dengan molekul oksigen disekitarnya, lalu terbentuklah ozon (Devins, 1956). Saat ini, metode *electrical discharge* merupakan metode yang paling banyak dipergunakan dalam pembuatan ozon.



Gambar 2.8 Prinsip alat pembangkit ozon dengan cara *electric discharge* (JWWA, 2012).

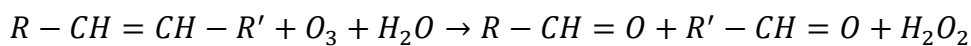


Gambar 2.9 Ilustrasi pembentukan ozon secara parsial dengan *electric discharge* (JWWA, 2012)

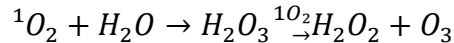
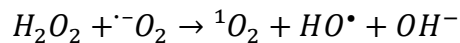
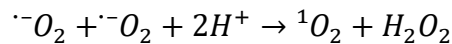
2.3.2 Mekanisme Ozon Merusak Mikroorganisme

Ozon adalah gas biru dengan bau menyengat yang khas dan dikenal sebagai oksidator paling kuat setelah fluor. Molekul ozon dibentuk oleh tiga atom oksigen dengan inti pusat terikat pada dua atom yang berjarak sama. Struktur ini dan susunan elektron yang tidak berpasangan menyebabkan reaktivitas yang kuat (Panebianco, 2022). Ozon membunuh mikroorganisme dengan cara mengoksidasi dan menghancurkan dinding sel sehingga mampu membunuh mikroorganisme. Mekanisme desinfeksi ozon dengan cara mengoksidasi langsung ketika ozon

kontak dengan dinding sel, suatu reaksi oksidasi terjadi sehingga menyebabkan lubang pada dinding sel sehingga bakteri mulai kehilangan bentuk atau pertahanan utamanya telah hancur (Zafhira, 2012). Oksigen yang masuk ke dalam lapisan bawah biofilm yang rendah akan oksigen akan menyebabkan peningkatan ROS sehingga akan merusak biofilm. Ozon dapat menghambat pengendalian enzim yang bekerja pada metabolisme sel bakteri sehingga dengan dosis yang cukup, ozon mampu merusak membran sel bakteri (Young & Setlow, 2004). Reaksi kimia yang terjadi sebagai berikut:



Interaksi antara fotosensitizer dan cahaya membentuk anion superoksida ($^{\cdot-}O_2$) dan oksigen singlet ($^1O_2$) dan reaksi komponen ini dapat membentuk H_2O_2 dan ozon (O_3) (Onyango, 2016).



Reaksi sitotoksik yang terjadi menurut reaksi diatas dapat berlangsung secara terus menerus sehingga perlu dilakukan kontrol terhadap dosis ozon yang digunakan. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengontrol dosis ozon adalah dengan menentukan durasi paparannya.

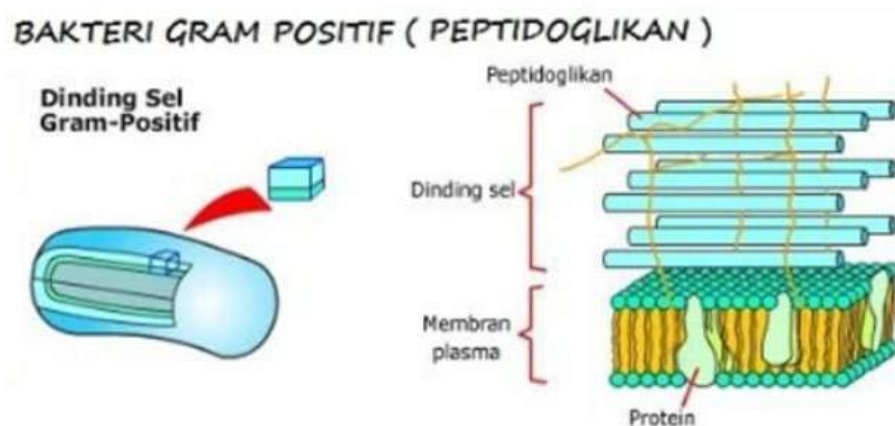
2.4 Bakteri

Salah satu penyebab terjadinya infeksi nosokomial adalah kontaminasi bakteri pada peralatan medis. Kontaminasi bakteri patogen pada alat medis dan benda disekitar pasien. Menurut *World Health Organization* (WHO) infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi saat dirawat di rumah sakit, artinya ketika masuk rumah sakit, pasien tersebut belum mengalami infeksi atau tidak dalam

masa inkubasi kuman tertentu. Bakteri patogen penyebab penyakit nosokomial diantara lainnya adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

2.4.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif dan membentuk kelompok seperti anggur pada pewarnaan gram. Struktur dinding sel bakteri gram positif mengandung peptidoglikan, asam teikoat, dan asam teikuronat. Oleh karena itu, dinding sel bakteri gram positif sebagian adalah peptidoglikan (Gambar 2.10). Bakteri *Staphylococcus aureus* bersifat non-motil dan aerobik. Bakteri *Staphylococcus aureus* bisa bertahan hidup lama di berbagai lingkungan permukaan (Enwemeka *et al*, 2008).



Gambar 2.10 Struktur dinding sel bakteri gram positif (Helmiyati *et al*, 2010)

Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai jenis infeksi dimulai dari infeksi kulit ringan, keracunan makanan sampai dengan infeksi sistemik (Herlina, 2015). Infeksi yang terjadi apabila keracunan makanan karena *Staphylococcus*, salah satu faktor virulensi yaitu *Staphylococcus enterotoxin (SE)*. Gejala umum keracunan SE ditandai dengan mual, muntah, kram perut dan diare yang terjadi 24-48 jam, masa penyembuhan biasanya terjadi antara 1-3 hari (Dwiyanti, 2016).

Menurut Garrity *et al* (2007), klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Order	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: Staphylococcus aureus

2.4.3 Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan sel mikroba yang dapat membentuk oleh satu atau campuran spesies bakteri yang secara *irreversibel* melekat dengan suatu permukaan dan tertutup dalam matriks bahan polisakarida *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) memungkinkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup di lingkungan yang tidak bersahabat (Tayal, 2015). Pembentukan biofilm dimulai dari beberapa bakteri yang hidup bebas (sel planktonik) yang melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Pembelahan akan terus terjadi hingga biofilm akan menebal. Pembelahan akan berhenti beberapa jam dan terjadi perubahan sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm yang memiliki perbedaan metabolik dan fisiologik. Sel biofilm menghasilkan EPS yang memiliki fungsi untuk melekatkan mikroba satu sama lain atau melekat pada suatu permukaan yang kemudian akan membentuk mikrokoloni (Gunardi, 2014). Matriks yang berisikan sel-sel bakteri akan mengeluarkan sinyal kimia yang berperan untuk membentuk biofilm lebih matang. Aksi dari sinyal ini adalah suatu proses *quorum sensing*, yaitu komunikasi antar sel untuk mencetuskan aksi yang bergantung pada konsentrasi

sinyal lingkungan (Gunardi, 2014). Struktur biofilm dianggap sebagai faktor virulensi penting yang terbentuk di dalam kandung kemih dan berfungsi sebagai reservoir untuk infeksi berulang dan atau persisten. Biofilm memiliki peran penting dalam kejadian resistensi antibiotik (Makled *et al*, 2017). Sel-sel mikroba dalam biofilm terdiri dari (15% dari volume) dan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) mencakup 50-90% dari total karbon organik biofilm dan dapat dianggap bahan matriks primer biofilm. EPS dapat memiliki sifat kimia dan fisik yang berbeda, tetapi terutama terdiri dari polisakarida. Beberapa polisakarida bersifat netral atau polianionik, seperti EPS bakteri gram negatif. EPS memiliki sifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda-beda (Homonta *et al*, 2016).

Pada Tabel 2.1 menunjukkan komponen-komponen biofilm yang menandakan integritas biofilm dan membuat biofilm tahan terhadap berbagai faktor lingkungan.

Tabel 2.1. Komponen Biofilm (Jamal *et al*, 2015)

No	Components	Persentase matriks
1	Sel Mikroba	2-5%
2	DNA dan RNA	<1-2%
3	Polisakarida	1-2%
4	Protein	<1-2% (termasuk enzim)
5	Air	97%

Bakteri pembentuk biofilm mengaktifkan beberapa gen yang mengaktifkan ekspresi gen stres yang pada gilirannya beralih ke fenotip yang resisten karena perubahan tertentu, misalnya kepadatan sel, nutrisi atau suhu, pH dan osmolaritas (Jamal *et al*, 2015). Biofilm memberikan keuntungan untuk bakteri berupa perlindungan dari agen mikroba, pertukaran nutrisi, metabolit, dan atau pertukaran genetik dengan mikroorganisme lainnya. Biofilm mengakibatkan keterbatasan penetrasi antibiotik untuk menjangkau bakteri penyebab infeksi serta mengakibatkan rendahnya laju multiplikasi sel mikroorganisme sehingga menyebabkan penyakit infeksi semakin berkembang (Tayal, 2015). Biofilm

mampu terbentuk pada permukaan tubuh dan bertahan setelah terapi dengan beragam antibiotik. Sel biofilm juga dapat menahan respon imun inang (bawaan dan adaptif), sangat resisten terhadap fagositosis, dan 10-1000 kali lipat lebih tahan terhadap pengobatan dengan antibiotik dibandingkan dengan bentuk planktoniknya (De la Fuente-Núñez *et al*, 2013).

2.4.3.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Biofilm dibentuk melalui serangkaian proses yang sangat kompleks, ketika sel-sel mikroorganisme berubah dari bentuk planktonik (bakteri hidup bebas) menjadi sel agregat berkoloni (fenotip biofilm) (Jamal *et al*, 2015). Pembentukan biofilm dimulai ketika mikroorganisme bebas (planktonik) menempel pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri (*proliferasi*), pematangan (*maturasi*) dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm (Aparna *et al*, 2008). Penjelasan mengenai empat langkah utama yang terlibat dalam pembentukan biofilm sebagai berikut:

A. Adhesi awal atau keterikatan (*reversible*)

Biofilm terbentuk di lingkungan yang memiliki nutrisi yang tepat. Permukaan untuk pelekatan sel bisa berupa abiotik (logam, kaca, plastik, implan medis, stainless steel) atau biotik (sel epitel, kulit manusia dan jaringan hewan). Bakteri yang motil memiliki keunggulan kompetitif, memanfaatkan flagella untuk mengatasi gaya hidrodinamik dan repulsif (Kostakioti, 2013). Flagella memiliki fungsi untuk membantu pergerakan aktif bakteri dan meningkatkan interaksi antara bakteri dengan permukaan yang memfasilitasi adhesi awal bakteri dengan permukaan. Motilitas bakteri merupakan faktor penting untuk adhesi, akan tetapi bakteri *nonmotile* mampu melakukan adhesi dengan ekspresi faktor adhesi yang

kuat (Aparna *et al*, 2008). Pembentukan biofilm diawali dengan perlekatan sel mikroba planktonik pada permukaan substrat. Sel-sel pada tahap perlekatan awal tidak melekat dengan kuat (*reversible*) karena hanya menggunakan kekuatan ikatan *Van der Waals*. Lalu, koloni akan mengikatkan diri lebih kuat pada permukaan dengan menggunakan pili. Koloni awal memiliki peran sebagai fasilitator bagi sel lainnya untuk mencari sisi perlekatan selanjutnya sebagai tempat pembuatan matriks biofilm. Bagi sel-sel yang tidak mampu untuk melekat pada permukaan, sel tersebut memacu sel-sel dalam koloni untuk membentuk matriks melalui *quorum sensing* (QS) (Aparna, 2008).

B. Perkembangan awal struktur biofilm (*irreversible*)

Pembentukan mikrokoloni segera terjadi setelah bakteri melekat pada permukaan jaringan atau substrat. Bakteri mengalami multiplikasi atau proliferasi dan mengeluarkan sinyal kimia untuk berkomunikasi secara internal yang disebut dengan *quorum sensing* (QS). Bakteri menghasilkan EPS, fungsi EPS yaitu melekatkan bakteri yang telah bereplikasi dan membentuk mikrokoloni. Mempertahankan lingkungan mikro yang sangat terhidrasi di seputar mikroorganisme biofilm akan menyebabkan mikroorganisme dapat mentoleransi terhadap gangguan pada lingkungan yang kekurangan air, menyebabkan mikroorganisme lain resisten terhadap pertahanan spesifik dan non spesifik host selama infeksi, dan resistensi terhadap berbagai agen antimikroba (Flemming, 2010). Mortalitas dari sel agregat semakin menurun sejalan dengan progresif penebalan EPS. Mikrokoloni menyebabkan perlekatan bakteri dengan permukaan jaringan menjadi lebih stabil. *Fimbriae tipe 1* dan *curli fimbriae* merupakan organel adhesif yang memiliki peran pada perlekatan *irreversible* bakteri pada permukaan substrat atau jaringan (Aparna *et al*, 2008; Jamal *et al*, 2015).

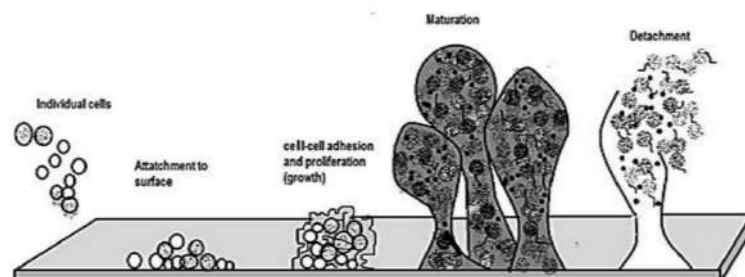
C. Pematangan biofilm

Sel-sel yang melekat dengan kuat pada permukaan substrat atau jaringan akan bergabung melalui interaksi antarsel. Pada fase pematangan, biofilm akan terus

tumbuh sejalan dengan pertumbuhan koloni. Semakin lama, biofilm akan semakin berkembang dengan pertambahan ukuran dan perubahan bentuk. Pada tahap ini, ketebalan biofilm mencapai lebih dari 100 μm dan dapat mencapai 300-400 μm (Aparna *et al*, 2008).

D. Dispersi sel dari biofilm untuk kembali ke keadaan planktonik

Pada tahap ini, bakteri akan meninggalkan biofilm secara teratur. Pelepasan ini terjadi karena degradasi enzimatis (*dispersin B* dan *deoxyribonuclease*) matriks biofilm dan QS sebagai respons terhadap perubahan lingkungan yang berkaitan dengan tingkat gizi dan diplesi oksigen oleh beberapa kekuatan eksternal. Bakteri lepas dari biofilm dalam keadaan matang (dalam bentuk planktonik) dan menyebar serta membentuk biofilm lainnya (Aparna *et al*, 2008). Pelepasan sel bakteri planktonik dari biofilm adalah detasemen terprogram, memiliki pola alami. Beberapa bakteri menghentikan produksi EPS dan terlepas ke lingkungan (Gambar 2.11) (Jamal *et al*, 2015).



