



**ULTRASONIK OZON UNTUK MEMBUNUH METHICILLIN
RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA IN
VITRO MELALUI STRES MEKANIK, KAVITASI DAN
EFEK KIMIA**

DISERTASI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor**



Oleh :

Mas Mansyur

NIM. 117070100011028

**PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
KEKHUSUSAN BIOMEDIK**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2018

DISERTASI

ULTRASONIK OZON UNTUK MEMBUNUH *METHICILLIN RESISTANT Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA *IN VITRO* MELALUI STRES MEKANIK, KAVITASI DAN EFEK KIMIA

Oleh:
MAS MANSYUR

Dipertahankan di Depan Penguji
Pada Tanggal : 2 Mei 2018
Dan Dinyatakan Memenuhi Syarat

Komisi Pembimbing



Prof. Dr. dr. Edi Widjajanto, MS, SpPK (K)
Promotor


Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK (K)
Ko Promotor I


Dr. Ir. Erni Yudaningsyach, MT
Ko Promotor II


Prof. dr. M. Aris Widodo, MS, SpFK, Ph.D
Penguji 1


Dr. Dra. Sri Widyarti, M.Si
Penguji 2


Prof. Drs. Win Darmanto, M.Si, Ph.D
Penguji 3

Malang,
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan


Dr. dr. SH Andayani, M.Kes
MP 055004141987012001





Ultrasonik Ozon Untuk Membunuh Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Secara In Vitro Melalui Stres Mekanik, Kavitas Dan Efek Kimia.

Nama Mahasiswa : Mas Mansyur
N I M : 117070100011028
Program Studi : Program Doktor Ilmu Kedokteran
Minat : Biomedik

KOMISI PROMOTOR:

Promotor : Prof. Dr. Edi Widjajanto, dr., MS, Sp.PK (K)
Ko Promotor 1: Prof. Dr. Soemarno, dr., DMM.,Sp.PK (K)
Ko Promotor 2: Dr. Ir. Erni Yudaningtyas, MT

TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1: Prof. dr. M. Aris Widodo, MS., SpFK., Ph.D
Dosen Penguji 2: Prof. Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D
Dosen Penguji 3: Dr. Dra. Sri Widyarti M.Si

Tanggal Ujian Tertutup : 08 September 2017.
Tanggal Ujian Terbuka : 2 Mei 2018

SK Penguji



PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik disuatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Proposal DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang akan saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 25 April 2018

Mahasiswa,

METERAI
STAMPEL

6000
RUPIAH

Nama : Mas Mansyur

N.I.M : 117070100011028

P.S : Doktor Ilmu Kedokteran

Prog. : Pascasarjana

Fak. : Kedokteran UB



KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

1. The Effect of Low Power Ultrasonic Wave Exposure to Suppress Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) In Vitro (Publish in Journal of Tropical Life Science, Vol 8. No. 2. April 2018).
2. Low Frequency Ultrasonic Wave to Kill Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro Due to Mechanical Stress, Cavitation, and Chemistry Effect (Accepted in Internasional Journal of Tropical Medicine)
3. The Utilization of Ozone To Kill Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) By In Vitro With Cell Damage as Indicator (On going)

**PERUNTUKAN**

“ Ya Tuhanku, berikanlah kepadaku hikmah dan masukkanlah aku ke dalam golongan orang-orang yang saleh.

Dan jadikanlah aku buah tutur yang baik bagi orang-orang (yang datang) kemudian.

Dan jadikanlah aku termasuk orang-orang yang mempusakai surga yang penuh kenikmatan”.

(Asy-Syu'ara: 83 – 85)

Sebenarnya saat kita dilahirkan di dunia ini telah dikaruniai dengan benih-benih kesuksesan. Tinggal digali dan dikembangkan sampai ke puncak kesuksesan. Go to win

Karya ilmiah ini kutujukan kepada :

Istri dan anak-anakku tercinta
Esti, Shely, Ines, Haikal, dan Farras



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis mampu menyelesaikan disertasi yang berjudul: Aplikasi Metode Ultrasonik-Ozon Untuk Membunuh Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Melalui Stres Mekanik, Kavitasi Dan Efek Kimia.

Tulisan ini membahas tentang metode alternatif untuk membunuh Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) dengan menggunakan kombinasi gelombang ultrasonik dengan ozon dengan disertai mekanisme dan bukti fisik terkait dengan kemarian MRSA. Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap.

Tahap 1: Mencari pengaruh paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

Tahap 2: Mencari pengaruh dosis paparan ozon terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

Tahap 3: Mencari pengaruh kombinasi paparan gelombang ultrasonik dengan ozon terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

Mekanisme kematian sel MRSA dapat diketahui melalui perubahan: bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel. Perubahan bentuk dan ukuran dapat diamati dengan menggunakan Scanning Electron Mikroskope (SEM), perubahan struktur menggunakan Transmission Electron Mikroskope (TEM), serta perubahan pewarnaan menggunakan perwarnaan gram.

Dengan selesainya penulisan disertasi ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih sedalam-dalamnya dengan ketulusan hati kepada:

1. Prof. Dr. dr. Edi Widjanto, MS., SpPK(K) selaku promotor. Diawali dari karya tulis ilmiah, beliau sebagai pembimbing dengan sabar, telaten dan



penuh kearifan membuka logika berfikir penulis melalui konsep Kausa, efek, dan eksplanasinya. Langkah demi langkah tanpa mengenal lelah beliau terangkan dengan baik dan runtut sehingga memahami materi yang sedang dikerjakan. Penulis menyadari kesulitan yang menghadang saat studi lanjut di S3, mengingat latar belakang keilmuan yang penulis yang berasal dari Biofisika dan teknik lingkungan. Dengan bijaksana beliau mengarahkan untuk menggabungkan ilmu biofisika dan kedokteran sehingga akan menjadi lebih menantang dan menarik untuk diterapkan pada penelitian disertasi. Saat semangat penulis berada pada titik nadir beliau selalu mengingatkan melalui SMS, dengan kata pendek tapi selalu dapat membangkitkan semangat, yaitu "Progress...?". dengan penuh keikhlasan beliau selalu menyediakan waktu untuk konsultasi baik tatap muka maupun melalui telpon. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan keberkahan kepada beliau dan keluarganya. Terima kasih Profesor jasamu akan selalu kukenang.

2. Prof. Dr. dr. Soemarno, DMM., SpPK(K) selaku ko-promotor 1. Sebagai pakar di bidang mikrobiologi yang juga dosen mata kuliah penunjang disertasi, beliau selalu mengarahkan dan membimbing dengan penuh keihlasan terkait teori maupun hal-hal teknis perkait dengan percobaan yang penulis kerjakan. Kata-kata yang selalu saya ingat saat penulis kebingungan dan menghadap ke beliau... "gampang iku engkok tak ajari". Dengan kata itu penulis semangat kembali untuk melanjutkan penelitian, yang tadinya beban itu terasa berat sekarang menjadi ringan. Jika penulis bertanya , Prof. bagaimana Jurnalnya? Beliau menjawab "wis nanti saya bantu" .: adem rasanya untuk membangkitkan semangat yang hampir runtuh. Semoga Allah SWT mengangkat derajat beliau ditempat yang terbaik. Terima kasih Profesor atas bimbingannya.



3. Dr. Ir. Erni Yudaningsy, MT selaku ko-promotor, beliau selalu memberi masukan yang positif terkait dengan penggunaan alat yang akan digunakan dan saat konsultasi senantiasa mengingatkan dan memberi semangat terkait dengan percobaan yang penulis lakukan. Motivasi beliau yang selalu saya ingat adalah “ayo ndang maju pak” . rasanya semangat untuk segera menyelesaikan studi berkobar kembali. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmatnya dan kasih sayangnnya kepada beliau dan keluarganya, terima kasih bu Erni atas bimbingannya.

4. Prof. dr M. Aris Widodo, MS., Ph.D selaku penguji 1 yang telah banyak memberikan masukan, saran, dan kritik yang bersifat konstruktif demi kesempurnaan disertasi yang saya kerjakan, hal ini sudah beliau lakukan sejak penulis mengerjakan karya tulis ilmiah. Terima kasih yang tulus saya sampaikan pada beliau, semoga Allah SWT memuliakan dan merahmatinya

5. Prof. Drs. Win Darmanto, MSi., Ph.D, selaku penguji 2 dan dekan Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya yang telah banyak memberi masukan dan pencerahan sehingga memudahkan penulis untuk mengerjakan penelitian yang sedang dilakukan. Sering beliau mengajukan pertanyaan-pertanyaan tentang realita medik terkini yang sangat berguna untuk mengembangkan wawasan penulis. Terima kasih Prof. Jasamu akan selalu kukenang, semoga Allah mengangkat derajat beliau ditempat tertinggi.

6. Prof. Dr. dr. Djanggan Sargowo, SpPD, SpJP(K), FIHA, FACC, selaku penguji kualifikasi dan mantan dekan FK UWKS, yang telah memberi masukan-masukan berupa kritik, koreksi dan saran yang sangat berguna untuk kelancaran tahap berikutnya. Pada masa beliau menjadi dekan, penulis diberi kesempatan untuk studi S3 yang sebelumnya tidak pernah



terbayangkan untuk melanjutkan studi S3. Dengan segala ketulusan hati saya ucapkan terima kasih pada beliau. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmatnya kepada beliau.

7. Prof. Drs. Sutiman B. Sumitro, SU, DSC, selaku penguji kualifikasi yang telah membuka wawasan penulis dengan masukan-masukan dan saran yang mengaplikasikan bidang fisika kedalam bidang kedokteran sehingga menemukan ide untuk disertasi yang saat ini penulis lakukan. Semoga Allah senantiasa mencurahkan berkahnya kepada beliau. Terima kasih Profesor.

8. Ir. D.J. Djoko H. Santijojo M.Phil., PhD., selaku dosen mata kuliah penunjang disertasi yang selalu memberi masukan dan koreksi yang bersifat konstruktif dalam bidang fisika terhadap disertasi yang penulis sedang lakukan. Semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu menganugerahi kesehatan yang baik dan menyayangi beliau sekeluarga. Terima kasih pak Djoko atas bantuannya selama ini.

9. Dr. Dra. Sri Widyarti M.Si, selaku dosen mata kuliah penunjang disertasi yang dengan telaten membimbing penulis dalam bidang trasportasi zat melalui membran dan pengaruhnya bagi kelangsungan hidup bakteri. Melalui kesempatan ini saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas binbingannya selama ini. Semoga Allah selalu melimpahkan rahmatnya kepada beliau sekeluarga.

Dengan selesainya disertasi ini, penulis sampaikan terima kasih yang setulu-tulusnya atas dukungan yang telah diberikan selama ini. Ucapan terima kasih tersebut penulis sampaikan kepada:

1. Drs. Soejadmiko, MM. Selalu ketua yayasan Wijaya Kusuma Surabaya



yang telah membiayai studi S3 selama 6 semester, semoga ilmu yang penulis peroleh dapat meningkatkan pengabdian di Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Semoga beliau senantiasa diberi kesehatan yang baik oleh Allah SWT sebagai bekal untuk melanjutkan pengabdian di bidang pendidikan, terima kasih pak Djat atas bantuan biaya pendidikan yang telah bapak berikan.

2. Prof. dr. Sri Harmadji, SpTHT(K), selaku Rektor Universitas Wijaya Kusuma Surabaya yang telah memberikan ijin untuk studi lanjut. Ijin ini memotivasi saya untuk menempuh studi yang lebih tinggi guna meningkatkan kualitas pengabdian penulis di Universitas Wijaya Kusuma yang kita cintai. Semoga Allah SWT memberikan rahmatnya kepada beliau.

3. Prof dr. Soedarto, DTM&H, PhD., Sp Park(K), selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya yang selalu memberi motivasi dan semangat pada penulis terkait dengan penyelesaian studi yang sedang berjalan. Kata-kata beliau yang selalu saya ingat “ayo segera diselesaikan yo”. Semoga Allah SWT mengangkat derajat beliau, terima kasih Prof, atas motivasinya selama ini.

4. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes. sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang telah memberikan ijin dan kemudahan kepala penulis selama mengikuti Pendidikan Program Doktor. Semoga Allah merahmati beliau.

5. Drs Tri Anggono Prijo sebagai dosen instrumentasi biofisika Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya, yang telah membantu mendisain peralatan penguat daya gelombang ultrasonik serta mensetting peralatan yang setiap kali penulis akan melakukan percobaan beliau selalu hadir untuk membantu dan mengawasi peralatan yang akan



digunakan. Terima kasih pak Tri atas kebaikan dan ketulusan hati bapak, semoga Allah senantiasa melimpahkan rahmatnya kepada beliau.

6. Dr. drh. Dadik Rahardjo, M.Kes selaku kepala laboratorium Gastroenteritis dan Salmonelloensis Institut Tropical Disease Universitas Airlangga Surabaya, yang telah membantu, memfasilitasi dan memberi saran terkait dengan percobaan yang sedang penulis lakukan. Terima kasih pak Dadik, semoga Allah SWT membalas dengan pahala yang berlimpah.
7. Prof. Dr. dr. Ni Made Mertaniasih, MS., Sp.MK, selaku kepala bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, yang telah membantu untuk memperoleh Isolat MRSA dan memberikan masukan terkait dengan percobaan yang akan penulis lakukan. Terima kasih Profesor semoga Tuhan membalas semua amal kebaikan yang telah ibu lakukan.
8. Seluruh staf pengajar Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan ilmunya dengan baik. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatnya kepada beliau.
9. Drs. Abdulloh Fuad, M.Si selaku kepala unit mikroskop elektron Laboratorium Mineral dan Material Maju FMIPA Universitas Negeri Malang, yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan pemetretan morfologi MRSA dengan menggunakan Scanning Electron Microscope. Semoga Allah melimpahkan rahmatnya pada bapak sekeluarga.
10. Dr. Indriana Kartini Ka Unit Layanan TEM Departemen Kimia FMIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta, yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk pengambilan gambar struktur MRSA. Semoga Allah memberikan rahmatnya kepada beliau.
11. dr. Akhmad Sudibya, M.Kes selaku Kepala Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, yang telah memberi



ijin dan bantuan kepada penulis untuk melakukan pengecatan gram. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan perlindungan kepada beliau.

12. dr. Maria Yulianti, M.Kes dan dr. Ana Lewi M.Kes selaku kepala bagian dan dosen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, yang telah memberikan ijin dan bantuan kepada penulis untuk melakukan pemotretan pewarnaan gram. Semoga Tuhan senantiasa merahmati beliau.

13. Rini Purbowati, S.Si., M.Si selaku dosen Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, yang telah membantu penulis terkait dengan: menentukan faktor pengenceran, pembuatan media kultur, teknik kultur bakteri, menghitung koloni bakteri. Semoga Allah SWT mengangkat derajat beliau ditempat yang tinggi.

14. Drs. H. Sediono, M.Si. dan Marissa H. S.Si, M.Si selaku dosen Statistika Fakultas Sain Dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya, yang telah membantu menganalisis data hasil penelitian yang penulis kerjakan. Semoga Allah Senantiasa merahmati beliau.

15. Mbak Indah, Pak Samsul, mas Deny, mbak win dan semua karyawan yang tidak dapat penulis sebutkan semua di bagian Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang telah membantu kelancaran selama studi di Program Pendidikan Doktor ini. Semoga Allah SWT memberkahi kehidupannya.

16. Mbak Harti, mbak Winny, Mas Mustofa, dan seluruh laboran bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya yang telah membantu penulis untuk membuat preparat pewarnaan gram dan preparasi untuk pengamatan dengan mikroskop elektron. Semoga Allah SWT memberikan rejeki yang tiada terputus kepada mereka.



17. Mbak wahyu dan mbak Dita laboran Gastrointestinal dan Salmonelloensis Institut Tropical. Desease Universitas Airlangga Surabaya, yang telah membantu memfasilitasi pengadaan bahan dan sterilisasi peralatan yang akan digunakan percobaan. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatnya kepada mereka.

18. Mbak Alfiah dan mbak Zul selaku operator di Labolatorium Mikroskop Elektrom FMIPA Universitas Negeri Malang, yang telah membantu penulis untuk mendokumentasikan morfologi sel MRSA dengan SEM. Semoga Allah SWT selalu memberikan karunianya kepada mereka berdua.

19. Mas Wahyu selaku operator di Labolatorium Mikroskop Elektron FMIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta, yang telah membantu mendokumentasikan kerusakan struktur sel MRSA dengan TEM. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatnya kepada beliau.

20. Teman-teman satu angkatan di Pendidikan Program Doktor FK UB, terima kasih untuk semua kebersamaan, dukungan dan motivasinya. Semoga Tuhan yang maha esa selalu membimbing dan merahmati kita semua.

21. Istri dan anak-anakku tercinta, tiada kata yang dapat menggambarkan betapa besar pengorbanan dan ketulusanmu. Untuk kalian semua terima kasih yang tak terhingga. Balasan pahala, rahmat dan karunia Allah SWT yang tiada terputus lebih pantas buat kalian semua.

22. Teman sejawat di Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, yang telah memberi dorongan semangat dikala duka, perhatian dan keihlasan dalam berbagi. Semoga Tuhan yang maha esa melapangkan dan memberi kemudahan pada setiap kegiatan yang akan dilakukan.



Semoga dukungan, bantuan dan kerjasama yang baik selama ini yang disertai dengan penuh keikhlasan penulis ucapkan terima kasih. Semoga Allah melimpahkan karunia, rahmat dan kasih sayangNya tiada terputus buat kita semua. Semoga Disertasi ini berguna dan memberikan manfaat bagi yang membacanya. Kesempurnaan hanya milik Allah SWT, sedang semua kekurangan dan keterbatasan milik penulis. Semua bentuk masukkan yang bersifat konstruktif sangat penulis harapkan demi kesempurnaan disertasi ini.

Malang, 2 Mei 2018

Penulis

RINGKASAN

Mas Mansyur, NIM. 117070100011028. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 30 Januari 2017. Ultrasonik Ozon Untuk Membunuh Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Melalui In Vitro Stres Mekanik, Kavitasi Dan Efek Kimia. Komisi Pembimbing Ketua: Prof. Dr. Edi Widjajanto, dr., MS, Sp.PK (K), Anggota: Prof. Dr. Soemarno, dr., DMM., Sp.PK (K), Dr. Ir. Erni Yudaningtyas, MT.

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) adalah *Staphylococcus aureus* yang mengalami resistensi karena perubahan genetik yang disebabkan paparan terapi antibiotik yang tidak rasional transmisi bakteri ini dari satu pasien ke pasien yang lain melalui peralatan medis yang tidak diperhatikan sterilisasinya, transmisi dapat pula melalui udara maupun fasilitas ruangan. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) adalah bakteri penyebab utama infeksi nosokomial yang bersifat multiresisten terhadap antibiotik sehingga bakteri ini sulit untuk dibunuh.

Banyak penelitian yang bertujuan untuk membunuh bakteri dengan menggunakan gelombang ultrasonik saja atau dengan ozon yang dilakukan orang baik dengan menggunakan metode kontak maupun non kontak. Mereka sering menyimpulkan bahwa bakteri tersebut mati akibat stres mekanik, kavitasi, turbulensi larutan, perubahan suhu, perubahan tekanan, dan efek kimia sebagai akibat terbentuknya hidrogen peroksida yang bersifat desinfektan. Kesimpulan tersebut tidak didukung oleh bukti fisik kematian bakteri tersebut yang dapat diamati secara langsung.

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap. Penelitian tahap pertama adalah mencari frekuensi efektif dan daya lethal paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia. Indikator kematian MRSA adalah: perubahan bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel. Penelitian ini adalah eksperimental laboratorium murni yang dilakukan secara in vitro, dengan cara memapari 100 ml suspensi MRSA dengan gelombang ultrasonik berdaya 2 watt, dalam waktu 2 menit dengan beragam frekuensi. Percobaan dilanjutkan dengan memapari 100 ml suspensi MRSA dengan frekuensi efektif, dalam waktu 2 menit dengan daya beragam. Data hasil penelitian ini akan dianalisis dengan *software MINITAB 16*, untuk mencari pengaruh frekuensi dan daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambar, tabel, diagram batang dan grafik, yang sebelumnya diuji dengan uji normalitas, homogenitas, dan Anova.

Penelitian tahap dua, dilakukan bertujuan untuk mencari dosis lethal paparan ozon terhadap persen kematian MRSA melalui stress mekanik, kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan: bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel. Penelitian dilakukan secara in vitro dengan cara memapari 100 ml suspensi MRSA dengan ozon dengan waktu paparan beragam. Data hasil penelitian. Data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk: tabel, gambar, diagram batang dan grafik regresi. Data akan diuji normalitas, homogenitas, dan mengetahui perbedaannya diuji menggunakan *one way Anova* kemudian untuk mengetahui pengaruhnya dilakukan uji regresi.



Penelitian tahap tiga merupakan gabungan penelitian tahap satu dan dua, dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia, dengan indikator perubahan: bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel. 100 ml suspensi MRSA dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi efektif, daya lethal dan ozon dengan waktu beragam. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk: tabel, gambar, diagram batang dan grafik regresi. Kerusakan sel MRSA akan dibandingkan dengan percobaan tahap satu dan dua.

Berdasarkan hasil percobaan tahap 1 dapat disimpulkan bahwa frekuensi paparan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap persen kematian MRSA dengan $P\text{-value } (0,005) < \alpha (0,05)$, frekuensi efektif 26 kHz, dan kematian MRSA 25,19%. Persamaan regresi pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA (K) adalah $K = -556,2 + 44,8f - 0,87f^2$ ($R^2 = 77,5\%$). Percobaan lanjutan menghasilkan daya lethal 8,432 watt, daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap persen kematian MRSA $P\text{-value } (0,000) < \alpha (0,05)$, dengan persamaan regresi $K = -0,188 + 11,881P$ ($R^2 = 99,8\%$). Dari hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop elektron (SEM dan TEM) terlihat bahwa terjadi perubahan dari bulat menjadi tidak bulat, ukurannya berubah dari semula bisa menjadi lebih besar atau kecil terdapat sobekan akibat stres mekanik, serpihan kecil-kecil MRSA akibat kavitasi, dan keluarnya sitoplasma dan MRSA tampak lebih terang akibat efek kimia.

Pada percobaan tahap 2 dapat disimpulkan bahwa, waktu paparan ozon berpengaruh terhadap persen kematian MRSA dengan $P\text{-value } (0,001) < \alpha (0,05)$, dosis lethal 0,274 mg/L, dengan kematian MRSA sebesar 99,53%. Grafik pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian dinyatakan dengan $K = 40,85 - 5,295 t + 0,3688.t^2 - 0,004952t^3$ ($R^2 = 97,5\%$). Hal ini didukung hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop elektron ternyata: dinding dan membran sel mengalami kebocoran akibat reaksinya dengan ozon, sitoplasmanya keluar warna selnya berubah yang semula berwarna hitam menjadi transparan dan bentuk selnya mengalami perubahan.

Dari hasil percobaan tahap 3 dapat disimpulkan bahwa waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon berpengaruh terhadap persen kematian MRSA dengan $P\text{-value } (0,017) < \alpha (0,05)$, persamaan regresinya dinyatakan dengan $K = -13,4 + 4,9t - 0,051t^2$ dengan $R^2 = 98,6\%$. Dari hasil percobaan ini ditemukan bahwa gabungan antara kombinasi paparan gelombang ultrasonik ($f_{\text{efektif}} = 26$ kHz, $P_{\text{lethal}} = 8,4$ watt, dan $t = 40$ sekon) menyebabkan MRSA mati sebesar 99,71%. Ternyata hal ini tidak berbeda jauh dengan paparan ozon saja dengan waktu 40 detik, tetapi untuk waktu yang lebih kecil dari 40 detik kematian MRSA yang disebabkan paparan gelombang ultrasonik dan ozon masih lebih bagus dibandingkan dengan paparan ozon saja atau gelombang ultrasonik saja. Dari hasil pengamatan dengan mikroskop elektron terlihat bahwa sel MRSA mati akibat perubahan bentuk mengecil atau memanjang disebabkan stres mekanik, pecah menjadi kecil-kecil akibat kavitasi, dan perubahan bentuk yang tidak beraturan sekitar sel terdapat sitoplasma akibat efek kimia.

Kata kunci: MRSA, ultrasonik, ozon, stres mekanik, kavitasi, persen kematian.

SUMMARY

Mas Mansyur, NIM. 117070100011028. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Februari 2017. Ultrasound-Ozone for Killed Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) In Vitro Through Mechanical Stress, Cavitation, and Chemical effect. Advisor Committee, Chairman: Edi Wijayanto, Anggota: Soemarno, Erni Yudaningtyas.

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is *Staphylococcus aureus* which has resistance because of the genetic change which is caused by the exposure to antibiotic therapy which is not rational. The transmission of this bacteria from one patient to another patient is by unsterilized medical tools. The transmission of this bacteria can also from the air nor the room facilities. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* is the main bacteria cause of nosocomial infections that are multiresistant to antibiotics so this bacteria is hard to kill.

There are a lot of research that aims to kill bacteria by ultrasonic or by ozon done by people either by contact or non-contact method. They often conclude that the bacteria die because of the mechanical stress, cavitation, liquid turbulence, climate change, changes in pressure, and chemistry effects as a result of the formation of hydrogen peroxyde which has a characteristic as a disinfectan. That conclusion is not supported by physical evidence of the bacterial death which can be observed directly.

The research conducted in three stages. The first stage is to find the effective frequency and the lethal power of the ultrasonic waves exposure on percents of the MRSA death by mechanical stress, cavitation, and chemistry effects. The death indicator of MRSA are: changes in shape, size, structure and staining cells. This research is a pure laboratory experimental that performed in vitro by exposing 100 ml of MRSA suspension with 2 watts ultrasonic waves in 2 minutes with various frequencies. The experiment continues by exposing 100 ml of MRSA suspension with effective frequency in 2 minutes with various powers. The result data of this research will be analyzed by *MINITAB 16 software*, to find the effect of frequency and the power of ultrasonic waves exposure to the percent of MRSA death. The result data of the research will be presented in images, tables, bar charts and graphs, which tested first with normality, homogeneity and Anova tests.

The second stage of the research aims to find the lethal dosage of ozon exposure to the percent of MRSA death by mechanical stress, cavitation and chemistry effect with indicators of change: shape, size, structure and staining cells. The research is performed in vitro by exposing 100 ml of MRSA suspension with ozone in various exposure times. The result data of the research will be presented in images, tables, bar charts and regression graphs. The data will be tested for normality, homogeneity and to know the difference will be tested by *one way Anova* and then to know the effect will be tested by regression test.

The third stage of the research is a combination of the first and second stages research with the aim to know the effect of exposure time combinations of ultrasonic waves and ozone to the percent of MRSA death by mechanical stress, cavitation and chemical effects, with indicators of change" shape, size, structure and staining cells. Exposing 100 ml of MRSA suspension with ultrasonic waves with effective frequency, lethal power and ozone in various times. The result data of the research will be presented in images, tables bar charts and regression



graphs. The MRSA cell damage will be compared with the first stage and second stage of the research.

Based on the first experiment, can be concluded that the frequency of ultrasonic waves takes effect to the percent of MRSA death with P-value (0,005) $< \alpha$ (0,05), effective frequency 26 kHz, dan MRSA death 25,19%. The regression equation of the ultrasonic waves exposure's frequency to the percent of MRSA death (K) is $K = - 556,2 + 44,8f - 0,87f^2$ ($R^2 = 77,5\%$). A follow-up experiment produces 8,432 watt of lethal power, ultrasonic wave exposure power takes effect to the percent of MRSA death with P-value (0,000) $< \alpha$ (0,05), with regression equation $K = - 0,188 + 11,881 P$ ($R^2 = 99,8\%$). From observational data using electron microscope (SEM and TEM) seen that there is a shape change from round to not round, size change to be bigger or smaller, tear due to mechanical stress, small flakes of MRSA due to cavitation, the release os cytoplasm and MRSA appear lighter due to chemistry effect.

Based on second experiment, can be concluded that ozone exposure time takes effect to the percent of MRSA death with P-value (0,001) $< \alpha$ (0,05), lethal dosage 0,274 mg/L, with the amount of MRSA death is 99,53%. The graph of the ozone exposure time effect to the percent of MRSA death stated by $K = 40,85 - 5,295 t + 0,3688.t^2 - 0,004952t^3$ ($R^2 = 97,5\%$). It is supported by the observation result with electron microscope and: cell walls and membranes leak due to the reaction with ozone, cytoplasm out and change of color from black to transparent and the shape changes.

Based on third experiment can be concluded that the exposure time combinations of ultrasonic waves and ozone takes effect to the percent of MRSA death with P-value (0,017) $< \alpha$ (0,05), the regression equation stated by $K = - 13,4 + 4,9t - 0,051t^2$ with $R^2 = 98,6\%$. From this result, found that the combination between ultrasonic waves exposure combinations ($f_{\text{effective}} = 26$ kHz, $P_{\text{lethal}} = 8,4$ watt, and $t = 40$ seconds) caused 99,71% of MRSA death. In fact, it is not much different with only ozone exposure in 40 seconds, but for time that less from 40 seconds, the death of MRSA that caused by the exposure of ultrasonic waves and ozones is better compared to the exposure of ozone only or ultrasonic waves only. From the observation result with electron microcope, can be seen that MRSA cells die due to shrink or elongate shape changes because of mechanical stress, break into small pieces due to cavitation, changes in irregular shapes and cytoplasm around cell due to chemistry effect.

Keywords : MRSA, ultrasonic, ozone, mechanical stress, cavitation, percent of death

**DAFTAR ISI**

SAMPUL	Halaman	1
PENGESAHAN		i
PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI		ii
IDENTITAS TIM PENGUJI		iii
KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH		iv
PERUNTUKAN		v
KATA PENGANTAR		vi
RINGKASAN		xv
SUMMARY		xvii
DAFTAR ISI		xix
DAFTAR TABEL		xxiv
DAFTAR GAMBAR		xxviii
DAFTAR LAMPIRAN		xxxvi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG		xxxviii
BAB I PENDAHULUAN		1
1.1 Latar Belakang Masalah		1
1.2 Permasalahan		6
1.2.1 Sub Permasalahan		6
1.3 Tujuan Penelitian		7
1.3.1 Tujuan umum		7
1.3.2 Tujuan khusus		8
1.4 Manfaat Penelitian		9
1.4.1 Manfaat akademis		9
1.4.2 Manfaat praktis		9

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>		10
2.1.1 Ukuran bakteri		11

xix



2.1.2 Struktur dinding sel bakteri	11
2.1.3 Komposisi dan sifat dinding sel bakteri	16
2.1.4 <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	21
2.1.5 Pertumbuhan bakteri	22
2.1.6 Pengendalian bakteri	25
2.2 Gelombang Elastik	28
2.3 Gelombang Ultrasonik	34
2.3.1 Perambatan gelombang ultrasonik	34
2.3.2 Kecepatan gelombang ultrasonik	38
2.3.3 Energi gelombang ultrasonik	39
2.3.4 Intensitas gelombang ultrasonik	41
2.3.5 Atenuasi gelombang ultrasonik	43
2.3.6 Interaksi gelombang ultrasonik dengan medium	45
2.3.7 Kavitasi oleh gelombang ultrasonik	48
2.3.8 Efek kimia gelombang ultrasonik	58
2.4 O z o n	60
2.4.1 Toksisitas ozon	62
2.4.2 Mekanisme kematian sel akibat paparan ozon	63
2.4.3 Dosis ozon untuk menginaktivasi bakteri	63
2.4.4 Produksi ozon	64
2.4.5 Mekanisme reaksi ozonisasi	70
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	74
3.1 Kerangka Konsep	74
3.2 Hipotesis Penelitian	76
3.2.1 Hipotesis	76
3.2.2 Sub hipotesis	76
BAB 4. METODE PENELITIAN	78
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	78
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	79
4.2.1 Tempat penelitian	79
4.2.2 Waktu penelitian	80
4.3 Variabel dan Indikator Penelitian	80
4.3.1 Variabel bebas	80
4.3.2 Indikator penelitian	80
4.4 Subyek dan Alur Penelitian	81
4.4.1 Alur penelitian tahap 1	81
4.4.2 Alur penelitian tahap 2	82
4.4.3 Alur penelitian tahap 3	83
4.5 Prosedur Penelitian	84
4.6 Persiapan Penelitian	85
4.7 Analisis Data	87
	xx



BAB 5. PENELITIAN TAHAP 1 89

Aplikasi Gelombang Ultrasonik Untuk Membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* In Vitro Melalui Stres Mekanik, Kavitasi, dan Efek Kimia

5.1	Latar Belakang Masalah	89
5.2	Masalah Penelitian	90
5.3	Tujuan Penelitian	90
5.3.1	Tujuan umum	90
5.3.2	Tujuan khusus	90
5.4	Manfaat Penelitian	91
5.4.1	Manfaat akademis	91
5.4.2	Manfaat praktis	91
5.5	Kerangka Teori	91
5.5.1	Frekuensi resonansi gelombang ultrasonik	94
5.5.2	Daya gelombang ultrasonik	94
5.5.3	Pengaruh frekuensi dan daya paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh bakteri	94
5.6	Metode Penelitian	96
5.6.1	Rancangan penelitian	96
5.6.2	Populasi dan sampel penelitian	96
5.6.3	Waktu dan tempat penelitian	97
5.6.4	Variabel dan Indikator penelitian	98
5.6.5	Definisi operasional variabel	99
5.6.6	Alat dan bahan penelitian	100
5.6.7	Alur dan prosedur penelitian	102
5.6.8	Prosedur pengamatan hasil penelitian	108
5.6.9	Teknik analisis data	108
5.7	Hasil dan Analisis Data	109
5.7.1	Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati	110
5.7.1.1	Analisis pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	110
5.7.1.2	Analisis pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap OD suspensi MRSA	116
5.7.1.3	Indikator kematian MRSA	118
5.7.2	Analisis Pengaruh Daya Paparan Gelombang Ultrasonik Terhadap Populasi MRSA Yang Teramati dan OD Suspensi MRSA	141
5.7.2.1	Analisis pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	144
5.7.2.2	Analisis pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap OD suspensi MRSA	147
5.7.2.3	Indikator kematian MRSA	151
5.8	Pembahasan penelitian tahap 1	168
5.9	Kesimpulan	176



5.10 Saran	176
BAB 6. PENELITIAN TAHAP 2	175
Pengaruh Dosis Ozon Terhadap Kematian <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) In Vitro</i> Dengan Indikator Perubahan Bentuk, Ukuran, Struktur, dan Pewarnaan Sel	
6.1 Latar Belakang Masalah	177
6.2 Masalah Penelitian	178
6.3 Tujuan Penelitian	178
6.3.1 Tujuan umum	178
6.3.2 Tujuan khusus	178
6.4 Manfaat Penelitian	179
5.4.1 Manfaat akademis	179
5.4.2 Manfaat praktis	179
6.5 Kerangka Teori	179
6.6 Metode Penelitian	182
6.6.1 Rancangan penelitian	182
6.6.2 Populasi dan sampel penelitian	182
6.6.3 Waktu dan tempat penelitian	183
6.6.4 Variabel dan Indikator penelitian	183
6.6.4.1 Variabel penelitian	183
6.6.4.2 Indikator penelitian	184
6.6.5 Definisi operasional variabel	184
6.6.6 Alat dan bahan penelitian	184
6.6.6.1 Alat penelitian	185
6.6.6.2 Bahan penelitian	185
6.6.7 Alur dan prosedur penelitian	186
6.6.7.1 Alur penelitian	186
6.6.7.2 Prosedur penelitian	186
6.6.8 Teknik analisis data	188
6.7 Hasil dan Analisis Data	189
6.7.1 Menemukan karakteristik generator ozon	189
6.7.2 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA	191
6.7.3 Indikator kematian MRSA	200
6.8 Pembahasan Percobaan Tahap 2	218
6.9 Kesimpulan	223
6.10 Saran	222
BAB 7. PENELITIAN TAHAP 3	224
Ultrasonik-Ozon Untuk Membunuh <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) In Vitro</i> Melalui Stres Mekanik, Kavitasi dan Efek Kimia.	



7.1 Latar Belakang Masalah	224
7.2 Masalah Penelitian	225
7.3 Tujuan Penelitian	225
7.3.1 Tujuan umum	225
7.3.2 Tujuan khusus	225
7.4 Manfaat Penelitian	226
7.4.1 Manfaat akademis	226
7.4.2 Manfaat praktis	226
7.5 Kerangka Teori	226
7.6 Metode Penelitian	229
7.6.1 Rancangan penelitian	229
7.6.2 Populasi dan sampel penelitian	228
7.6.3 Waktu dan Tempat Penelitian	230
7.6.4 Variabel dan indikator penelitian	230
7.6.4.1 Variabel penelitian	230
7.6.4.2 Indikator penelitian	229
7.6.5 Definisi operasional variabel	231
7.6.6 Alat dan bahan penelitian	231
7.6.6.1 Alat penelitian	232
7.6.6.2 Bahan penelitian	232
7.6.7 Alur dan Prosedur Penelitian	233
7.6.7.1 Alur penelitian	233
7.6.7.2 Prosedur penelitian	234
7.6.8 Teknik analisis data	237
7.7 Hasil dan analisis data	238
7.7.1 Pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA	238
7.7.2 Pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap OD suspensi MRSA	242
7.7.3 Indikator kematian sel MRSA	246
7.8 Pembahasan penelitian tahap 3	260
7.9 Kesimpulan	268
7.10 Saran	269
BAB 8 PEMBAHASAN UMUM	270
BAB 9. KESIMPULAN DAN SARAN	285
9.1 Kesimpulan	285
9.2 Saran	287
DAFTAR PUSTAKA	288
LAMPIRAN	298



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbandingan beberapa sifat bakteri gram positif dan gram negatif	20
Tabel 2.2 Metode fisika untuk pengendalian pertumbuhan	27
Tabel 2.3 Rapat massa dan kecepatan suara dalam berbagai medium	38
Tabel 2.4 Impedansi Karakteristik jaringan	43
Tabel 2.5 Koefisien pantulan dari pasangan-pasangan medium berbeda	48
Tabel 2.6 Dosis ozon untuk menginaktivasi mikroorganisme	64
Tabel 5.1 Komparasi paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh bakteri	95
Tabel 5.2 Uraian masing-masing blok beserta fungsinya	103
Tabel 5.3 Hasil pengamatan pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap jumlah populasi MRSA	110
Tabel 5.4 Hasil perhitungan pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap % kematian MRSA	111
Tabel 5.5 Hasil uji regresi Kematian MRSA versus frekuensi	117
Tabel 5.6 Pengaruh frekuensi terhadap OD suspensi MRSA	117
Tabel 5.7 Hasil uji regresi frekuensi dengan OD	118
Tabel 5.8 Pengaruh frekuensi terhadap perubahan bentuk sel MRSA	123
Tabel 5.9 Hasil analisis Anova dan regresi persen perubahan bentuk versus frekuensi	125
Tabel 5.10 Diameter maksimum sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan beragam frekuensi	128
Tabel 5.11 Hasil uji Anova perbedaan diameter maksimum MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan beragam frekuensi	130
Tabel 5.12 Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap diameter maksimum MRSA	131



Tabel 5.13 Hasil uji Anova dan regresi antara diameter maksimum MRSA versus frekuensi	133
Tabel 5.14 Pengaruh frekuensi paparan terhadap kematian MRSA melalui perubahan pewarnaan sel MRSA	137
Tabel 5.15 Hasil analisis uji Anova dan regresi antara persentase MRSA pink versus frekuensi	139
Tabel. 5.16 Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap jumlah koloni MRSA dan OD	141
Tabel 5.17 Hasil perhitungan pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	144
Tabel 5.18 Hasil uji Anova dan regresi antara daya versus persen kematian MRSA	145
Tabel 5.19 Hasil uji regresi antara daya paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian MRSA	147
Tabel 5.20 pengaruh daya terhadap OD	149
Tabel 5.21 Perubahan bentuk MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan daya beragam	154
Tabel 5.22 Hasil uji Anova dan regresi antara daya versus persentase perubahan bentuk	155
Tabel 5.23 Diameter maksimum MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan beragam daya	158
Tabel 5.24. Pengaruh daya terhadap diameter maksimum sel MRSA	159
Tabel 5.25 Hasil uji Anova dan regresi antara daya paparan ultrasonik versus diameter maksimum MRSA	160
Tabel 5.26 Perubahan pewarnaan gram sel MRSA dengan daya beragam	164
Tabel 5.27 Hasil uji Anova dan regresi antara daya versus persen perubahan warna	166
Tabel 6.1 Pengaruh waktu paparan ozon dengan konsentrasi ozon di aquades	190
Tabel 6.2 Hasil uji Anova dan regresi konsentrasi ozon versus waktu	191
Tabel. 6.3 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap jumlah koloni MRSA dan OD	193
Tabel 6.4 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen	



kematian MRSA	196
Tabel 6.5 Hasil uji Anova dan regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA	199
Tabel 6.6 Perubahan bentuk MRSA yang telah dipapari ozon dengan waktu beragam	203
Tabel 6.7 Hasil uji Anova dan regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap persentase perubahan bentuk sel MRSA	205
Tabel 6.8 Diameter maksimum sel MRSA akibat dipapari ozon dengan waktu beragam	208
Tabel 6.9 Pengaruh waktu paparan terhadap diameter maksimum sel MRSA	208
Tabel 6.10 Hasil uji Anova dan regresi antara rerata diameter maksimum sel MRSA versus waktu paparan ozon	210
Tabel 6.11 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen perubahan warna sel MRSA	214
Tabel 6.12 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan ozon dengan perubahan warna sel MRSA menjadi pink	216
Tabel 7.1 Data dari hasil percobaan tahap 3.....	238
Tabel 7.2 Pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dengan persen kematian MRSA	239
Tabel 7.3 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan presentase kematian MRSA	240
Tabel 7.4 antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap OD	243
Tabel 7.5 Hasil Uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan OD	244
Tabel 7.6 Pengaruh waktu paparan terhadap persen perubahan bentuk	248
Tabel 7.7 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan perubahan bentuk sel MRSA	250
Tabel 7.8 Diameter maksimum MRSA akibat dipapari ultrasonik-ozon dengan waktu beragam	253
Tabel 7.9 Pengaruh waktu paparan gelombang ultrasonik-ozon terhadap diameter maksimum MRSA	254



Tabel 7.10 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon dengan diameter maksimum sel MRSA	255
Tabel 7.11 Perubahan pewarnaan gram MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik-ozon dengan waktu beragam	259
Tabel 7.12 Hasil uji Anova dan regresi pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon terhadap perubahan warna sel MRSA menjadi pink	261
Tabel 8.1 Perbandingan mekanisme kerusakan sel MRSA pada penelitian tahap 1, 2, dan 3	283



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Staphylococcus aureus berbentuk seperti kelompok anggur	10
Gambar 2.2 Dinding sel bakteri beserta bagian-bagiannya	12
Gambar 2.3 Struktur utama yang terdapat di dalam dinding sel bakteri	14
Gambar 2.4 N-asetilglukosa dan N-acetilmuramic	16
Gambar 2.5 L- dan D-isomer dari asam amino yang ditunjukkan dengan bola dan tongkat	17
Gambar 2.6 Dinding sel bakteri	18
Gambar 2.7. MRSA dengan perbesaran 50.000 kali	21
Gambar 2.8 Empat fase kurva pertumbuhan mikroorganisme	22
Gambar 2.9 Bagan pengendalian bakteri dengan menggunakan metode fisika	26
Gambar 2.10 Paralelepiped segi empat yang digunakan untuk analisis tegangan-regangan	29
Gambar 2.11 Enam komponen regangan	30
Gambar 2.12 Regangan geser pada bidang CDGH dari Gambar 2.10	31
Gambar 2.13 Gelombang longitudinal sinusoidal yang merambat ke kanan, diperlihatkan pada selang waktu seperdelapan periode	35
Gambar 2.14 Pergeseran elemen kecil batang akibat pergeseran gelombang longitudinal	36
Gambar 2.15 Rambat energi gelombang	41
Gambar 2.16 Absorpsi gelombang ultrasonik melalui medium	44
Gambar 2.17 Gelombang yang mengalami pembiasan	46
Gambar 2.18 Transmisi dan refleksi gelombang yang mengenai pembatas Medium	46
Gambar 2.19 Gelombang ultrasonik yang ditransmisikan melalui medium cair	49
Gambar 2.20 Gelembung inti di dalam larutan	55



Gambar 2.21a. Tekanan akibat gelombang ultrasonik	59
Gambar 2.21b. Kurva radius gelembung terhadap waktu	59
Gambar 2.22 Produksi ozon alamiah	66
Gambar 2.23 Lapisan ozon	67
Gambar 2.24 Prinsip kerja generator ozon	69
Gambar 2.25 Bagan generator penghasil ozon	69
Gambar 2.26 Mekanisme ozonisasi secara langsung dan tak langsung	71
Gambar 3.1 Kerangka konsep metode ultrasonik ozon untuk membunuh MRSA	74
Gambar 4.1 Alur penelitian tahap 1	82
Gambar 4.2 Alur penelitian tahap 2	83
Gambar 4.3 Alur penelitian tahap 3	84
Gambar 4.4 Prosedur percobaan tahap 2, 2, dan 3	85
Gambar 4.5 Tahap persiapan pembuatan Suspensi MRSA	86
Gambar 5.1. Gaya resonansi mekanik	92
Gambar 5.2. Gaya geser yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik	93
Gambar 5.3 Gaya geser mekanik	93
Gambar 5.4 Diagram blok percobaan dengan gelombang ultrasonik	103
Gambar 5.5 Prosedur pengumpulan data penelitian tahap 1	104
Gambar 5.5 Diagram batang Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	113
Gambar 5.6 Grafik sebaran pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	114
Gambar 5.7 persamaan garis regresi antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian.....	115
Gambar 5.8 Grafik sebaran Pengaruh frekuensi paparan terhadap OD suspensi MRSA	117
Gambar 5.9 Persamaan regresi antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA	117
Gambar 5.10 Gambar sel MRSA kontrol	119



Gambar 5.11 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 21 kHz	119
Gambar 5.12 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 22 kHz	119
Gambar 5.13 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 23 kHz	120
Gambar 5.14 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 24 kHz	120
Gambar 5.15 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 25 kHz	120
Gambar 5.16 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz	121
Gambar 5.17 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 27 kHz	121
Gambar 5.18 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 28 kHz	121
Gambar 5.19 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 29 kHz	122
Gambar 5.20 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 29 kHz	122
Gambar 5.21 Diagram batang pengaruh frekuensi paparan gelombang Ultrasonik terhadap perubahan bentuk sel MRSA	126
Gambar 5.22 Grafik pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap perubahan bentuk MRSA	126
Gambar 5.23 Mekanisme kematian MRSA	127
Gambar 5.24 Diagram batang antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan rerata diameter maksimum MRSA	134
Gambar 5.25 Grafik pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap rerata diameter maksimum MRSA	134
Gambar 5.26 Gambar sel MRSA kontrol dengan perbesaran 20.000 x	135
Gambar 5.27 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 24 kHz	136



Gambar 5.28 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 25 kHz	136
Gambar 5.29 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz	136
Gambar 5.30 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 27 kHz	136
Gambar 5.31 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 28 kHz	140
Gambar 5.32 Diagram batang antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan prosentase MRSA pink	140
Gambar 5.33 Grafik pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan perubahan warna sel MRSA menjadi pink	146
Gambar 5.34 Diagram batang pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	146
Gambar 5.35 Persamaan regresi antara daya dengan persen kematian MRSA	149
Gambar 2.36 Uji asumsi kenormalan residual	150
Gambar 5.37 Sebaran data antara daya paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA	150
Gambar 5.38 Grafik regresi antara dengan daya dengan OD	151
Gambar 5.39 Gambar sel MRSA kontrol (perbesaran 50.000 x)	151
Gambar 5.40 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 2 watt dan waktu paparan 2 menit	152
Gambar 5.41 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 3 watt dan waktu paparan 2 menit	152
Gambar 5.42 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 4 watt dan waktu paparan 2 menit	152



Gambar 5.43 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 5 watt dan waktu paparan 2 menit	153
Gambar 5.44 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang Ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 6 watt dan waktu paparan 2 menit	153
Gambar 5.45 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 8,4 watt dan waktu paparan 2 menit	156
Gambar 5.46 Diagram batang antara daya gelombang ultrasonik dengan perubahan bentuk	157
Gambar 5.47 Grafik pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik dengan perubahan bentuk sel MRSA	158
Gambar 5.48 Diagram batang antara daya gelombang ultrasonik terhadap rerata diameter maksimum MRSA	161
Gambar 5.49 Persamaan regresi pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap rerata diameter maksimum sel MRSA	162
Gambar 5.50 Sel MRSA kontrol	163
Gambar 5.51 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, berdaya 4 watt dalam waktu 2 menit	163
Gambar 5.52 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, berdaya 6 watt dalam waktu 2 menit	163
Gambar 5.53 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, berdaya 8,4 watt dalam waktu 2 menit	164
Gambar 5.54 Diagram batang pengaruh daya terhadap MRSA berwarna pink	167
Gambar 5.55 Pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persentase MRSA berwarna pink	167
Gambar 5.56 Bagan hasil penelitian pengaruh paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	168
Gambar 5.57 Bagan hasil penelitian pengaruh paparan gelombang Ultrasonik terhadap persen kematian MRSA	169
Gambar 6.1 Mekanisme kerusakan dinding bakteri akibat ozon	181
Gambar 6.2 Prosedur pengumpulan data penelitian tahap 2	186



Gambar 6.3 Pengaruh waktu paparan terhadap konsentrasi ozon	190
Gambar 6.4 Uji asumsi kenormalan residual	196
Gambar 6.5 Diagram batang Pengaruh waktu paparan ozon terhadap Persen kematian MRSA	197
Gambar 6.6 Grafik sebaran data pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA	197
Gambar 6.7 Persamaan regresi pengaruh waktu paparan terhadap persen kematian MRSA	198
Gambar 6.8 Sel MRSA kontrol	200
Gambar 6.9 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 5 detik	200
Gambar 6.10 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 10 detik	201
Gambar 6.11 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 15 detik	201
Gambar 6.12 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 20 detik	201
Gambar 6.13 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 25 detik	202
Gambar 6.14 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 30 detik	202
Gambar 6.15 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 35 detik	202
Gambar 6.16 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 40 detik	203
Gambar 6.17 Diagram batang antara waktu paparan ozon dengan perubahan bentuk MRSA	206
Gambar 6.18 Grafik pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan bentuk sel MRSA	206
Gambar 6.19 Mekanisme kematian MRSA setelah dipapari dengan ozon	207
Gambar 2.20 Diagram batang sebaran data antara waktu paparan ozon dengan rerata diameter maksimum sel MRSA	211



Gambar 6.21 Grafik regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap Rerata diameter maksimum Sel MRSA	211
Gambar 6.22 Sel MRSA kontrol diamati dengan menggunakan TEM	212
Gambar 6.23 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 10 detik	212
Gambar 6.24 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 20 detik	213
Gambar 6.25 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 30 detik	213
Gambar 6.26 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 40 detik	213
Gambar 6.27 Diagram batang antara waktu paparan ozon dengan MRSA berwarna pink.....	217
Gambar 6.28 Grafik pengaruh waktu paparan ozon terhadap sel MRSA yang berubah menjadi pink	217
Gambar 6.29 Grafik pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan warna sel MRSA dari ingu menjadi pink	218
Gambar 6.30 Bagan hasil penelitian pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA	220
Gambar 7.1 Grafik Hasil paparan gelombang ultrasonik terhadap bakteri	227
Gambar 7.2 Alur penelitian tahap 3	234
Gambar 7.3 Prosedur pengumpulan data penelitian tahap 3	234
Gambar 7.4 Diagram batang antara waktu paparan gelombang ultrasonik dan ozon dengan persen kematian MRSA	241
Gambar 7.5 Grafik pengaruh waktu kombinasi paparan gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA..	242
Gambar 7.6 Grafik pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap OD suspensi MRSA	245
Gambar 7.7 Sel MRSA kontrol	246
Gambar 7.8 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik-ozon dalam waktu 10 detik.....	246
Gambar 7.9 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik-ozon dalam waktu 20 detik	247
Gambar 7.10 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik-ozon dalam waktu 30 detik	247



Gambar 7.11 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik-ozon dalam waktu 40 detik	247
Gambar 7.12 Diagram batang antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan perubahan bentuk sel MRSA	251
Gambar 7.13 Perubahan bentuk sel MRSA yang Menyebabkan kematian terbesar	251
Gambar 7.14 Pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap persen perubahan bentuk sel MRSA	250
Gambar 7.15 Diagram batang antara waktu paparan ultrasonik-ozon dengan rerata diameter maksimum MRSA	256
Gambar 7.16 Grafiks pengaruh waktu paparan ultrasonik-ozon terhadap rerata diameter maksimum MRSA	257
Gambar 7.17 Sel MRSA kontrol diamati dengan menggunakan TEM	258
Gambar 7.18 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, daya 8,4 watt, dan dipapari ozon secara simultan dalam waktu 20 detik	258
Gambar 7.19 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, daya 8,4 watt, dan dipapari ozon secara simultan dalam waktu 40 detik	258
Gambar 7.20 Diagram batang antara waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon terhadap MRSA berwarna pink ...	262
Gambar 7.21 Grafik pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap perubahan warna sel MRSA menjadi Pink	262
Gambar 7.22 Bagan hasil penelitian pengaruh waktu paparan gelombang ultrasonik-ozon terhadap persen kematian MRSA	265

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Mendisain Peralatan Penguat Daya Gelombang Ultrasonik	298
Lampiran 2. Surat Keterangan Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan	302
Lampiran 3. Pembuatan Suspensi <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>	303
Lampiran 4. Pembuatan Media Kultur Dan Peremajaan MRSA	306
Lampiran 5. Pembuatan Air Grafis Dan Kultur Hasil Pengenceran..	307
Lampiran 6. Perlakuan Dengan Gelombang Ultrasonik dan Hasilnya	308
Lampiran 7. Menemukan Karakteristik Generator Ozon	309
Lampiran 8. Pemaparan suspensi MRSA dengan Ozon	311
Lampiran 9. Pemaparan Suspensi MRSA Dengan Kombinasi Gelombang ultrasonik dan Ozon	312
Lampiran 10. Pengamatan Morfologi Sel MRSA Dengan SEM	313
Lampiran 11. Pengamatan Struktur MRSA Dengan Menggunakan TEM..	315
Lampiran 12. Pengamatan perubahan warna sel MRSA dengan pewarnaan	316
Lampiran 13. Prosedur Pewarnaan Gram	317
Lampiran 14. Foto Hasil SEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Ultrasonik Berdaya 2 watt, Selama 2 Menit Dengan Frekuensi Beragam	319
Lampiran 15. Ciri-ciri Kematian MRSA Yang Diamati Dengan SEM ...	
Lampiran 16. Foto Hasil SEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Gelombang Ultrasonik Frekuensi 26 kHz Dengan Daya Beragam...	333
Lampiran 17. Foto Hasil SEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Ozon Dengan Waktu Beragam	340
Lampiran 18. Foto Hasil SEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari kombinasi Ultrasonik Frekuensi 26 kHz, Daya 8,4 watt Dan Ozon Dengan Waktu Paparan Beragam	350

xxxvi



Lampiran 19. Foto Hasil TEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Gelombang Ultrasonik Berdaya 2 watt Dengan Frekuensi Beragam Selama 2 Menit	355
Lampiran 20. Foto Hasil TEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Gelombang Ultrasonik Berfrekuensi 26 kHz, Dengan Daya Beragam Selama 2 Menit	357
Lampiran 21. Foto Hasil TEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Ozon Dengan Waktu Beragam	358
Lampiran 22. Foto Hasil TEM Sel MRSA Yang Telah Dipapari Kombinasi Gelombang Ultrasonik (frekuensi 26 kHz dan Daya 8,4 watt) dan Ozon Dengan Waktu Beragam	359
Lampiran 23. Hasil Pewarnaan Gram MRSA Yang Telah Dipapari Gelombang Ultrasonik Dengan Daya 2 watt, 2 menit Dengan Frekuensi Beragam	360
Lampiran 24. Hasil Pewarnaan Gram MRSA Yang Telah Dipapari Gelombang Ultrasonik Dengan Frekuensi 26 kHz, Selama 2 Menit Dengan Daya Beragam	362
Lampiran 25. Hasil Pewarnaan Gram MRSA Yang Telah Dipapari Ozon Dengan Waktu Beragam	364
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	367

**DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG****Singkatan**

ATP

DNA

EMB

kHz

LPS

MRSA

NAG

NAM

OD

RBC

SEM

TEM

TPC

UV

VRSA

Lambang

v

 λ

f

 σ

c

e

Kepanjangan Dari Singkatan

Adenosin Triphospat

Deoxyribo Nucleic Acid

Eosin Methylene Blue

Kilohertz

Lipopolisakarida

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

N-asetilglukosamin

N-asetilmuramik

Optical Density

Red blood cell

Scaning Electron Microskope

Transmission Electron Microskope

Total Plate Count

Ultraviolet

*Vancomisin Resistant Staphylococcus aureus***Arti Lambang**

Kecepatan gelombang ultrasonik

Panjang gelombang/konstanta lame

Frekuensi

Tegangan geser

Konstanta elastik bahan

Modulus geser



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Staphylococcus aureus merupakan nama spesies yang merupakan bagian dari genus *Staphylococcus*. Bakteri ini pertama kali diamati dan dikembangkan oleh Pasteur dan Koch, kemudian diteliti secara lebih terinci oleh Ogston dan Rosenbach pada era tahun 1880-an. Nama genus *Staphylococcus* diberikan oleh Ogston, karena bakteri ini pada pengamatan mikroskopis berbentuk seperti setangkai buah anggur, sedangkan nama spesies *aureus* diberikan oleh Rosenbach karena pada biakan murni, koloni bakteri ini terlihat berwarna kuning-keemasan. Rosenbach juga mengungkapkan bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab infeksi pada luka dan furunkel. Sejak itu *Staphylococcus aureus* dikenal secara luas sebagai penyebab infeksi pada pasien pascabedah dan pneumonia terutama pada musim dingin/hujan (Lowy, 1998).

Bakteri *Staphylococcus aureus* adalah patogen manusia yang penting, yang menyebabkan peningkatan jumlah penyakit dan kematian setiap tahun (Klevens *et al*, 2007). Bakteri berkolonisasi di hidung dan kulit manusia dan dapat menyebabkan penyakit mulai dari infeksi kulit (Hansra & Shinkai, 2011) serta penyakit yang mengancam kehidupan seperti *endokarditis*, *bakteremia*, *pneumonia*, *meningitis*, *osteomyelitis*, *sepsis* dan *toxic shock syndrome* (Lowy, 1998; Deftereos *et al*, 2009; Aguilar *et al*, 2010). Keberhasilan pengobatan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* tetap menjadi tantangan, berbagai obat-obatan membuat bakteri ini resistan, yaitu: *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Vankomisin Resistant Staphylococcus aureus* (VRSA)

adalah kejadian yang menonjol. Selain itu, munculnya strain baru *Staphylococcus aureus* yang membuat masalah kesehatan di masyarakat berkembang pesat. Dalam rangka untuk mengembangkan strategi baru untuk memerangi bakteri ini, pemahaman yang lebih baik dari organisme dan fungsi komponen sangat dibutuhkan (Otto, 2010).

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang mengalami kekebalan terhadap antibiotik jenis metisilin. MRSA mengalami resistensi karena perubahan genetik yang disebabkan oleh paparan terapi antibiotik yang tidak rasional (Nurkusuma, 2009).

MRSA bersifat multiresisten terhadap antibiotik yang sulit untuk dibunuh dibandingkan gram negatif (Herceg *et al*, 2013). MRSA merupakan salah satu patogen paling menonjol penyebab gangguan kesehatan, komunitas, dan ternak yang berhubungan dengan infeksi (Song *et al*, 2011; Stefani *et al*, 2012; Schaumburg, 2012; Tavares, 2013; Xiao, 2013). Agar MRSA tidak menimbulkan banyak kerugian maka harus dibasmi dengan menggunakan metode yang aman.

Pendekatan yang menyeluruh diterapkan untuk mengatasi masalah infeksi dan resistensi MRSA yaitu terapi dengan antimikroba baru, eksplorasi target gen esensial, vaksinasi dan program pencegahan. Antimikroba baru yang tengah digunakan untuk mengatasi infeksi MRSA adalah quinupristin-dalfopristin dan linezolid. Quinupristin-dalfopristin bersifat bakterisidal sedangkan linezolid bersifat bakteriostatik. Kabar terkini yang mengkhawatirkan adalah temuan adanya galur MRSA resisten terhadap linezolid. Obat lain yang tengah dalam uji klinis adalah daptomisin yaitu suatu antibakteri baru yang bersifat bakterisida dengan cara merusak membran sitoplasma (Goetghebeur *et al*, 2007).

Mikroorganisme telah menyesuaikan diri dengan keragaman dari habitat bumi yang telah ada, bahkan dari perubahan suhu, kelembaban, tekanan dan





cahaya. Mikroba yang telah beradaptasi mampu menahan kondisi fisik yang ekstrem (panas, dingin, pengeringan, radiasi), upaya untuk mengontrol mungkin akan memiliki pengaruh yang kecil. Merupakan suatu keuntungan, karena sebagian besar mikroba yang harus dikendalikan tidak bisa menyesuaikan diri dengan kondisi ekstrem tersebut dan mudah dikendalikan oleh perubahan mendadak dalam lingkungan. Metode fisika yang banyak digunakan adalah panas lembab (uap bertekanan, air mendidih), panas kering (pembakaran, sterilisasi air panas), suhu rendah (pendinginan, pembekuan), radiasi non-ionisasi (sinar ultraviolet), radiasi ionisasi (sinar-x dan sinar γ), dan filter bakteriologis (Talaro & Talaro, 1993; Tortora *et al*, 2007). Dari uraian di atas terlihat bahwa gelombang mekanik belum dimanfaatkan untuk mengendalikan bakteri, padahal gelombang ini memberikan efek destruktif yang relatif lebih kecil dibandingkan gelombang elektromagnetik.

Gelombang ultrasonik adalah gelombang longitudinal yang merambat melalui medium dengan frekuensi lebih dari 20 kHz; sehingga partikel-partikel berpindah searah dengan arah rambatan gelombang. Pada medium yang dilalui terjadi proses peregangan dan perapatan. Telah kita ketahui bahwa massa medium selalu tetap sedangkan volume berubah sehingga rapat massanya berubah dan menyebabkan perubahan tekanan. Jadi gelombang ini dapat dipandang sebagai gelombang perpindahan, volume, rapat massa dan energi. Kecepatan gelombang akustik yang merambat ke berbagai arah mempunyai harga yang sama (Maskunah, 1986; Yatarif, 2008; Baidillah, 2008).