Gambar 2.11 Siklus biofilm (Jamal *et al*, 2015)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada

Waktu : Februari-Juni 2022

Tempat : Laboratorium Biofisika dan Fisika Medis Departemen
Fisika
Universitas Airlangga

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Seprangkat laser dioda merah dengan panjang gelombang $665,520 \pm 0,005$ nm, dan alat lainya Optical Power dan Wavelength Meter, Power Meter Multimeter Digital, jangka sorong, penggaris, dan statif.
2. Peralatan pendukung untuk mempersiapkan sampel bakteri: cawan petri (diameter 6 cm), tabung reaksi, Erlenmeyer 250 ml, micropipper, lidi sapu (jarum ose), lampu bunsen, neraca, microwave oven, spektrometer, dry oven, autoklaf, inkubator, dan colony counter.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Isolat bakteri *Staphylococcus aureus*
2. Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan TSB (*Tryptic Soy Broth*)
3. Aquades
4. Air fisiologis (campuran aquades dan NaCl)
5. Alumunium foil
6. Kapas
7. Plastik wrap

8. *Phosphate Buffered Saline* (PBS)
9. Crystal violet
10. 2% Sukrosa
11. Mikroplate

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui variasi paling efektif diantara paparan laser dioda merah dengan ozon, tanpa ozon, dan hanya laser dioda merah untuk menginaktivasi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratorium menggunakan rancangan acak lengkap yang melibatkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan pemaparan, yang berfungsi untuk membandingkan dengan jumlah populasi bakteri yang tumbuh akibat perlakuan.

Kelompok perlakuan adalah kelompok sampel yang dipapari laser terdiri dari dua kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok yang diberi variasi waktu penyinaran menggunakan laser, kelompok kedua adalah kelompok pemaparan ozon, dan kelompok ketiga adalah kelompok kombinasi perlakuan penyinaran laser dioda merah dengan aktivasi ozon. Rancangan penelitian melibatkan 3 perlakuan dengan 4 variasi waktu (10 detik, 20 detik, 30 detik, dan 40 detik). Berikut ini merupakan penjelasan kelompok perlakuan:

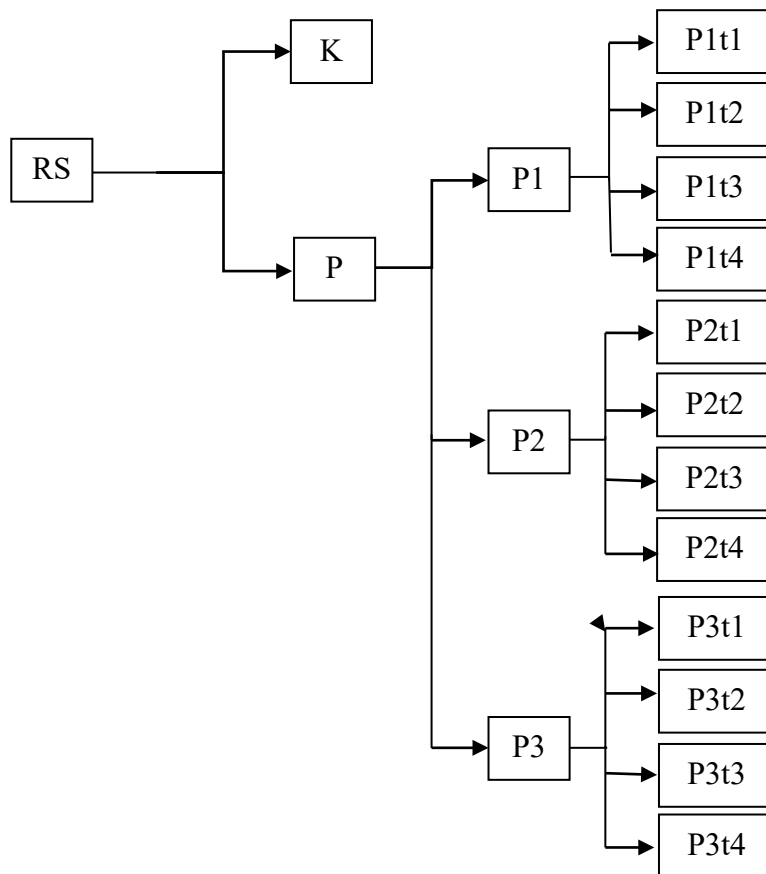
1. Kelompok 1: Laser dioda merah on, ozon off
2. Kelompok 2: Laser dioda merah off, ozon on
3. Kelompok 3: Laser dioda merah on, ozon on

Jumlah replikasi sampel dapat dihitung menggunakan rumus Lemeshow yaitu sebagai berikut:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 pq}{d^2} \quad (3.1)$$

Dimana n merupakan jumlah sampel, Z_{α} merupakan standar deviasi normal bergantung pada α (5% dengan nilai 1,960), p merupakan estimasi proporsi populasi, q merupakan $1-p$, dan d merupakan penyimpangan terhadap populasi atau derajat ketepatan yang diinginkan, biasanya bernilai 0,05. Jika nilai p sebesar 4% atau 0,004, maka jumlah sampel (n) minimal yang dibutuhkan adalah 5 sampel

Berikut merupakan skema definisi operasional variabel:



Gambar 3.1 Skema definisi operasional variabel

Keterangan:

1. RS: Randomisasi sampel bakteri
2. K: Kelompok kontrol bakteri
3. P1: Kelompok perlakuan dengan ozon dengan variasi waktu 10, 20, 30, dan 40 detik

4. P2: Kelompok perlakuan dengan laser dengan variasi waktu 10, 20, 30, dan 40 detik
5. P3: Kelompok perlakuan dengan laser dan ozon dengan variasi waktu 10, 20, 30, dan 40 detik
6. t1-t4: Variasi waktu secara berurutan 10, 20, 30, dan 40 detik

Variasi penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas: Waktu paparan.
- b. Variabel terikat: OD (*Optical Density*), jumlah koloni bakteri
- c. Variabel kendali: kultur bakteri, medium TSA.

3.4 Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Waktu Paparan

Variasi waktu paparan 10, 20, 30, dan 40 detik yang akan digunakan untuk tiap kelompok perlakuan.

3.4.2 Optical Density

Kepadatan bakteri yang terlihat sebagai kekeruhan medium. Nilai OD diperoleh menggunakan alat spektrofotometer UV-fis untuk kurva McFarland dan ELISA *reader* ketika mencari nilai OD hasil perlakuan.

3.4.3 Jumlah Koloni Bakteri

Jumlah koloni bakteri dengan nilai OD tertentu yang tumbuh pada cawan. Jumlah koloni diperoleh dengan menggunakan perhitungan manual yang nantinya akan digunakan untuk memperoleh hubungan nilai OD dan CFU/ml

3.4.4 Kultur Bakteri

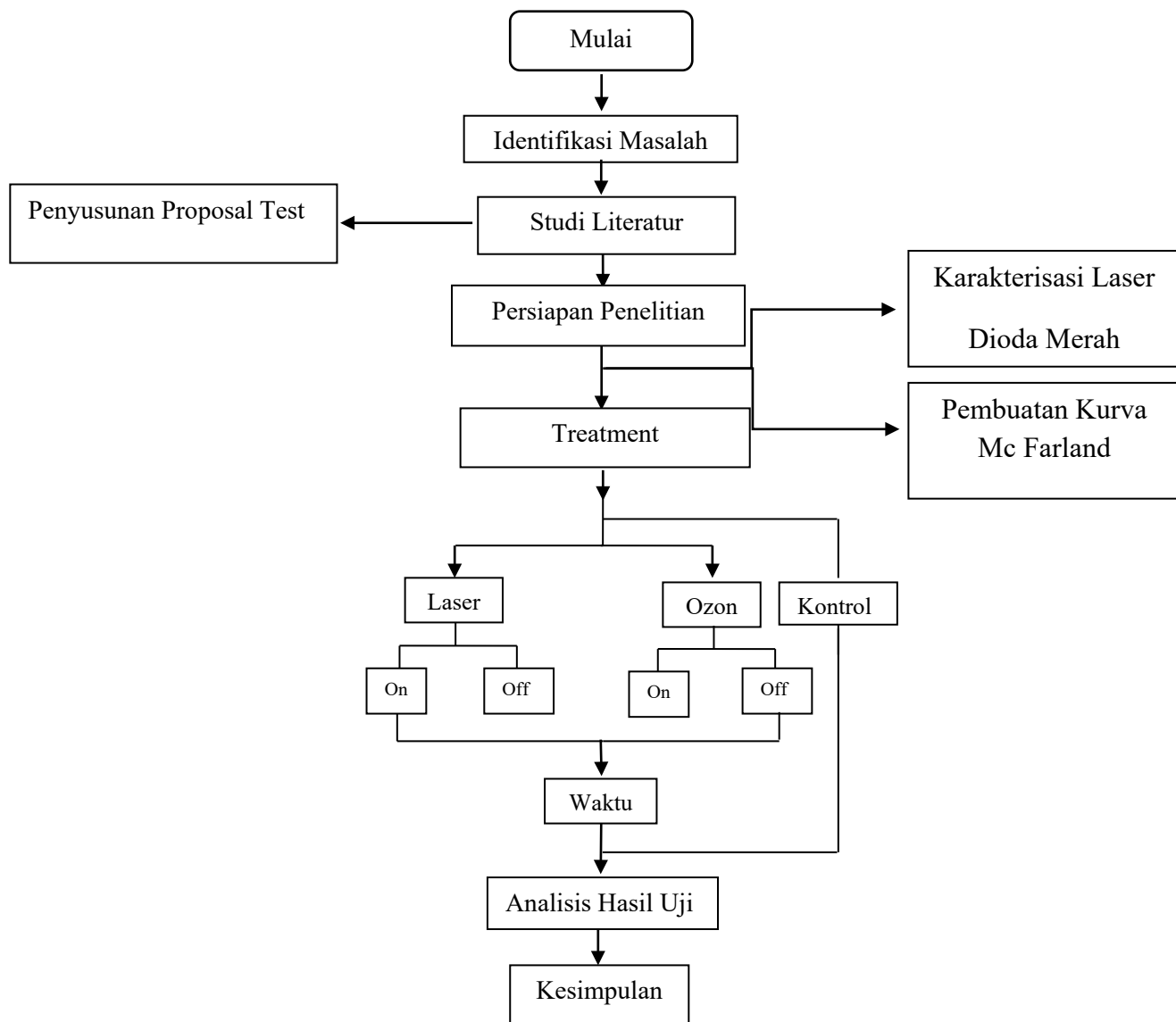
Kultur bakteri yang ditumbuhkan pada mikropate dengan perlakuan khusus (Gambar 3.3) dan waktu inkubasi 48 jam agar menjadi biofilm bakteri.

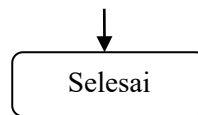
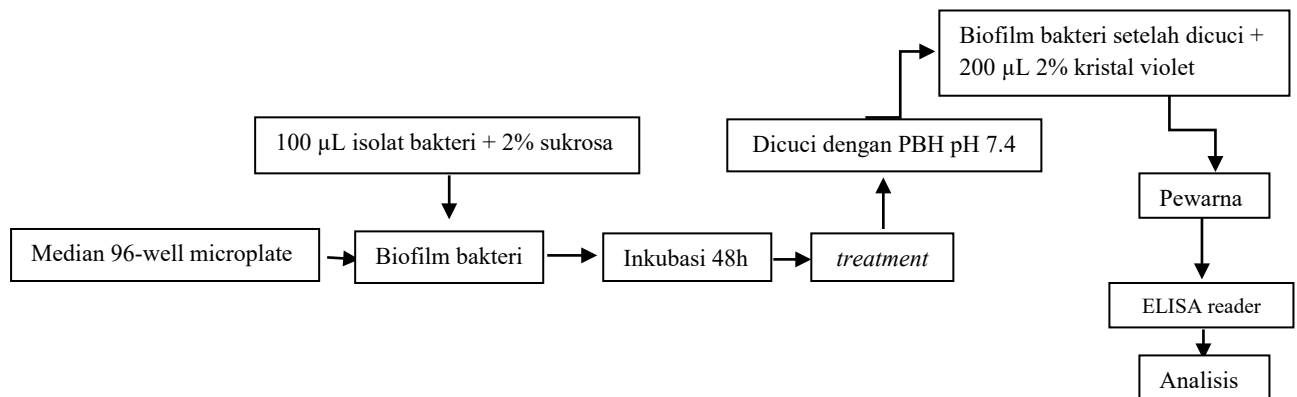
3.4.5 Medium TSA

Medium bakteri menggunakan *Tryptic Soy Agar* untuk menjadi media bakteri tumbuh dan dilakukan peremajaan tiap 2 minggu.

3.5 Prosedur Penelitian

Diagram alir penelitian ini menjelaskan tentang alur dari penelitian yang dilakukan untuk mencapai tujuan. Berikut adalah diagram alir yang akan digunakan pada penelitian ini:



**Gambar 3.2** Diagram alir penelitian**Gambar 3.3** Skema tahap perlakuan

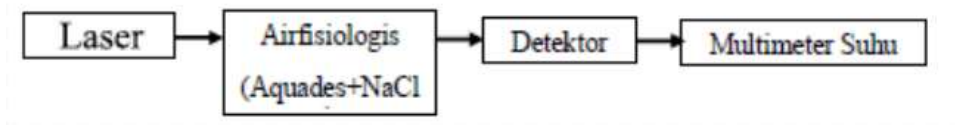
3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 Karakterisasi Laser Dioda Merah

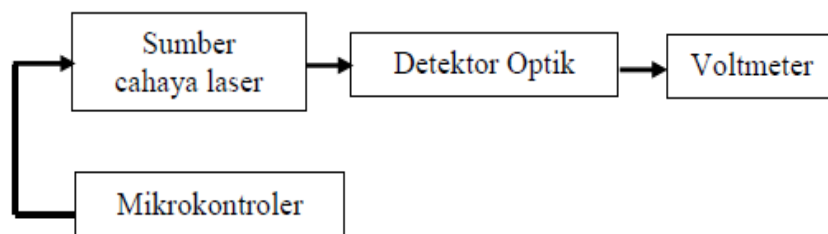
Karakterisasi laser dioda merah dilakukan untuk mengetahui spesifikasi laser serta memperoleh daya optimum untuk inaktivasi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Karakterisasi yang dilakukan adalah karakterisasi temperatur, karakterisasi daya terhadap waktu, dan karakterisasi panjang gelombang. Karakterisasi waktu pemaparan dilakukan menggunakan stopwatch digital. Karakterisasi temperatur dilakukan di Laboratorium Elektronika Medis, Jurusan Otomasi Sistem Instrumentasi (OSI), Fakultas Vokasi, Universitas Airlangga menggunakan termometer digital. Berkas cahaya laser ditembakkan dengan jarak 1 cm dari sampel *Staphylococcus*

aureus, hasilnya akan ditampilkan display yang terhubung detector.