Berbagai percobaan pengendalian bakteri *E. coli* dengan menggunakan gelombang ultrasonik, diantaranya adalah: Hudori (2002), menggunakan frekuensi 40 kHz, daya 10 watt, mampu mereduksi bakteri 99,46 %. Dehghani & Hadi (2005), menggunakan frekuensi 42 kHz, daya 70 watt, mampu mereduksi



bakteri 99,80 %. Sementara itu, Mansyur & Sembiring (2009), menggunakan frekuensi 1,05 MHz; daya 0,42 watt, mampu reduksi bakteri *E. coli* sebesar 40%.

Sedangkan Herceg *et al* (2013), menggunakan frekuensi 20 kHz, daya 600 watt yang dikombinasi dengan suhu tinggi mampu mereduksi bakteri *E. coli* 3014,

Staphylococcus aureus 3048, *Salmonella spp* 3046, *Listeria monosytogeneses* ATCC 23074, dan *Basillus cereus* 30. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa

bakteri gram negatif lebih rentan terhadap paparan gelombang ultrasonik dibandingkan dengan gram positif (Herceg *et al*, 2013). Menurut Kumar *et al*

(2014), populasi bakteri dalam lumpur mengalami penurunan sesuai dengan frekuensi (35 KHz dan 130 KHz), daya 250 watt dan jangka waktu (5, 10, 20 dan

30 menit). Karena frekuensi dan periode waktu meningkat populasi bakteri menurun. Juga diamati bahwa frekuensi 130 KHz lebih efektif dibandingkan

frekuensi 35 KHz. Li *et al* (2016), menggunakan ultrasonik dengan frekuensi 20

kHz dengan daya dan waktu iradiasi masing-masing 60 W.m² dan 0 sampai 20 menit. Diperoleh hasil: Laju pembunuhan 10⁶ CFU/ml *E. coli* dan *S. aureus*

sesudah diberi perlakuan selama 20 menit berturut-turut adalah: 98.14% ± 0.89% and 91.68% ± 1.45%, sementara laju pembunuhan 10⁸ CFU/ml *E. coli*

and *S. aureus* berturut-turut setelah diberi perlakuan selama 20 menit adalah: 99.24% ± 0.44% and 92.75% ± 1.06%.

Sangat sedikit informasi yang ditemukan dalam literatur tentang pengaruh amplitudo gelombang ultrasonik pada mikroorganismen inaktivasi. Namun

demikian, telah dilaporkan bahwa intensitas gelombang ultrasonik berkaitan langsung dengan amplitudo, ketika terjadi peningkatan amplitudo terjadi

peningkatan daerah kavitasi, hal ini menyebabkan bakteri menjadi lebih tidak aktif. (Patil, 2009; Noci, 2009; Herceg *et al*, 2012). Banyak hasil penelitian

menggunakan gelombang ultrasonik, namun belum ada yang menyebutkan mekanisme kematian bakteri dan tampilan fisik bakteri yang telah mati.

Gelombang ultrasonik digunakan sebagai metode alternatif untuk membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* karena : gelombang ultrasonik adalah gelombang mekanik yang relatif tidak berbahaya dan tidak menimbulkan pencemaran terutama bunyi (Mansyur & Sembiring, 2009), dapat membunuh bakteri secara fisika melalui stres mekanik, kavitasi, serta turbulensi larutan (Hudori, 2002; Dehghani & Hadi, 2005), dapat membunuh bakteri secara kimia melalui H_2O_2 yang dihasilkan melalui peristiwa kavitasi (Ackerman, 1998; Cheke 2002). Kavitasi umumnya terjadi pada gelombang ultrasonik frekuensi rendah yang digunakan untuk merusak membran dan melisiskannya (Lillard, 1994; Raso *et al*, 1998; Vollmer *et al*, 1998; Belgrade *et al*, 1999; Singer *et al*, 1999; Cochran *et al*, 2001; Chandrapala *et al*, 2012).

Ozon (O_3), gas ditemukan di pertengahan abad kesembilan belas, adalah molekul yang terdiri dari tiga atom oksigen dalam struktur dinamis tidak stabil. Gas ini tidak berwarna, berbau menyengat dan eksplosif dalam bentuk cair atau padat. Ozon memiliki paruh 40 menit pada $20^\circ C$ dan sekitar 140 menit pada $0^\circ C$. Fungsi dasarnya adalah untuk melindungi manusia dari efek berbahaya dari radiasi ultraviolet. Massa jenis ozon kurang dari $20 \text{ mg} / \text{m}^3$ di permukaan bumi pada konsentrasi yang sangat kompatibel dengan kehidupan. Meskipun ozon memiliki efek relatif berbahaya, namun para peneliti percaya memiliki banyak efek terapi (DiPaolo *et al*, 2004; Elvis & Ekta, 2011). Ozon medis digunakan untuk mendisinfeksi dan mengobati penyakit. Mekanisme tindakan adalah dengan inaktivasi bakteri, virus, jamur, ragi dan protozoa, stimulasi metabolisme oksigen, aktivasi sistem kekebalan tubuh. Bentuk obat dalam keadaan gas belum, dan untuk alasan ini bahwa teknik aplikasi khusus harus dikembangkan untuk penggunaan ozon yang aman (Elvis & Ekta, 2011).



Ozon digunakan sebagai metode alternatif untuk membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* karena mampu menginaktivasi dinding sel bakteri melalui oksidasi fosfolipid dan lipoprotein (Elvis & Ekta, 2011), merupakan desinfeksi yang kuat yang mampu mengoksidasi berbagai jenis bakteri, spora, jamur, protozoa, bahan organik lainnya (Sastroasmoro *et al*, 2004; Seidler *et al*, 2008; Jani *et al*, 2012), dan dapat meningkatkan kekebalan inang dengan meningkatkan produksi sitokin (Bocci, 1998).

Metode ultrasonik-ozon adalah metode yang relatif baru, yaitu menggabungkan gelombang ultrasonik dengan air ozon. Metode ini digunakan untuk membunuh bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), karena : 1. Gelombang ultrasonik adalah gelombang mekanik yang memerlukan medium untuk merambat, sedangkan air ozon adalah medium yang baik untuk merambat gelombang ultrasonik. 2. Metode ini menggabungkan metode fisika dan kimia sekaligus sehingga mempunyai daya bunuh relatif tinggi. 3. Gelombang ultrasonik dapat menginaktivasi bakteri secara fisika melalui stres mekanik, kavitasitas, serta efek kimia, sedangkan ozon menginaktivasi bakteri melalui efek kimia. 4. Adanya gelombang ultrasonik dapat mengurangi dosis ozon yang digunakan untuk membunuh MRSA.

1.2 Permasalahan

Dengan melihat latar belakang permasalahan yang telah diuraikan, maka permasalahan pada penelitian ini adalah:

Bagaimana aplikasi kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon untuk membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasitas, dan efek kimia ?

1.2.1 Sub Permasalahan

Rumusan sub permasalahan ini difokuskan pada pengaruh antar variabel



penelitian dengan didukung oleh fakta empirik berupa gambar-gambar terkait dengan kematian MRSA, sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap Persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia?
2. Bagaimana pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia?
3. Bagaimana tingkat kerusakan sel MRSA *in vitro* dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik?
4. Bagaimana pengaruh dosis paparan ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia serta berapa dosis lethalnya?
5. Bagaimana tingkat kerusakan sel MRSA *in vitro* akibat dipapari ozon melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel ?
6. Bagaimana pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan Ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia?
7. Bagaimana tingkat kerusakan sel MRSA *in vitro* akibat dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan?
8. Membandingkan tingkat kerusakan sel MRSA *in vitro* akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik, ozon, dan kombinasi ultrasonik-ozon dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel?



1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menemukan pengaruh gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan sebagai metode alternatif untuk membunuh *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah dalam konteks membuktikan gagasan peneliti tentang pengaruh antar variabel, parameter, dan didukung oleh indikator penelitian

1. Menemukan pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap Persen kematian *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.
2. Menemukan pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.
3. Menemukan tingkat kerusakan sel *MRSA in vitro* dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik?
4. Menemukan pengaruh dosis paparan ozon terhadap persen kematian *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia serta besar dosis lethalnya?
5. Menemukan tingkat kerusakan sel *MRSA in vitro* akibat dipapari ozon melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel ?
6. Menemukan pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan Ozon terhadap persen kematian *MRSA in vitro* melalui stres mekanik,



kavitasi dan efek kimia?

7. Mengamati dan menganalisis tingkat kerusakan sel MRSA *in vitro* akibat dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan.

8. Membandingkan dan menganalisis tingkat kerusakan sel MRSA *in vitro* akibat paparan gelombang ultrasonik, ozon, dan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, serta perubahan warna sel MRSA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat akademis

1. Memberikan informasi tentang pemanfaatan metode ultrasonik-ozon sebagai metode alternatif untuk membunuh bakteri melalui stress mekanik, kavitasi dan efek kimia.

2. Memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme kematian MRSA serta tampilan fisiknya setelah terpapar gelombang ultrasonik-ozon.

3. Dapat digunakan untuk melengkapi metode pengendalian mikroba pada teks book yang belum mencantumkan metode pengendalian mikroba dengan menggunakan gelombang mekanik.

1.4.2 Manfaat praktis

1. Sebagai penelitian awal untuk memanfaatkan gelombang ultrasonik-ozon sebagai metode alternatif untuk mempercepat penyembuhan luka kronis yang aman.

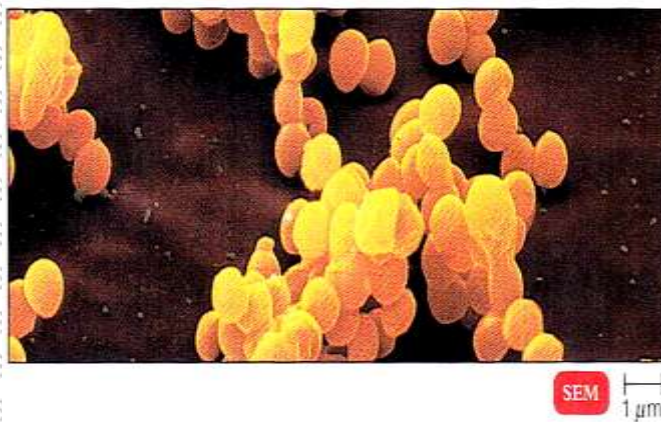
2. Dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk desinfektan pada pengolahan air bersih



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 $^{\circ}\text{C}$, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20 $^{\circ}\text{C}$ - 25 $^{\circ}\text{C}$). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau (Gambar 2.1)



Gambar 2.1 *Staphylococcus aureus* berbentuk seperti kelompok anggur (Tortora et al, 2007)

Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *Staphylococcus aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Kusuma, 2009).



2.1.1 Ukuran bakteri

Satuan ukuran bakteri ialah mikrometer (μm), yang setara dengan 10^{-6} m.

Bakteri yang paling umum dipelajari di dalam praktikum mikrobiologi dasar berukuran kira-kira $0,5 - 1,0 \times 2,0 - 5,0 \mu\text{m}$. Sebagai contoh bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* yang berbentuk bola mempunyai diameter yang berkisar dari $0,75$ sampai $1,25 \mu\text{m}$. Bentuk batang yang berukuran rata-rata seperti bakteri tifoid dan disentri mempunyai lebar $0,5$ sampai $1 \mu\text{m}$ dan panjang 2 sampai $3 \mu\text{m}$. Sel beberapa spesies bakteri amat panjang; panjangnya dapat melebihi $100 \mu\text{m}$ dan diameternya berkisar dari $0,1$ sampai $0,2 \mu\text{m}$. (Pelezar & Chan, 1988; Tortora, 2007)

2.1.2 Struktur dinding sel bakteri

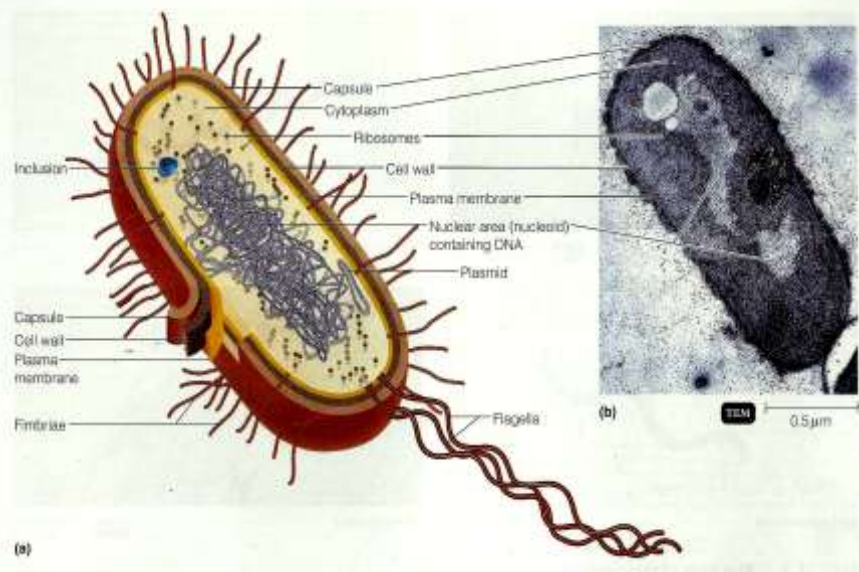
Pada umumnya bakteri terbungkus dalam dinding yang melindungi sel-sel terhadap lisis oleh tekanan osmotik dari dalam maupun dari bahan kimia atau serangan biologis dari luar. Dinding disatukan dalam lapisan yang terdiri dari empat komponen utama membran dalam, peptidoglikan, membran luar dan S-lapisan. Dua yang pertama adalah unsur dasar dari dinding bakteri, membran luar merupakan ciri dari salah satu cabang dari bakteri dan S-lapisan adalah pilihan dalam berbagai mikroorganisme. Dua jenis dasar dinding yang Gram-positif, yang tidak memiliki membran luar, dan Gram-negatif, yang memiliki membran luar. (Young, 2010)

a. Struktur luar dinding sel

Pada umumnya bakteri terbungkus dalam dinding yang melindungi sel-sel terhadap lisis oleh tekanan osmotik dari dalam maupun dari bahan kimia atau serangan biologis dari luar. Dinding disatukan dalam lapisan yang terdiri dari empat komponen utama: membran dalam, peptidoglikan, membran luar dan S-layer. Dua yang pertama adalah



unsur dasar dari dinding bakteri, membran luar merupakan ciri dari salah satu cabang dari bakteri dan S-lapisan adalah pilihan dalam berbagai mikroorganisme. Dua jenis dasar dinding yang Gram-positif, yang tidak memiliki membran luar, dan Gram-negatif, yang memiliki membran luar. (Young, 2010). Pada gambar 2.2 adalah sel bakteri tunggal beserta bagian-bagiannya.



Gambar 2.2 Dinding sel bakteri beserta bagian-bagiannya. (a) Gambar dengan mikroskop (b) menunjukkan bakteri memanjang untuk mengungkapkan komposisi dalam (Tortora *et al*, 2007).

Flagelum adalah rambut yang teramat tipis memuat menembus dinding sel dan bermula dari tubuh dasar, suatu struktur granular tepat di bawah membran sel di dalam sitoplasma. **Flagelum** menyebabkan motilitas pada sel bakteri. **Flagelum** terdiri dari tiga bagian : tubuh dasar, struktur seperti kait, dan sehelai filamen panjang di luar dinding sel. jika bakteri mendeteksi adanya makanan maka akan berenang menuju nutrisi tersebut. (Chen S, 2011)



Pili (fimbriae) adalah struktur tambahan yang melekat pada permukaan dinding sel tetapi lebih pendek dari flagella serta lebih halus.

Pili tersusun dari protein yang disebut pilin dan biasanya dimiliki oleh bakteri gram negatif. Alat ini berfungsi sebagai alat untuk menempelkan dirinya pada sel hospes disebut coloning factor. Selain itu ada **pili** yang berperan di dalam proses pemindahan materi genetik dari salah satu bakteri ke bakteri yang lahir, disebut **sex pili**. (Tim mikrobiologi FK Universitas Brawijaya, 2003).

Kapsul adalah suatu lapisan tipis, berada di luar dinding sel dan secara tersusun atas polisakarida, polipeptida atau kedua-duanya. Kapsul dapat melindungi bakteri dari dari proses fagositosis. Kapsul juga menentukan derajat keganasan bakreri suatu penyakit selain itu juga bersifat antigenik. (Tim mirobiologi FK Universitas Brawijaya, 2003). untuk dapat menyebabkan penyakit, organisme harus berhasil menjajah tuan rumah, berkembang biak, menahan serangan dari respon imun bawaan.

Polisakarida kapsuler yang berulang oligosakarida dirakit di sitoplasma dan diangkut eksternal ke dinding sel oleh transferases membran sel dimana mereka terikat untuk polisakarida dinding sel dan peptidoglikan. (Buttery & Moxon, 2002).

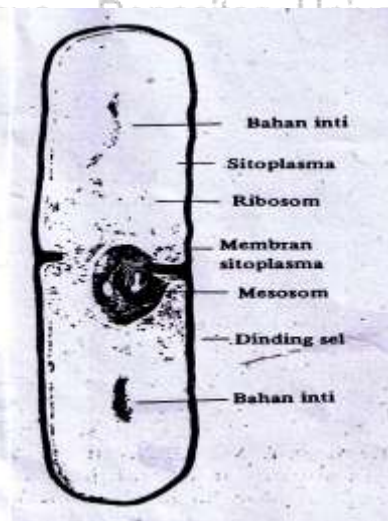
Dinding sel bakteri adalah makro molekul elastis yang mendefinisikan bentuk bakteri dan memungkinkan bakteri untuk melawan lisis sebagai akibat dari tekanan tinggi osmotik intraseluler. Banyak bakteri merombak sebanyak setengah dari dinding sel mereka per generasi, dan proses ini akan mewakili kerugian yang signifikan dari sumber daya jika sel-dinding tidak kembali setelah daur ulang. Hal ini



dapat dilakukan dengan cara menaruh bakteri tersebut di bawah tekanan amat tinggi, suhu amat rendah, atau kondisi-kondisi fisik aslinya selama dan sesudah perlakuan semacam itu. (Johnson *et al*, 2013).

b. Struktur dalam dinding sel

Struktur paling umum yang mungkin terdapat di dalam dinding sel bakteri diperlihatkan pada Gambar 2.3 Berikut ini adalah deskripsi masing-masing struktur tersebut.



Gambar 2.3 Struktur utama yang terdapat di dalam dinding sel bakteri. Struktur tertentu, misalnya butiran atau tubuh inklusi, tidak selalu ada padasemua sel bakteri. (Pelezar & Chan, 1988).

Membran sitoplasma adalah lapisan tipis yang terletak di sebelah dalam dinding sel, tersusun oleh 60% protein dan 40% lipid yang umumnya berbentuk fosfolipid. Membran ini berfungsi mengatur keluar masuknya bahan-bahan dari dalam sel atau dari luar sel, dan hanya bahan-bahan tertentu saja yang bisa melewatinya. Sifat tersebut dinamakan semipermeabilitas membran sitoplasma. (Tim Mikrobiologi FK Universitas Brawijaya, 2003).



Mesosom. Membran sitoplasma dengan cara melipat ke arah dalam atau invaginasi ke dalam *sitoplasma*, menghasilkan suatu struktur yang disebut *mesosom*. *Mesosom* selalu sinambung dengan membran sitoplasma. Mereka seringkali dijumpai bermula pada titik tempat membran memulai invaginasi sebelum terjadinya pembelahan sel, dan mereka jadi melekat pada daerah nukleus. *Mesosom* diduga berfungsi dalam sintesis dinding sel dan pembelahan nukleus. (Plezar & Chan, 1988)

Bahan inti sel bakteri, tidak seperti sel organisme eukariotik, tidak mempunyai kromosom yang diskrit (tersendiri), alat mitosis untuk pembelahan sel, nukleolus, dan membran nukleus. Fungsi nukleus sebagai pusat kendali sel dipengaruhi oleh keberadaan materi genetik yang berada di dalamnya. Materi genetik tersebut berupa molekul asam nukleat yang berisi informasi untuk menentukan urutan asam amino yang akan menjadi protein struktural maupun protein fungsional dalam sel. Asam nukleat juga merupakan bagian dari struktur selular sel yang dapat menentukan dan memperbaiki rantai polipeptida jika terjadi kesalahan dalam sintesisnya, dan dapat mengkatalisis beberapa reaksi penting dalam sel, termasuk pembentukan ikatan peptida antar asam amino selama proses sintesis protein. (Habas & Dawid, 2005).

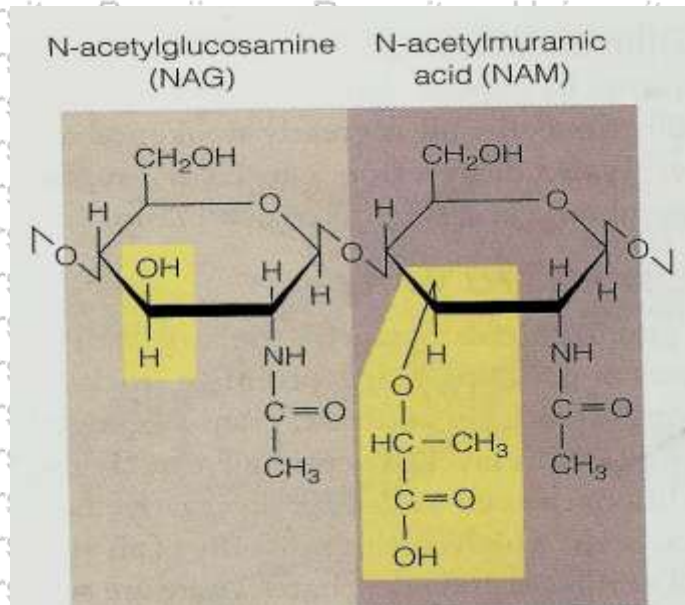
Fungsi umum dari dinding sel adalah mencegah sel bakteri pecah ketika tekanan air dari dalam sel lebih besar dari pada di luar sel. Dinding sel berperan untuk membantu mempertahankan bentuk bakteri dan berfungsi sebagai titik berlabuhnya flagela. Volume bakteri menambah membran plasma dan dinding sel memperpanjang sesuai kebutuhan. Secara klinis, sel dinding adalah penting karena memberikan kontribusi untuk



kemampuan beberapa spesies untuk menyebabkan penyakit. Selain itu, komposisi kimia dari dinding sel digunakan untuk membedakan jenis bakteri (Tortora *et al*, 2007)

2.1.3 Komposisi dan sifat dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri terdiri dari jaringan makromolekul yang disebut peptidoglikan (juga dikenal sebagai murein), yang hadir baik sendiri atau dalam kombinasi dengan substansi. Peptidoglikan lain terdiri dari pengulangan disakarida dipasang polipeptida ke dari kisi mengelilingi dan melindungi seluruh sel. Bagian disakarida terdiri dari monosakarida disebut N-asetilglukosamin (NAG) dan asam N-acetylmuramik (NAM) (dari Nurus, yang berarti dinding), yang berhubungan dengan glukosa. Rumus struktural untuk NAG dan NAM seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4

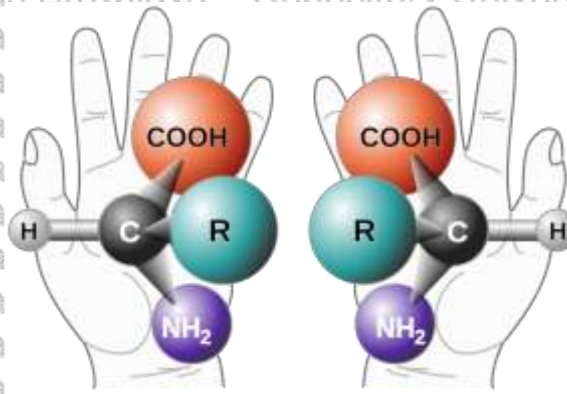


Gambar 2.4 N-asetilglukosamin (NAG) dan asam N-acetylmuramic (NAM) bergabung sebagai peptidoglikan dalam sebuah daerah emas menunjukkan perbedaan antara dua molekul. Keterkaitan diantaranya disebut β -1,4 linkage (Tortora *et al*, 2007).

Jenis komponen peptidoglikan dirakit pada dinding sel bergantian antara molekul-molekul NAM dan NAG terhubung dalam baris 10 sampai 65 gula untuk

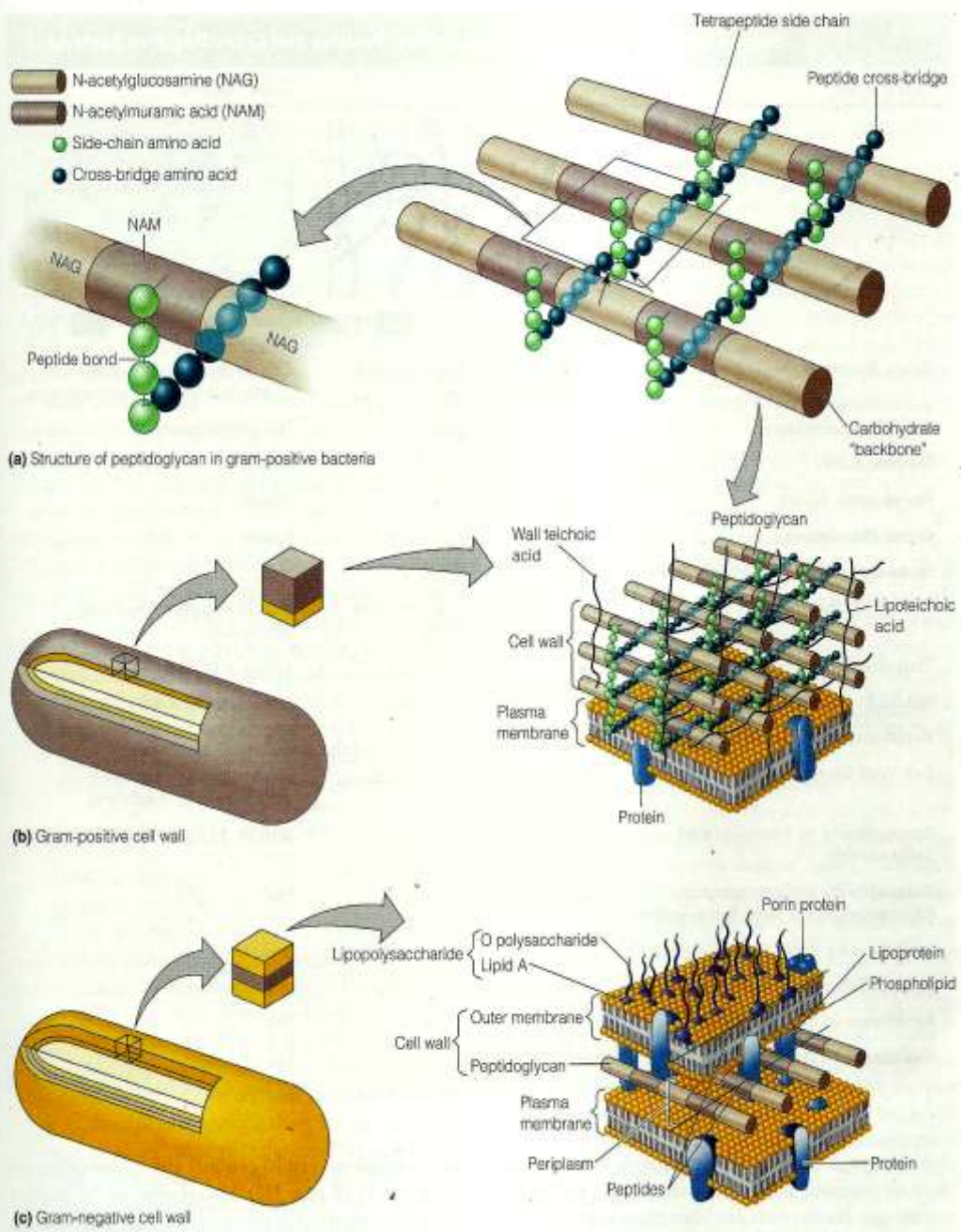


membentuk karbohidrat "tulang punggung (*backbone*)" (bagian glikan dari peptidoglikan). Baris yang berdekatan dihubungkan oleh polipeptida (bagian peptida dari peptidoglikan). Meskipun struktur link polipeptida bervariasi, selalu termasuk rantai samping tetrapeptide, yang terdiri dari empat asam amino yang melekat pada NAMs pada backbone tersebut. Asam amino dalam pola D dan bentuk L (Gambar 2.5). Ini unik karena asam amino yang ditemukan dalam protein lainnya adalah bentuk-bentuk L (Tortora *et al*, 2007).



Gambar 2.5 L-dan D-isomer dari asam amino, yang ditunjukkan dengan model bola-dan-tongkat. Dua isomer, seperti tangan kiri dan kanan, merupakan bayangan cermin satu sama lain dan tidak dapat ditumpangkan pada satu sama lain (Tortora *et al*, 2007)

Rantai samping tetrapeptide paralel dapat langsung terikat satu sama lain atau dihubungkan oleh sebuah peptida lintas-jembatan, yang terdiri dari rantai pendek asam amino. penisilin mengganggu dengan menghubungkan akhir dari baris peptidoglikan oleh peptida cross-bridge (Gambar 2.6). Akibatnya, dinding sel sangat lemah dan sel mengalami lisis, kerusakan yang disebabkan pecahnya membran plasma dan hilangnya sitoplasma.



Gambar 2.6 Dinding sel bakteri (a) Struktur peptidoglikan bakteri gram positif. Bersama tulang punggung karbohidrat (bagian glikan) dan rantai samping tetrapeptide (bagian peptida) membentuk peptidoglikan.. (b) Dinding sel gram positif (c) Dinding sel gram yang negatif (Tortora *et al*, 2007).



Pada umumnya bakteri gram positif, dinding sel terdiri atas banyak lapisan peptidoglikan, berbentuk tebal, struktur yang kaku (Gambar 2.5b).

Sebaliknya, dinding sel gram-negatif hanya berisi lapisan tipis peptidoglikan (Gambar 2.5c). Selain itu, dinding sel bakteri gram positif mengandung asam teichoik, yang terutama terdiri dari alkohol (seperti gliserol atau ribitol) dan fosfat.

Dinding sel bakteri gram negatif terdiri dari satu atau beberapa lapisan peptidoglikan dan membran luar (Gambar 2.5c). Peptidoglikan ini terikat pada lipoprotein (lipid kovalen terkait dengan protein) dalam membran lain dan dalam periplasma, cairan seperti gel antara membran luar dan membran plasma.

Periplasma mengandung konsentrasi tinggi enzim degradatif dan protein transport. Dinding sel Gram-negatif tidak mengandung asam teichoik. Karena dinding sel bakteri gram negatif hanya berisi sejumlah kecil peptidoglikan, bakteri ini lebih rentan terhadap kerusakan mekanis (Tortora *et al*, 2007). Perbandingan beberapa sifat bakteri gram positif dan gram negatif ditunjukkan dalam Tabel 2.1



Tabel 2.1 Perbandingan beberapa sifat bakteri gram positif dan gram negatif

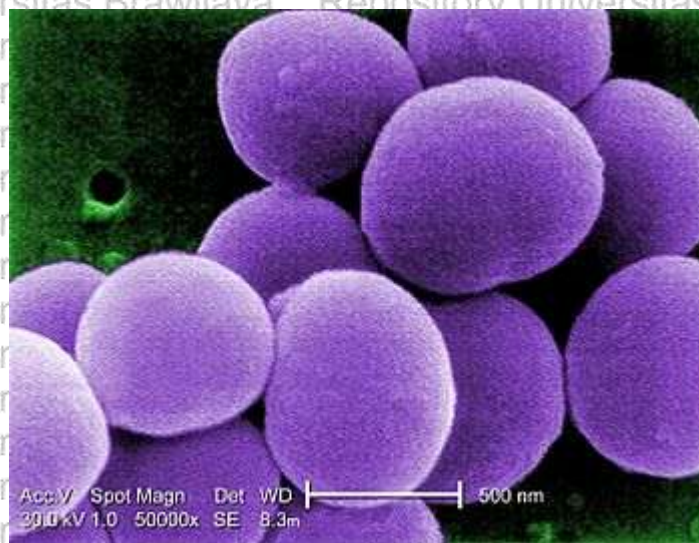
	Gram positif	Gram negatif
Reaksi gram	Mempertahankan violet kristal pewarna dan noda ungu gelap atau ungu	Dapat berdekolonisasi untuk menerima kontra noda (safranin) dan noda merah muda
Lapisan Peptidoglikan	Tebal (berlapis-lapis)	Tipis (satu lapis)
Asam teichoic	Ada di banyak tempat	Tidak ada
Ruang periplasma	Tidak ada	ada
Membran luar	Tidak ada	ada
Kadar Lipopolisakarida (LPS)	Hampir tidak ada	Tinggi
Kadar lipid dan lipoprotein	Rendah (asam bakteri cepat memiliki lipid terkait dengan peptidoglikan)	Tinggi (karena adanya membran luar)
Struktur flagellar	2 cincin dalam tubuh basal	4 cincin dalam tubuh basal
Racun yang dihasilkan	Terutama eksotoksin	Terutama endotoksin
Ketahanan terhadap gangguan fisik	Tinggi	Rendah
Gangguan dinding sel oleh lisozim	Tinggi	Rendah (membutuhkan perlakuan awal untuk merusak membran luar)
Kerentanan terhadap penisilin dan sulfonamide	Tinggi	Rendah
Kerentanan terhadap streptomisin, kloramfenikol, dan tetrasiklin	Rendah	Tinggi
Penghambatan oleh pewarna dasar	Tinggi	Rendah
Kerentanan terhadap deterjen anionik	Tinggi	Rendah
Resistensi terhadap natrium azida	Tinggi	Rendah
Resistensi terhadap pengeringan	Tinggi	Rendah

Tortora *et al*, 2007



2.1.4 Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

MRSA adalah *Staphylococcus aureus* yang mengalami resistensi karena perubahan genetik yang disebabkan paparan terapi antibiotik yang tidak rasional. Transmisi bakteri ini dari satu pasien ke pasien yang lain melalui peralatan medis yang tidak diperhatikan sterilisasinya. Transmisi dapat pula melalui udara maupun fasilitas ruangan (Goldman and Huskins, 2000; Golsby *et al*, 2003; Aderen and Hasan, 2005; Denis, 2007; Laura, 2009). MRSA adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang mengalami kekebalan terhadap antibiotik jenis metisilin dan dapat didiagnosis dengan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan kultur dengan *CHROMagar MRSA* (Wahyono, 2001; Wensel and Brewer, 2002; Denis, 2007; Wilson, 2008). Gambar 2.7 adalah MRSA yang diamati dengan perbesaran 50.000 kali dan skala 500 nm.



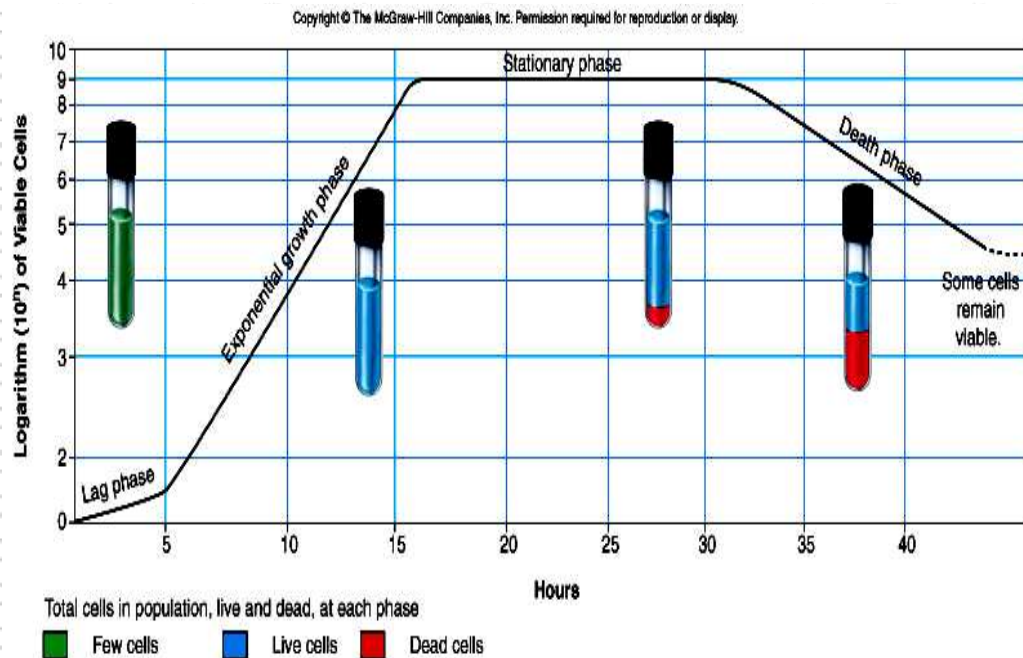
Gambar 2.7 MRSA dengan perbesaran 50.000 kali dan skala 500 nm

Bakteri ini mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menimbulkan wabah di rumah sakit. MRSA dapat menjadi karier di lingkungan rumah sakit melalui pasien dan tenaga kesehatan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa karier merupakan media pembawa MRSA yang potensial di

rumah sakit (Safdar dan Maki, 2002; Goyal *et al*, 2002; Sachdev *et al*, 2003; Cesur *et al*, 2004).

2.1.5 Pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah semua komponen organisme secara teratur. Pertumbuhan bakteri berarti jumlah bakteri tersebut bertambah dan berakumulasi sebagai koloni yang merupakan populasi yang terdiri atas miliaran sel (Radji, 2010). Phase pertumbuhan dapat dilihat dalam gambar 2.8



Gambar 2.8 Empat fase kurva pertumbuhan mikroorganisme (Tortora *et al*, 2007)

Dalam Gambar 2.8 terlihat bahwa ada 4 phase kurva pertumbuhan mikroorganisme, yaitu :

1. Lag phase

Phase ini disebut phase adaptatif. Jika bakteri dipindahkan ke dalam



suatu medium, maka akan beradaptasi dengan kondisi lingkungannya.

Waktu adaptatif ini berlangsung selama 2 jam, bakteri belum berkembang biak dalam phase ini, tetapi aktivitas metabolisme sangat tinggi (Suharto dan Chatim, 2014). Menurut Tortora *et al*, 2007. Faktor-faktor yang mempengaruhi fase ini diantaranya adalah :

a. Medium dan lingkungan pertumbuhan

Jika pertumbuhan sama seperti lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi. Tetapi jika nutrient yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru berbeda dengan sebelumnya, maka diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesa enzim-enzim.

b. Jumlah inokulum

Jumlah inokulum yang semakin tinggi akan mempercepat fase adaptasi. Ada beberapa hal yang mungkin menghambat

Fase adaptasi diantaranya adalah : kultur dipindahkan dari medium yang kaya nutrien ke medium yang kandungan nuriennya terbatas, mutan yang baru dipindahkan dari fase statis ke medium baru dengan komposisi sama seperti sebelumnya.

2. Fase pertumbuhan eksponensial

Pada phase ini mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada phase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrient, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Pada phase ini mikroba membutuhkan energi lebih banyak dari pada phase lainnya (Tortora *et al*, 2007). Bakteri berkembang

menjadi dua, jumlahnya mengalami peningkatan, pada umumnya



bakteri berkembang biak dengan berlipat, phase ini berlangsung 18 – 24 jam. Pada pertengahan phase ini pertumbuhan bakteri sangat ideal, pembelahan terjadi secara teratur, semua bahan dalam sel berada dalam keadaan seimbang (balanced Growth) (Suharto dan Chatim, 2014)

Selama pertumbuhan ini, bakteri menjadi lebih sensitif terhadap lingkungan yang buruk, sebagai contoh : radiasi dan antibiotik dapat mempengaruhi tahapan penting dalam proses pertumbuhan sel selama phase ini (Radji M., 2015)

3. Phase stasioner

Peningkatan jumlah bakteri dapat meningkatkan pula jumlah hasil metabolisme yang toksis. Bakteri ada yang mati, bakteri mulai ada yang mati, pembelahan terhambat, hingga suatu saat jumlah kuman yang hidup tetap sama Periode ini disebut fase stasioner (Suharto dan Chatim, 2014; Radji M., 2015). Kekurangan nutrisi, akumulasi produk sisa, dan perubahan pH yang bersifat toksik bagi sel dianggap sebagai penyebab berhentinya pertumbuhan eksponensial sel. (Radji M., 2015).

4. Phase Kematian

Pada phase ini jumlah bakteri yang hidup berkurang dan menurun. Keadaan lingkungan menjadi sangat jelek. Pada beberapa bakteri timbul bentuk bentuk yang abnormal (Suharto dan Chatim, 2014). Menurut Tortora *et al*, 2007. Sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu:

- a. Nutrien di dalam medium sudah habis.
- b. Energi cadangan di dalam sel habis. Kecepatan kematian bergantung pada kondisi nutrien, lingkungan, dan jenis mikroba.



2.1.6 Pengendalian bakteri

Menurut Radji (2015), mikroorganismen dapat menimbulkan penyakit pada makhluk hidup lain karena memiliki kemampuan menginfeksi, mulai dari infeksi ringan sampai infeksi berat dan bahkan dapat menyebabkan kematian.

Mikroorganismen juga dapat mencemari makanan, minuman, kosmetik dan sediaan obat yang tidak layak dikonsumsi. Oleh karena itu pengendalian yang tepat perlu dilakukan agar mikroorganismen tidak menimbulkan kerugian.

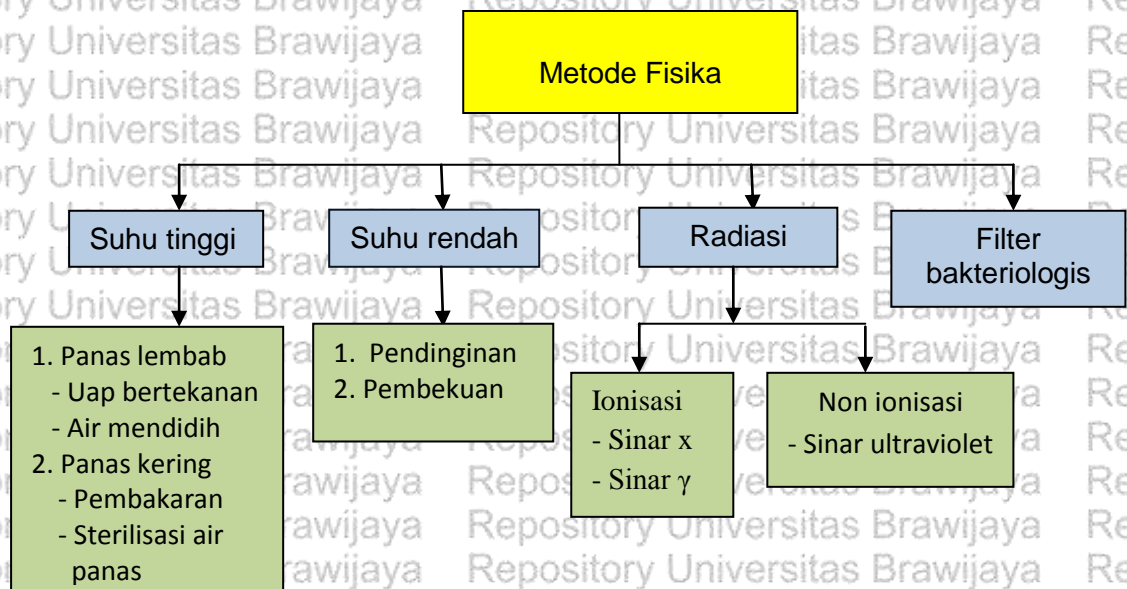
Menurut Radji (2015), tujuan dari pengendalian mikroorganismen antara lain :

- Mencegah penyebaran penyakit infeksi,
- Memusnahkan mikroorganismen yang berada dalam hospes yang terinfeksi,
- Mencegah pembusukan dan kerusakan makanan,
- Mensterilkan peralatan-peralatan yang digunakan untuk proses aseptis.

Mikroorganismen telah menyesuaikan diri dengan keragaman dari habitat bumi yang telah ada, bahkan dari perubahan suhu, kelembaban, tekanan dan cahaya. Untuk mikroba yang terbiasa mampu menahan kondisi fisik yang ekstrim (panas, dingin, pengeringan, radiasi), upaya untuk mengontrol mungkin akan memiliki pengaruh yang kecil. Merupakan suatu keuntungan, karena sebagian besar mikroba yang harus dikendalikan tidak bisa menyesuaikan diri dengan kondisi ekstrem tersebut dan mudah dikendalikan oleh perubahan mendadak dalam lingkungan. Paling menonjol diantaranya antimikroba dengan metode fisika seperti panas, sedangkan kurang banyak digunakan adalah radiasi, filtrasi, gelombang ultrasonik, dan bahkan pendinginan. Bagian berikut akan membahas beberapa metode fisika yang digunakan untuk mengendalikan bakteri. (Talaro & Talaro, 1993).

Mikroorganisme dapat menyebabkan bahaya dan kerusakan. Hal itu nampak dari kemampuannya menginfeksi manusia, hewan, serta tanaman, menimbulkan penyakit yang berkisar dari infeksi ringan sampai kepada kematian. Kerugian ekonomi yang diakibatkannya dapat sangat besar. Karena itu adanya prosedur untuk mengendalikan pertumbuhan dan kontaminasi oleh mikroba merupakan suatu keharusan. Yang dimaksud dengan pengendalian di sini ialah sebagai kegiatan yang dapat menghambat, membasmi atau menyingkirkan mikroorganisme. (Tortora *et al*, 2007)

Metode pengendalian mikroorganisme ada tiga, yaitu: metode fisika, kimia dan biologi. Metode fisika terdiri atas suhu tinggi dan rendah, radiasi, serta filter bakteriologis. Gelombang ultrasonik merupakan metode radiasi non ionisasi karena merupakan gelombang mekanik. Berbeda dengan sinar x dan sinar γ yang merupakan gelombang elektromagnetik energi tinggi yang bersifat ionisasi (Tortota *et al*, 2007). Gambar 2.9 adalah bagan pengendalian mikroorganisme dengan menggunakan metode fisika.



Gambar 2.9 Bagan pengendalian mikroorganisme dengan menggunakan metode fisika.



Dalam tabel 2.2 akan diuraikan pengendalian mikroorganisme (bakteri) dengan menggunakan metode fisika beserta mekanismenya serta penggunaannya.

Tabel 2.2 Metode fisika untuk pengendalian perumbuhan bakteri

Metode	Mekanisme aksi	Keterangan	Penggunaan
Panas			
1. Panas lembab	Denaturasi protein	membunuh bakteri vegetatif dan patogenesis jamur	piring, baskom, pitcher, peralatan,
a. Uap bertekanan		hampir semua virus dalam waktu 10 menit, kurang efektif pada endospora	berbagai
b. Air mendidih	Denaturasi protein	Metode sterilisasi sangat efektif, di sekitar tekanan 15 psi (121°C). Semua sel vegetatif dan endospora mati dalam waktu sekitar 15 menit	Media mikroba, larutan, linen, peralatan, pakaian, peralatan, dan item lainnya yang dapat menahan suhu dan tekanan
3. Panas kering			
a. pembakaran	Terbakar menjadi abu	Sangat efektif untuk metode sterilisasi	cangkir, kertas, berpakaian terkontaminasi, binatang, bangkai, tas dan tisu
b. Sterilisasi air panas	Oksidasi	Metode sterilisasi yang sangat efektif, tetapi membutuhkan suhu 120 C selama sekitar 2 jam.	Gelas kosong, alat, kebutuhan dan jarum suntik kaca.
Dingin			
1. Pendinginan	Penurunan reaksi kimia dan mungkin perubahan dalam protein	Memiliki efek bakteristatik	Pengawetan makanan dan obat
2. Pembekuan	Penurunan reaksi kimia dan mungkin perubahan dalam protein	merupakan metode yang efektif untuk menjaga kultur mikroba, yang cepat beku antara -50°C dan -95°C	Pengawetan makanan dan obat
Radiasi			
1. Ionisasi	Penghancuran DNA	Tidak meluas di sterilisasi rutin. Radiasi tidak terlalu menem-	sterilisasi obat-obatan dan perlengkapan medis dan gigi



2. Non inosisasi	Kerusakan DNA bus	pengendalian kuman dilindungi tertutup dengan lampu UV
Filter bakteriologis	Pemisahan bakteri dari suspensi zat cair	Menghapus mikroba dari cairan atau gas melalui layar seperti bahan, filter yang paling sering digunakan terdiri dari selulosa aasetat atau nitroselulosa
		Berguna untuk mensterilkan cairan (enzim, vaksin) yang dihancurkan oleh panas

(Tortora *et al*, 2007)

2.2 Gelombang Mekanik

Gelombang mekanik adalah energi getaran yang dapat merambat pada medium gas, cair dan padat. Gelombang terjadi akibat adanya gangguan atau getaran yang bergerak terus menerus. Gangguan dapat berupa medan listrik dan medan magnet yang disebut gelombang elektromagnetik (Giancoli, 2001, Halliday *et at*, 2010). Gelombang ultrasonik adalah gelombang mekanik longitudinal yang memiliki frekuensi diatas 20 kHz (Halliday 2010).

Menurut Gooberman (1988). Persamaan gelombang mekanik atau gelombang elastik satu dimensi dapat dinyatakan dengan persamaan (2.1)

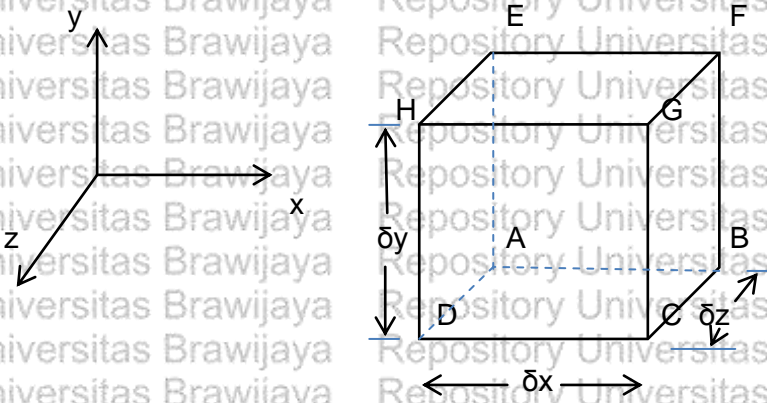
$$a = F/m$$

$$\frac{\partial^2 U}{\partial t^2} = v^2 \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} = \frac{F}{m} \dots\dots\dots (2.1)$$

- Dengan:
- a : percepatan (m/s²)
- F : gaya (N)
- m : massa beban (kg)
- U : Simpangan atau perpindahan (m)
- x : Posisi (m)
- t : waktu (s)
- v : Cepat rambat gelombang(m/s)

Hubungan antara tegangan (stress) dan regangan (strain)

Menurut Gooberman (1988) dan Widodo (1989), bentuk persamaan tegangan dan regangan yang paling umum adalah untuk bahan padat. Hal ini disebabkan fluida dan gas tidak dapat menahan tegangan geser, tetapi untuk cairan dengan viskositas tinggi kesederhanaan tersebut tidak berlaku. Suatu elemen kecil bahan padat dengan panjang sisinya δ_x , δ_y , dan δ_z . Berturut-turut sejajar sumbu x , y dan z dalam koordinat kartesian yang ditunjukkan oleh gambar 2.10



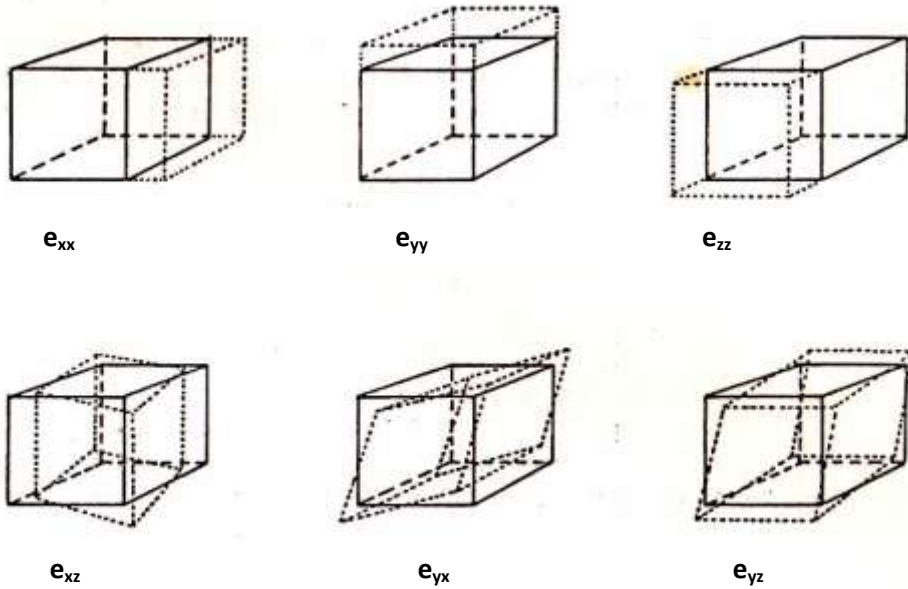
Gambar 2.10 Paralelepiped segi empat yang digunakan untuk analisis tegangan-regangan (Gooberman, 1988)

Bila elemen kecil ini dikenai tekanan, maka akan terjadi perubahan posisi dan sekaligus perubahan bentuk. Perpindahan dapat berupa translasi atau rotasi, sedangkan perubahan bentuknya (deformasi) dapat berupa perubahan panjang setiap sisinya (regangan longitudinal) maupun perubahan sudut setiap bidangnya (regangan geser). Regangan yang ditimbulkannya adalah e_{ij} , dengan indeks i dan j sebagai x dan y , ataupun z dalam koordinat kartesian. Bila $i = j$, regangannya merupakan regangan longitudinal (longitudinal strain), sedangkan bila $i \neq j$, regangannya adalah regangan geser (shear strain).

Untuk elemen kecil bahan padat yang panjang sisinya masing-masing



adalah δx , δy , dan δz , terdapat 6 buah komponen regangan. 6 komponen regangan tersebut ditunjukkan oleh Gambar 2.11



Gambar 2.11 Enam komponen regangan (Gooberman, 1988)

Menurut Gooberman (1988), bila perpindahan titik A sebagai akibat adanya tegangan adalah U_x , U_y , dan U_z yang masing-masing adalah perpindahan titik tersebut dan sejajar sumbu x, y dan z, maka perpindahan titik H terdapat titik asal dapat dinyatakan sebagai:

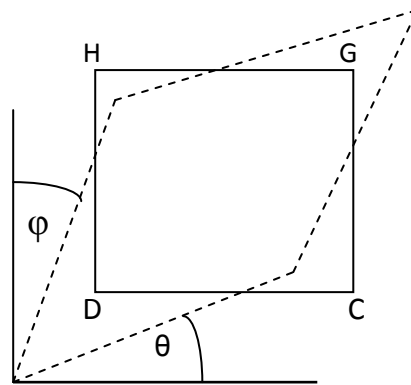
$$U_x + \frac{\partial U_x}{\partial x} \delta x ; \quad U_y + \frac{\partial U_y}{\partial x} \delta y ; \quad U_z + \frac{\partial U_z}{\partial x} \delta z \dots\dots\dots (2.2)$$

Regangan longitudinal didefinisikan sebagai perubahan panjang dalam arah sejajar, maka didapat:

$$e_{xx} = \frac{\partial U_x}{\partial x} ; \quad e_{yy} = \frac{\partial U_y}{\partial y} ; \quad e_{zz} = \frac{\partial U_z}{\partial z} \dots\dots\dots (2.3)$$

Untuk regangan geser yang didefinisikan sebagai perubahan sudut yang terjadi seperti pada Gambar 2.12, regangan gesernya adalah:

$$E_{xy} = \theta + \phi \dots\dots\dots (2.4)$$



Gambar 2.12 Regangan geser pada bidang CDGH dari gambar 2.10 (Gooberman, 1988)

Besar sudut θ dan ϕ dapat ditentukan dari persamaan berikut:

$$\tan \theta = \frac{\partial U_y}{\partial x} ; \quad \tan \phi = \frac{\partial U_x}{\partial y} \quad \dots \dots \dots (2.5)$$

Untuk perubahan sudut yang kecil berlaku:

$$\tan \theta \approx \theta \quad \text{dan} \quad \tan \phi \approx \phi \quad \text{sehingga}$$

$$e_{xy} = \frac{\partial U_y}{\partial x} + \frac{\partial U_x}{\partial y} \quad \dots \dots \dots (2.6)$$

Dengan menggunakan persamaan 2.6 dapat ditentukan regangan untuk bidang yang lainnya:

$$e_{yz} = \frac{\partial U_z}{\partial y} + \frac{\partial U_y}{\partial z} \quad \dots \dots \dots (2.7)$$

$$e_{zx} = \frac{\partial U_x}{\partial z} + \frac{\partial U_z}{\partial x} \quad \dots \dots \dots (2.8)$$

Terlihat pada persamaan (2.6), (2.7), dan (2.8) adanya sifat simetri regangan geser $e_{xy} = e_{yx}$, $e_{xz} = e_{zx}$, $e_{yz} = e_{zy}$ sehingga ada 6 regangan yang bebas.

Ada 6 komponen tegangan bebas yang terdiri dari 3 komponen tegangan geser dan 3 tegangan longitudinal.

Tegangan geser σ_{xy} , σ_{yz} , dan σ_{zx} sedangkan



Tegangan longitudinal : σ_{xx} , σ_{yy} , dan σ_{zz}
 Menurut Goberman (1988) dan Widodo (1989), pada pembahasan ini digunakan definisi yang berupa tegangan bertanda positif untuk tegangan tarik dan bertanda negatif untuk tegangan tekan. Menurut hukum Hooke, bila tegangan yang bekerja tidak melewati batas elastisitas bahannya, maka regangannya sebanding dengan tegangan yang menimbulkankannya. Secara umum dapat dituliskan hubungan antara komponen tegangan dan regangan sebagai:

$$\begin{aligned} \sigma_{xx} &= c_{11}e_{xx} + c_{12}e_{yy} + c_{13}e_{zz} + c_{14}e_{yz} + c_{15}e_{zx} + c_{16}e_{xy} \\ \sigma_{yy} &= c_{21}e_{xx} + c_{22}e_{yy} + c_{23}e_{zz} + c_{24}e_{yz} + c_{25}e_{zx} + c_{26}e_{xy} \\ \sigma_{zz} &= c_{31}e_{xx} + c_{32}e_{yy} + c_{33}e_{zz} + c_{34}e_{yz} + c_{35}e_{zx} + c_{36}e_{xy} \\ \sigma_{yz} &= c_{41}e_{xx} + c_{42}e_{yy} + c_{43}e_{zz} + c_{44}e_{yz} + c_{45}e_{zx} + c_{46}e_{xy} \\ \sigma_{zx} &= c_{51}e_{xx} + c_{52}e_{yy} + c_{53}e_{zz} + c_{54}e_{yz} + c_{55}e_{zx} + c_{56}e_{xy} \\ \sigma_{xy} &= c_{61}e_{xx} + c_{62}e_{yy} + c_{63}e_{zz} + c_{64}e_{yz} + c_{65}e_{zx} + c_{66}e_{xy} \dots\dots (2.9) \end{aligned}$$

dengan c_{11} , c_{12} , dan c_{66} adalah konstanta elastik bahan.

Jadi sifat suatu bahan ditentukan oleh tiga puluh enam konstanta elastik bahan tersebut. Tetapi bila digunakan sifat simetri $c_{rs} = c_{sr}$, dengan r dan s adalah bilangan bulat 1 sampai 6, maka jumlah konstanta tersebut dapat direduksi menjadi 21 konstanta saja. Untuk bahan isotropik, jumlah konstanta elastik bahan tersebut hanya ada dua komponen saja, yaitu konstanta Lamé yang diberi notasi λ dan μ . Konstanta-konstanta ini berhubungan dengan konstanta elastik bahan sebagai:

$$\lambda = c_{12} = c_{13} = c_{23} = c_{21} = c_{31} = c_{32} \dots\dots\dots (2.10a)$$

$$\mu = c_{44} = c_{55} = c_{66} \dots\dots\dots (2.10b)$$

$$\lambda + 2\mu = c_{11} = c_{22} = c_{33} \dots\dots\dots (2.10c)$$

Sedangkan konstanta-konstanta lainnya sama dengan nol, jadi untuk bahan isotropik, hubungan antara tegangan dan regangan adalah:

$$\sigma_{xx} = (\lambda + 2\mu) e_{xx} + \lambda e_{yy} + \lambda e_{zz} \dots\dots\dots (2.11a)$$



$$\sigma_{yy} = \lambda e_{xx} + (\lambda + 2\mu) e_{yy} + \lambda e_{zz} \dots\dots\dots (2.11b)$$

$$\sigma_{zz} = \lambda e_{xx} + \lambda e_{yy} + (\lambda + 2\mu) e_{zz} \dots\dots\dots (2.11c)$$

$$\sigma_{yz} = \mu e_{yz}, \quad \sigma_{zx} = \mu e_{zx}, \quad \sigma_{xy} = \mu e_{xy} \dots\dots\dots (2.11d)$$

Dalam prakteknya jarang digunakan konstanta Lamé λ dan konstanta Lamé μ ini. Konstanta elastik suatu bahan yang lebih sering digunakan adalah modulus Young, modulus Bulk, modulus kekakuan (rigidity), dan Poisson's Ratio.