Karakterisasi temperatur dilakukan dengan rentang waktu 10-30 menit. Karakterisasi memiliki skema (Gambar 3.4) dan set-up (Gambar 3.5) sebagai berikut :



Gambar 3.4 Skema karakterisasi temperatur



Gambar 3.5 Skema karakterisasi intensitas cahaya laser

Untuk melakukan pengukuran intensitas laser hal pertama yang dilakukan adalah daya pemaparan laser pada berbagai *Pulse Width Modulation* (PMW) diukur dengan menggunakan *Silicone Detector* 818 SL yang dikontrol menggunakan mikrokontroler. Output dari *Silicone Detector* 818 SL disambungkan dengan voltmeter. Daya (P) yang dipancarkan laser diterima oleh detektor dengan luas penampang (A) menghasilkan intensitas (P/A). Intensitas akan diubah menjadi arus listrik yang outputnya terbaca dalam satuan Volt.

3.5.1.2. Pembuatan Diagram Standar McFarland

Tujuan dari pembuatan diagram standar McFarland adalah menggantikan perhitungan bakteri dan memperkirakan kepadatan jumlah bakteri melalui nilai OD (*Optical Density*). Nilai OD yang diperoleh akan digunakan sebagai konversi nilai OD ke CFU/mL. Prosedur pembuatan diagram standar McFarland yaitu:

1. Membuat kultur bakteri *Staphylococcus aureus* dengan mengambil kultur dari media TSA sebanyak satu ose, kemudian dimasukkan pada air fisiologis steril sebanyak 5 mL dan vortex hingga homogen
2. Mengukur nilai OD menggunakan spektrofotometer dengan mengisi 1000 μ L air fisiologis ke kuvet sebagai blangko.
3. Selanjutnya mengisi kultur pada kuver sebanyak 1000 μ L dan dibaca nilai OD oleh spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.
4. Setelah mengetahui nilai OD, maka kultur diambil sebanyak 50 μ L ke cawan petri kemudian ditambahkan TSA steril dan dihomogenkan membentuk pola angka delapan.
5. Cawan petri yang terisi sampel diinkubasi pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Untuk mencari OD selanjutnya dilakukan proses pengeceran dengan menambahkan air fisiologis sebanyak 500 μ L ke kultur bakteri kemudian dihomogenkan.
7. Mengulangi tahap ke 2-6 hingga diperoleh nilai OD yang diinginkan.
8. Kemudian menghitung koloni bakteri dengan metode TPC (*Total Plate Count*), data yang terambil memiliki satuan CFU/mL. Setelah

itu membuat diagram McFarland berdasarkan hubungan OD dengan log CFU/mL.

3.4.1.3 Pengkulturan Bakteri dalam Mikroplate

1. Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari media agar diambil menggunakan ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 mL yang berisi Trypsin Soy Broth (TSB).
2. Melakukan pengenceran dengan cara mengambil kultur sebanyak 500 μL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi air fisiologis 4,5 mL (10^{-1}). Kemudian dihomogenkan dengan pengadukan menggunakan vortex.
3. Hasil pengenceran pertama diambil 500 μL kemudian dimasukkan ke dalam air fisiologis 4,5 mL (10^{-2}) lalu dihomogenkan dengan vortex.
4. Prosedur 2-3 dilakukan kembali hingga pengenceran $\sim 10^8$ CFU/mL.
5. 100 μL kultur bakteri diletakkan dalam mikroplate sumur 96 dan tambahkan 20 μL 2% sukrosa (w/v). Sampel kemudian diinkubasi selama 48 jam.
6. Biofilm yang tumbuh dalam mikroplate dibilas dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (pH 7.0) sebanyak tiga kali untuk menghilangkan sel individual.
7. 100 μL dari 1% kristal violet ditambahkan kedalam sampel dan inkubasi selama 30 menit dalam suhu 37 °C.
8. Sampel kemudian ditiriskan dan dikeringkan selama 3 jam.
9. Nilai *Optical Density* (OD) terukur pada 450 nm menggunakan ELISA reader.

10. Penghitungan tingkat biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* yang tereduksi dilihat melalui perhitungan sumur yang memiliki warna violet yang berkurang setelah diberi perlakuan.

3.5.2 Treatment

Treatment dilakukan menggunakan laser dioda merah dengan panjang gelombang $663,85 \pm 0,022$ nm serta kombinasi laser dioda merah dengan output sumber ozon 400 mg/h. Tahap melakukan treatment yaitu:

1. Meletakkan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* pada alat terapi.
2. Menyalakan saklar, bila tegangan telah terhubung maka plot lamp akan menyala dan akan berbunyi menandakan timer, kemudian atur timer mulai dari 10, 20, 30, dan 40 detik. Serta set output sumber ozon 400 mg/h
3. Jarak laser terhadap sampel biofilm bakteri berjarak sejauh 1 cm dalam ruangan gelap.
4. Pilih sumur mana yang akan diberi paparan laser dioda merah sebanyak 10 replikasi.
5. Setelah waktu pemaparan selesai maka akan muncul tulisan “selesai” yang menandakan pemaparan telah selesai. Kemudian matikan alat.
6. Lanjutkan untuk kelompok perlakuan lanjutan.

3.5.3 Analisis Statistik

Analisis data kuantitatif dilakukan menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui pengaruh pada masing-masing kelompok perlakuan. Melalui analisis ini, dapat diketahui perlakuan yang mampu menginaktivasi bakteri secara optimal. Faktor perlakuan penyinaran yang memiliki potensi fotoinaktivasi terbesar menjadi tujuan akhir dalam penelitian ini.

Uji *One Way Anova* (Analisis Varian Satu Arah) berfungsi untuk mengetahui perbedaan antar dua sampel atau lebih yang tidak saling berkaitan. Syarat untuk uji *One Way Anova* adalah data terdistribusi

normal dan homogen dengan data berskala interval atau rasio. Data dikatakan memiliki perbedaan atau H_o ditolak apabila nilai signifikansi $p < \alpha = 0,05$. Agar data lebih terperinci, dilakukan uji Post Hoc metode Tukey dengan syarat $p < 0,05$ untuk mengetahui perbedaan tiap faktor sampel. Dari uji ini akan diketahui perlakuan yang paling berpengaruh terhadap fotoinaktivasi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

- a. H_o : tidak terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan
- b. H_1 : minimal ada sepasang kelompok yang berbeda

3.5.4. Analisis

Setelah dilakukan pemaparan terhadap bakteri, dapat dilakukan perhitungan presentase penurunan jumlah koloni bakteri menggunakan rumus:

$$\%kematian = \left| \frac{\Sigma_{perlakuan}(CFU/mL) - \Sigma_{kontrol}(CFU/mL)}{\Sigma_{kontrol}(CFU/mL)} \right| \times 100\%$$

Setelah diperoleh data hasil penelitian, selanjutnya yaitu menganalisis data penelitian menggunakan analisis statistik IBM SPSS (*Statistical Package for Social Science*). Adapun uji statistik yang dilakukan adalah *One Way Anova*. Uji ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan hasil dari setiap kelompok perlakuan.

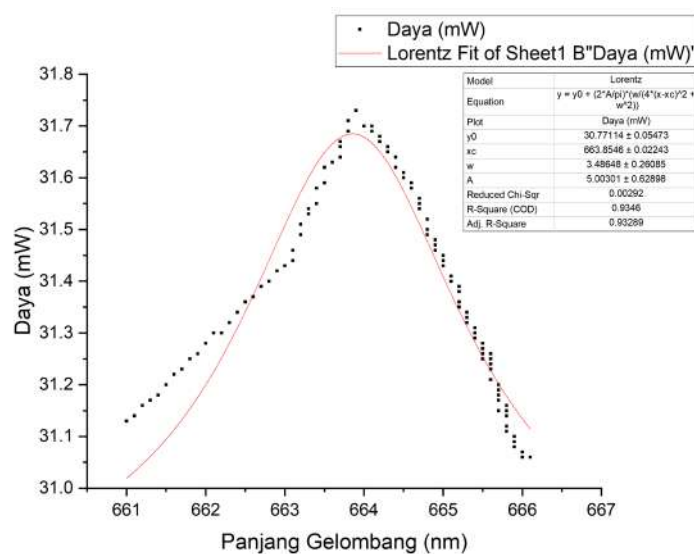
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Karakterisasi Sumber Cahaya

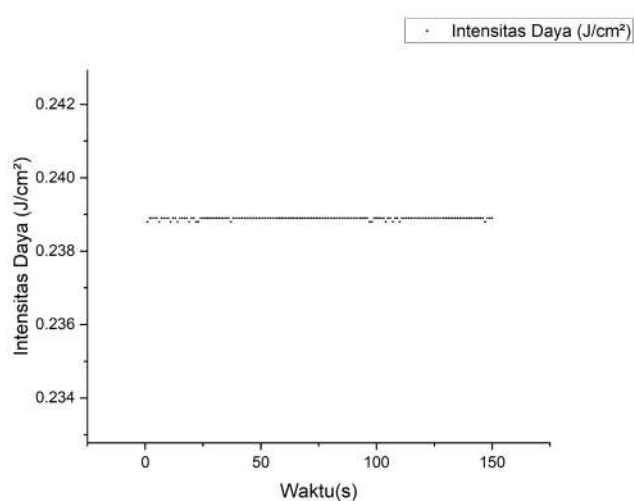
Sumber cahaya menggunakan laser dioda. Spektrum panjang gelombang laser diukur menggunakan *monochromator* menunjukkan puncak panjang gelombang di $663,85 \pm 0,022$ nm yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Blok persegi hitam menyatakan hasil kuantitatif dari pengukuran sedangkan garis merah merupakan hasil fitting. Nilai *power* pada puncak panjang gelombang sebesar $30,77 \pm 0,054$ mW.



Gambar 4.1 Karakterisasi Panjang Gelombang Laser Dioda

Panjang gelombang memiliki peran yang sangat penting dalam proses fotofisika untuk perlakuan PDT. Fotofisika melibatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu yang dapat mengaktifkan suatu molekul (fotosensitizer). Pengaktifan fotosensitizer akan melibatkan penyerapan energi foton oleh

fotosensitizer yang mengakibatkan elektron tereksitasi sehingga molekul menjadi tidak stabil. Molekul fotosensitizer akan coba mencapai stabil dengan 2 cara yaitu *internal conversion* (IC) dan *intersystem crossing* (ISC). Proses IC akan menghasilkan fluorescence dan proses ISC akan menghasilkan phosphorescence atau merubah molekul oksigen. Proses perubahan molekul oksigen dapat terjadi dengan 2 cara yaitu transfer elektron yang menghasilkan HO^- dan transfer energi yang merubah $^3\text{O}_2$ menjadi $^1\text{O}_2$. Proses tersebut tentunya dipengaruhi jumlah energi foton dan stabilitas daya. Stabilitas daya keluaran yang diberikan laser ditunjukkan pada Gambar 4.2. Blok persegi hitam menyatakan hasil dari uji karakterisasi sedangkan garis merah adalah hasil fitting. Nilai standar deviasi yang kecil sebagai justifikasi bahwa daya laser akan stabil selama proses penyinaran. Daya pada perlakuan dan karakterisasi diasumsikan sama sehingga besar daya dapat dijadikan dasar dalam penghitungan rapat energi penyinaran laser. Penyinaran dilakukan pada jarak 1 cm dengan luas area $0,13 \text{ cm}^2$ dengan waktu selama 400 detik.



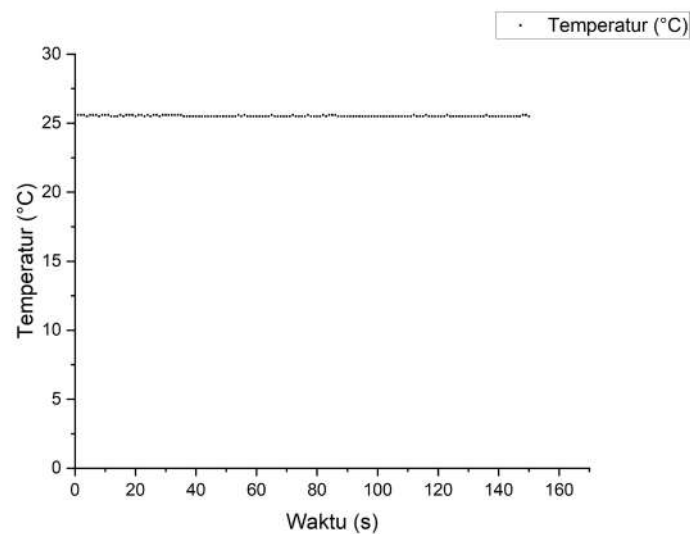
Gambar 4.2 Karakterisasi intensitas daya keluaran laser dioda terhadap waktu

Hasil karakterisasi panjang gelombang dan stabilitas daya diatas akan digunakan untuk menentukan jumlah foton yang diemisikan setiap waktu menggunakan persamaan 2.3. Densitas energi sumber cahaya yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kerapatan energi yang diemisikan oleh laser dioda

Luas Area (cm ²)	Daya Laser (W)	Waktu (s)	Densitas Energi (J/cm ²)
0,13	$3,185 \times 10^{-2}$	10	2,37
	$3,192 \times 10^{-2}$	20	4,74
	$3,20 \times 10^{-2}$	30	7,13
	$3,206 \times 10^{-2}$	40	9,53

Karakterisasi temperatur perlu dilakukan untuk mengetahui perubahan temperatur penyinaran dalam selang waktu tertentu. Pengukuran dilakukan menggunakan *thermometer gun* dalam selang waktu 150 detik, dengan pencatatan waktu setiap 1 detik pada grafik dibawah ini:

**Gambar 4.3** Karakterisasi temperatur terhadap waktu

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa temperatur penyinaran relatif stabil pada suhu 25,5-25,6 °C dengan standar deviasi 0,044. Rendahnya standar deviasi menjadi justifikasi bahwa temperatur penyinaran akan stabil pada suhu tersebut

dan tidak akan terjadi efek fototermal selama proses fotoinaktivasi dengan menggunakan laser dioda merah.

4.1.2 Konsentrasi sumber ozon

Berdasarkan pembuat alat, sumber ozon memiliki output 400 mg/jam. Waktu durasi ozon dikontrol dan ditampilkan pada layar LCD. Probo ozonisasi diarahkan langsung ke sampel. Pengukuran konsentrasi molekul O_3 ditambahkan setiap kali pemaparan dilakukan dengan menggunakan metode iodometrik titrasi. Berikut Tabel hasil konsentrasi ozon:

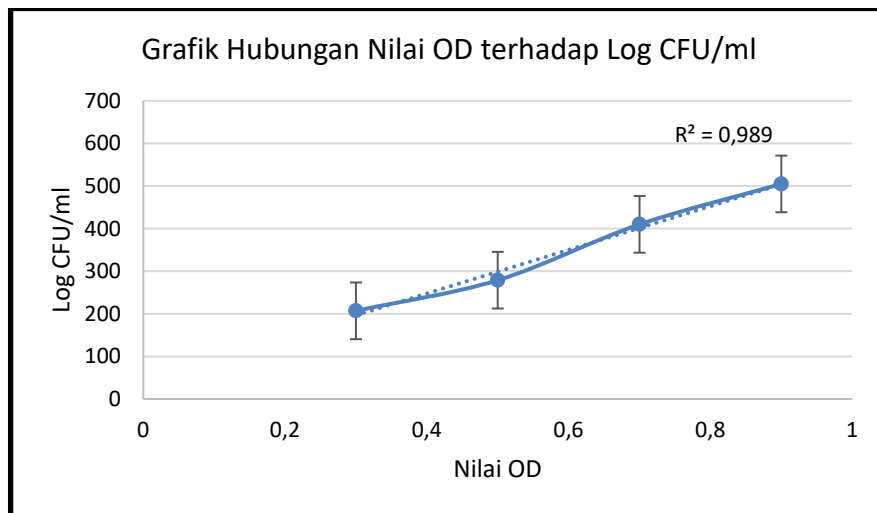
Tabel 4.2 Konsentrasi Ozon

Ozon	
Waktu paparan (s)	Konsentrasi (mg/L)
20	3×10^{-3}
40	5×10^{-3}
60	1×10^{-2}

4.1.3 Hasil Uji Standar Mc Farland dan Standar Pengenceran Bakteri

Staphylococcus aureus

Uji Mc Farland memiliki tujuan untuk mengetahui kerapatan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada nilai OD (*optical density*) tertentu. Jumlah koloni yang terhitung akan dikonversi menjadi satuan CFU/ml. Nilai OD terbaca menggunakan alat spektrofotometer UV-Fis. Berdasarkan plotting hubungan nilai OD terhadap jumlah koloni bakteri yang tumbuh diperoleh nilai $R^2 = 0,98$ pendekatan linier yang berarti hasil plot sesuai dengan fungsi matematis linier. Hasil uji Mc Farland ditunjukkan pada grafik dibawah ini:



Gambar 4.4 Grafik hubungan CFU/mL terhadap nilai OD pada panjang gelombang 595nm

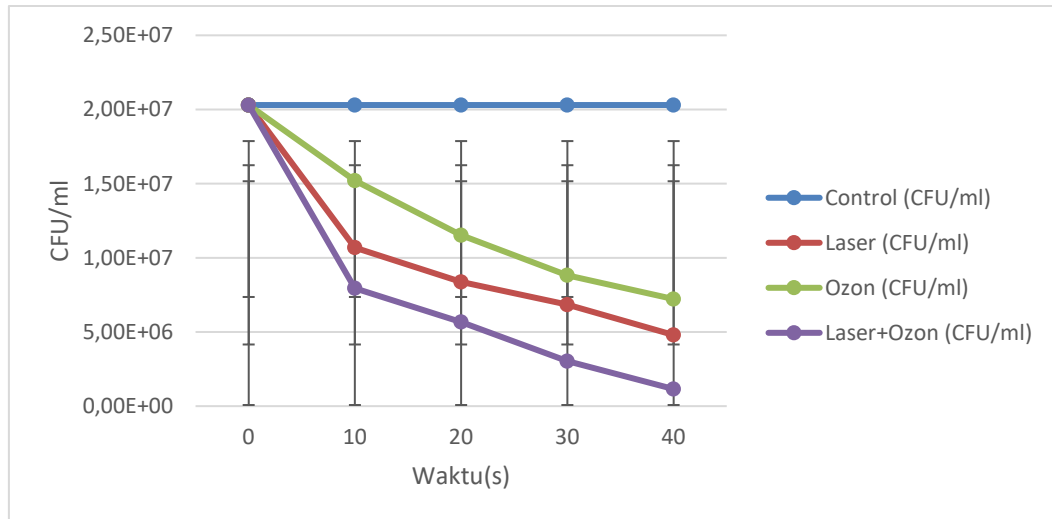
Standar pengenceran dibuat untuk mengurangi jumlah kandungan bakteri sehingga dapat diamati dan diketahui jumlah bakteri secara spesifik. Dari hasil pengenceran bertingkat, dipilih hasil pengenceran yang memiliki jumlah koloni bakteri dalam rentang 30-300 koloni bakteri. Dari data hasil pengenceran bakteri *S. aureus* diperoleh jumlah koloni yang memenuhi standar adalah pada pengenceran ke-5, dengan jumlah rerata 236 koloni bakteri.

4.1.4 Hasil Analisis Perlakuan Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

Treatment dilakukan dengan variasi waktu dan kelompok perlakuan. Variasi waktu yang dilakukan adalah 10, 20, 30, dan 40 detik. Dengan adanya variasi waktu maka akan ada perbedaan rapat energi pada setiap perlakuan. Tolak ukur keberhasilan dalam treatment ini dapat diamati dari presentase penurunan jumlah OD atau CFU/ml biofilm bakteri hasil treatment terhadap kelompok kontrol.

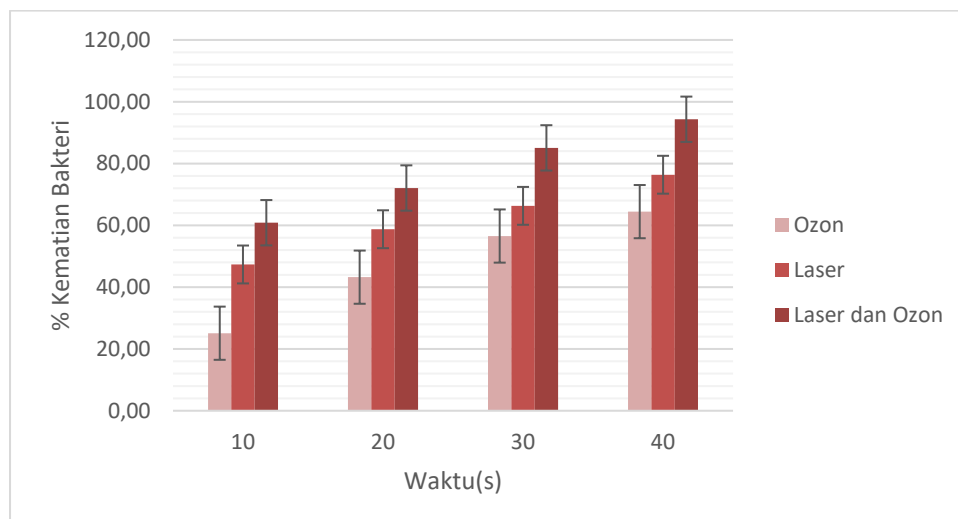
Terdapat tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok pertama menggunakan laser, kelompok kedua menggunakan ozon, dan kelompok ketiga menggunakan kombinasi laser dan ozon semua diberikan waktu paparan yang sama yaitu,

10, 20, 30, dan 40 detik. Data hasil pengamatan pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada lampiran 3. Hasil perlakuan pada ketiga kelompok tersebut menghasilkan hubungan antara waktu yang digunakan untuk treatment dengan viabilitas bakteri dalam nilai OD yang disajikan pada grafik dibawah ini:



Gambar 4.5 Penurunan viabilitas biofilm bakteri *S. aureus*

Dari CFU/ml yang sudah diperoleh, kemudian dihitung presentase kematian bakteri. Presentase kematian bakteri dapat dilihat dari grafik dibawah ini:



Gambar 4.6 Perbandingan presentase reduksi biofilm bakteri *S. aureus*

Hasil uji normalitas dari kelompok perlakuan laser, ozon, dan kombinasi laser+ozon secara beurutan diperoleh nilai signifikansi $p = 0,540$, $p = 0,109$, $p = 0,182 > \alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas dengan tujuan mengetahui variasi data homogen atau tidak. Hasil uji homogenitas ditunjukkan pada tabel output *Levene's test for equality of variances* dengan nilai $p > 0,05$ yang menunjukkan bahwa variasi data bersifat homogen ($p_{Laser} = 0,075$, $p_{Ozon} = 1,537$, $p_{Laser+Ozon} = 0,926$). Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,000 < \alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa ada perbedaan makna dari setiap variasi waktu yang diberikan pada setiap perlakuan. Perbandingan efektivitas perlakuan dalam mereduksi bakteri dapat dilihat pada Tabel hasil uji statistik dibawah ini:

Tabel 4.3 Tabel hasil analisis statistik pada bakteri *S. aureus*

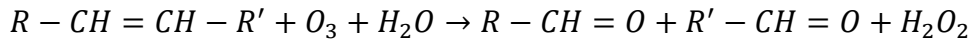
Interaksi	10	Std.E	Sig.	20	Std.E	Sig.	30	Std.E	Sig.	40	Std.E	Sig.
Laser vs Ozon	36,21	2,76	0,00	50,98	2,17	0,00	60,22	1,61	0,00	70,41	1,94	0,001
Laser vs Laser+Ozon	54,09	1,91	0,00	65,41	1,82	0,00	75,68	2,32	0,00	85,35	2,22	0,00
Ozon vs Laser+Ozon	42,96	4,25	0,00	57,65	3,54	0,00	69,60	3,67	0,00	79,38	3,70	0,00

Presentase reduksi diperoleh melalui perbandingan nilai OD antar kelompok perlakuan. Nilai OD dikonversikan ke CFU/ml. Korelasi antara nilai OD dan CFU/ml diperoleh melalui metode kurva McFarland. Setelah mengkonversi, nilai CFU/ml dibandingkan dengan kelompok kontrol sehingga diperoleh rerata presentase reduksi pada Tabel diatas.

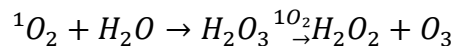
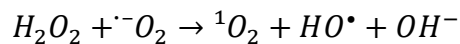
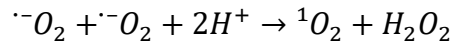
Pada Tabel tersebut dapat dilihat bahwa pada waktu 40 detik memiliki presentase reduksi yang lebih besar dibandingkan variasi waktu yang lain. Dan perlakuan yang memiliki tingkat efektivitas secara berurutan dari yang paling efektif adalah kelompok laser+ozon, laser, dan ozon. Sehingga diperoleh kesimpulan bahwa kelompok perlakuan laser+ozon dengan variasi waktu 40 detik secara maksimal mampu mereduksi bakteri *S. aureus*.

Setiap kelompok perlakuan mengalami fenomena yang berbeda. Pada kelompok perlakuan yang melibatkan laser, cahaya telah diserap oleh fotosensitizer yang menyebabkan terjadinya fenomena fotofisika dan fotokimia.

Sedangkan pada kelompok perlakuan ozon telah terjadi reaksi kimia sebagai berikut:

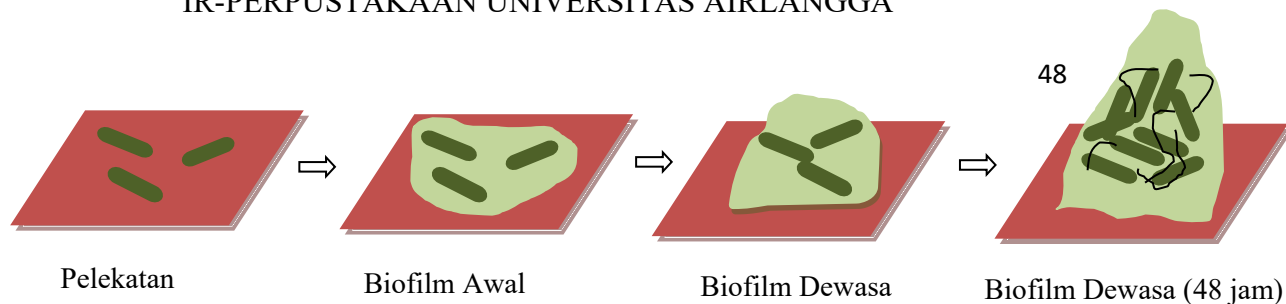


Pada kelompok perlakuan kombinasi laser+ozon terjadi interaksi antara fotosensitizer dan cahaya membentuk anion superoksida ($\cdot O_2^-$) dan oksigen singlet ($^1O_2$) dan reaksi komponen ini dapat membentuk H_2O_2 dan ozon (O_3).