Hubungan masing-masing konstanta elastik dengan konstanta Lamé λ dan μ adalah:

1. **Modulus Young (E)** adalah Nisbah antara tegangan dan regangan pada suatu spesimen yang diberi tegangan longitudinal secara uniform pada pada satu arah yang permukaan lateralnya dibiarkan bebas, penulisannya secara matematik adalah:

$$E = \frac{\sigma_{xx}}{e_{xx}} = \frac{\mu(3\lambda + 2\mu)}{\lambda + \mu} \dots\dots\dots (2.12)$$

2. **Modulus Bulk (B)** adalah nisbah antara tegangan dengan fraksi perubahan volume pada spesimen yang diberi tekanan hidrostatik yang unioform. Untuk regangan yang kecil, fraksi perubahan volume dinyatakan sebagai penjumlahan 3 regangan longitudinal, sehingga

$$B = \frac{\sigma_{xx}}{e_{xx} + e_{yy} + e_{zz}} = \lambda + 2/3 \mu \dots\dots\dots (2.13)$$

3. **Modulus Kekakuan (μ)** adalah nisbah antara tegangan geser dan regangan geser.

$$\mu = \frac{\sigma_{ij}}{e_{ij}} \text{ dengan } i \neq j \dots\dots\dots (2.14)$$



4. **Poisson's Ratio** (ν) adalah nisbah antara kontraksi lateral (pengurangan diameter) spesimen berbentuk batang dan pertambahan panjang aksial yang dapat dinyatakan sebagai

$$\nu = -\frac{e_{yy}}{e_{xx}} = \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} \quad \dots\dots\dots (2.15)$$

Menurut Cracknell (1980), kecepatan gelombang suara dalam medium:

- Padat dan cairan yang kental dinyatakan dengan $v_L = \sqrt{e/\rho}$
- Cair dinyatakan dengan $v_L = \sqrt{B/\rho}$

Dengan v_L = kelajuan gelombang longitudinal (m/s)

e = modulus elastisitas (Pa)

B = modulus bulk (Pa)

ρ = massa jenis medium (Kg/m^3)

2.3 Gelombang Ultrasonik

Menurut Cracnell (1989), gelombang ultrasonik adalah gelombang longitudinal yang merambat melalui medium dengan frekuensi lebih dari 20 kHz; sehingga partikel-partikel berpindah searah dengan arah rambatan gelombang.

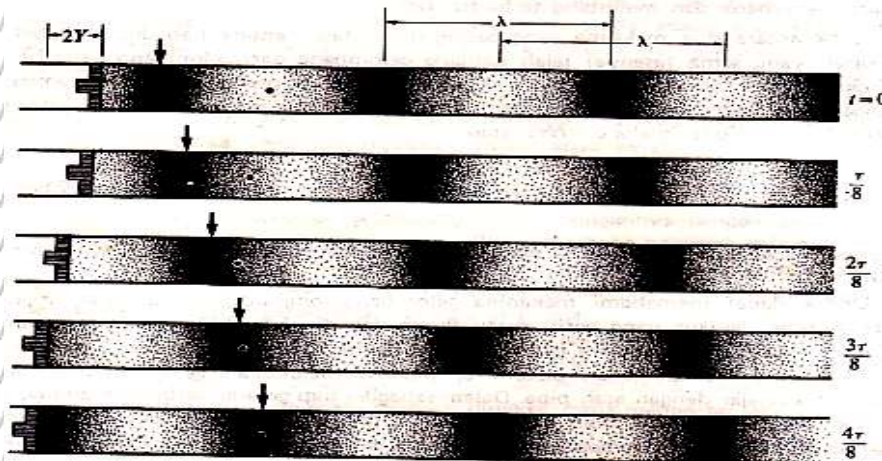
Pada medium yang dilalui terjadi proses peregangan dan perapatan. Telah kita ketahui bahwa massa medium selalu tetap sedangkan volume berubah sehingga rapat massanya berubah dan menyebabkan perubahan tekanan. Jadi gelombang ini dapat kita pandang sebagai gelombang perpindahan, volume, rapat massa dan energi.

2.3.1 Perambatan gelombang ultrasonik

Ada dua jenis perambatan gelombang akustik, yaitu gelombang longitudinal dan gelombang transversal. Pada gelombang longitudinal arah rambatannya sejajar atau searah dengan getarnya, sedangkan gelombang transversal arah rambatannya tegak lurus arah getarnya. Perambatan



gelombang ultrasonik dalam medium gas, cair dan tubuh manusia disebabkan gerak bolak-balik partikel melewati titik seimbangya searah dengan arah rambat gelombangnya. Gelombang bunyi adalah gelombang longitudinal. Di bawah ini adalah gambar rambatan gelombang longitudinal (Sears & Zemansky, 1982).



Gambar 2.13 Gelombang longitudinal sinusoidal yang merambat ke kanan, diperlihatkan pada selang waktu seperdelapan periode (Sears & Zemansky, 1982)

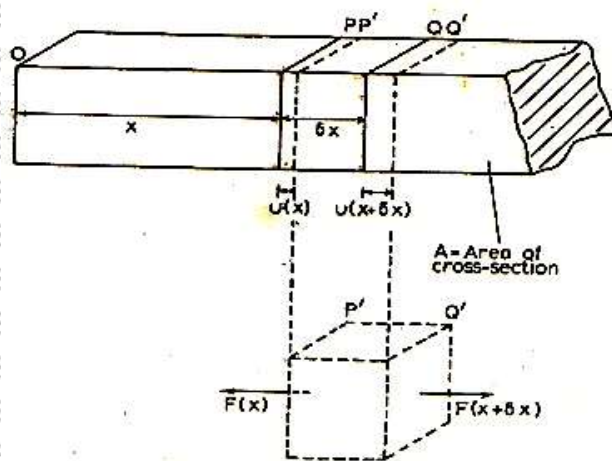
Untuk dapat memahami mekanika gelombang longitudinal, mari kita tinjau sebuah pipa panjang dan berisi suatu fluida dan ujung kirinya terdapat pinston, seperti tampak pada Gambar 2.13. Bintik-bintik merupakan partikel-partikel fluida.

Jika pinston digerakkan selaras sejajar dengan arah pipa. Dalam tiap getaran terbentuk suatu daerah yang tekanannya lebih tinggi daripada tekanan kesetimbangan. Daerah semacam ini di sebut rapatan (kondensasi) dan digambarkan oleh bintik-bintik yang letaknya rapat. Sesudah terjadi rapatan, timbul suatu daerah yang tekanannya lebih rendah daripada tekanan keseimbangan, daerah ini disebut regangan, digambarkan dengan bintik-bintik yang jarang. Rapatan dan regangan bergerak ke kanan dengan kecepatan



konstan. Panjang adalah jarak dua rapatan berturut-turut atau jarak dua regangan berturut-turut. (Sears & Zemansky, 1992).

Menurut Cracnell (1980), menurut Rambat gelombang ultrasonik sepanjang batang, dengan luas penampang A , dan modulus young bahan E ditunjukkan dalam Gambar 2.14



Gambar 2.14 Pergeseran elemen kecil batang akibat pergeseran gelombang longitudinal (Cracnell, 1980)

PQ adalah elemen kecil batang sepanjang δx yang posisi seimbangnya berada di x dan $x + \delta x$. Jadi δx adalah panjang elemen batang pada keadaan seimbang. Akibat adanya regangan, terjadi pergeseran ujung-ujung elemen batang sejauh U dan $U + \delta U$, dengan U merupakan fungsi posisi dan waktu yang dapat ditulis sebagai $U(x,t)$. Ujung-ujung elemen batang setelah dikenai tegangan adalah :

$$P' = x + U \quad \text{dan} \quad Q' = x + \delta x + U + \delta U$$

Bila δx adalah panjang elemen batang pada keadaan seimbang, sebagai akibat adanya tegangan maka pertambahan panjangnya δU , sehingga



regangannya adalah $\delta U/\delta x$. Bila ditinjau regangan sebagai penyimpangan yang kontinu sepanjang elemen batang, maka regangan dapat dinyatakan dengan $\partial U/\partial x$.

Dengan menggunakan definisi modulus Young

$$E = \frac{F(x)}{A \delta U/\delta x} \text{ atau } F(x) = EA \delta U/\delta x \dots\dots\dots (2.16)$$

Dengan Perbedaan gaya $F(x + \delta x)$ dan $F(x)$ di ujung tongkat elemen PQ akan menimbulkan gaya pemulihan, sehingga akan memenuhi hukum Newton sebagai

$$F(x + \delta x) - F(x) = ma \dots\dots\dots (2.17)$$

Karena $\rho = m/V$, $V = A\delta x$ dan $a = \partial^2 U/\partial t^2$ maka persamaan (2.17) dinyatakan dengan:

$$EA (\partial U/\partial x)_Q - EA (\partial U/\partial x)_P = \rho A \delta x (\partial^2 U/\partial t^2) \dots\dots\dots (2.18)$$

Atau

$$\frac{(\partial U/\partial x)_Q - (\partial U/\partial x)_P}{\delta x} = \rho/E (\partial^2 U/\partial t^2) \dots\dots\dots (2.19)$$

dengan menggunakan deret Taylor ruas kiri persamaan (2.19) dapat di tulis sebagai

$$\frac{(\partial U/\partial x)_Q - (\partial U/\partial x)_P}{\delta x} \approx \partial^2 U/\partial x^2 \dots\dots\dots (2.20)$$

Sehingga persamaan (2.20) menjadi :

$$\partial^2 U/\partial x^2 = \rho/E (\partial^2 U/\partial t^2) \dots\dots\dots (2.21)$$

Rumus umum persamaan differensial bagi gelombang 1 dimensi adalah:

$$\partial^2 U/\partial x^2 = 1/c^2 (\partial^2 U/\partial t^2) \dots\dots\dots (2.22)$$

Dengan c = cepat rambat gelombang longitudinal.

Dari persamaan (2.21) dan (2.22) dapat dituliskan cepat rambat gelombang longitudinal dalam suatu batang yang mempunyai modulus Young E adalah:



$$c = \sqrt{E/\rho} \quad (2.23)$$

Jadi dengan demikian cepat rambat gelombang longitudinal dalam suatu bahan sebanding dengan akar modulus elastik bahan dan berbanding terbalik dengan akar rapat massa bahan tersebut.

2.3.2 Kecepatan gelombang ultrasonik

Menurut Yatarif (2008), panjang gelombang (λ) adalah jarak yang ditempuh gelombang suara selama satu periode, sedangkan frekuensi (f) adalah jumlah gelombang yang bergetar dalam waktu satu detik. Manusia dapat mendengar gelombang bunyi antara 20 Hz sampai 20 kHz. Gelombang ultrasonik adalah gelombang suara dengan frekuensi diatas 20 kHz.

Periode (T) adalah waktu yang digunakan untuk menempuh satu panjang gelombang, hubungannya dengan frekuensi dinyatakan dengan $f = 1/T$.

Kecepatan gelombang ultrasonik (c) adalah jarak yang ditempuh gelombang persatuan waktu dan sebanding dengan panjang gelombang dikalikan frekuensi.

Secara matematik dapat ditulis sebagai:

$$c = \lambda f \quad (2.24)$$

Kecepatan gelombang ultrasonik di dalam jaringan tubuh manusia diberikan pada Tabel 2.3

Tabel 2.3 Rapat massa dan kecepatan suara dalam berbagai medium

Medium	Rapat massa (kg/m ³)	Kecepatan (m/s)
Paru-paru	300	600
Lemak	924	1450
Air	1000	1480
Jaringan lunak	1050	1540
Ginjal	1041	1565
Darah	1058	1560
Hati	1061	1555
Otot	1068	1600
Tulang	1912	4080

Yatarif, 2008



Dari Tabel 2.3 di atas terlihat bahwa kecepatan suara di medium bergantung kepada densitas medium yang dilewati. Dalam bidang kedokteran menurut Prijo (1989), untuk menentukan elastisitas suatu bahan atau jaringan. Sifat elastisitas ini berguna untuk mendeteksi tumor yang kadang-kadang tidak terdeteksi menggunakan sinar x. Hal ini disebabkan elastisitas jaringan asli berbeda dengan elastisitas tumor, sedangkan rapat massa jaringan asli sama dengan rapat massa tumornya. Sehingga bila digunakan sinar x kadang-kadang tidak dapat membedakan antara tumor dan jaringan aslinya. Keuntungan lainnya adalah efek sampingannya relatif lebih kecil dibandingkan dengan sinar x (Yatarif, 2008).

2.3.3 Energi gelombang ultrasonik

Menurut Maskunah (1986), perpindahan partikel sebagai fungsi x dan t dapat dinyatakan dengan fungsi gelombang yang secara matematik dituliskan sebagai :

$$U = U_0 e^{j(\omega t - kx)} \quad (2.25)$$

Fungsi gelombang pada persamaan (2.25) dapat pula dituliskan sebagai fungsi gelombang sinusoida seperti :

$$U = U_0 \sin 2\pi (t/T - x/\lambda) \quad (2.26)$$

Dengan:

U_0 : amplitudo perpindahan (m)

$\omega (2\pi f)$: frekuensi sudut (rad/s)

k : bilangan gelombang (m^{-1})

T : periode getaran (s)

λ : panjang gelombang (m)



Jika frekuensi getaran $f = 1/T$ persamaan (2.26) dapat dinyatakan dengan:

$$U(x,t) = U_0 \sin 2\pi (ft - x/\lambda) \dots\dots\dots (2.27)$$

Sedangkan kecepatan gelombang ultrasonik dapat dinyatakan dengan persamaan $c = \lambda.f$ atau $c = \lambda/T$

Kecepatan partikel dapat dicari dengan menurunkan persamaan (2.28)

$$v(x,t) = \frac{\partial U(x,t)}{\partial t}$$

$$v(x,t) = 2\pi f U_0 \cos 2\pi (ft - x/\lambda) \dots\dots\dots (2.29)$$

Kecepatan maksimum partikel

$$v_{maks} = 2\pi f U_0 \text{ atau } v_{maks} = U_0 \cdot \omega$$

Saat partikel melalui titik seimbang energi potensialnya nol dan energi kinetiknya maksimum. Karena jumlah energi potensial dan energi kinetik selalu konstanta, maka energi total partikel sama dengan energi kinetik maksimumnya. Jika massa elemen dari medium m , maka energi gelombang ultrasoniknya adalah:

$$E = \frac{1}{2} m v_{maks}^2 \text{ atau}$$

$$E = \frac{1}{2} m a^2 \omega^2 = 2\pi^2 m f^2 U_0^2 \dots\dots\dots (2.30)$$

Dari persamaan (2.30) terlihat bahwa energi sebanding dengan kuadrat frekuensinya. Bila rapat medium ρ bervolume V medium mempunyai massa ρV dan mengandung partikel sebanyak $\rho V/m$. Energi total dalam volum V adalah:

$$E = \frac{1}{2} m U_0^2 \omega^2 \rho V / m = \frac{1}{2} U_0^2 \omega^2 \rho V$$



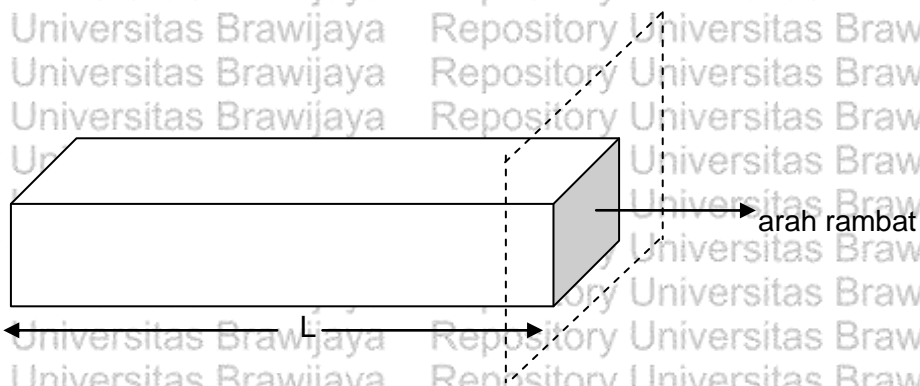
Energi total persatuan volume disebut rapat energi ϵ yang besarnya :

$$\epsilon = \frac{1}{2} U_0^2 \omega^2 \rho \text{ atau}$$

$$\epsilon = 2 \pi^2 f^2 U_0^2 \rho \quad \dots \dots \dots (2.31)$$

Energi ini dibawa oleh gelombang ultrasonik melalui medium dengan kecepatan v .

2.3.4 Intensitas gelombang ultrasonik



Gambar 2.15 Rambatan energi gelombang (Maskunah,1986)

Menurut Cheeke (2002), jumlah energi di dalam balok Gambar 2.15 di a adalah $\frac{1}{2} U_0^2 \omega^2 \rho LA$ akan melewati bidang ω dalam waktu L/c . Dengan demikian daya yang ditransmisikan $P = E / t$.

$$P = \frac{\frac{1}{2} U_0^2 \omega^2 \rho LA}{L/c} \text{ sehingga diperoleh}$$

$$P = \frac{1}{2} U_0^2 \omega^2 \rho c A \quad \dots \dots \dots (2.32)$$

Daya bersatuan joule per detik atau watt. Daya gelombang yang dipancarkan persatuan luas disebut intensitas. Jadi intensitas dapat dinyatakan dengan persamaan $I = P / A$. Gelombang ultrasonik yang dari sumber transduser mengalir kesemua arah. Gelombang ultrasonik merambat ke segala arah, energi



yang dibawanya tersebar ke permukaan yang makin lama semakin luas. Karena merambat dalam arah tiga dimensi, maka luas permukaan merupakan luasan permukaan bola dengan radius r adalah $4\pi r^2$, sehingga intensitas gelombang ultrasonik dapat dinyatakan dengan $I = P / 4\pi r^2$. Bila pada radius r_1 intensitas gelombang ultrasonik I_1 , sedangkan pada radius r_2 intensitas gelombang ultrasonik I_2 , maka hubungan diantara keduanya dapat dinyatakan dengan:

$$I_2 / I_1 = r_1^2 / r_2^2 \dots\dots\dots (2.33)$$

Disamping itu intensitas gelombang ultrasonik dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$I = \frac{1}{2} U_0^2 \omega^2 \rho c = 2 \pi^2 U_0^2 f^2 \rho c \dots\dots\dots (2.34)$$

atau

$$I = \frac{1}{2} \rho c (U_0 \omega)^2 \dots\dots\dots (2.35)$$

Jika impedansi akustik $Z = \rho c$, dan Z bersatuan $\text{kg} / \text{m}^2 \text{s}$ sehingga persamaan (2.35) menjadi:

$$I = \frac{1}{2} Z (U_0 \omega)^2 \dots\dots\dots (2.36)$$

Menurut Ackerman (1988), parameter yang paling mudah diukur adalah impedansi karakteristik Z , yang akan menjelaskan rambatan suatu gelombang jika tidak terjadi serapan. Tabel 2.4 memperlihatkan impedansi karakteristik berbagai jaringan.

Tabel 2.4 Impedansi Karakteristik jaringan

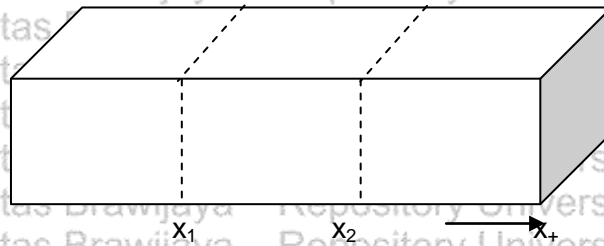
Jaringan/medium	ρ (kg/m ³)	c (m/s)	Z (kg/m ² s)
Paru-paru	300	600	$1,80 \times 10^5$
Lemak	924	1450	$1,34 \times 10^6$
Air	1000	1480	$1,48 \times 10^6$
Jaringan lunak	1050	1540	$1,62 \times 10^6$
Ginjal	1041	1565	$1,63 \times 10^6$
Darah	1058	1560	$1,65 \times 10^6$
Hati	1061	1555	$1,65 \times 10^6$
Otot	1068	1600	$1,71 \times 10^6$
Tulang	1912	4080	$7,80 \times 10^6$

Trisnobudi, 2001

Dari tabel 2.4 terlihat bahwa pada umumnya jaringan ini mempunyai impedansi karakteristik yang dekat nilainya dengan impedansi air. Tetapi untuk tulang mempunyai nilai impedansi karakteristik yang relatif lebih besar dibandingkan yang lainnya, sedangkan lemak mempunyai impedansi relatif lebih kecil dibandingkan dengan yang lainnya.

2.3.5 Atenuasi gelombang ultrasonik

Menurut Cheeke (2000), gelombang ultrasonik yang merambat melalui medium akan mengalami kehilangan energi akibat peristiwa pembiasan, pemantulan dan absorpsi oleh medium yang dilaluinya. Pada peristiwa pemantulan, pembiasan dan hamburan hanya terjadi perubahan arah aliran energi, sedangkan pada peristiwa absorpsi terjadi perubahan bentuk energi yaitu dari energi akustik menjadi energi bentuk lain bergantung pada medium yang dilewatinya. Untuk mencari koefisien absorpsi gelombang ultrasonik dalam medium ditunjukkan dalam Gambar 2.15.



Gambar 2.16 Absorpsi gelombang ultrasonik melalui medium (Maskunah, 1986)

Seberkas gelombang ultrasonik merambat di medium dengan arah sumbu x . Menurut Cheeke (2002), bila kita ukur intensitasnya sebagai fungsi x , maka intensitas di bidang 1 lebih besar dari pada intensitas di bidang 2. Ini berarti ada penurunan intensitas sepanjang x_1x_2 , besar penurunan intensitasnya dinyatakan dengan

$$I = I_0 e^{-\alpha_1 x} \dots \dots \dots (2.37)$$

Dengan I_0 : Intensitas pada bidang 1

I : Intensitas pada bidang 2

α_1 : konstanta pembanding

x : jarak tempuh ($x_2 - x_1$)

Sedangkan tekanan akustiknya adalah

$$P = P_0 e^{-\alpha_p x} \dots \dots \dots (2.38)$$

Dengan P_0 : Tekanan pada bidang 1

P : Tekanan pada bidang 2

α_p : Konstanta atenuasi medium

Akibat tekanan $P(x,t)$ sebanding perpindahan $U(x,t)$ ($P = j\omega\rho cU$), sedangkan intensitas gelombang ultrasonik sebanding dengan perpindahan kuadrat ($I \sim P^2$), dan $I/I_0 = (p/p_0)^2$



$$e^{-\alpha_1 x} = e^{-2 \alpha_p x}$$

Sehingga dapat disimpulkan bahwa $\alpha_1 = 2 \alpha_p$, satuan dari koefisien atenuasi α_p adalah Nepres / m (Np / m) dan $1 \text{ Np} / \text{cm} = 8,686 \text{ dB} / \text{cm}$.

Bila gelombang ultrasonik merambat di dalam air, saat terjadi kompresi jarak molekul – molekul air menjadi lebih pendek dari keadaan normal, pada saat terjadi ekspansi jarak molekul – molekul air menjadi lebih besar, untuk di perlukan energi dan energi diambil dari gelombang ultrasonik yang merambat di dalam air. Selain itu, gelombang ultrasonik yang intensif diberikan di dalam air dapat menimbulkan beberapa perubahan sifat fisik seperti perubahan suhu air, gaya ultrasonik stedy dan efek mematkan yang disebabkan oleh peristiwa kavitasi, dan radikal – radikal itu bereaksi yang menghasilkan H_2O_2 . Dengan demikian di dalam air akan terdapat banyak H_2O_2 yang berfungsi sebagai desinfektan (Ackerman, 1988).

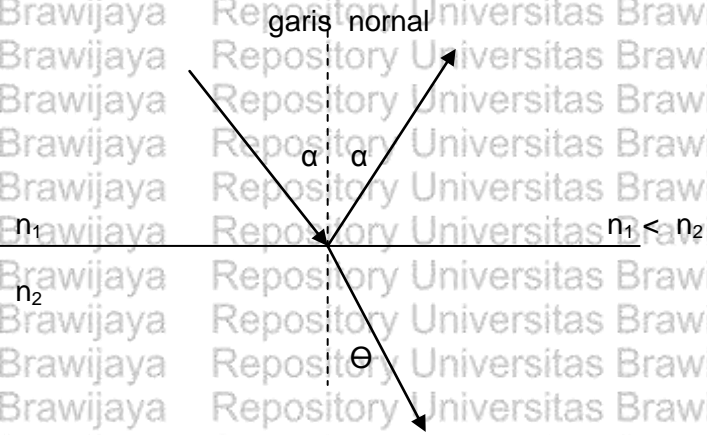
2.3.6 Interaksi gelombang ultrasonik dengan medium

a. Pembiasan

Menurut Halliday (2010), pembiasan adalah peristiwa perubahan arah gelombang ultrasonik ketika mengenai bidang batas medium yang berbeda dengan arah yang tidak tegak lurus bidang batas. Menurut hukum Snellius ketika gelombang mengalami pembiasan dan pemantulan maka besaran fisis yang mengalami perubahan adalah arah, kecepatan, dan panjang gelombang gelombang yang mengalami pembiasan. Bila gelombang datang dari medium yang mempunyai indek bias n_1 dengan kecepatan v_1 dan panjang gelombang λ_1 menuju medium n_2 dengan sudut datang α . Gelombang dipantulkan dengan sudut α dan dibiaskan dengan sudut Θ ,



kecepatan v_2 dan panjang gelombang λ_2 . Gambar 2.17 menunjukkan peristiwa pembiasan menurut hukum Snellius.



Gambar 2.17 Gelombang yang mengalami pembiasan (Halliday, 2010)

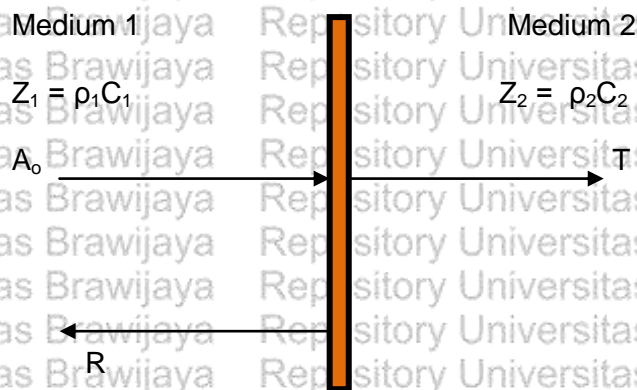
Pembiasan gelombang ultrasonik menurut hukum Snellius dinyatakan dengan:

$$\sin \alpha / \sin \Theta = n_2 / n_1 = v_1 / v_2 = \lambda_1 / \lambda_2 \dots\dots\dots (2.39)$$

Dari persamaan (2.39) terlihat bahwa $\Theta < \alpha$, $v_2 < v_1$, dan $\lambda_2 < \lambda_1$

b. Pemantulan

Menurut Cameron & Skofronik (1999), ketika gelombang suara menghumbuk tubuh, Sebagian suara akan memantul dan sebagian yang lain ditransmisikan ke dalam tubuh seperti tampak dalam Gambar 2.18



Gambar 2.18 Transmisi dan refleksi gelombang yang mengenai pembatas Medium (Cameron & Skofronik, 1999).



Menurut Trisnobudi (2001), gelombang ultrasonik datang tegak lurus mengenai pembatas dua medium dengan amplitudo A_0 , medium tersebut mempunyai impedansi akustik yang berbeda yaitu Z_1 dan Z_2 . Sebagian gelombang ultrasonik dipantulkan dengan amplitudo R , dan sebagian ditransmisikan dengan amplitudo T . Perbandingan amplitudo gelombang datang dengan amplitudo gelombang pantul, serta gelombang yang ditransmisikan. Perbandingan antara amplitudo gelombang ultrasonik yang dipantulkan dengan amplitudo gelombang ultrasonik datang dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$R / A_0 = (Z_2 - Z_1) / (Z_1 + Z_2) \dots\dots\dots (2.40)$$

Sedangkan perbandingan antara amplitudo gelombang ultrasonik yang ditransmisikan dengan amplitudo gelombang ultrasonik semula dinyatakan dengan persamaan:

$$T / A_0 = 2 Z_2 / (Z_1 + Z_2) \dots\dots\dots (2.41)$$

Persamaan (2.40) dan (2.41) adalah persamaan gelombang suara yang menabrak tegak lurus permukaan. Persamaan untuk gelombang datang dari beragam sudut akan lebih rumit.

Menurut Trisnobudi (2001), koefisien intensitas pantulan R_1 adalah:

$$R_1 = \{ (Z_2 - Z_1) / (Z_2 + Z_1) \}^2 \dots\dots\dots (2.42)$$

Di bawah ini adalah pasangan koefisien pantulan dari medium berbeda.

Tabel 2.5 Koefisien pantulan dari pasangan-pasangan medium berbeda

Pasangan medium	Koefisien pantulan
Lemak – otot	0,10
Lemak – ginjal	0,08
Otot – darah	0,03
Tulang – lemak	0,69
Tulang – otot	0,64
Lensa mata – aquaeous humor	0,10
Lensa mata – vitreous humor	0,09
Jaringan lunak – air	0,05
Jaringan lunak – kristal PZT 5	0,98
Jaringan lunak – castor oli	0,06

(Trisnobudi, 2001)

2.3.7 Kavitasi oleh gelombang ultrasonik

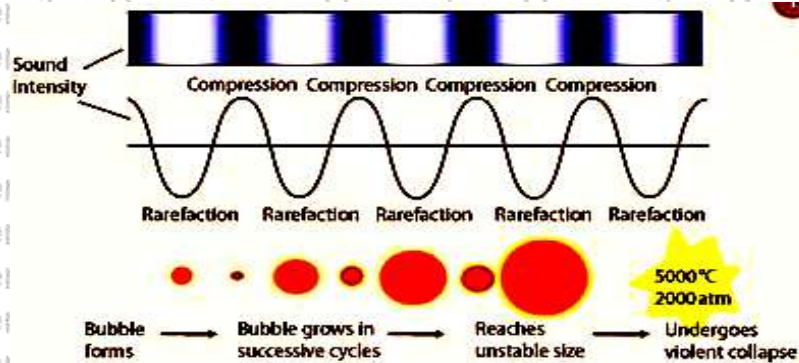
Kavitasi adalah proses dimana "rongga" terbentuk dalam medium non-elastis, seperti air dan jaringan manusia, sebagai gelombang tekanan akustik yang menyebar melalui medium. Ketika amplitudo dari gelombang ultrasonik mencapai ambang batas tertentu, besarnya tekanan negatif di bidang permukaan menjadi cukup untuk merobek media hingga terpisah, menyebabkan cairan mengalami usikan sehingga memungkinkan gas dalam medium lolos.

Gelembung kecil atau microbubbles terbentuk dari gelombang tekanan positif berikutnya, mulai berosilasi. Microbubbles ini akhirnya hancur, atau meledak, keras, mengirimkan gelombang kejut ke bagian yang berdekatan medium. gelombang kejut ini dapat merusak sel-sel yang berdekatan dalam berbagai cara (Miller *et al*, 2001).

Sehubungan dengan pengendalian mikroorganisme yang penting ialah bekerjanya gelombang suara berfrekuensi tinggi sebagai bakterisidal.

Ultrasonik, yaitu unit-unit berisi cairan yang dilalui oleh gelombang suara tersebut. Ketika gelombang ultrasonik menempuh perjalanannya melalui cairan

tadi, terbentuklah sejumlah besar gelembung kecil yang telah mencapai ukuran tertentu menjadi kempis dengan hebatnya (Gambar 2.18). Fenomena ini disebut kavitasi (Cavitation), yaitu tenaga yang terbangkitkan akan dapat menghilangkan partikel-partikel termasuk mikroorganisme dari permukaan benda yang berada dalam cairan tersebut (Gooberman, 1988; Cheeke, 2002).



Gambar 2.19 Gelombang ultrasonik yang ditransmisikan melalui medium cair. Mengalami rapatan dan regangan secara bergantian dapat menghasilkan gelembung kecil (microbubbles) dalam siklusnya gelembung tersebut tumbuh dan kemudian pecah dengan melepaskan sejumlah besar energi dengan suhu sampai 5000 K dan tekanan hingga 2000 atm (Mason, 2009).

a. Gelombang kejut akibat pecahnya gelembung kavitasi

Menurut Gooberman (1988), gerak pengembangan volume gelembung dalam bentuk kecepatan gerak dinding gelembung ke arah luar, mengakibatkan timbulnya energi kinetik larutan terhadap gelembung. Kecepatan gerak dinding gelembung berhubungan dengan pertambahan radius gelembung tiap satuan waktu. Saat gelembung mencapai radius maksimum (R_m) hingga gelembung pecah, periodenya lebih kecil dari pada periode gelombang ultrasonik. Sedangkan proses berubahnya tekanan gas dalam gelembung dapat dianggap sebagai proses kompresi adiabatik.