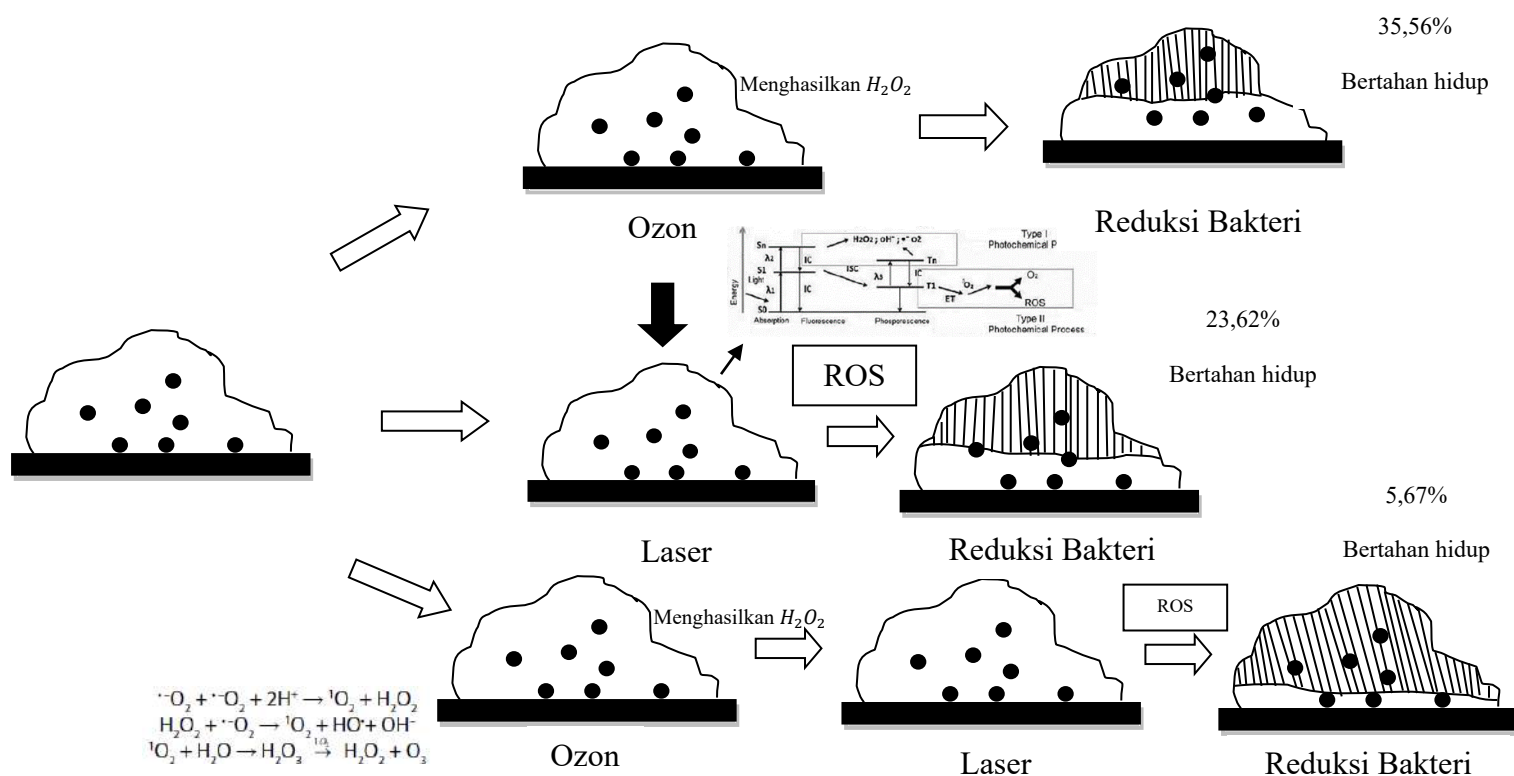
4.2 Pembahasan

Purbowati (2016) mendefinisikan biofilm sebagai suatu kondisi mikroorganisme yang membentuk suatu asosiasi dan menempel satu sama lain pada suatu permukaan yang membentuk matrik ekstraseluler (EPS). Keberadaan EPS menjadikan bakteri memiliki tingkat resisten yang lebih tinggi sehingga sulit untuk di reduksi. Meningkatnya jumlah EPS sesuai dengan usia biofilm (Homonta et al, 2016). Bakteri merupakan makhluk sel tunggal mikroskopis kecil yang memiliki struktur primitif. Mereka mengambil bahan makanan dan melepaskan produk metabolisme. Tubuh bakteri disegel oleh membran sel yang relatif padat. Perkembangan biofilm diawali dengan fase pelekatan sel bakteri pada host. Selanjutnya adalah fase biofilm awal yang ditandai dengan terbentuknya lapisan EPS tipis yang menutupi bakteri. Pada fase ini bakteri sudah lebih resisten terhadap pemberian antibiotik. Semakin bertambahnya usia biofilm maka jumlah EPS juga akan semakin meningkat (fase dewasa) menyebabkan pemberian antibiotik hampir tidak mungkin menyentuh bakteri yang berada didasar. Hal ini disebabkan semakin meningkatnya EPS akan menyebabkan ukuran pori-pori biofilm semakin menyempit. Studi menggunakan mikroskop fluorescence menunjukkan biofilm berkembang melalui tiga fase: fase awal(0-11 jam), fase menenga (sekitar 12-24 jam), dan fase dewasa(24-48 jam) (Chandra et al, 2010).



Gambar 4.7 Ilustrasi Mekanisme Pertumbuhan Biofilm *S. aureus*

Photodynamic Therapy (PDT) adalah solusi yang dapat dilakukan untuk mengontrol biofilm tersebut. Peristiwa PDT diakibatkan karena adanya interaksi antara cahaya dengan jaringan biologis atau molekul yang peka cahaya. Mekanisme terjadinya PDT dipengaruhi oleh 3 faktor utama yaitu cahaya, molekul penyerap cahaya dan oksigen. Pada penelitian ini digunakan laser dioda merah 661 – 666,1 nm, sedangkan bakteri *S. aureus* memiliki porfirin *coproporphyrin* endogen sekitar 68,3 – 74,6% (Nitzan et al, 2004).



Gambar 4.8 Ilustrasi mekanisme inaktivasi biofilm *S. aureus* menggunakan fotodinamik dan kombinasi fotodinamik dengan ozon (Astuti et al, 2019).

Cahaya dari laser dioda merah diserap oleh fotosensitizer endogen sehingga menyebabkan transisi dari keadaan *ground state* menjadi keadaan singlet tereksitasi. Spin elektron yang berinteraksi dengan elektron singlet keadaan tereksitasi meninggalkan molekul pada keadaan eksitasi triplet atau yang disebut sebagai *intersystem crossing*. Pada kondisi ini terjadi proses fotokimia. Proses fotokimia memiliki dua tipe jalur. Pada jalur tipe I berinteraksi dengan terbentuk anion atau kation berupa oksigen relatif (ROS) akibat interaksi molekul fotosensitif dengan molekul biologi. Pada jalur tipe II fotosensitizer triplet mentransfer energi secara langsung membentuk oksigen singlet tereksitasi (Astuti *et al*, 2011). Radikal oksigen singlet (ROS) dan oksigen triplet yang bersifat radikal dari proses fotokimia menginisiasi asam lemak tak jenuh dan membentuk hidroperoksida. Kemudian, formasi asam lemak jenuh yang terdiri dari ikatan hidrogen terputus oleh radikal oksigen singlet dan oksigen triplet sehingga menghasilkan hidroperoksida yang bersifat racun, proses ini disebut peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid menyebabkan kerusakan struktur dinding sel bakteri sehingga sel bakteri mengalami lisis (Astuti, 2011).

Peran ozon dalam hal ini adalah mengganggu metabolisme sel bakteri, kemungkinan besar dengan menghambat dan menghalangi operasi sistem kontrol enzimatik. Jumlah ozon yang menembus lapisan biofilm ini menyebabkan penghancuran bakteri (Gambar 4.6). (Bocci, 2006) mengatakan bahwa ozon dan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), antioksidan, senyawa tiol (-SH), glutathione (GSH) dan albumin dapat direaksikan. Senyawa tiol (-SH) dan glutathione (GSH) merupakan salah satu senyawa yang terkandung dalam substrat biofilm. Semua senyawa ini mengalami oksidasi dan membentuk satu mol hidrogen peroksida (H_2O_2). Senyawa ini merupakan bahan kimia organik yang memiliki sifat pengoksidasi kuat dan beracun dalam tubuh. (Obadi *et al*, 2018) menunjukkan bahwa kandungan SH berkurang dengan meningkatnya pemrosesan gas ozon. Hal ini menyebabkan konsentrasi ozon menjadi sangat penting untuk mereduksi, konsentrasi yang terlalu rendah menyebabkan reduksi rendah dan konsentrasi yang terlalu tinggi menyebabkan cedera pada jaringan disekitarnya. Konsentrasi

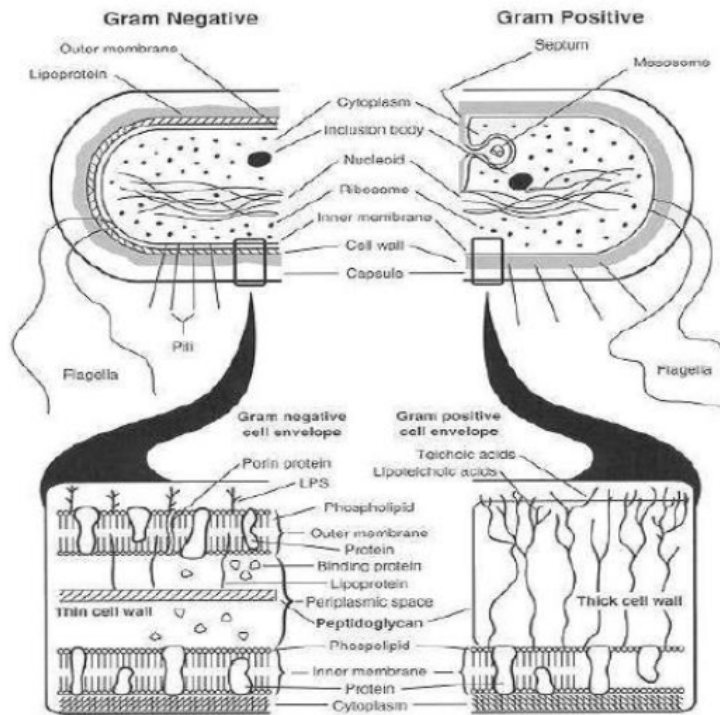
yang diberikan tidak boleh melebihi kapasitas enzim antioksidan (superoksida dismutase dan katalase) dan glutathione untuk mencegah akumulasi anion superoksida dan hidrogen peroksida, yang dapat menyebabkan degradasi membran sel (Xiao *et al*, 2006).

Tabel 4.4 Penelitian fotodinamik inaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus*.

No	Penelitian	Sumber Cahaya	Fotosensitizer	Bakteri	% Kematian Bakteri
1	Astuti <i>et al</i> (2020)	Laser dioda merah 658 nm 54,8 J/cm ²	Metilen Biru	Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	92,01%
2	Astuti <i>et al</i> (2011)	LED biru 430 nm 135 J/cm ²	Porfirin	<i>Staphylococcus aureus</i>	75%
3	Anwar (2017)	Laser dioda biru 400 nm 28,45 J/cm ² & Ozon	Porfirin	Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	71,96%
4	Enwemeka (2008)	Laser dioda biru 16,8 J/cm ²	Eksogen Ekstrak Kunyit	MRSA	83,93%
5	Astuti <i>et al</i> (2019)	Laser dioda 399,81 nm 8,69 J/cm ²	Klorofil	Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	80,26%

Bakteri memiliki dua jenis yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Kedua jenis bakteri tersebut memiliki perbedaan dari susunan dinding sel. Dinding sel pada bakteri gram positif memiliki susunan berupa peptidoglikan, asam teiokat, dan asam teikuronat. Dinding sel bakteri gram positif sebagian adalah polisakarida yang lebih mudah mengalami kerusakan pada proses fotoinaktivasi. Bakteri gram negatif memiliki sistem membran ganda, sedikit peptidoglikan yang berada diantara melaput luar dan selaput dalam dinding sel.

Dinding sel bakteri gram negatif sebelah luar merupakan komponen yang terdiri dari fosfolipid dan beberapa protein (Helmiyati, 2010). Struktur penyusun dinding sel bakteri gram positif dan bakteri gram negatif ada pada Gambar dibawah ini:



Gambar 4.9 Struktur dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif (Klien *et al*, 1999 dalam Helmiyati 2010)

Hasil penyinaran pada kelompok perlakuan kombinasi laser dioda merah dengan ozon memberikan presentase kematian bakteri terbesar dibandingkan dengan kedua kelompok perlakuan lainnya. Hal tersebut dikarenakan penggabungan laser dioda merah dengan ozon dapat meningkatkan oksigen reaktif yang dapat merusak sistem biologis bakteri sehingga bakteri mengalami lisis. Semakin banyak oksigen reaktif yang dihasilkan maka akan semakin besar presentase kematian bakteri. Seperti hasil pada kelompok perlakuan laser dengan aktivasi ozon yang memberikan presentase sebesar 60,85%, 72,08%, 85,07%, dan 94,33% Selain itu hasil analisis data penelitian ini menunjukkan ada terjadi peningkatan presentase kematian bakteri pada variasi lama waktu penyinaran. Pada waktu 40 detik menunjukkan presentase terbesar pada seluruh kelompok

perlakuan, pada kelompok perlakuan laser mampu mereduksi 76,38 %, ozon 64,44%, dan laser dengan ozon 94,33%. Semakin lama waktu yang digunakan, maka oksigen reaktif yang dihasilkan semakin besar, sehingga dapat menghasilkan kematian bakteri yang lebih banyak.

BAB 5

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa

1. Kombinasi antara ozon dengan laser dioda merah mampu mereduksi bakteri. Hal ini terbukti ketika laser dikombinasikan dengan ozon mampu meningkatkan presentase reduksi secara drastis dari kelompok perlakuan laser saja, meningkat sebesar 29,89%, ini dikarenakan ozon mampu menimbulkan reaksi yang menghasilkan H_2O_2 sehingga dapat meningkatkan presentase kehancuran bakteri.
2. Rapat energi yang terjadi pada penelitian ini belum bisa mencapai nilai optimal. Sehingga rapat energi maksimal untuk fotoinaktivasi biofilm bakteri *S. aureus* pada penelitian ini adalah $0,168 \text{ J/cm}^2$ pada detik ke 40 dengan penambahan ozon memiliki tingkat presentase kematian sebesar 97,47 %, sedangkan pada detik ke 40 dengan laser saja memiliki tingkat presentase kematian 87,5 %.

5.2 Saran

Saran untuk perbaikan dari penelitian ini adalah:

1. Dilakukan *treatment* perlakuan ozon-cahaya dengan waktu dan daya yang berbeda.
2. Penelitian dilakukan di laboratorium yang lebih steril karena terdapat kendala pada *laminar flow* Lab. Mikrobiologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji D. (2007). Perbandingan Sterilisasi Alkohol 70% Inframerah, Otoklaf, Dan Ozon Terhadap Pertumbuhan Bakteri (*Bacillus Subtilis*). *Sain Vet*, 25(1).
- Agung, B., & Syakur, W. A. (2011). *APLIKASI IGNITION COIL SEBAGAI PEMBANGKIT TEGANGAN TINGGI IMPULS UNTUK PENYEDIA DAYA REAKTOR OZON*.
- Anwar, & Febrianto Dadik. (2017). Potensi Ozon dengan Activator Laser Dioda Biru dalam Photodynamic untuk Inaktivasi Bakteri *Staphylococcus Aureus* Biofilm. *Perpustakaan Universitas Airlangga*.
- Aparna, M., Sharma, P. B. D., & Yadav, S. (2008). Biofilms: Microbes and Disease. In *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* (Vol. 12, Issue 6). www.bjid.com.br
- Astuti, S. (2020). Efek Fotodinamik Laser Dioda Merah Dengan Eksogen Metilen Biru Pada Biofilm *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 22, 1. <https://doi.org/10.20473/jbp.v22i1.2020.1-10>
- Astuti, S. D., Drantantiyas, N. D. G., Putra, A. P., Puspita, P. S., Syahrom, A., & Suhariningsih, S. (2019). Photodynamic effectiveness of laser diode combined with ozone to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm with exogenous chlorophyll of *Dracaena angustifolia* leaves. *Biomedical Photonics*, 8(2), 4–13. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2019-8-2-4-13>
- Astuti, S. D., Izak R., D., Ni'matuzahroh, N., Zainuddin, M., & Suhariningsih, S. (2011). POTENSI PHOTODINAMIK INAKTIVASI *Staphylococcus aureus* DAN *Vibrio cholerae* DENGAN ENDOGEN PHOTOSENSITIZER PADA PENYINARAN LED BIRU (430 ± 4) nm DAN MERAH (629 ± 6) nm. *Berkala Penelitian Hayati*, 16(2), 127–131. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.16.2.20115>
- Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 5(2), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Brooks, Geo., Carroll, K. C., Butel, Janet., & Morse, Stephen. (2012). *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 26/E*. McGraw-Hill Publishing.
- Cellamare, B. M., Fini, P., Agostiano, A., Sortino, S., & Cosma, P. (2013). Identification of ros produced by photodynamic activity of chlorophyll/cyclodextrin inclusion

- complexes. *Photochemistry and Photobiology*, 89(2), 432–441.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01238.x>
- Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2010). Fungal biofilms in the clinical lab setting. In *Current Fungal Infection Reports* (Vol. 4, Issue 3, pp. 137–144).
<https://doi.org/10.1007/s12281-010-0020-z>
- Coldren, L. A., Corzine, S. W., & Photonics, F. (2012). *Diode Lasers and Photonic Integrated Circuits Second Edition MILAN L. MAŠANOVIĆ MAŠANOVIĆ MAŠANOVIĆ*
www.wiley.com/go/permission.
- Costa, L., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, Â., & Almeida, A. (2012). Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. In *Viruses* (Vol. 4, Issue 7, pp. 1034–1074). <https://doi.org/10.3390/v4071034>
- Csele, M. (2004). *FUNDAMENTALS OF LIGHT SOURCES AND LASERS*.
www.copyright.com.
- de Freitas, M. T. M., Soares, T. T., Aragão, M. G. B., Lima, R. A., Duarte, S., & Zanin, I. C. J. (2017). Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. In *Photomedicine and Laser Surgery* (Vol. 35, Issue 5, pp. 239–245). Mary Ann Liebert Inc.
<https://doi.org/10.1089/pho.2016.4108>
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 16, Issue 5, pp. 580–589). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>
- Devins J.C. (1956). *Mechanism of Ozone Formation in the Silent Electric Discharge*.
- Dewi Dwiyantri, R., & Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Banjarmasin Jl Mistar Cokrokusumo, H. (2016). Medical Laboratory Technology Journal DAYA HAMBAT NaCl TERHADAP PERTUMBUHAN Staphylococcus aureus. *Medical Laboratory Technology Journal*, 2(2), 42–45. <http://ejurnal-analiskesehatan.web.id>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. In *Emerging Infectious Diseases* • (Vol. 8, Issue 9). <http://www.microbelibrary.org/>
- Dyah Astuti, S., & Zainuddin, M. (2011). Potensi Blue Light Emitting Diode (LED) untuk Fotoinaktivasi Bakteri Staphylococcus aureus dengan Porfirin Endogen (The Potency of Blue Light Emitting Diode (LED) for Photoinactivation of Staphylococcus aureus Bacteria with Endogeneous Porphyrin). In *JBP* (Vol. 13, Issue 3).

- Eichner, A., Gollmer, A., Späth, A., Bäuml, W., Regensburger, J., König, B., & Maisch, T. (2015). Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using light-activated derivatives of vitamin B2. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(2), 387–396. <https://doi.org/10.1039/c4pp00285g>
- Enwemeka, C. S., Williams, D., Hollosi, S., Yens, D., & Enwemeka, S. K. (2008). Visible 405 nm SLD light photo-destroys methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40(10), 734–737. <https://doi.org/10.1002/lsm.20724>
- Fitria Helmiyati, A., Nurrahman, D., Studi, P., Fakultas, G., Keperawatan, I., & Kesehatan, D. (2010). PENGARUH KONSENTRASI TAWAS TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI GRAM POSITIF DAN NEGATIF (The Growth of Positive and Negative Gram Bacteria under a variety of Alum Concentrations). In *Jurnal Pangan dan Gizi* (Vol. 01, Issue 01). <http://jurnal.unimus.ac.id>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 623–633). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J., & Tindall, B. J. (2007). *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*. <https://doi.org/10.1601/tx.0>
- Grossweiner, L. I. (2005). *THE SCIENCE OF PHOTOTHERAPY: AN INTRODUCTION*.
- Gunardi, W. D. (2014). *Tinjauan Pustaka Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi*.
- HERLINA, N. (2015, June 1). *Isolasi dan identifikasi Staphylococcus aureus dari susu mastitis subklinis di Tasikmalaya, Jawa Barat*. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010305>
- Homenta, H., Mikrobiologi, B., Kedokteran, F., Sam, U., & Manado, R. (2016). Infeksi biofilm bakterial. In *Jurnal e-Biomedik (eBm)* (Vol. 4, Issue 1).
- Jamal, M., Khan, A. W., Hussain, T., & Andleeb, S. (2015). *Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections Mastitis (bovine and goat)-Antimicrobial resistance, and development of alternative therapy for mastitis View project*. <https://www.researchgate.net/publication/285228261>
- JWWA. (2012). *The Design Criteria for Water Supply Facilities*.
- Katz, J. (ed.), & Noyes Data Corp. NJ (USA) eng, P. R. (1980). *Ozone and chlorine dioxide technology for disinfection of drinking water*. Park Ridge, N.J. (USA) NDC.

- Konoralma, K. (2019). IDENTIFIKASI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI NOSOKOMIAL DI RUMAH SAKIT UMUM GMIM PANCARAN KASIH MANADO. In *Jurnal KESMAS* (Vol. 8, Issue 1).
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
- Lanzani, Guglielmo. (2006). *Photophysics of molecular materials : from single molecules to single crystals*. Wiley-VCH.
- Makled, A. F., Salem, E. H., Elbrolosy, A. M., & Makled, A. (2017). Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance Pattern of Uropathogenic E. coli: Comparison of Phenotypic and Molecular Methods. In *Egyptian Journal of Medical Microbiology* (Vol. 26, Issue 2).
- Maslennikov, O. v, Kontorshchikova, C. N., Gribkova, I. A., & Novgorod, N. (2008). *O 3 MINISTRY OF HEALTH SERVICE OF THE RUSSIAN FEDERATION THE STATE MEDICAL ACADEMY OF NIZHNY NOVGOROD OZONE THERAPY IN PRACTICE HEALTH MANUAL*.
- McConnell, J. C., & Jin, J. J. (2008). Stratospheric ozone chemistry. *Atmosphere - Ocean*, 46(1), 69–92. <https://doi.org/10.3137/ao.460104>
- Neville Angela. (2020). *STERILIZATION GUIDELINES THIRD EDITION 2020*.
- Niemz M.H. (2019). *Medical Applications of Lasers in Laser-Tissue Interaction*.
- Nitzan, Y., Salmon-Divon, M., Shporen, E., & Malik, Z. (2004). ALA induced photodynamic effects on Gram positive and negative bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3(5), 430–435. <https://doi.org/10.1039/b315633h>
- Obadi, M., Zhu, K.-X., Peng, W., Sulieman, A., Mohammed, K., & Zhou, H.-M. (2018). Effects of ozone treatment on the physicochemical and functional properties of whole grain flour. *Journal of Cereal Science*, 81. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.008>
- Onyango, A. N. (2016). Endogenous generation of singlet oxygen and ozone in human and animal tissues: Mechanisms, biological significance, and influence of dietary components. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2398573>
- Panebianco, F., Rubiola, S., & di Ciccio, P. A. (2022). The Use of Ozone as an Eco-Friendly Strategy against Microbial Biofilm in Dairy Manufacturing Plants: A Review. In

Microorganisms (Vol. 10, Issue 1). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10010162>

Papageorgiou, P., Katsambas, A., & Chu, A. (2000). Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 142).

Prasad. (2004). *Nanophotonics*. www.copyright.com.

Purbowati, R., & Biomedik, B. (2016). HUBUNGAN BIOFILM DENGAN INFEKSI : IMPLIKASI PADA KESEHATAN MASYARAKAT DAN STRATEGI MENGONTROLNYA. In *Ilmiah Kedokteran* (Vol. 5).

Rizkia, N. (2014). *Sintesis dan Karakterisasi Tetra (p-dimetilaminofenil) porfirin dengan Metode Microwave-Assisted Organic Synthesis (MAOS)*.

Rusdi, U. D., Suliasih, D. N., Jurusan, D., Fakultas, T., Unpad, P., Kopertis, D., & Iv, W. (2002). *OZONISASI DAN KUALITAS AIR SUSU*.

Scrollavezza, P., Ablondi, M., Pogliacomì, B., Dall'aglio, R., Poldi, R., & Pezzoli, G. (1997). *Ozone treatment in mastitis, metritis and retention of fetal membranes in the cow*.

Slamet, L., & Bidang Aplikasi Klimatologi dan Lingkungan, P. (2010). *PEMANFAATAN POTENSI OZON DI INDONESIA*.

STEPHENS, N. A. T., & SUMNER, D. (2002). Renalcids as Fossilized Biofilm Clusters. *Palaios*, 17, 225–236. [https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2002\)017<0225:RAFBC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2002)017<0225:RAFBC>2.0.CO;2)

Sun Haiyin. (2012). *Laser Diode Beam Basics, Manipulations and Characterizations*. <http://www.springer.com/series/8902>

Sunarjo L. (2007). Modul Teori Sterilisasi. *Jurusan Kesehata Gigi Politeknik Kesehatan Semarang*.

Tanassatha N.A. (2019). Optimasi Ozon untuk Inaktivasi Biofilm *Pseudomonas Aeruginosa* menggunakan Aktivator Laser Dioda Biru. *Perpustakaan Universitas Airlangga*.

Tayal, R., Baveja, S., & De, A. (2015). Analysis of biofilm formation and antibiotic susceptibility pattern of uropathogens in patients admitted in a tertiary care hospital in India. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 4, 247. <https://doi.org/10.4103/2278-344X.167648>

- Tietjen Linda, Bossemeyer Debora, & McIntosh Noel. (2016). Panduan Pencegahan Infeksi untuk Fasilitas Pelayanan Kesehatan dengan Sumber Daya Terbatas. *PT Bina Pustaka Sarowono Prawirohardjo*.
- Vatansever, F., de Melo, W. C. M. A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N. A., Yin, R., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 6, pp. 955–989). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026>
- Xiao, Y., Tian, J. L., Li, J. K., & Zhang, J. S. (2006). CT-guided ozone injection for the treatment of cervical disc herniation. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 5, 109–114.
- Yankovsky, I. (2016). *Evaluation of photodynamic activity of chlorine-type photosensitizers with β -cyclodextrins nanovectors*. <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>
- Young, S. B., & Setlow, P. (2004). Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1133–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02236.x>
- Zafhira N.A. (2012). Pengaruh Waktu Inkubasi dan Dosis Ozon Pada Desinfeksi Hama Bakteri *Xanthomonas Oryzae* dengan Kombinasi Proses Ozonasi dan Adsorpsi dengan Zeolit Alam. *Skripsi Universitas Indonesia*.

LAMPIRAN**Karakterisasi Laser Dioda Merah****1. Karakterisasi Daya Terhadap Panjang Gelombang**

Panjang gelombang (nm)	Daya (mW)
661	31.13
661.1	31.14
661.2	31.16
661.3	31.17
661.4	31.18
661.5	31.2
661.6	31.22
661.7	31.23
661.8	31.25
661.9	31.26
662	31.28
662.1	31.3
662.2	31.3
662.3	31.32
662.4	31.34
662.5	31.36
662.6	31.37
662.7	31.39
662.8	31.4
662.9	31.42
663	31.43
663.1	31.44
663.1	31.46
663.2	31.49
663.2	31.51
663.3	31.53
663.3	31.54
663.4	31.55
663.4	31.58
663.5	31.59
663.5	31.62

663.6	31.63
663.7	31.64
663.7	31.66
663.7	31.67
663.8	31.69
663.8	31.71
663.9	31.73
663.9	31.73
664	31.7
664.1	31.7
664.1	31.69
664.2	31.68
664.2	31.67
664.3	31.66
664.3	31.65
664.4	31.64
664.4	31.62
664.5	31.61
664.5	31.6
664.6	31.59
664.6	31.58
664.7	31.56
664.7	31.55
664.7	31.54
664.8	31.52
664.8	31.5
664.8	31.49
664.9	31.48
664.9	31.48
664.9	31.47
664.9	31.46
665	31.45
665	31.44
665	31.43
665.1	31.41
665.1	31.4
665.2	31.39
665.2	31.38
665.2	31.38

665.2	31.36
665.2	31.35
665.3	31.34
665.3	31.33
665.3	31.32
665.4	31.31
665.4	31.3
665.4	31.3
665.4	31.29
665.5	31.28
665.5	31.27
665.5	31.26
665.5	31.25
665.6	31.26
665.6	31.25
665.6	31.24
665.6	31.23
665.6	31.21
665.7	31.2
665.7	31.19
665.7	31.18
665.7	31.17
665.7	31.15
665.8	31.16
665.8	31.15
665.8	31.14
665.8	31.12
665.8	31.11
665.9	31.1
665.9	31.09
665.9	31.09
665.9	31.08
665.9	31.08
666	31.07
666	31.07
666	31.07
666	31.07
666	31.06
666	31.06

666	31.06
666	31.06
666	31.06
666	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
665.8	31.2
665.8	31.19
665.8	31.18
665.8	31.17
665.8	31.15
665.8	31.16
665.8	31.15
665.8	31.14
665.8	31.12
665.8	31.11
665.8	31.1
665.8	31.09
665.9	31.09
665.9	31.08
665.9	31.08
666	31.07
666	31.07
666	31.07
666	31.07
666	31.06
666	31.06
666	31.06
666	31.06
666	31.06
666	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06
666.1	31.06

666.1	31.06
666.1	31.06

2. Stabilitas Intensitas Daya

1	0.2389
2	0.2389
3	0.2389
4	0.2389
5	0.2389
6	0.2389
7	0.2389
8	0.2389
9	0.2389
10	0.2389
11	0.2388
12	0.2389
13	0.2389
14	0.2388
15	0.2389
16	0.2389
17	0.2389
18	0.2389
19	0.2388
20	0.2389
21	0.2389
22	0.2388
23	0.2388
24	0.2389
25	0.2389
26	0.2389
27	0.2389
28	0.2389
29	0.2389
30	0.2389
31	0.2389
32	0.2389
33	0.2389

34	0.2389
35	0.2389
36	0.2389
37	0.2388
38	0.2389
39	0.2389
40	0.2389
41	0.2389
42	0.2389
43	0.2389
44	0.2389
45	0.2389
46	0.2389
47	0.2389
48	0.2389
49	0.2389
50	0.2389
51	0.2389
52	0.2389
53	0.2389
54	0.2389
55	0.2389
56	0.2389
57	0.2389
58	0.2389
59	0.2389
60	0.2389
61	0.2389
62	0.2389
63	0.2389
64	0.2389
65	0.2389
66	0.2389
67	0.2389
68	0.2389
69	0.2389
70	0.2389
71	0.2389
72	0.2389