Saat radisi gelembung R_m , gas didalamnya bertekanan Q menurut Noltingk dan Neppiras yang menghitung persamaan kecepatan gelombang



saat pecah, dengan mengabaikan viskositas, tegangan permukaan dan kopresibelitas larutan. Persamaan gerak pecahnya gelembung dalam bentuk kecepatan dinding gelembung (Gooberman, 1988):

$$v(R) = \frac{dr}{dt} \dots\dots\dots (2.43)$$

Sebelum gelembung pecah, energi kinetik larutan adalah:

$$E_k = \frac{1}{2} m v^2(R) = \frac{1}{2} \rho V_g v^2(R) \quad E_k = \frac{1}{2} \rho \left(\frac{4}{3} \pi R^3 \right) v^2(R) \dots\dots (2.44)$$

dengan :

$$v(R) = \frac{dR}{dt} = \text{kecepatan gerak mengecilnya dinding gelembung}$$

ρ = rapat massa larutan

V_g = Volume gelembung

Karena ada 3 kecepatan yang sama besar dan searah dengan 3 sumbu koordinat, maka persamaan (2.44) menjadi :

$$E_k = 2\pi\rho R^3 v^2(R) \dots\dots\dots (2.45)$$

Diasumsikan bahwa gas yang terkompresi dalam gelembung mengalami proses adiabatik, maka tekanannya pada suatu saat (bila dibandingkan dengan tekanan saat R_m yaitu sebesar Q) adalah

$$P_g = P_m \left(\frac{V_m}{V_g} \right)^\gamma = Q \left(\frac{R_m}{R} \right)^{3\gamma} \dots\dots\dots (2.46)$$

dengan $\gamma = \frac{C_p}{C_v}$ = kalor jenis, sehingga kerja yang dilakukan gas terkompresi adalah:

$$dW_g = F \cdot dR = P_g \cdot A \cdot dR \quad \text{atau}$$

$$W_g = \int_R^{R_m} Q \left(\frac{R_m}{R} \right)^{3\gamma} \cdot 4\pi R^2 dR \dots\dots\dots (2.47)$$



Pada saat gelembung pecah, kerja netto (W_n) terjadi akibat penjumlahan energi kinetik larutan (E_k) dan kerja gas terkompresi adalah:

$$dE_k + dW_g = dW_n \dots\dots\dots (2.48)$$

Sedangkan $dW_n = P \cdot dV$ dengan P : tekanan larutan yang dianggap konstan.

$$dW_n = P \cdot \frac{4}{3} \pi(R)^3$$

$$W_n = \frac{4}{3} \pi P(R_m^3 - R^3) \dots\dots\dots (2.49)$$

Dengan menggunakan persamaan (2.45) (2.47) dan (2.49) dimasukkan kedalam (2.48) dan menganggap bahwa energi kinetik larutan (2.45) sama dengan nol saat radius gelembung mencapai radius maksimum R_m .

Persamaan energi saat gelembung akan pecah adalah:

$$[E_k(R) - E_k(R_m)] + dW_g = dW_n$$

$$2\pi\rho R^3 v^2 (R) + \int_R^{R_m} Q \left(\frac{R_m}{R}\right)^{3\gamma} \cdot 4\pi R^2 dR = \frac{4}{3} \pi P (R_m^3 - R^3) \dots (2.50)$$

Berdasarkan parsial dari persamaan :

$$\int_R^{R_m} Q \left(\frac{R_m}{R}\right)^{3\gamma} \cdot 4\pi R^2 dR = 4\pi Q R_m^{3\gamma} \int_R^{R_m} R^{2-3\gamma} \cdot dR$$

$$= 4\pi R_m^{3\gamma} Q \cdot \frac{1}{3(1-\gamma)} (R_m^{3(1-\gamma)} - R^{3(1-\gamma)})$$

Sehingga persamaan (2.50) menjadi

$$2\pi\rho R^3 v^2 (R) + 4\pi Q R_m^{3\gamma} \cdot \frac{1}{3(1-\gamma)} (R_m^{3(1-\gamma)} - R^{3(1-\gamma)})$$

$$= \frac{4}{3} \pi P (R_m^3 - R^3) \dots\dots\dots \text{Dibagi } \frac{4}{3} \pi.$$



$$\frac{3}{2} \pi \rho R^3 v^2(R) + \frac{Q}{1-\gamma} \left[\left(\frac{R_m}{R} \right)^3 - \left(\frac{R_m}{R} \right)^{3\gamma} \right] R^3 = P(R_m^3 - R^3) \rightarrow : R^3$$

$$\frac{3}{2} \rho v^2(R) + \frac{Q}{1-\gamma} \left[R_m^3 - \left(\frac{R_m}{R} \right)^{3\gamma} \right] = P \left[\left(\frac{R_m}{R} \right)^3 - 1 \right]$$

bila $z = \left(\frac{R_m}{R} \right)^3$ persamaan (2.50) dapat diubah menjadi

$$\frac{3}{2} \rho v^2(R) + \frac{Q}{1-\gamma} (Z - Z^\gamma) = P(Z - 1)$$

Persamaan kelipatan gerak dinding gelembung adalah :

$$v^2(R) = \frac{2}{3\rho} \left(P(Z - 1) - \frac{Q(Z - Z^\gamma)}{1-\gamma} \right) \dots \dots \dots (2.51)$$

Untuk menentukan persamaan kecepatan gelembung maksimum atau minimum maka $v(R) = 0$

$$P(\gamma - 1) (Z - 1) = Q(Z^\gamma - Z) \dots \dots \dots (2.52)$$

Radius maksimum $R = R_m$ dicapai bila $Z = 1$

Jika $R \ll R_m$, maka $Z \gg 1$ maka persamaan (2.52) menjadi

$$\frac{Z^\gamma - Z}{Z - 1} = \frac{P(\gamma - 1)}{Q} \rightarrow \frac{Z^\gamma}{Z} - 1 = \frac{P(\gamma - 1)}{Q}$$

$$Z^{\gamma-1} - 1 = \frac{P(\gamma - 1)}{Q} \text{ sehingga } Z \sim \left[\frac{P(\gamma - 1)}{Q} \right]^{\frac{1}{\gamma-1}}$$

Tekanan gas dalam gelembung pada suatu saat adalah $q = QZ^\gamma$. Tekanan maksimumnya jika radius gelembung mengecil sesuai dengan persamaan (2.53).



Tekanan maksimumnya adalah :

$$q_{\text{maks}} = Q \left[\frac{p(\gamma - 1)}{Q} \right]^{\frac{\gamma}{\gamma - 1}} \dots \dots \dots (2.53)$$

Ternyata tekanan yang ditimbulkan oleh gelombang kejut dan tekanan yang paling besar hanya terjadi pada larutan yang paling dekat dengan permukaan gelembung pecah. Tekanan ini tidak mempengaruhi sifat-sifat larutan secara keseluruhan, karena gelombang kejut ini terkonsentrasi pada volume – volume gelembung yang sangat kecil. Adanya gelembung kejut dari satu gelembung yang pecah, dalam larutan memungkinkan untuk timbul gelembung inti yang baru. Dari gelembung inti yang baru ini akan mempermudah untuk timbulnya gelembung kavitasi dan dengan pengaruh gelombang ultrasonik, intensitas kavitasi akan narik diseluruh volume larutan yang terkena paparan gelombang ultrasonik. Selama gelembung kavitasi pecah, tekanan lokal ini akan dimanfaatkan untuk membersihkan kotoran yang menempel pada permukaan benda dan mematikan mikroorganisme yang berada pada benda tersebut. (Cracknell, 1980).

b. Efek kavitasi gelombang ultrasonik

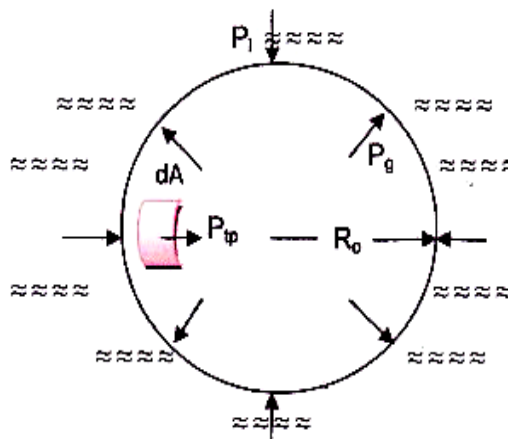
Gelombang ultrasonik adalah gelombang longitudinal yang merambat melalui medium dengan frekuensi lebih dari 20 kHz; sehingga partikel-partikel berpindah searah dengan arah rambatan gelombang. Pada medium yang dilalui terjadi proses peregangan dan perapatan. Telah kita ketahui bahwa massa medium selalu tetap sedangkan volume berubah sehingga rapat massanya berubah dan menyebabkan perubahan tekanan. Jadi gelombang ini dapat kita pandang sebagai gelombang perpindahan, volume, rapat massa dan energi (Cracknell, 1980). Ketika gelombang ultrasonik menempuh



perjalanannya melalui cairan tadi, terbentuklah sejumlah besar gelembung kecil yang setelah mencapai ukuran tertentu menjadi kempis dengan hebatnya. Fenomena ini disebut kavitasi (Cavitation), yaitu tenaga yang terbangkitkan akan dapat menghilangkan partikel-partikel termasuk mikroorganisme dari permukaan benda yang ditaruh dalam cairan tersebut (Gooberman, 1988).

Kavitasi dapat dibangkitkan dalam larutan yang pada umumnya dapat dibagi menjadi 2 macam, yaitu larutan murni dan larutan yang berisi gas-gas yang tidak larut. Dalam larutan murni, kavitasi dapat terjadi apabila tekanan yang ditimbulkan oleh gelombang ultrasonik relatif lebih kecil dibandingkan dengan tekanan larutan. Untuk mengatasi gaya kohesi larutan diperlukan amplitudo tekanan gelombang ultrasonik yang cukup besar. Apabila perubahan tekanan cukup besar dan cepat, akan timbul gelembung-gelembung kecil yang berisi gas. Pada saat bersamaan transfer energi gelombang ultrasonik air menghasilkan hidrogen peroksida (Gooberman, 1988).

Bila di dalam larutan terdapat titik-titik gelembung inti yang melayang-layang berbentuk bola (gambar 2.19). Akan diamati satu gelembung gas beserta tekanan-tekanan yang berpengaruh selama perkembangngannya menjadi gelembung kavitasi. Gelembung secara diskrit tidak dapat diamati, tetapi populasinya yang banyak memungkinkan untuk diamati. Hal ini akan dibuktikan secara matematik terkait dengan ukuran gelembung hasil kavitasi yang tidak teramati tersebut.



Gambar 2.20 Gelembung inti di dalam larutan (Gooberman, 1988)

Dari gambar 2.19 di atas besaran fisisnya adalah :

P_l = tekanan larutan di luar gelembung

P_g = tekanan gas di dalam gelembung

P_{tp} = tekanan akibat tegangan permukaan larutan

dA = elemen luas permukaan gelembung (luas seluruh permukaan bola $A_{gel} = 4\pi R^2$)

Menurut Widodo (1990). Dalam larutan yang bertekanan hidrostatik

P_A dan tegangan permukaan S terdapat gelembung inti dengan radius R_0 ,

Tekanan gas dalam gelembung inti (P_g) seperti tampak dalam gambar 2.5.

Tekanan keseimbangan terjadi bila:

$$P_g = P_A + 2S/R_0 \dots\dots\dots (2.54)$$

Jika dalam larutan dilewati gelombang ultrasonik dengan amplitudo tekanan

P_0 dan frekuensi sudut ω , tekanan sinusoidal gelombang ultrasonik

bersuperposisi dengan tekanan statis larutan P_A menghasilkan tekanan sebesar :

$$P_l = P_A + P_0 \sin \omega t \dots\dots\dots (2.55)$$



Tekanan gelombang ultrasonik bersuperposisi negatif karena gelombang ultrasonik membantu pengembangan gelembung inti, yang berarti mengurangi besar tekanan larutan. Kerja yang dilakukan larutan terhadap gelembung adalah:

$$dW_l = F \cdot dR = P_l \cdot A_{gel} \cdot dR$$

$$= (P_A - P_o \sin \omega t) 4\pi R^2 dR \dots\dots\dots (2.56)$$

Selama berkembang, tekanan gas dalam gelembung akan berubah.

Dengan mengasumsikan bahwa perubahan tekanan gas dalam gelembung sesuai dengan proses isothermal maka tekanan gas pada suatu saat (P_{gt}) dalam gelembung adalah:

$$P_{gt} = P_g V_g / V_{gt} = (P_A + 2S/R_o) R_o^3 / R^3 \dots\dots\dots (2.57)$$

Gas dalam gelembung melakukan kerja dalam larutan sebesar:

$$dW_g = F \cdot dR = P_{gt} \cdot A_{gel} \cdot dR$$

$$= (P_A + 2S/R_o) R_o^3 / R^3 \cdot 4\pi R^2 dR \dots\dots\dots (2.58)$$

Dengan berkembangnya gelembung, tekanan yang dirasakan dinding gelembung akibat tegangan permukaan juga berubah sesuai dengan jari-jari gelembung dan kerja yang dilakukan tegangan permukaan terhadap dinding gelembung adalah:

$$dW_p = F \cdot dR = P_{tp} \cdot A_{gel} \cdot dR$$

$$= 2S/R \cdot 4\pi R^2 \cdot dR = 8\pi RS \cdot dR \dots\dots\dots (2.59)$$

Dengan berkembangnya gelembung, volumenya juga bertambah besar, maka dianggap terjadi pertambahan massa larutan sebesar $m = \rho \cdot V$, dengan ρ = rapat massa, dan $V = 4/3 \pi R^3$. Gerak perkembangan volume



gelembung dalam bentuk kecepatan gerak dinding gelembung ke arah luar, mengakibatkan timbulnya energi kinetik larutan terhadap gelembung.

Kecepatan gerak dinding gelembung berhubungan dengan pertambahan radius gelembung tiap satuan waktu, sedemikian hingga energi kinetik larutan adalah:

$$E_k = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{1}{2} \rho \cdot V (dR/dt)^2 \dots\dots\dots (2.60)$$

Bila terdapat tiga arah kecepatan yang besarnya sama terhadap sumbu koordinat, maka energi kinetiknya menjadi:

$$E_k = 3 \cdot \frac{1}{2} \rho \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi R^3 (dR/dt)^2 = 2 \pi \rho R^3 (dR/dt)^2 \dots\dots\dots (2.61)$$

Energi kinetik larutan sebanding dengan jumlah kerja yang dilakukan tegangan permukaan, tekanan gas dalam gelembung, dan tekanan larutan akibat gelombang ultrasonik, sedangkan kerja yang dilakukan oleh tekanan larutan dan tegangan permukaan arahnya selalu berlawanan dengan kerja yang dilakukan oleh gas dalam gelembung. Dari persamaan (2.44), (2.46), (2.47), dan (2.48) dan dengan menganggap bahwa energi kinetik larutan sebelum gelembung berkembang sama dengan nol, maka diperoleh persamaan energi:

$$dE_k = -[(P_A - P_0 \sin \omega t) \cdot 4\pi R^2 \cdot dR] + [(P_A + 2S/R_0) R_0^3/R^3 \cdot 4\pi R^2 \cdot dR] - [8\pi RS \cdot dR] \text{ atau}$$

$$2\pi \rho R^3 (dR/dt)^2 = \int_{R_0}^R \{ 4\pi R^2 [P_0 \sin \omega t - P_A + (P_A + 2S/R_0) R_0^3/R^3] - 8\pi RS \} dR \dots\dots\dots (2.62)$$

$$6\pi \rho R^2 (dR/dt)^2 + 2 \pi \rho R^3 d/dR (dR/dt)^2 = 4\pi R^2 [P_0 \sin \omega t - P_A + (P_A + 2S/R_0) R_0^3/R^3] - 8\pi RS \dots\dots\dots (2.63)$$

Jika persamaan (2.63) dibagi dengan $2\pi R$ diperoleh:



$$3\pi R(dR/dt)^2 + \rho R^2 d/dR (dR/dt)^2 = 2R [P_o \sin \omega t - P_A + (P_A + 2S/R_o) R_o^3/R^3] - 4S \quad (2.64)$$

Penyelesaian dari $\rho R^2 d/dR (dR/dt)^2$ pada persamaan (2.64) adalah

$$\begin{aligned} \rho R^2 d/dR (dR/dt)^2 &= \rho R^2 dU^2/dR \\ &= \rho R^2 2UdU/dR = 2\rho R^2 dR/dt \cdot d/dR(dR/dt) \\ &= 2\rho R^2 d^2R/dt^2 \end{aligned}$$

Sehingga persamaan (2.64) menjadi:

$$3\pi R(dR/dt)^2 + 2\rho R^2 d^2R/dt^2 = 2R [P_o \sin \omega t - P_A + (P_A + 2S/R_o) R_o^3/R^3] - 4S \quad (2.65)$$

Persamaan (2.66) dapat ditulis sebagai:

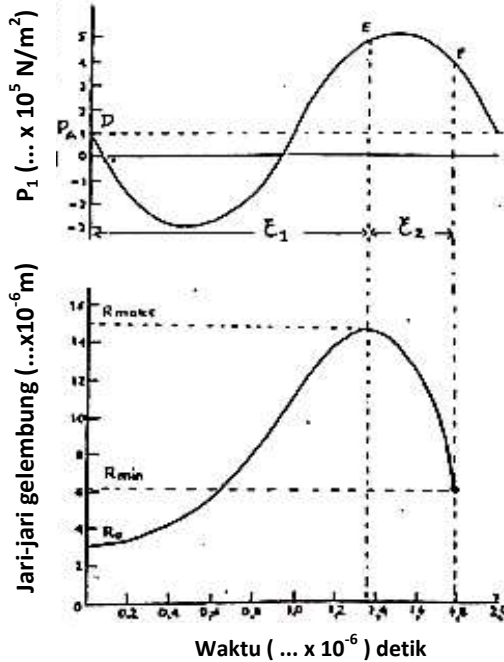
$$2R [P_o \sin \omega t - P_A + (P_A + 2S/R_o) R_o^3/R^3] = 4S + 3\rho R(dR/dt)^2 + 2\rho R^2 d^2R/dt^2 \quad (2.66)$$

Persamaan (2.66) dapat diselesaikan secara numerik dengan memberikan harga - harga P_o , ω , dan R_o untuk medium air pada tekan 1 atm

($\rho_{air} = 1000 \text{ kg/m}^3$, $S = 0,08 \text{ N/m}$, dan $P_A = 10^5 \text{ N/m}^2$). Dengan menggunakan penganalisa deferensial didapatkan sejumlah penyelesaian dengan memasukkan harga-harga P_o , ω , dan R_o yang berbeda-beda.

Penyeseaiannya terlihat pada gambar 2.20a dan 2.20b. Penyelesaiannya dilakukan dengan memasukkan harga - harga parameter $P_o = 4 \times 10^5 \text{ N/m}^2$, $f = 3 \times 10^6 \text{ Hz}$ dan $R_o = 3,2 \times 10^{-6} \text{ m}$ sedemikian hingga radius gelembung yang dicapai atau maksimumnya adalah:

$$R_m = 15 \times 10^{-6} \text{ m} \text{ saat } t_m = 1,4 \times 10^{-6} \text{ detik.}$$



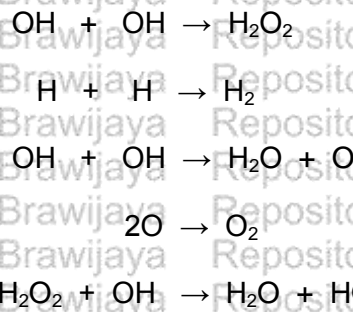
Gambar 2.21a Tekanan akibat gelombang ultrasonik $P_1 = P_A - P_0 \sin \omega t$

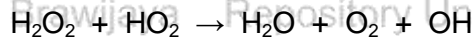
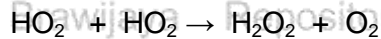
Gambar 2.21b Kurva radius gelembung terhadap waktu satu periode gelombang ultrasonik (Goobermen, 1988)

Ultrasonik diperbesar maka akan terjadi letusan gelembung pada saat radius gelembung maksimum tekanan gelembung tidak pada tekanan maksimumnya. Bila tekanan maksimum maka gelembung akan mengecil dengan cepat sampai akhirnya meletus dengan memancarkan energi tertentu.

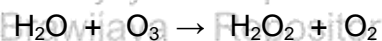
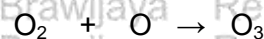
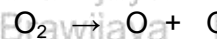
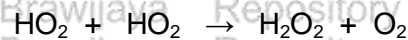
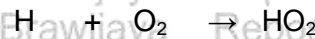
2.3.8 Efek kimia gelombang ultrasonik

Menurut Cracknell (1980), bila gelombang ultrasonik yang intensif melalui air, maka terjadi radikal bebas H dan OH akibat peristiwa kavitasi dan radikal-radikal itu saling bereaksi menurut reaksi:





demikian seterusnya. Reaksi tersebut menghasilkan H_2O_2 dan bila air mengandung O_2 , hasil H_2O_2 bertambah menurut reaksi:



2.4 Ozon

Secara alamiah ozon tersusun dari tiga atom oksigen yang sangat reaktif.

Menurut Sunnen (1998), Sastroasmoro (2004), atom oksigen di alam terdapat dalam beberapa bentuk:

1. sebagai partikel atom bebas (O), sangat reaktif dan tidak stabil.
2. oksigen (O_2), paling banyak, lebih stabil, dalam bentuk gas tidak berwarna dan dalam bentuk cair berwarna biru.
3. ozon (O_3), memiliki berat molekul 48, kepadatan gas ini satu setengah kali oksigen, memiliki energi yang sangat besar ($\frac{3}{2} \text{O}_2 + 143 \text{ KJ/mol}$), dalam bentuk gas berwarna biru dan dalam bentuk padat berwarna biru tua.
4. O_4 gas biru pucat nonmagnetik, sangat tidak stabil, jarang terdapat, biasanya sudah dipecah menjadi 2 molekul oksigen

Ozon adalah oksidan yang sangat kuat, hanya dikalahkan oleh fluorin dalam kemampuan ini. Ozon juga bereaksi dengan hidrokarbon, amin, kelompok sulfhidril dan senyawa aromatik. Yang berhubungan penting dengan



sistem biologi adalah interaksi ozon dengan jaringan, termasuk komponen darah (Sastroasmoro, 2004).

Lapisan ozon (O_3) adalah lapisan di atmosfer bumi yang mengandung konsentrasi yang relatif tinggi ozon. Lapisan ini menyerap 93% sampai 99% dari cahaya matahari ultraviolet yang frekuensi tinggi, yang berpotensi merusak kehidupan di bumi. Lebih dari 91% dari ozon di atmosfer bumi hadir di sini. Hal ini terutama terletak di bagian bawah stratosfer dari sekitar 10 km sampai 50 km di atas bumi, meskipun ketebalan bervariasi. Tanpa ozon kehidupan di bumi tidak akan berkembang (Sivasakthivel & Reddy, 2011). Ozon dikenal memiliki peranan dalam melindungi keseimbangan ekologi bumi dan dapat berinteraksi pada tingkat dasar dengan polutan dari industri. Ozon juga memiliki kemampuan biologi yang khas sehingga banyak diteliti untuk digunakan dalam dunia medis. Efek medis ozon ditemukan pada abad 19 yang digunakan pertama kali oleh A. Wolf di Jerman pada tahun 1915 sebagai antiseptik (Sastroasmoro dkk, 2004).

Walaupun ozon telah digunakan sebagai desinfektan yang manjur selama hampir satu abad, dan telah digunakan sebagai terapi alternatif selama 4 dekade, kegunaannya dalam dunia kedokteran masih kontroversial. Pihak yang pro meyakini bahwa terapi ozon merupakan pengobatan yang sangat baik sedangkan pihak yang kontra menyatakan bahwa ozon bersifat toksik dan tidak boleh digunakan dalam dunia kedokteran. Masalah ini seharusnya tidak dibiarkan begitu saja, karena setiap tahunnya jumlah pasien di dunia yang menjalani terapi ozon bertambah terus (Bocci, 1999). Sebagai molekul yang memiliki energi yang sangat besar, ozon dapat menginaktivasi bakteri, virus, jamur, dan beberapa jenis protozoa, sehingga dapat digunakan sebagai

pilihan terapi dalam pengobatan beberapa penyakit dan sebagai terapi tambahan pada penyakit lain (Sastroasmoro, 2004).

Segala sesuatu adalah racun, tidak ada yang tanpa racun dan hanya dosis yang tepat membedakan racun dari obat. Toksisitas ozon tergantung pada dosis dan, lebih penting, bahwa dosis ozon yang tidak tepat dapat dinetralkan oleh pertahanan biologis. Efek toksik ozon terbesar saat berada di medium udara, karena atom oksigen yang sangat reaktif (O). Atom ini mampu menyebabkan inflamasi di saluran nafas dan paru dengan gejala sesak nafas dan gejala-gejala respiratorik lainnya. Untuk menghindari toksisitas pada paru, penggunaan ozon melalui inhalasi harus dihindari (Bocci *et al*, 2011).

Ozon telah lama dikenal dan sering digunakan sebagai terapi alternatif yang potensial untuk melengkapi terapi konvensional dalam penyembuhan luka.

Terapi ozon untuk luka umumnya diberikan secara lokal sebagai antimikroba. Hingga saat ini, penggunaan ozon baik secara sistemik maupun topikal telah diaplikasikan untuk membantu penyembuhan luka seperti luka bakar, luka tembak, luka terinfeksi, ulkus-gangren diabetikum, ulkus dekubitus, luka bekas operasi, dan lain-lain. (Dewiyanti *et al*, 2009). Selain digunakan sebagai antiseptik, ozon juga dinyatakan memiliki efek antivirus, antijamur dan antiprotozoa (Sastroasmoro dkk, 2004).

2.4.1 Toksisitas ozon

Ada sejumlah studi eksperimental yang menunjukkan bahwa paparan ozon yang terhirup berkepanjangan menyebabkan kerusakan sistem pernapasan dan organ paru, juga dapat menyebabkan kerusakan kulit. Beberapa surat kabar juga memberikan kontribusi untuk membangun dogma bahwa ozon selalu beracun dan aplikasi medis harus dilarang. Meskipun kurang dikenal, terapi ozon biasa diaplikasikan menjadi sangat berguna baik sendiri atau



diterapkan dalam kombinasi dengan obat-obatan yang lain dalam berbagai penyakit. Para penentang terapi ozon mempunyai dasar penilaian terhadap sifat kimia ozon, dan dokter tanpa pengetahuan tentang masalah ini sering skeptis. Selama 15 tahun terakhir, pemahaman yang jelas tentang tindakan ozon dalam biologi dan kedokteran telah diperoleh, sehingga hari ini, masihkah berdebat apakah benar bahwa ozon selalu beracun? (Bocci, 2009).

2.4.2 Mekanisme kematian sel akibat paparan ozon

Perlakuan dengan menggunakan ozon dapat mengganggu integritas amplop sel bakteri melalui oksidasi fosfolipid dan lipoprotein. Pada jamur, ozon menghambat pertumbuhan sel pada tahap tertentu. Pada virus, ozon merusak kapsid virus dan mengganggu siklus reproduksi dengan mengganggu virus ke sel kontak dengan peroksidasi. Lapisan enzim yang lemah pada sel-sel yang membuat virus rentan terhadap invasi oleh virus yang membuat rentan terhadap oksidasi dan eliminasi dari tubuh, yang kemudian menggantikan dengan sel-sel sehat (Elvis & Ekta, 2011).