73	0.2389
74	0.2389
75	0.2389
76	0.2389
77	0.2389
78	0.2389
79	0.2389
80	0.2389
81	0.2389
82	0.2389
83	0.2389
84	0.2389
85	0.2389
86	0.2389
87	0.2389
88	0.2389
89	0.2389
90	0.2389
91	0.2389
92	0.2389
93	0.2389
94	0.2389
95	0.2389
96	0.2389
97	0.2389
98	0.2389
99	0.2389
100	0.2389
101	0.2389
102	0.2389
103	0.2389
104	0.2389
105	0.2389
106	0.2389
107	0.2389
108	0.2389
109	0.2389
110	0.2389
111	0.2389

112	0.2389
113	0.2389
114	0.2389
115	0.2389
116	0.2389
117	0.2389
118	0.2389
119	0.2389
120	0.2389
121	0.2389
122	0.2389
123	0.2389
124	0.2389
125	0.2389
126	0.2389
127	0.2389
128	0.2389
129	0.2389
130	0.2389
131	0.2389
132	0.2389
133	0.2389
134	0.2389
135	0.2389
136	0.2389
137	0.2389
138	0.2389
139	0.2389
140	0.2389
141	0.2389
142	0.2389
143	0.2389
144	0.2389
145	0.2389
146	0.2389
147	0.2388
148	0.2389
149	0.2389
150	0.2389

Standar deviasi: $2,11 \times 10^{-5}$

3. Berkas Cahaya

Jarak (cm)	dx (mm)	dy (mm)	Luas Berkas (cm ²)
1	4	4	0.13

4. Temperatur

Waktu (s)	Temperatur (°C)
1	25.6
2	25.6
3	25.6
4	25.5
5	25.6
6	25.6
7	25.6
8	25.5
9	25.6
10	25.6
11	25.6
12	25.5
13	25.5
14	25.5
15	25.6
16	25.5
17	25.6
18	25.6
19	25.6
20	25.5
21	25.6
22	25.6
23	25.5
24	25.6
25	25.5
26	25.6

27	25.6
28	25.5
29	25.6
30	25.6
31	25.6
32	25.6
33	25.6
34	25.6
35	25.6
36	25.5
37	25.5
38	25.5
39	25.5
40	25.5
41	25.5
42	25.5
43	25.5
44	25.5
45	25.5
46	25.5
47	25.5
48	25.5
49	25.5
50	25.5
51	25.5
52	25.5
53	25.5
54	25.6
55	25.5
56	25.6
57	25.5
58	25.5
59	25.5
60	25.5
61	25.5
62	25.5
63	25.5
64	25.5
65	25.6

66	25.5
67	25.5
68	25.5
69	25.5
70	25.5
71	25.5
72	25.6
73	25.5
74	25.5
75	25.5
76	25.5
77	25.6
78	25.5
79	25.5
80	25.5
81	25.5
82	25.6
83	25.5
84	25.6
85	25.6
86	25.6
87	25.5
88	25.5
89	25.5
90	25.5
91	25.5
92	25.5
93	25.5
94	25.5
95	25.5
96	25.5
97	25.5
98	25.5
99	25.5
100	25.5
101	25.5
102	25.5
103	25.5
104	25.5

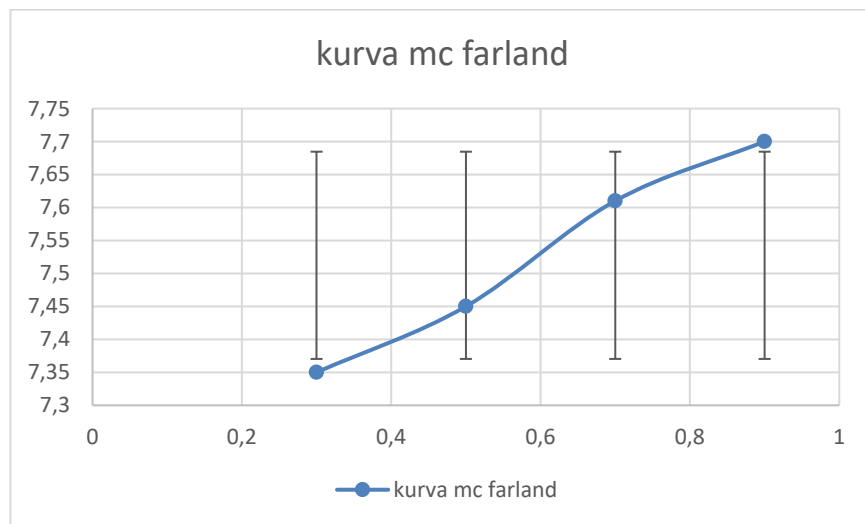
105	25.5
106	25.5
107	25.5
108	25.5
109	25.5
110	25.5
111	25.5
112	25.6
113	25.5
114	25.5
115	25.5
116	25.6
117	25.5
118	25.5
119	25.5
120	25.5
121	25.5
122	25.5
123	25.6
124	25.5
125	25.5
126	25.5
127	25.5
128	25.5
129	25.5
130	25.5
131	25.5
132	25.5
133	25.5
134	25.5
135	25.5
136	25.6
137	25.5
138	25.5
139	25.5
140	25.5
141	25.5
142	25.5
143	25.5

144	25.5
145	25.5
146	25.5
147	25.5
148	25.6
149	25.6
150	25.5

LAMPIRAN 2

5. Hasil Uji Standar Mc. Furland Pada Bakteri *Staphylococcus Aureus*

OD	Jumlah Koloni	CFU/ml	Log CFU/ml
0,9	505	50500000	7,70
0,7	410	41000000	7,61
0,5	279	27900000	7,45
0,3	207	20700000	7,32



Grafik hubungan CFU/ml terhadap nilai OD pada panjang gelombang 595 nm

6. Standar Pengenceran Bakteri *Staphylococcus Aureus*

Pengenceran Ke-	OD	Jumlah Koloni Bakteri					Rerata
		1	2	3	4	5	
1	0,200	1080	1000	1052	1085	1079	1059,2
2	0,090	824	755	834	843	785	808,2
3	0,080	744	657	698	735	700	706,8
4	0,077	628	635	500	526	578	573,4
5	0,073	225	236	227	261	243	238,4
6	0,070	93	100	128	156	143	124,0
7	0,070	79	49	58	53	67	61,2
8	0,068	7	25	15	16	21	16,8
9	0,065	3	4	3	5	6	4,2
10	0,014	2	2	1	2	1	1,6

LAMPIRAN 3**7. Data Hasil Kelompok Kontrol Bakteri *Staphylococcus Aureus***

Jenis Perlakuan	OD	CFU/ml	Log CFU/ml
Control	2.385	20300000	7.307496038

8. Data Hasil Kelompok Perlakuan Bakteri *Staphylococcus Aureus* menggunakan Laser

Jenis Treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase Reduksi	Rata-rata	SD
Laser 10	0.662	0.9111	4001131.86	6.602182864	80.29	75.86	5.96
	0.837		4347764.57	6.638266019	78.58		
	0.853		4376061.12	6.641083379	78.44		
	0.964		4545840.41	6.657614185	77.61		
	0.966		4545840.41	6.657614185	77.61		
	1.252		7693831.35	6.886142662	62.10		
	0.748		4234578.38	6.626810176	79.14		
	0.837		4354838.71	6.638972075	78.55		
	1.146		6547821.17	6.81609681	67.74		
	0.846		4361912.85	6.639676984	78.51		

8

Jenis Treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase Reduksi	Rata-rata	SD
Laser 20	0.49	0.553	2423599.32	6.384460822	88.06	83.89	3.68
	0.63		3979909.45	6.599873191	80.39		
	0.57		3760611.21	6.575258436	81.47		
	0.55		3711092.25	6.56950175	81.72		
	0.4		1992076.97	6.299306115	90.19		
	0.74		4220430.11	6.625356713	79.21		
	0.58		3788907.75	6.578514031	81.34		
	0.54		3322014.71	6.521401551	83.64		
	0.52		2798528.58	6.446929747	86.21		
	0.51		2699490.66	6.431281829	86.70		

Jenis Treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase Reduksi	Rata-rata	SD
Laser 30	0.496	0.553	2536785.51	6.4042833748	87.50	84.53	4.42

	0.49		2232597.62	6.348810457	89.00		
	0.478		2423599.32	6.384460822	88.06		
	0.692		4163837.01	6.619493721	79.49		
	0.704		4340690.44	6.637558815	78.62		
	0.55		2770232.03	6.442516146	86.35		
	0.43		2020373.51	6.305431666	90.05		
	0.574		3781833.62	6.577702418	81.37		
	0.53		2897566.5	6.462033412	85.73		
	0.76		4234578.38	6.626810176	79.14		

Jenis Treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase Reduksi	Rata-rata	SD
Laser 40	0.539	0.5045	2720713.07	6.434682743	86.60	87.50	3.33
	0.488		2338709.68	6.368976313	88.48		
	0.476		1970854.56	6.294654577	90.29		
	0.583		3067345.78	6.486762736	84.89		
	0.547		3131013.02	6.495684874	84.58		
	0.411		1518109.79	6.181303181	92.52		
	0.523		2840973.4	6.453467167	86.01		
	0.585		3739388.79	6.572800622	81.58		
	0.446		2027447.65	6.306949649	90.01		
	0.447		2027447.65	6.306949649	90.01		

9. Data Hasil Kelompok Perlakuan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Menggunakan Ozon

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Ozon 10	1.834	1.6299	10526316	7.0222764	48.15	52.95	4.98
	1.552		9762309	6.98955255	51.91		
	1.491		9391624.2	6.97274071	53.74		
	1.526		9731182.8	6.98816563	52.06		
	1.524		9731182.8	6.98816563	52.06		
	1.643		9858517.3	6.9938116	51.44		
	1.728		10007074	7.00030712	50.70		
	1.879		10870119	7.03623429	46.45		
	1.677		7594793.4	6.88051597	62.59		
	1.445		8047538.2	6.90566305	60.36		

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Ozon 20	1.021	1.295	4708545.6	6.67288678	76.81	64.57	10.94
	1.562		9770798	6.98993003	51.87		
	1.501		9695812.1	6.98658419	52.24		
	1.645		9864176.6	6.99406084	51.41		
	1.371		7996604.4	6.90290561	60.61		
	1.096		4889643.5	6.68927719	75.91		
	1.425		8039049.2	6.90520469	60.40		
	1.212		7361346.9	6.86695729	63.74		
	1.021		4708545.6	6.67288678	76.81		
	1.096		4885399	6.68890004	75.93		

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Ozon 30	1.133	1.1866	6417657.1	6.80737651	68.39	65.99	9.67
	1.391		7998019.2	6.90298244	60.60		
	0.726		4199207.7	6.62316736	79.31		
	0.951		4510469.7	6.65422177	77.78		
	1.31		7998019.2	6.90298244	60.60		
	1.466		8068760.6	6.90680683	60.25		
	1.574		9787775.9	6.99068402	51.78		
	1.304		7969722.7	6.90144321	60.74		
	0.726		4213345	6.62462702	79.24		
	1.285		7877758.9	6.89640269	61.19		

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Ozon 40	1.032	1.2047	4722693.8	6.67418979	76.74	67.80	7.57
	0.993		4623655.9	6.66498551	77.22		
	1.222		5932371.3	6.77322832	70.78		
	1.293		7903225.8	6.89780439	61.07		
	1.117		5741369.6	6.7590155	71.72		
	1.367		7990945.1	6.90259815	60.64		
	1.437		8040464.1	6.90528112	60.39		
	1.28		7835314.1	6.89405641	61.40		
	1.013		4673174.9	6.66961203	76.98		
	1.293		7906055.5	6.89795986	61.05		

10. Data Hasil Kelompok Perlakuan Bakteri *Staphylococcus Aureus* menggunakan Laser + Ozon

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Laser Ozon 10	0.265	0.2202	1702037.35	6.2309691	91.62	94.20	2.45
	0.238		1595925.3	6.2030126	92.14		
	0.171		796547.821	5.9012119	96.08		
	0.19		796547.821	5.9012119	96.08		
	0.2		1001697.79	6.0007367	95.07		
	0.23		1178551.22	6.0713485	94.19		
	0.185		796547.821	5.9012119	96.08		
	0.307		1815223.54	6.2589301	91.06		
	0.265		1702037.35	6.2309691	91.62		
	0.151		386247.878	5.5868661	98.10		

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Laser Ozon 20	0.158	0.1979	449915.11	5.6531306	97.78	95.07	3.27
	0.109		223542.728	5.3493605	98.90		
	0.101		200000	5.30103	99.01		
	0.299		1794001.13	6.2538227	91.16		
	0.141		301358.234	5.4790831	98.52		
	0.255		1666666.67	6.2218488	91.79		
	0.202		1008771.93	6.003793	95.03		
	0.213		1065365.03	6.0274984	94.75		
	0.244		1624221.84	6.2106453	92.00		
	0.257		1680814.94	6.2255199	91.72		

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Laser Ozon 30	0.27	0.1775	1709111.49	6.2327704	91.58	95.94	2.49
	0.239		1581777.02	6.1991453	92.21		
	0.162		676287.493	5.8301314	96.67		
	0.152		393322.015	5.5947483	98.06		
	0.202		1008771.93	6.003793	95.03		
	0.11		230616.865	5.3628911	98.86		
	0.176		803621.958	5.9050518	96.04		
	0.179		796547.821	5.9012119	96.08		

	0.172		796547.821	5.9012119	96.08		
	0.113		237691.002	5.3760127	98.83		

Jenis treatment	OD	Rerata	CFU/ml	Log CFU/ml	Presentase reduksi	Rata-rata	SD
Laser Ozon 40	0.134	0.1516	301358.234	5.4790831	98.52	97.47	1.64
	0.198		902659.875	5.9555241	95.55		
	0.151		315506.508	5.4990083	98.45		
	0.169		711658.178	5.8522714	96.49		
	0.101		202320.317	5.3060395	99.00		
	0.219		1107809.85	6.0444652	94.54		
	0.125		287209.96	5.4581995	98.59		
	0.103		202320.317	5.3060395	99.00		
	0.144		301358.234	5.4790831	98.52		
	0.172		803621.958	5.9050518	96.04		

LAMPIRAN 4

11. Hasil Uji *One Way Anova* pada Bakteri *S. Aureus* untuk kelompok perlakuan laser

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Reduksi Laser
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	62.1925
	Std. Deviation	11.44106
	Absolute	.127
Most Extreme Differences	Positive	.093
	Negative	-.127
Kolmogorov-Smirnov Z		.803
Asymp. Sig. (2-tailed)		.540

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

Reduksi Laser

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10.00	10	47.3450	4.86379	1.53806	43.8657	50.8243	38.02	57.53
20.00	10	58.7410	4.41455	1.39600	55.5830	61.8990	50.56	68.44
30.00	10	66.3050	3.30238	1.04430	63.9426	68.6674	58.30	68.55
40.00	10	76.3790	3.54737	1.12178	73.8414	78.9166	70.88	80.81
Total	40	62.1925	11.44106	1.80899	58.5335	65.8515	38.02	80.81

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Reduksi_Laser

Tukey HSD

(I) Laser	(J) Laser	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
10.00	20.00	-11.39600*	1.82530	.000	-16.3119	-6.4801
	30.00	-18.96000*	1.82530	.000	-23.8759	-14.0441
	40.00	-29.03400*	1.82530	.000	-33.9499	-24.1181
20.00	10.00	11.39600*	1.82530	.000	6.4801	16.3119
	30.00	-7.56400*	1.82530	.001	-12.4799	-2.6481
	40.00	-17.63800*	1.82530	.000	-22.5539	-12.7221
30.00	10.00	18.96000*	1.82530	.000	14.0441	23.8759
	20.00	7.56400*	1.82530	.001	2.6481	12.4799
	40.00	-10.07400*	1.82530	.000	-14.9899	-5.1581
40.00	10.00	29.03400*	1.82530	.000	24.1181	33.9499
	20.00	17.63800*	1.82530	.000	12.7221	22.5539
	30.00	10.07400*	1.82530	.000	5.1581	14.9899

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Test of Homogeneity of Variances

Reduksi_Laser

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.075	3	36	.973

Reduksi_LaserTukey HSD^a

Laser	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10.00	10	47.3450			
20.00	10		58.7410		
30.00	10			66.3050	
40.00	10				76.3790
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

12. Hasil Uji *One Way Anova* pada Bakteri *S. Aureus* untuk kelompok perlakuan ozon

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Reduksi Ozon
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	46.7243
	Std. Deviation	15.91982
	Absolute	.191
Most Extreme Differences	Positive	.124
	Negative	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z		1.206
Asymp. Sig. (2-tailed)		.109

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Reduksi Ozon
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	46.7243
	Std. Deviation	15.91982
	Absolute	.191
Most Extreme Differences	Positive	.124
	Negative	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z		1.206
Asymp. Sig. (2-tailed)		.109

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Reduksi Ozon

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.537	3	36	.222

Tes post hoc**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Reduksi_Ozon

Tukey HSD

(I) Ozon	(J) Ozon	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
10.00	20.00	-18.13700*	2.77994	.000	-25.6240	-10.6500
	30.00	-29.05400*	2.77994	.000	-36.5410	-21.5670
	40.00	-39.35400*	2.77994	.000	-46.8410	-31.8670
20.00	10.00	18.13700*	2.77994	.000	10.6500	25.6240
	30.00	-10.91700*	2.77994	.002	-18.4040	-3.4300
	40.00	-21.21700*	2.77994	.000	-28.7040	-13.7300
30.00	10.00	29.05400*	2.77994	.000	21.5670	36.5410
	20.00	10.91700*	2.77994	.002	3.4300	18.4040
	40.00	-10.30000*	2.77994	.004	-17.7870	-2.8130
40.00	10.00	39.35400*	2.77994	.000	31.8670	46.8410
	20.00	21.21700*	2.77994	.000	13.7300	28.7040
	30.00	10.30000*	2.77994	.004	2.8130	17.7870

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Reduksi_OzonTukey HSD^a

Ozon	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10.00	10	25.0880			
20.00	10		43.2250		

30.00	10			54.1420	
40.00	10				64.4420
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

13. Hasil Uji *One Way Anova* pada Bakteri *S. Aureus* untuk kelompok perlakuan laser dan ozon

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Reduksi_Laser _Ozon
N		40
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	78.0825
	Std. Deviation	13.66014
	Absolute	.173
Most Extreme Differences	Positive	.121
	Negative	-.173
Kolmogorov-Smirnov Z		1.095
Asymp. Sig. (2-tailed)		.182

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

Reduksi Laser Ozon

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10.00	10	60.8470	5.48654	1.73500	56.9222	64.7718	52.13	65.00
20.00	10	72.0800	4.67460	1.47824	68.7360	75.4240	62.45	76.00
30.00	10	85.0700	4.67687	1.47896	81.7244	88.4156	71.89	87.00
40.00	10	94.3330	4.12264	1.30369	91.3838	97.2822	85.17	97.00
Total	40	78.0825	13.66014	2.15986	73.7138	82.4512	52.13	97.00

Test of Homogeneity of Variances

Reduksi_Laser_Ozon

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.926	3	36	.438

Tes post hoc**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Reduksi_Laser_Ozon

Tukey HSD

(I) Laser_Ozon	(J) Laser_Ozon	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
10.00	20.00	-11.23300*	2.13100	.000	-16.9723	-5.4937
	30.00	-24.22300*	2.13100	.000	-29.9623	-18.4837
	40.00	-33.48600*	2.13100	.000	-39.2253	-27.7467
20.00	10.00	11.23300*	2.13100	.000	5.4937	16.9723
	30.00	-12.99000*	2.13100	.000	-18.7293	-7.2507
	40.00	-22.25300*	2.13100	.000	-27.9923	-16.5137
30.00	10.00	24.22300*	2.13100	.000	18.4837	29.9623
	20.00	12.99000*	2.13100	.000	7.2507	18.7293
	40.00	-9.26300*	2.13100	.001	-15.0023	-3.5237
40.00	10.00	33.48600*	2.13100	.000	27.7467	39.2253
	20.00	22.25300*	2.13100	.000	16.5137	27.9923
	30.00	9.26300*	2.13100	.001	3.5237	15.0023

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Reduksi_Laser_OzonTukey HSD^a

Laser_Ozon	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10.00	10	60.8470			
20.00	10		72.0800		
30.00	10			85.0700	
40.00	10				94.3330

Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000
------	--	-------	-------	-------	-------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

14. Hasil Uji Perbandingan *One Way Anova* Antar Perlakuan

Laser vs Ozon pada waktu 10s

Descriptives

Reduksi_10s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	47.3450	4.86379	1.53806	43.8657	50.8243	38.02	57.53
Ozon	10	25.0880	4.81181	1.52163	21.6458	28.5302	20.91	31.92
Total	20	36.2165	12.35049	2.76165	30.4363	41.9967	20.91	57.53

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_10s	Based on Mean	1.452	1	18	.244
	Based on Median	.321	1	18	.578
	Based on Median and with adjusted df	.321	1	17.896	.578
	Based on trimmed mean	1.380	1	18	.255

ANOVA

Reduksi_10s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2476.870	1	2476.870	105.827	.000
Within Groups	421.289	18	23.405		
Total	2898.159	19			

Laser vs Ozon pada waktu 20s**Descriptives**

Reduksi_20s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	58.7410	4.41455	1.39600	55.5830	61.8990	50.56	68.44
Ozon	10	43.2250	6.83929	2.16277	38.3325	48.1175	30.11	46.66
Total	20	50.9830	9.73358	2.17649	46.4275	55.5385	30.11	68.44

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_20s	Based on Mean	2.447	1	18	.135
	Based on Median	.115	1	18	.738
	Based on Median and with adjusted df	.115	1	13.619	.739
	Based on trimmed mean	1.688	1	18	.210

ANOVA

Reduksi_20s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1203.731	1	1203.731	36.331	.000
Within Groups	596.377	18	33.132		
Total	1800.108	19			

Laser vs Ozon pada waktu 30s**Descriptives**

Reduksi_30s

N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		

Laser	10	66.3050	3.30238	1.04430	63.9426	68.6674	58.30	68.55
Ozon	10	54.1420	4.12365	1.30401	51.1921	57.0919	50.06	61.77
Total	20	60.2235	7.22162	1.61480	56.8437	63.6033	50.06	68.55

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_30s	Based on Mean	1.871	1	18	.188
	Based on Median	1.464	1	18	.242
	Based on Median and with adjusted df	1.464	1	17.818	.242
	Based on trimmed mean	2.005	1	18	.174

ANOVA

Reduksi_30s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	739.693	1	739.693	53.005	.000
Within Groups	251.192	18	13.955		
Total	990.885	19			

Laser vs Ozon pada waktu 40s**Descriptives**

Reduksi_40s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	76.3790	3.54737	1.12178	73.8414	78.9166	70.88	80.81
Ozon	10	64.4420	8.22360	2.60053	58.5592	70.3248	51.74	77.25
Total	20	70.4105	8.68866	1.94284	66.3441	74.4769	51.74	80.81

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_40s	Based on Mean	5.882	1	18	.026
	Based on Median	1.813	1	18	.195
	Based on Median and with adjusted df	1.813	1	10.759	.206
	Based on trimmed mean	5.859	1	18	.026

ANOVA

Reduksi_40s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	712.460	1	712.460	17.765	.001
Within Groups	721.903	18	40.106		
Total	1434.362	19			

Laser vs Laser+Ozon pada waktu 10s**Descriptives**

Reduksi_10s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	47.3450	4.86379	1.53806	43.8657	50.8243	38.02	57.53
Laser+Ozon	10	60.8470	5.48654	1.73500	56.9222	64.7718	52.13	65.55
Total	20	54.0960	8.56967	1.91624	50.0853	58.1067	38.02	65.55

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_10s	Based on Mean	1.539	1	18	.231
	Based on Median	.298	1	18	.592
	Based on Median and with adjusted df	.298	1	17.640	.592
	Based on trimmed mean	1.331	1	18	.264

ANOVA

Reduksi_10s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	911.520	1	911.520	33.912	.000
Within Groups	483.826	18	26.879		
Total	1395.346	19			

Laser vs Laser+Ozon pada waktu 20s**Descriptives**

Reduksi_20s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	58.7410	4.41455	1.39600	55.5830	61.8990	50.56	68.44
Laser+Ozon	10	72.0800	4.67460	1.47824	68.7360	75.4240	62.45	76.49
Total	20	65.4105	8.14896	1.82216	61.5967	69.2243	50.56	76.49

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_20s	Based on Mean	.558	1	18	.465
	Based on Median	.182	1	18	.675
	Based on Median and with adjusted df	.182	1	17.859	.675
	Based on trimmed mean	.500	1	18	.489

ANOVA

Reduksi_20s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	889.645	1	889.645	43.040	.000
Within Groups	372.061	18	20.670		
Total	1261.705	19			

Laser vs Laser+Ozon pada waktu 30s**Descriptives**

Reduksi_30s

N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	Minimum	Maximum
---	------	----------------	------------	----------------------------------	---------	---------

					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	66.3050	3.30238	1.04430	63.9426	68.6674	58.30	68.55
Laser+Ozon	10	85.0700	4.67687	1.47896	81.7244	88.4156	71.89	87.92
Total	20	75.6875	10.40151	2.32585	70.8194	80.5556	58.30	87.92

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_30s	Based on Mean	.043	1	18	.839
	Based on Median	.001	1	18	.979
	Based on Median and with adjusted df	.001	1	15.668	.979
	Based on trimmed mean	.003	1	18	.959

ANOVA

Reduksi_30s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1760.626	1	1760.626	107.425	.000
Within Groups	295.010	18	16.389		
Total	2055.636	19			

Laser vs Laser+Ozon pada waktu 40s**Descriptives**

Reduksi_40s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Laser	10	76.3790	3.54737	1.12178	73.8414	78.9166	70.88	80.81
Laser+Ozon	10	94.3330	4.12264	1.30369	91.3838	97.2822	85.17	97.74
Total	20	85.3560	9.94181	2.22306	80.7031	90.0089	70.88	97.74

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_40s	Based on Mean	.072	1	18	.791
	Based on Median	.101	1	18	.754
	Based on Median and with adjusted df	.101	1	13.874	.756

Based on trimmed mean	.011	1	18	.919
-----------------------	------	---	----	------

ANOVA

Reduksi_40s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1611.731	1	1611.731	108.974	.000
Within Groups	266.220	18	14.790		
Total	1877.951	19			

Ozon vs Laser+Ozon pada waktu 10s**Descriptives**

Reduksi_10s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Ozon	10	25.0880	4.81181	1.52163	21.6458	28.5302	20.91	31.92
Laser+Ozon	10	60.8470	5.48654	1.73500	56.9222	64.7718	52.13	65.55
Total	20	42.9675	19.01915	4.25281	34.0663	51.8687	20.91	65.55

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_10s	Based on Mean	.090	1	18	.768
	Based on Median	.000	1	18	1.000
	Based on Median and with adjusted df	.000	1	17.918	1.000
	Based on trimmed mean	.044	1	18	.836

ANOVA

Reduksi_10s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6393.530	1	6393.530	240.107	.000
Within Groups	479.300	18	26.628		

Total	6872.831	19			
-------	----------	----	--	--	--

Ozon vs Laser+Ozon pada waktu 20s**Descriptives**

Reduksi_20s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Ozon	10	43.2250	6.83929	2.16277	38.3325	48.1175	30.11	46.66
Laser+Ozon	10	72.0800	4.67460	1.47824	68.7360	75.4240	62.45	76.49
Total	20	57.6525	15.86241	3.54694	50.2287	65.0763	30.11	76.49

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_20s	Based on Mean	1.068	1	18	.315
	Based on Median	.002	1	18	.965
	Based on Median and with adjusted df	.002	1	14.357	.965
	Based on trimmed mean	.632	1	18	.437

ANOVA

Reduksi_20s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4163.055	1	4163.055	121.323	.000
Within Groups	617.649	18	34.314		
Total	4780.704	19			

Ozon vs Laser+Ozon pada waktu 30s**Descriptives**

Reduksi_30s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Ozon	10	54.1420	4.12365	1.30401	51.1921	57.0919	50.06	61.77

Laser+Ozon	10	85.0700	4.67687	1.47896	81.7244	88.4156	71.89	87.92
Total	20	69.6060	16.43585	3.67517	61.9138	77.2982	50.06	87.92

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_30s	Based on Mean	.493	1	18	.492
	Based on Median	.816	1	18	.378
	Based on Median and with adjusted df	.816	1	14.760	.381
	Based on trimmed mean	.816	1	18	.378

ANOVA

Reduksi_30s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4782.706	1	4782.706	246.039	.000
Within Groups	349.899	18	19.439		
Total	5132.604	19			

Ozon vs Laser+Ozon pada waktu 40s**Descriptives**

Reduksi_40s

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Ozon	10	64.4420	8.22360	2.60053	58.5592	70.3248	51.74	77.25
Laser+Ozon	10	94.3330	4.12264	1.30369	91.3838	97.2822	85.17	97.74
Total	20	79.3875	16.58943	3.70951	71.6234	87.1516	51.74	97.74

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Reduksi_40s	Based on Mean	4.552	1	18	.047
	Based on Median	1.967	1	18	.178
	Based on Median and with adjusted df	1.967	1	14.426	.182
	Based on trimmed mean	4.769	1	18	.042

ANOVA

Reduksi_40s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4467.359	1	4467.359	105.582	.000
Within Groups	761.614	18	42.312		
Total	5228.974	19			

LAMPIRAN 5