2.4.3 Dosis ozon untuk menginaktivasi bakteri

Bakteri adalah makhluk kecil, bersel tunggal memiliki struktur primitif. Tubuh bakteri dilindungi oleh membran sel padat relatif. Ozon mengganggu metabolisme sel bakteri, kemungkinan besar melalui menghambat dan menghalangi pengoperasian sistem kontrol enzimatik. Dengan dosis ozon yang cukup, ozon dapat menerobos membran sel, dan ini menyebabkan kematian bakteri (Lillard, 2004). Berikut adalah dosis ozon yang dapat menginaktivasi mikroorganisme (Tabel 2.6)

Tabel 2.6 Dosis ozon untuk menginaktivasi mikroorganisme

Patogen	Dosis
Aspergillus Niger (Black Mount)	Dihancurkan oleh 1,5 sampai 2 mg / l
Bacillus Bakteri	Dihancurkan oleh 0,2 m / l dalam waktu 30 detik
Bacillus anthracis (penyebab anthrax pada domba, sapi dan babi. Juga patogen manusia)	Ozon rentan
Bacillus cereus	Kerusakan 99% setelah 5-menit pada 0,12 mg / l dalam air
B. cereus (spora)	Kerusakan 99% setelah 5-menit pada 2,3 mg / l dalam air
Bacillus subtilis	Pengurangan 90% pada 0,10-PPM selama 33 menit
F2 bakteriofag	Kehancuran 99,99% pada 0,41 mg / l selama 10-detik dalam air
Botrytis cinerea	3,8 mg / l selama 2 menit
Bakteri Candida	Kehancuran 99,999% pada 0,6 mg / l selama 2 menit (dalam air)
Candida Bakteri	Ozon rentan
Clavibacter michiganense	Kehancuran 99,99% pada 1,1 mg / l selama 5 menit
Cladosporium	Pengurangan 90% pada 0,10-PPM selama 12,1 menit
Bakteri Clostridium	Ozon rentan
Clostridium Botulinum Spora. Toksin yang melumpuhkan sistem saraf pusat, menjadi racun dalam makanan.	0,4-0,5 mg / l nilai ambang
Coxsackie Virus A9	Kerusakan 95% di 0,035 mg / l selama 10-detik dalam air
Coxsackie Virus B5	Kehancuran 99,99% pada 0,4 mg / l selama 2,5 menit dalam lumpur limbah
Difteri Patogen	Dihancurkan oleh 1,5 sampai 2 mg / l
Eberth Bacillus (Tifus abdominalis). Spread biasanya oleh infeksi berair dan menyebabkan tifus.	Dihancurkan oleh 1,5 sampai 2 mg / l
Echo Virus 29: Virus yang paling esicular terhadap ozon.	Setelah waktu kontak dari 1 menit pada 1 mg / l ozon, 99,999% mati.
Virus esicul	Kerusakan 95% pada 4,1 mg / l selama 29 menit dalam air limbah baku
Escherichia Coli Bakteri (dari tinja)	Dihancurkan oleh 0,2 mg / l dalam waktu 30 detik di udara
E-coli (air bersih)	Kehancuran 99,99% sebesar 0,25 mg / l selama 1,6 menit
E-coli (dalam air limbah)	Kehancuran 99,9% pada 2,2 mg / l selama 19 menit
Virus Enecephalomyocarditis	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik dengan 0,1-0,8 mg / l.
Endamoebic Kista Bakteri	Ozon rentan
Enterovirus Virus	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik dengan 0,1-0,8 mg / l.
Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici	1,1 mg / l selama 10 menit
Fusarium oxysporum f.sp. melonogea	Kehancuran 99,99% pada 1,1 mg / l selama 20



	menit
GDVII Virus	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik dengan 0,1-0,8 mg / l.
Virus Hepatitis A	Penurunan 99,5% pada 0,25 mg / l selama 2-detik dalam buffer fosfat
Herpes Virus	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik wit 0,1-0,8 mg / l.
Influenza Virus	0,4-0,5 mg / l nilai ambang
Klebs-Loffler Bacillus	Dihancurkan oleh 1,5 sampai 2 mg / l
Legionella pneumophila	Kehancuran 99,99% pada 0,32 mg / l selama 20 menit dalam air suling
Berchahaya Basidiomycetes (spesies yang tidak memiliki pigmen melanin):	Hancur dalam 10 menit pada 100-PPM
Mucor piriformis	3,8 mg / l selama 2 menit
Mycobacterium avium	99,9% dengan nilai CT 0,17 dalam air
Mycobacterium foruitum	Kerusakan 90% sebesar 0,25 mg / l selama 1,6 menit dalam air
Bakteri Penicillium	Ozon rentan
Phytophthora parasitica	3,8 mg / l selama 2 menit
Poliomyelitis Virus	99,99% kill dengan 0,3-0,4 mg / l dalam 3-4 menit
Jenis virus polio 1	Kehancuran 99,5% sebesar 0,25 mg / l selama 1,6 menit dalam air
Bakteri Pseudomonas	Sangat rentan
Virus rhabdovirus	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik dengan 0,1-0,8 mg / l
Bakteri Salmonella	Sangat rentan
Salmonella typhimurium	Kehancuran 99,99% sebesar 0,25 mg / l selama 1,67 menit dalam air
Epidermidis Staph	Pengurangan 90% pada 0,1-ppm untuk 1,7 menit
Staphylococci	Dihancurkan oleh 1,5 hingga 2,0 mg / l
Stomatitis Virus	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik dengan 0,1-0,8 mg / l
Bakteri Streptococcus	Dihancurkan oleh 0,2 mg / l dalam waktu 30 detik
Verticillium esicular	Kehancuran 99,99% pada 1,1 mg / l selama 20 menit
Virus vesicular	Dihancurkan untuk level nol dalam waktu kurang dari 30 detik dengan 0,1-0,8 mg / l

(Lillard, 2004)

2.4.4 Produksi ozon

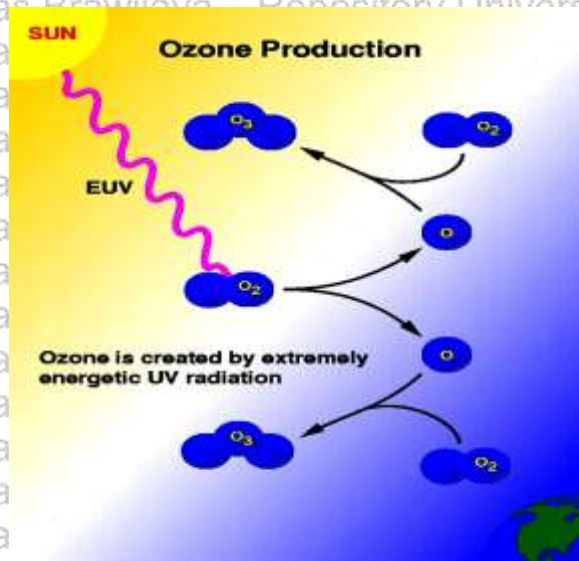
Ozon terbuat dari tiga atom oksigen (O_3), tidak seperti oksigen yang kita hirup dan yang memainkan peran penting dalam proses pembakaran, yang



terbuat dari dua atom oksigen. Ozon dapat diproduksi secara alamiah dan buatan (Eichmann & Ross, 2012).

a. Secara alamiah

Ozon adalah gas terdiri dari tiga atom oksigen (O_3). Hal ini terbentuk secara alami di tingkat atas atmosfer bumi oleh radiasi ultraviolet energi tinggi dari matahari. Radiasi memecah molekul oksigen (O_2), melepaskan atom bebas (O), beberapa di antaranya ikatan dengan molekul oksigen yang lain untuk membentuk ozon (O_3). Sekitar 90% persen dari semua ozon di atmosfer terbentuk dengan cara ini, antara 15 dan 55 kilometer di atas permukaan bumi - bagian dari atmosfer disebut stratosfer. Oleh karena itu, hal ini dikenal sebagai "lapisan ozon." (Leticí, 2006).



Gambar 2.22 Produksi ozon alamiah (Leticí, 2007)

Ozon diproduksi ketika oksigen (O_2) yang dipecah menjadi atomnya (O) oleh radiasi matahari energi tinggi, panjang gelombang 240 nanometer bawah. O_3 melindungi permukaan bumi dari sinar matahari berbahaya. Ozon menyerap di atas semua radiasi dari matahari yang terletak di daerah UV-B: λ (panjang gelombang 280-315 nm), energi UV-B dapat dihitung dengan

persamaan $E = h \cdot c / \lambda$ dengan h : konstanta planck, c : kecepatan cahaya. dan melalui penyerapan ini dibagi lagi menjadi atom oksigen dan molekul oksigen (Eichmann, 2012). Lapisan ozon adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan keberadaan molekul-molekul ozon di stratosfer. Lapisan ozon sangat penting bagi kehidupan di permukaan planet. Ini bertindak sebagai filter dan mencegah radiasi ultraviolet yang berbahaya (UV-B) dari mencapai Bumi (Letic, 2006).



Gambar 2.23 Lapisan ozon (Letic, 2006)

Penipisan lapisan ozon akan menyebabkan pengurangan kapasitas perisai dan dengan demikian peningkatan paparan radiasi UV-B, dapat menyebabkan akibat pada: manusia (kanker kulit, katarak mata, kulit terbakar, kebutaan salju, penuaan kulit, dan depresi dari sistem kekebalan tubuh) (Letic, 2006).

b. Produksi ozon medis

Ozon memiliki waktu paruh 45 menit pada suhu 20°C (68°F), dan konsentrasinya menurun menjadi 16% dari nilai awal dalam 2 jam,

sehingga ozon harus diproduksi pada saat akan digunakan untuk pengobatan. Pada suhu kamar hampir 50% ozon berubah menjadi oksigen murni (Sunnen, 1998). Untuk menghasilkan ozon medik secara aman dan dalam dosis yang tepat, dibutuhkan generator ozon medik dilengkapi sistem penyalurannya. Generator ozon medik berbeda dengan generator industri dalam hal kemampuannya untuk menghasilkan campuran ozon-oksigen paling murni dengan dosis yang tepat. (Sunnen, 1998).

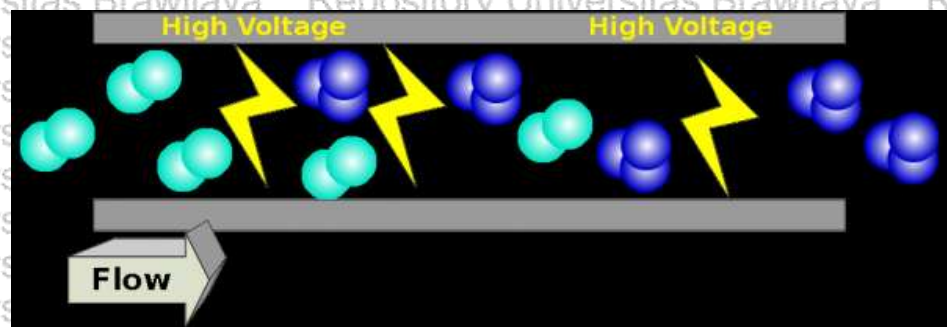
Generator dan sistem penyaluran sebagai sumber oksigen harus memiliki tingkat kemurnian medik sehingga terhindar dari nitrogen dan kotoran lain karena nitrogen dapat memproduksi NO yang bersifat toksik terhadap jaringan (Sunnen, 2000). Generator ozon klinis yang mengatur aliran ozon medik melalui tabung voltase dengan output bervariasi dari 4000 V sampai 14000 volt dapat menghasilkan campuran ozon-oksigen dengan rentang konsentrasi sampai 5%, yang tergantung dari 3 variabel: (1) tegangan yang digunakan (2) kecepatan aliran oksigen dan (3) jarak yang memisahkan elektroda. Kemurnian sumber oksigen menjadi penting karena nitrogen, dengan adanya energi tinggi, dapat membentuk nitrit oksida yang toksik. Ozon diproduksi pada saat akan diberikan, karena ozon bukanlah obat yang memiliki shelf life dan dapat ditaruh dalam waktu lama dan dosis tertentu (Sunnen, 2000).

Bertentangan dengan teknis ozon dan kabut asap, O_3 digunakan dalam pengobatan dihasilkan dari oksigen murni melalui debit listrik statis, itu tidak mungkin untuk menggunakan oksigen konsentrator atau campuran oksigen / udara karena komponen nitrogen dan kemungkinan akibatnya nitrogen oksida yang terbentuk dalam tabung debit. Sebagai konsentrasi dan laju dekomposisi ozon sangat tergantung pada parameter yang berbeda



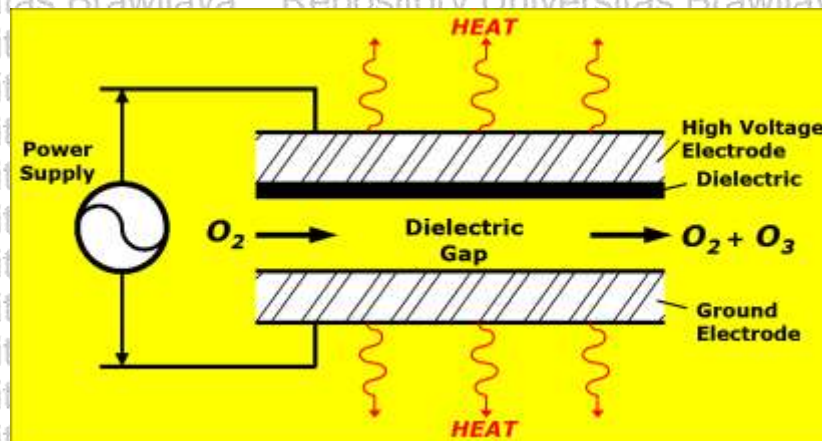
seperti suhu, tekanan, volume laju aliran dll, generator ozon medis harus dilengkapi dengan alat ukur untuk memastikan kontrol konsentrasi kontinyu (Habil *et al*, 2009)

Menurut Leusink (2011), Sebagian besar generator ozon menggunakan lucutan korona (Corona discharge) untuk menghasilkan ozon. Secara prinsip, percikan energi yang dihasilkan tegangan tinggi (corona discharge) digunakan untuk membagi molekul oksigen diatomik menjadi atom oksigen yang reaktif. Atom oksigen memiliki muatan negatif dan akan berikatan cepat dengan molekul oksigen yang lain untuk menghasilkan ozon. Untuk setiap molekul oksigen perpecahan 2 atom oksigen yang selanjutnya menghasilkan 2 molekul ozon (Gambar 2.24)



Gambar 2.24 Prinsip kerja generator ozon (Leusink,2009)

Di bawah ini adalah diagram generator penghasil ozon



Gambar 2.25 Bagan generator penghasil ozon (Leusink, 2009)

Sebuah catu daya yang digunakan untuk menghasilkan lucutan listrik dielektrik, dan celah udara. Dielektrik yang digunakan menyebar lucutan listrik ke seluruh area yang luas dibandingkan dengan titik tunggal seperti percikan normal. Molekul oksigen melewati celah udara yang terkena lucutan listrik dan akibat paparan tersebut molekul oksigen dibagi menjadi atom oksigen (bermuatan negatif) yang reaktif. Selanjutnya berikatan dengan molekul oksigen menjadi ozon. Sejumlah besar panas yang dihasilkan dari proses ini dan akan dilepas dari elektroda seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.25

2.4.5 Mekanisme Reaksi Ozonisasi

Menurut Bollyky (2000), saat ozon terlarut dalam air akan mengalami tiga reaksi sekaligus yaitu: oksidasi, desinfeksi, dan dekomposisi. Sistem kelarutan ozon menurut hukum Henry sesuai dengan persamaan:

$$C_s = \beta \times M \times P_i \dots\dots\dots (2.66)$$

Dengan: C_s = konsentrasi jenuh ozon terlarut (kg/m^3)

β = rasio kelarutan

M = densitas gas (kg/m^3)

P_i = tekanan parsial gas (Pa)

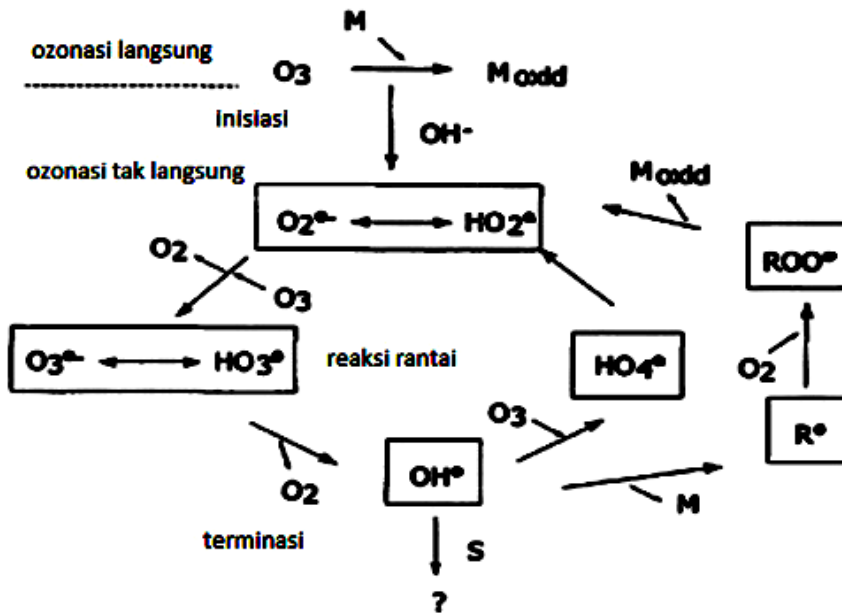
Perpindahan massa ozon – air secara umum dipengaruhi oleh konsentrasi ozon dalam gas, daya keluaran ozon pada larutan, waktu kontak, jumlah dan ukuran gelembung gas, tekanan dan temperatur operasi, jenis masukan umpan (udara atau oksigen), dan metode kontak yang digunakan.

Ozon bereaksi dalam dua substansi yang berbeda, secara langsung dan tidak langsung. Kedua jenis reaksi yang berbeda ini memberikan mekanisme oksidasi yang berbeda. Pada pembahasan ini akan diuraikan tentang reaksi tidak langsung pada ozon. Menurut Gottschalk (2007), reaksi ozon tidak langsung melibatkan ion-ion radikal. Langkah awal reaksi ini adalah terdekomposisinya molekul ozon yang diakselerasi oleh ion OH^- membentuk



hidroksil radikal (OH^\bullet). Radikal hidroksil ini bereaksi dalam larutan secara cepat dan bersifat non selektif dengan konstanta laju reaksi ($k = 10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Mekanisme reaksi ini terdiri dari tiga tahap yang berbeda yaitu: Inisiasi, reaksi berantai, dan terminasi (Rubin, 2001). Mekanisme ozonisasi secara langsung dan tak langsung dapat dilihat dalam Gambar 2.26



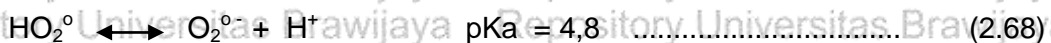
Gambar 2.26 Mekanisme ozonisasi secara langsung dan tak langsung. S: Scavenger, R: Hasil reaksi, M: Mikro polutan (Gottschalk et al, 2000)

2.4.5.1 Inisiasi

Reaksi antara ion hidroksida dengan ozon membentuk anion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dan hidroperoksida radikal (HO_2^\bullet).



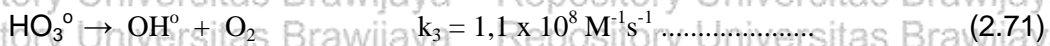
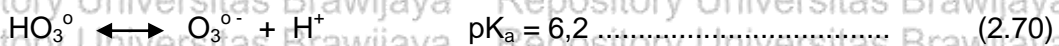
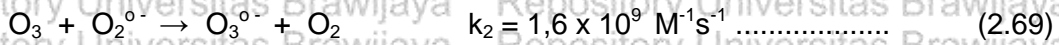
Dengan hidroperoksida radikal tersebut berada pada keseimbangan asam basa.



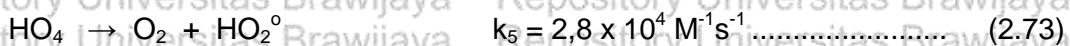
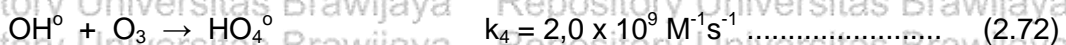


2.4.5.2 Reaksi rantai

Anion ozon radikal (O_3°) akan terbentuk pada tahap ini, melalui reaksi antara ozon dengan anion superoksida radikal (O_2°) dan terdekomposisi menjadi hidroksil radikal (OH°) secara cepat.



Menurut Hoigne dan Bader (1983), hidroksil radikal yang terbentuk dapat bereaksi dengan ozon melalui reaksi:



Dengan terurainya HO_4° menjadi O_2 dan HO_2° maka tahap reaksi berantai akan kembali ke tahap (2.67) dan (2.68). Senyawa kimia yang mengkonversi OH° menjadi radikal superoksida O_2° / HO_2° bereaksi dengan *chain carriers* yang disebut sebagai promotor, demikian juga dengan molekul organik (R) yang bereaksi dengan OH° membentuk komponen organik radikal R°



Molekul organik peroksi radikal (ROO°) akan terbentuk bila terdapat molekul oksigen. Reaksi selanjutnya adalah eliminasi O_2° / HO_2° dan kembali lagi ke rantai sebelumnya.





Terdekomposisinya molekul ozon karena terinisiasi ion hidroksida memicu terbentuknya hidroksi radikal yang bereaksi sangat cepat dan non selektif. Waktu paruh hidroksi radikal tersebut 10 μs pada konsentrasi 10^{-4} M saat densitas elektron tertinggi sehingga sangat baik untuk mendegradasi menyawa aromatik dalam air.

2.4.5.3 Terminasi

Menurut Gottschalk (2007), beberapa senyawa kimia organik dan anorganik bereaksi dengan OH° membentuk radikal sekunder dengan tidak membentuk $\text{O}_2^{\circ-}$ / HO_2° . Jenis inhibitor ini menterminasi reaksi berantai dan mencegah ozon terdekomposisi.



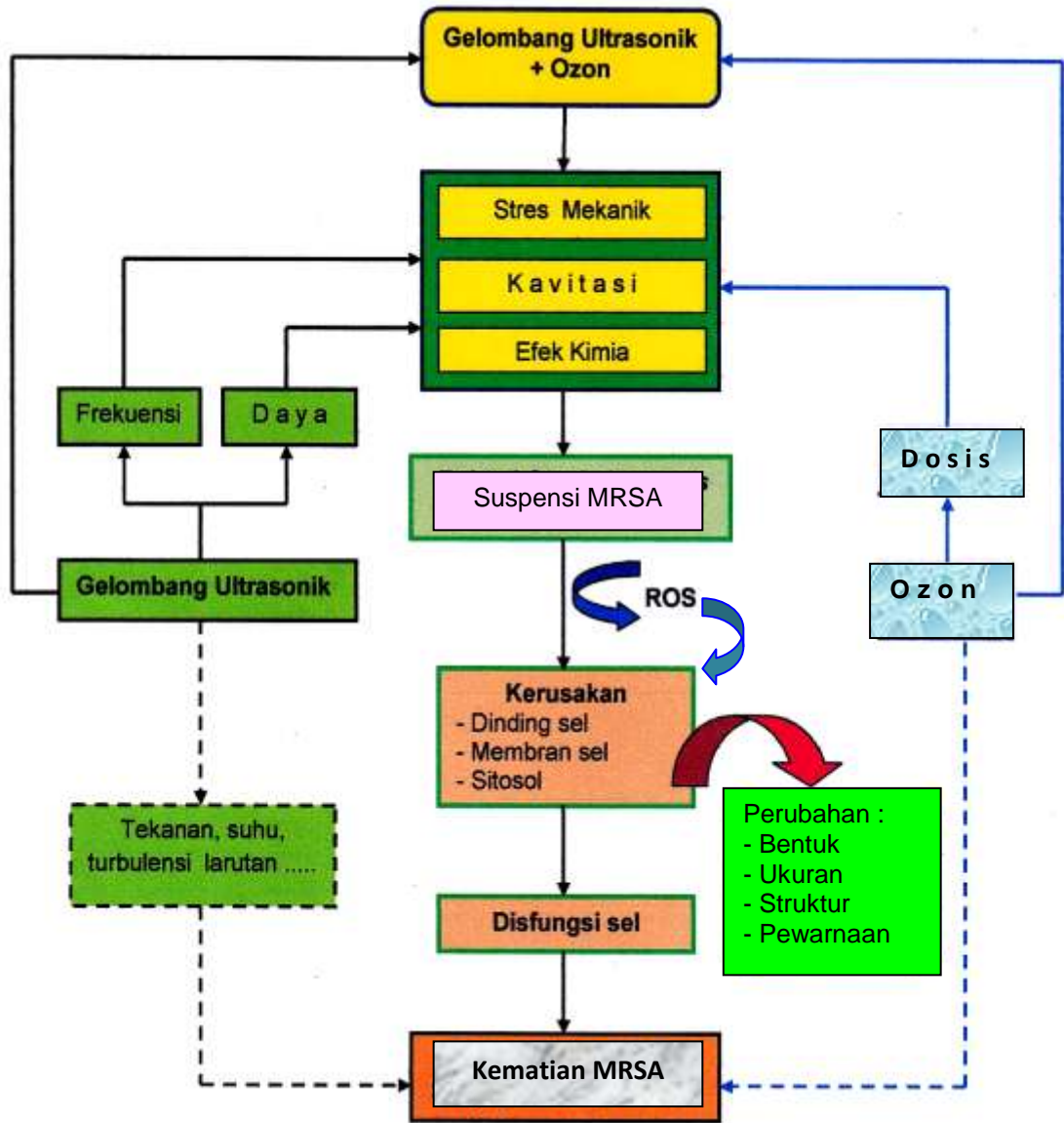
Kombinasi reaksi (2.67) sampai (2.73) menunjukkan bahwa 3 buah molekul ozon dapat memproduksi 2 buah OH°



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep metode ultrasonik-ozon untuk membunuh MRSA

Sumber gelombang ultrasonik adalah function generator yang ditransmisikan ke. transduser ultrasonik, transduser bekerja berdasarkan prinsip piezoelektrik yang mengubah energi listrik menjadi energi mekanik, demikian



pula sebaliknya. Energi mekanik menghasilkan gelombang longitudinal yang merambat melalui medium (Yatarif, 2008). Gelombang longitudinal berpindah dengan pola rapatan dan renggangan, molekul-molekul medium saling bertabrakan dengan momentum tertentu (Swerdlow *et al*, 2010). Energi yang dirambatkan melalui medium disimpan dalam pola-pola rambatan gelombang, medium rambatannya dapat berupa padat, cair dan gas. Perubahan frekuensi dan daya gelombang ultrasonik menyebabkan perubahan energi gelombang ultrasonik yang melalui medium. (Cheke, 2002)

Bakteri MRSA dipapari gelombang ultrasonik dan ozon maka selnya akan mengalami kerusakan secara fisika dan kimia. Paparan gelombang ultrasonik menyebabkan kerusakan fisika yaitu: stres mekanik menyebabkan sobeknya dinding sel bakteri; kavitasi menyebabkan bakteri hancur akibat ledakan yang ditimbulkan, dan kerusakan kimia yang ditimbulkan oleh hidrogen peroksida melalui oksidasi dinding sel bakteri (Hudori, 2002; Deghani & Hadi, 2005). Ozon dapat berpenetrasi ke dalam membran sel dan bereaksi dengan substansi sitoplasma dan mengganggu beberapa tingkat kompleksitas metabolik (Sunnen, 2000). Pada virus, ozon merusak kapsid virus dan mengganggu siklus reproduksi dengan menghambat kontak virus ke sel melalui peroksidasi (Sastroasmoro dkk, 2004). Akibat interaksi ozon dengan bakteri menyebabkan ledakan oksidatif yang menghasilkan ROS, dan ROS yang dihasilkan mengakibatkan kematian bakteri. Kerusakan meliputi dinding sel, membran sel, dan sitosol. Indikator kerusakannya meliputi perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan, akibat adanya kerusakan ini bakteri akan mati. Metode ultrasonik-ozon adalah metode gabungan antara pengrusakan sel bakteri secara fisika dan kimia, metode ini relatif baru sehingga efektivitasnya untuk mereduksi bakteri perlu dibuktikan secara eksperimental. Indikator kerusakan sel bakteri berupa perubahan bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan akan diamati dengan



menggunakan mikroskop elektron (Scanning Electron Microscope (SEM) dan Transmission Electron Microscope (TEM)).

3.2 Hipotesis Penelitian

3.2.1 Hipotesis

Berdasarkan kerangka konsep di atas dapat disusun hipotesis penelitian sebagai berikut:

Ada pengaruh antara paparan gelombang ultrasonik-ozon terhadap persen kematian *Methicillen Resistant Staphylococcus aureus in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia.

3.2.2 Sub Hipotesis

1. Ada pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.
2. Ada pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik dan terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.
3. Ada kerusakan sel MRSA *in vitro* terjadi jika dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel.
4. Ada pengaruh dosis paparan ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.
5. Ada perbedaan tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari ozon melalui Stres mekanik kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel ?
6. Ada pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.



7. Ada pengaruh tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik, ozon, dan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan perubahan warna sel MRSA.

8. Ada perbedaan tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik, ozon, serta kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian pada disertasi ini adalah penelitian eksperimental labolatorik murni dengan rancangan acak lengkap (Completely randomized design). Yang dilakukan dalam 3 tahap, yaitu :

1. Tahap 1

Mencari frekuensi efektif dan daya lethal paparan gelombang Ultrasonik untuk membunuh MRSA, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel.

2. Tahap 2

Mencari dosis lethal paparan ozon untuk membunuh MRSA, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel.

3. Tahap 3

Mencari pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA serta membandingkan tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik (frekuensi efektif dan daya lethal dari percobaan tahap 1) dan ozon dengan tingkat kerusakan sel pada percobaan tahap 1 dan tahap 2.

Bukti fisik kerusakan sel MRSA meliputi : perubahan bentuk, ukuran diamati dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan struktur dengan menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM). Pewarnaan dapat diketahui dengan pewarnaan gram.



4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

a. Laboratorium instrumentasi biofisika Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya.

Kegiatan yang dilakukan ditempat ini adalah: Mendisain peralatan penguat daya gelombang ultrasonik dan kalibrasi peralatan yang akan digunakan.

b. Laboratorium Gastroenteritis dan Salmonellosis, Institut Tropical Disease Universitas Airlangga Surabaya.

Kegiatan yang dilakukan ditempat ini adalah :

- Pembuatan media kultur *MRSA*
- Pembuatan suspensi *MRSA*
- Perlakuan pada sampel, plating, inkubasi dan perhitungan jumlah koloni *MRSA*.
- Pemaparan ozon pada sampel, plating, inkubasi dan perhitungan jumlah koloni *MRSA*.

c. Laboratorium mikroskop elektron Universitas Negeri Malang

Di tempat ini peneliti melakukan pengamatan, dan pemotretan sel *MRSA* kontrol maupun perlakuan dengan menggunakan *SEM*. Pengamatan difokuskan pada tingkat kerusakan sel *MRSA* (bentuk dan ukuran) yang ditimbulkan akibat pemaparan gelombang ultrasonik, ozon, dan ultrasonik dan ozon.

d. Laboratorium mikroskop elektron Universitas Gajah Mada Yogyakarta

Di tempat ini peneliti melakukan pengamatan, dan pemotretan sel *MRSA* kontrol maupun perlakuan dengan menggunakan *TEM*. Pengamatan difokuskan pada tingkat kerusakan struktur sel *MRSA*



yang ditimbulkan akibat pemaparan gelombang ultrasonik, ozon, dan kombinasi ultrasonik dan ozon.

e. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

Kegiatan di tempat ini difokuskan untuk pewarnaan gram MRSA dan pengamatan hasilnya, serta preparasi untuk pengamatan dengan menggunakan mikroskop elektron.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 9 bulan, yang meliputi: penelusuran pustaka; Mendesaian peralatan penguat daya gelombang ultrasonik, kalibrasi peralatan dan persiapan serta pelaksanaan percobaan. Penelitian ini dimulai bulan januari 2016.

4.3 Variabel dan Indikator Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

a. Penelitian tahap 1:

Frekuensi dan daya paparan gelombang ultrasonik.

b. Penelitian tahap 2:

Dosis paparan ozon

c. Penelitian tahap 3:

Waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon

4.3.1 Variabel terikat

Variabel terikat penelitian tahap 1, 2, dan 3 adalah persen kematian *MRSA*.

4.3.2 Indikator penelitian

Indikator penelitian tahap 1, 2, dan 3 adalah: perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel *MRSA*.



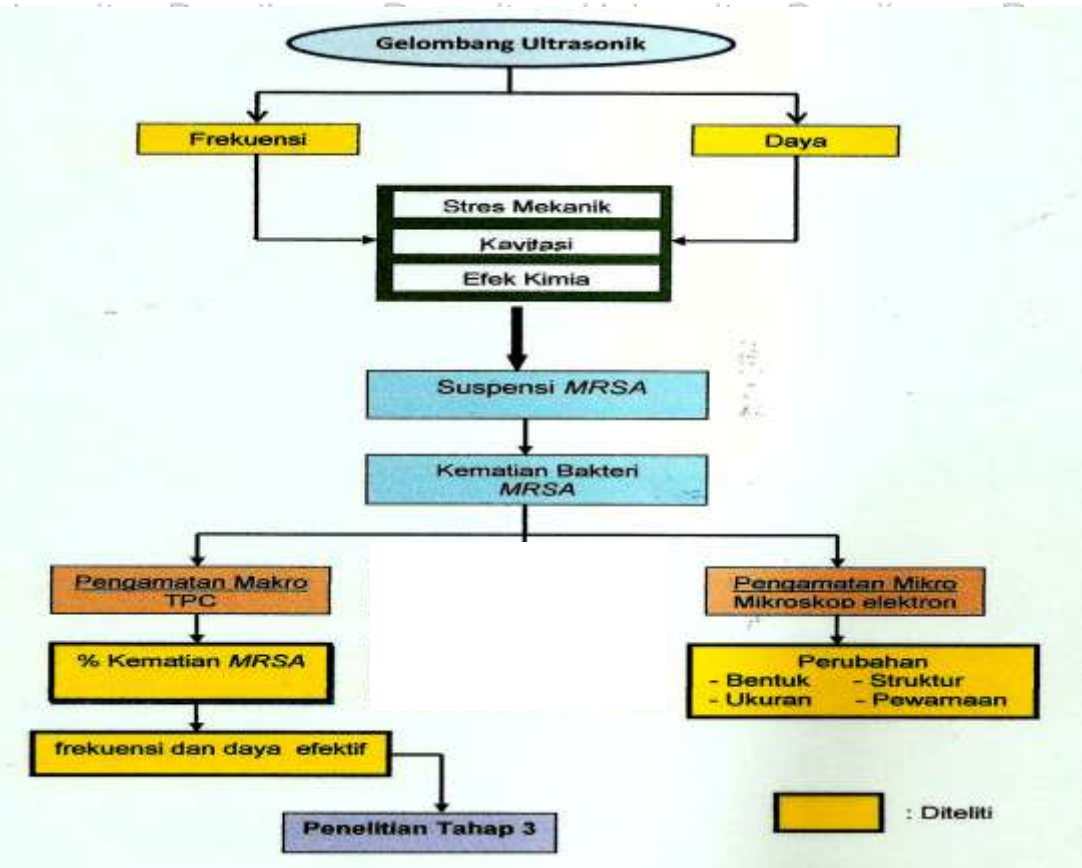
4.4 Subyek dan Alur Penelitian

Subyek dari penelitian tahap 1, 2, dan 3 adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* yang di peroleh dari bagian Mikrobiologi RS Dr Soetomo Surabaya pada tanggal 26 Januari 2016 Subyek penelitian ini pada setiap tahapan penelitian diberi perlakuan yang berbeda-beda, perlakuan tersebut tampak pada alur penelitian di bawah ini :

4.4.1 Alur Penelitian Tahap 1

Pada gambar 4.1, Suspensi *MRSA* dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan 2 macan perlakuan yaitu : frekuensi dan daya gelombang ultrasonik diubah-ubah, dengan volume suspensi *MRSA* , waktu paparan gelombang ultrasonik tetap. Pengamatan kematian *MRSA* dilakukan dengan 2 cara, yaitu : Pengamatan makro, dengan menggunakan metode total plate count dengan cara menghitung persen kematian *MRSA*, dan pengamatan mikro, dengan menggunakan mikroskop elektron untuk mengamati perubahan bentuk, ukuran, struktur, sedangkan pewarnaan sel menggunakan pewarnaan gram .

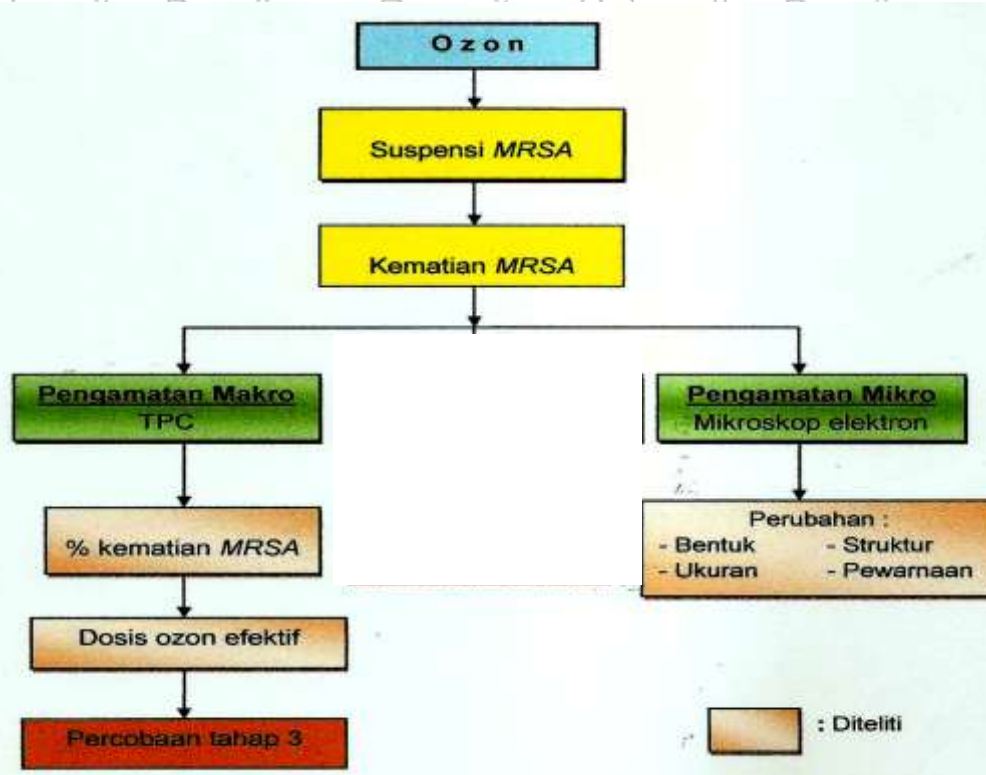
Penelitian tahap 1 bertujuan untuk menentukan frekuensi efektif dan daya lethal paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA* beserta bukti fisik kematian *MRSA*.



Gambar 4.1 Alur penellitian tahap 1.

4.4.2 Alur Penelitian Tahap 2

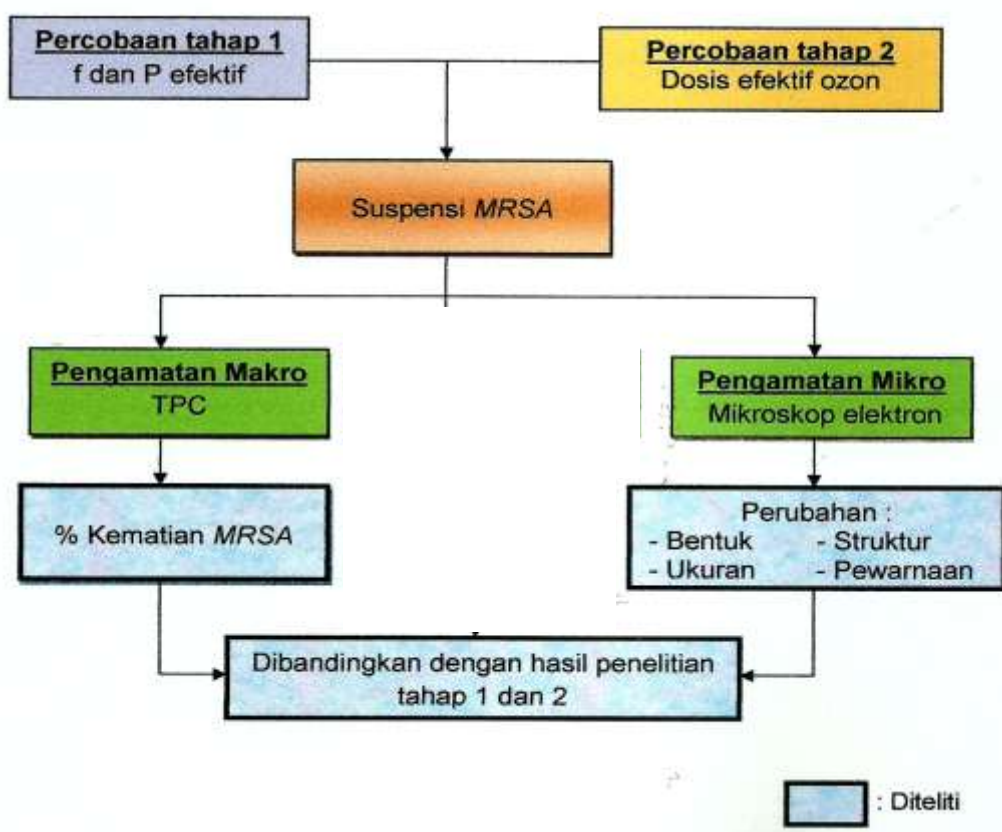
Pada Gambar 4.2, suspensi MRSA dipapari dengan ozon dengan waktu yang berbeda-beda dengan volume suspensi MRSA tetap. Pengamatan kematian MRSA dilakukan dengan 2 cara, yaitu : Pengamatan makro, dengan menggunakan metode total plate count dengan cara menghitung persen kematian MRSA. dan Pengamatan mikro dengan mikroskop elektron untuk mengamati perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel menggunakan pewarnaan gram. Penelitian tahap 2 bertujuan untuk menentukan dosis lethal ozon untuk membunuh MRSA beserta bukti fisik kematian MRSA



Gambar 4.2 Alur penelitian tahap 2.

4.4.3 Alur Penelitian Tahap 3

Pada Gambar 4.3, Suspensi *MRSA* dipapari secara bersamaan dengan gelombang ultrasonik yang frekuensi efektif dan daya lethalnya diperoleh dari percobaan tahap 1 dan ozon dengan dosis lethalnya diperoleh dari percobaan tahap 2. Pengamatan kematian *MRSA* dilakukan dengan 2 cara, yaitu : Pengamatan makro, dengan menggunakan metode total plate count dengan cara menghitung persen kematian *MRSA*. dan Pengamatan mikro dengan menggunakan mikroskop elektron untuk mengamati perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel menggunakan pewarnaan gram. Tingkat kerusakan sel pada percobaan tahap 3 dibandingkan dengan tingkat kerusakan sel pada percobaan tahap 1 dan tahap 2.

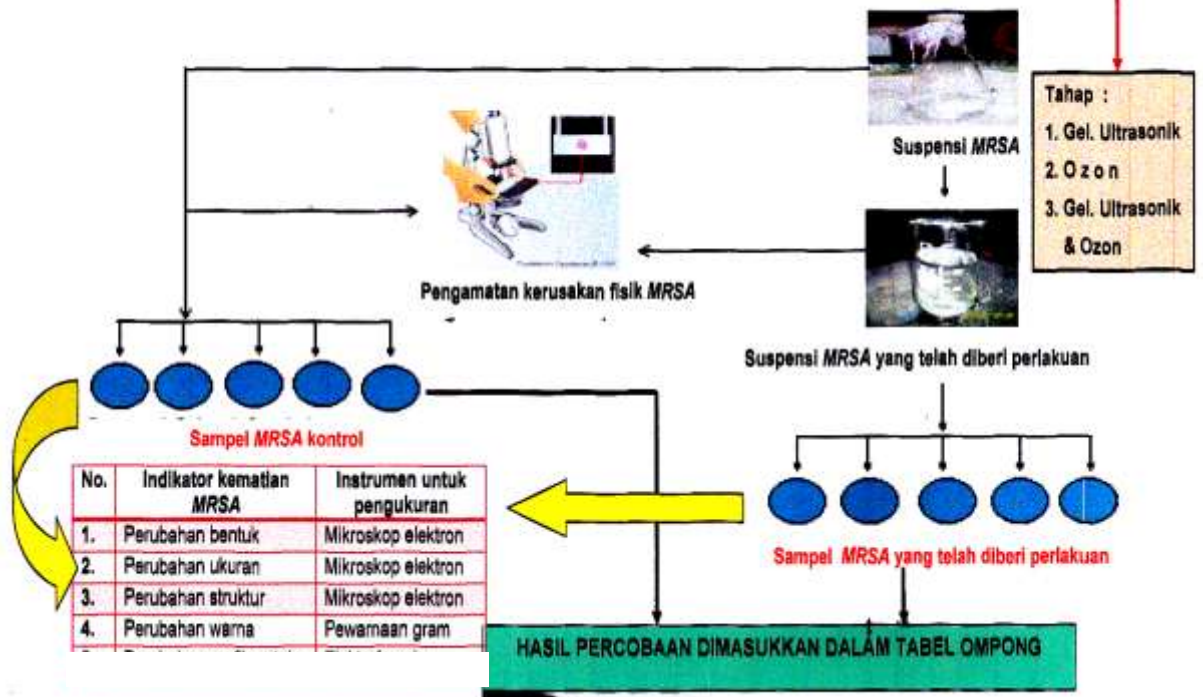


Gambar 4.3 Alur penelitian tahap 3.

4.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian tahap 1, 2, dan 3 secara umum tampak dalam gambar 4.4

Prosedur percobaan tahap 1, 2, dan 3

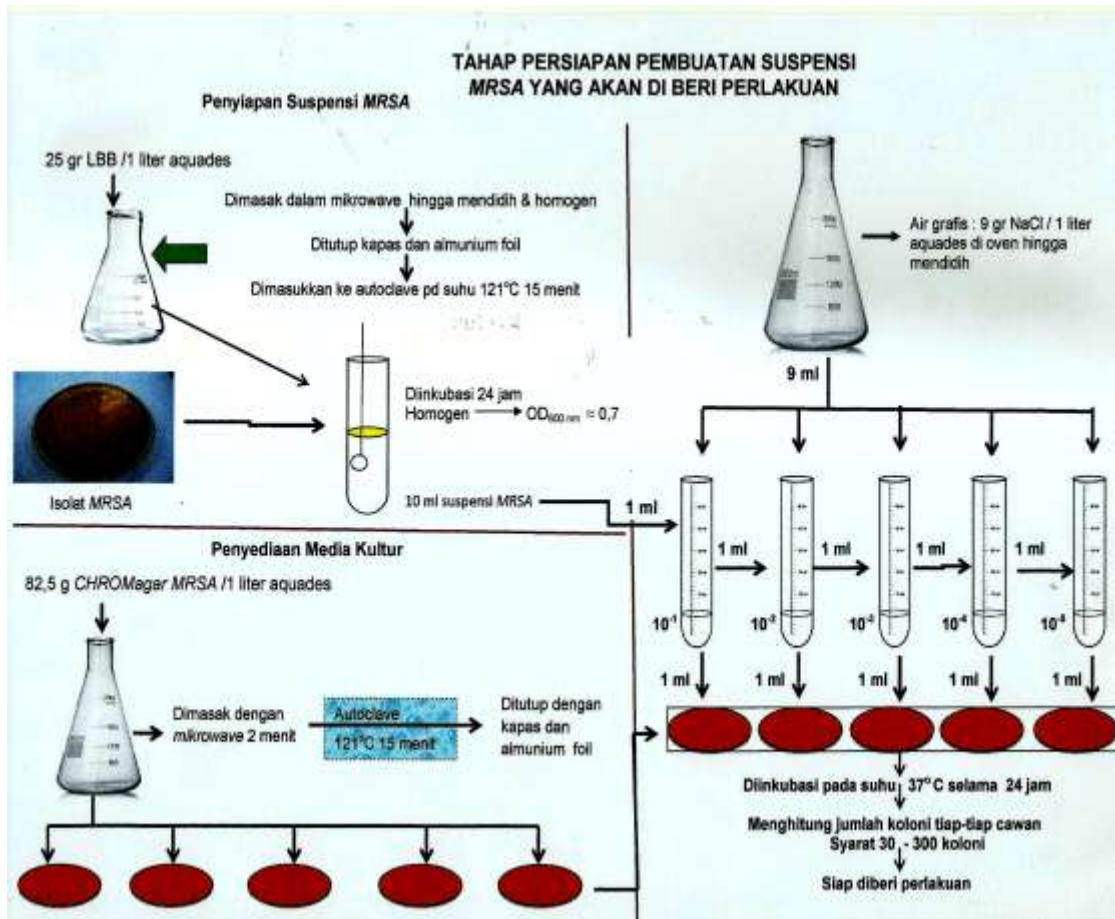


Gambar 4.4 Prosedur percobaan tahap 1, 2, dan 3. Sampel suspensi *MRSA* sebelum diberi perlakuan diambil untuk diamati (sebagai kontrol): bentuk, ukuran, struktur, pewarnaan, dan profil protein *MRSA*. Suspensi *MRSA* yang telah diberi perlakuan (dipapari gelombang ultrasonik saja, dipapari ozon saja, atau dipapari gelombang ultrasonik dan ozon), kemudian diamati persen kematian, perubahan bentuk, ukuran, struktur, pewarnaan, dan perubahan profil protein *MRSA*. Hasil pengamatan dimasukkan dalam tabel ompong untuk dianalisis. Membandingkan tingkat kerusakan sel *MRSA* pada percobaan tahap 1, 2, dan 3

4.6 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian disertasi ini meliputi :

1. Mendisan peralatan penguat daya gelombang ultrasonik (Lampiran 1)
2. Pembelian isolat *MRSA* di bagian mikrobiologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
3. Pembuatan media kultur *MRSA*.



Gambar 4.5 Tahap persiapan pembuatan Suspensi MRSA

Pembuatan suspensi MRSA

Bakteri MRSA diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi RS Dr. Soetomo Surabaya tanggal 26 Januari 2016 dalam bentuk agar plate setelah mengalami proses isolasi.

1. Menyediakan media steril *Luria Bertani Broth* dengan komposisi 25 gram /liter aquades. campuran ini dimasak dengan menggunakan microwave hingga mendidih dan dibuat homogen kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil.
2. Campuran ini disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit di dalam *autoclave*.
3. Mengambil isolat MRSA dengan menggunakan ose steril dan memasukkan



ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml media *Luria Bertani Broth* dan dibuat homogen lalu ditunggu dalam waktu satu hari untuk memperoleh $OD_{600nm} = 0,65$.

4. Menyiapkan media steril *Chromagar MRSA* dengan komposisi 82,5 gram /1liter aquades dimasukkan ke dalam autoclave untuk disterilkan dengan suhu $121^{\circ}C$ dalam waktu 15 menit. Hasilnya dimasukkan ke dalam Labu elen meyer yang berisi aquades steril lalu ditutup dengan kapas dan almunium foil dan dimasak dengan menggunakan autoclave sekitar 2 menit hingga homogen.
5. Menyiapkan cawan petri yang telah diberi label untuk menuangkan media agar sebagai medium tumbuh bakteri MRSA.
6. Menuangkan *Chromagar MRSA* cair ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga padat, setelah padat dibungkus dengan plastik *wrap* agar steril
7. Menuangkan 1 ml suspensi MRSA kedalam cawan petri
8. Cawan petri ini dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu $37^{\circ}C$ dengan posisi terbalik.
9. Menghitung jumlah koloni MRSA yang berada di cawan petri dengan menggunakan quebec colony counter. Syarat yang harus dipenuhi agar dapat dihitung dengan baik sekitar 30 hingga 300.
10. Jika memenuhi syarat maka tabung tersebut diberi tanda, tetapi jika tidak memenuhi maka pengenceran harus diulang kembali.
11. Suspensi MRSA siap untuk diberi perlakuan.

4.7 Analisis Data

Pada penelitian ini, diperoleh 2 macam data, yaitu : data dari pengamatan makro, yang berupa persen kematian MRSA dan data pengamatan mikro, yang berupa tampilan fisik (perubahan : bentuk, ukuran, stuktur, dan perwarnaan) MRSA.



a. Uji normalitas dan homogenitas

Data yang telah dikumpulkan akan diproses dengan menggunakan *MINITAB 16.0*, dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. **Uji normalitas** berguna untuk menentukan data yang telah dikumpulkan berdistribusi normal atau diambil dari populasi normal. Uji statistik normalitas yang dapat digunakan diantaranya Kolmogorov Smirnov, Lilliefors, Shapiro Wilk.

2. **Pengujian homogenitas** adalah pengujian mengenai sama tidaknya variansi-variansi dua buah distribusi atau lebih. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data dalam variabel x dan y bersifat homogen atau tidak, digunakan uji *Levene test* (Putri, 2013).

b. Uji Anova

Uji ini digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan atau tidak antar kelompok tersebut, dengan kata lain pada uji ini mencari pengaruh variabel bebas terhadap variabel terganggunya.

c. Uji Regresi

Uji ini bertujuan untuk membuat estimasi rata-rata dan nilai variabel tergantung dengan didasarkan pada variabel bebasnya. Pada umumnya pengaruh variabel bebas terhadap variabel terganggunya dinyatakan dengan grafik fungsi.

**BAB 5****PENELITIAN TAHAP 1****Gelombang Ultrasonik Untuk Membunuh *Methicillin Resistant******Staphylococcus aureus* (MRSA) Secara In Vitro Melalui Stres Mekanik, Kavitasi, Dan Efek Kimia****5.1 Latar Belakang Masalah**

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram-positif, dengan diameter dari 0,5-1,5 μm dan ditandai dengan kokus individu, yang terbagi dalam lebih dari satu permukaan untuk membentuk seperti cluster anggur. Sampai saat ini, ada 32 spesies dan delapan sub-spesies dalam genus *Staphylococcus*, banyak yang menginfeksi tubuh manusia, namun *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Staphylococcus epidermidis* adalah dua strain yang paling banyak dipelajari (Harris *et al.*, 2002). Patogenesis infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* merupakan hasil interaksi berbagai protein permukaan bakteri dengan berbagai reseptor pada permukaan sel inang. Penentuan faktor virulen yang paling berperan sulit dilakukan karena demikian banyak dan beragam faktor virulen yang dimiliki *Staphylococcus aureus* (DeLeo *et al.*, 2009).

Pertumbuhan mikroorganisme dapat dikendalikan melalui proses fisik dan kimia. Pengendalian dapat berupa pembasmian dan penghambatan populasi mikroorganisme. Menurut Tortora *et al.* (2007), pengendalian bakteri dengan menggunakan metode fisika dapat dilakukan dengan menggunakan: suhu tinggi (panas lembab: uap bertekanan, air mendidih dan panas kering: pembakaran, sterilisasi air panas), suhu rendah (pendinginan dan pembekuan), radiasi ionisasi (sinar x dan sinar γ), radiasi non ionisasi (sinar ultraviolet), dan filter bakteriologis.

Dari metode pengendalian bakteri diatas belum memanfaatkan gelombang



mekanik (gelombang ultrasonik) sebagai metode untuk mengendalikan bakteri. Gelombang ini memiliki banyak keuntungan karena mampu membunuh bakteri baik secara fisika maupun kimia, disamping itu gelombang ini tidak menimbulkan pencemaran terutama suara. Tampilan fisik akibat stres mekanik, kavitasi, serta efek kimia yang telah mati akibat paparan gelombang ultrasonik akan diamati.

5.2 Masalah Penelitian

1. Berapa besar frekuensi efektif dan pengaruh paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia ?
2. Berapa besar daya lethal dan pengaruh paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia ?
3. Bagaimana tingkat kerusakan sel *MRSA* dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram *MRSA* akibat dipapari gelombang Ultrasonik.

5.3 Tujuan Penelitian

5.3.1 Tujuan umum

Mencari pengaruh paparan gelombang ultrasonik jika diaplikasikan untuk membunuh *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

5.3.2 Tujuan khusus

1. Menemukan frekuensi efektif dan pengaruh paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia ?
2. Menemukan daya lethal dan pengaruh paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia ?



3. Mengamati dan menganalisis tingkat kerusakan sel *MRSA* dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram *MRSA* akibat dipapari gelombang ultrasonik.

5.4 Manfaat Penelitian

5.4.1 Manfaat akademis

1. Memberikan informasi ilmiah tentang proses kematian *MRSA* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia akibat paparan gelombang ultrasonik.
2. Merupakan metode alternatif yang dapat digunakan untuk melengkapi buku mikrobiologi yang belum mencantumkan metode fisika yang menggunakan gelombang mekanik untuk mengendalikan bakteri.

5.4.2 Manfaat praktis

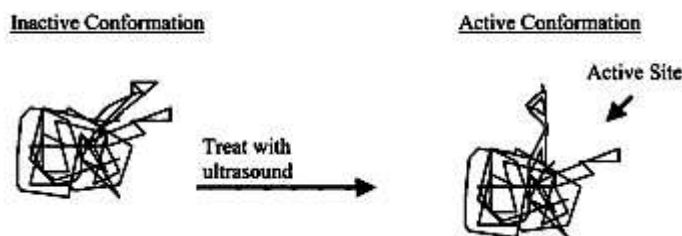
1. Merupakan penelitian pendahuluan untuk mengaplikasikan metode ultrasonik-ozon untuk mempercepat proses penyembuhan luka kronis.
2. Dapat digunakan sebagai desinfektan yang ramah lingkungan pada proses pengolahan air bersih.

5.5 Kerangka Teori

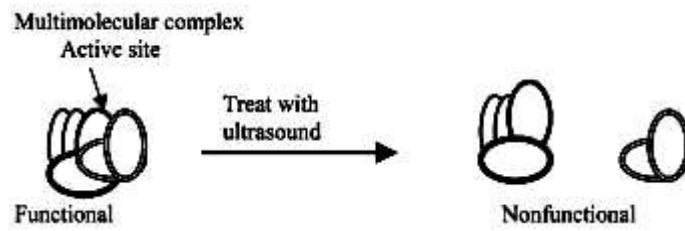
Penelitian tentang pemanfaatan gelombang ultrasonik sebagai metode inaktivasi mikroba potensial dimulai pada 1960, setelah ditemukan bahwa gelombang suara yang digunakan dalam perang anti-kapal selam dapat membunuh ikan. Selama proses sonikasi, gelombang longitudinal dibuat ketika gelombang sonik bertemu dengan medium cair, sehingga menciptakan daerah bolak-balik dengan daerah kompresi dan ekspansi. Ini daerah perubahan tekanan menyebabkan kavitasi terjadi, dan gelembung gas yang terbentuk di media. Gelembung ini memiliki area permukaan yang lebih besar selama siklus

ekspansi, yang meningkatkan difusi gas, menyebabkan gelembung untuk memperluas diri kemudian pecah (Herceg, 2013).

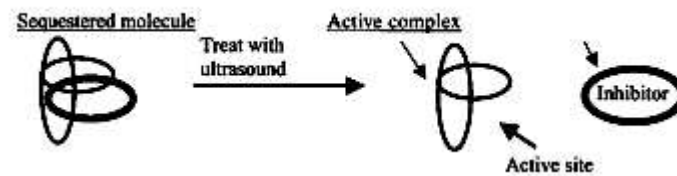
Konsep penyerapan energi ultrasonik oleh protein enzimatis yang menyebabkan perubahan dalam kegiatan enzim ini tidak baru. Namun, laporan terbaru menunjukkan gelombang ultrasonik yang mempengaruhi aktivitas enzim dan mungkin regulasi gen memberikan data yang memadai untuk menampilkan mekanisme molekuler nonthermal. Hipotesis frekuensi resonansi menjelaskan dua mekanisme biologis yang mungkin mengubah fungsi protein sebagai akibat dari penyerapan energi ultrasonik. Pertama, penyerapan energi mekanik oleh protein dapat menghasilkan pergeseran konformasi transient (memodifikasi struktur 3-dimensi) dan mengubah aktivitas fungsional protein. Kedua, resonansi atau stres mekanik (atau keduanya) dapat memisahkan multimolecular kompleks, sehingga mengganggu fungsi kompleks (Johns, 2002). Gambar 5.1; 5.2; dan 5.3 adalah gambar hipotesis frekuensi resonansi :



Gambar 5.1 Gaya resonansi mekanik yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik dapat menyebabkan pergeseran konformasi sementara. Molekul biasanya ditemukan di salah satu dari bentuk 3-dimensi, sebuah konformasi " aktif " atau " tidak aktif ". (Johns, 2002)



Gambar 5.2 Gaya geser yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik dapat mengakibatkan pemisahan kompleks multimolekular dengan hilangnya fungsi atau penurunan aktivitas (Johns, 2002)



Gambar 5.3 Gaya geser mekanik yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik dapat mengusir molekul inhibitor yang menyebabkan aktivasi jalur sinyal transduksi (Johns, 2002)

Bila bakteri berada di dalam medan ultrasonik yang intensif dalam frekuensinya tinggi maka bakteri akan menderita getaran yang hebat dan tegangan yang besar, pada dinding sel terjadi perapatan dan peregangan yang diantaranya terjadi beda tekanan. Bila regangan pada dinding sel besar hingga batas elastisitasnya dilampaui maka dinding sel akan sobek dan bakteripun mati.

Mekanisme lain untuk menjelaskan interaksi gelombang ultrasonik dengan bakteri adalah pengaruh kavitasi. Pengaruh kavitasi dapat merusak ikatan molekul. Molekul H_2O yang pecah menjadi radikal-radikal H , OH dan HO_2 dan terjadilah H_2O_2 . Dengan demikian di dalam air akan terdapat banyak H_2O_2 yang berfungsi sebagai disinfektan yang berfungsi mengoksidasi tubuh bakteri tersebut sehingga bakteri mati, efek ini disebut efek yang mematikan (Lethal effect). (Ackerman, 1998).



5.5.1 Frekuensi resonansi gelombang ultrasonik

Secara kumulatif, dapat menunjukkan bahwa energi mekanik dalam gelombang ultrasonik dan gaya geser gelombang bergabung untuk menghasilkan sifat mekanik yang mempengaruhi membran sel dan struktur molekul dalam sel. Dugaan utama dari mekanisme kerja frekuensi resonansi adalah bahwa energi mekanik dalam gelombang ultrasonik diserap oleh protein, mengubah konformasi struktur protein individu atau fungsi kompleks multimolekular. Selain itu, gelombang ultrasonik dapat menyebabkan aktivitas resonansi dalam protein, modulasi molekul atau fungsi efektor multimolekular kompleks (Johns, 2002).

5.5.2 Daya gelombang ultrasonik

Daya gelombang ultrasonik adalah energi persatuan luas persatuan waktu yang dipancarkan oleh gelombang ultrasonik. adalah $P = 2\pi^2 f^2 U_0^2 \rho c A$ (persamaan 2.32 hal 41) terlihat bahwa daya (P) berbanding lurus dengan kuadrat amplitudo (U_0) dan kuadrat frekuensi (f), massa jenis medium (ρ), kelajuan (v), serta luas permukaan bidang (A), jika frekuensi dibuat konstan, peningkatan daya paparan gelombang ultrasonik menyebabkan terjadinya peningkatan amplitudonya, hal ini menyebabkan stres mekanik yang ditimbulkan akan semakin besar (Goobermen, 1988).

5.5.3 Pengaruh Frekuensi dan Daya Gelombang Ultrasonik Untuk Membunuh Bakteri

Paparan dengan menggunakan gelombang ultrasonik dibedakan menjadi 2 macam, yaitu paparan dengan frekuensi rendah dan tinggi. Gelombang ultrasonik dengan frekuensi rendah didefinisikan sebagai gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20 kHz – 120 kHz dengan daya 0,5 – 1,0 W/cm².

Sedangkan frekuensi tinggi didefinisikan sebagai gelombang ultrasonik dengan



frekuensi 0,5 MHz – 10 MHz dengan daya sampai 1500 W/cm² (Stanisic *et al*, 2005). Dari hasil berbagai penelitian menggunakan gelombang ultrasonik untuk membunuh bakteri diperlihatkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1 Komparasi paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh bakteri

Peneliti	Frekuensi	Daya (watt)	Bakteri	Kesimpulan
Hudori (2002)	40 kHz	10	<i>E. coli</i>	99,46% mati
Dehghani & Hadi (2005)	42 kHz	70	<i>E. coli</i>	99,80% mati
Mansyur & Sembiring (2009)	1,05 MHz	0,42	<i>E.coli</i>	40% mati
Herceg Z., Markov K., Salamon B.S., Jambrak A.R., Vukusic T., & Kaliterna J (2013)	20 kHz,	600	<i>E. coli</i> 3014, <i>S. aureus</i> 3048, <i>Salmonella spp.</i> 3064, <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 23074 and <i>Bacillu cereus</i> 30	Terjadi penurunan konsentrasi bakteri dan bakteri gram negatif lebih rentan terhadap paparan gelombang ultrasonik
Jiao <i>et al</i> (2016)	20 kHz	60 watt/cm ²	<i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>	Laju kematian <i>E. coli</i> : (98.14% ± 0.89%) dan <i>S. aureus</i> : (91.68% ± 1.45%)

Gelombang ultrasonik mampu menonaktifkan bakteri, membuatnya lebih rentan *E. coli* terhadap efek yang ditimbulkan. Efek yang ditimbulkan meliputi efek fisik, mekanik dan kimia yang timbul dari kavitasasi akustik. Kavitasasi digambarkan sebagai gelembung mikroskopik akibat perubahan kerapatan medium. Pertumbuhan dan runtuhnya gelembung mikroskopis ketika gelombang ultrasonik melalui cairan, mengakibatkan rambatan stres mekanik mikroskopis (Srinivasa & Linga, 2013).



5.6 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif eksperimental laboratorium murni yang memanfaatkan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA in Vitro* melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia.

5.6.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni yang terdiri dari tahap persiapan dan pelaksanaan penelitian. Tahap persiapan telah diuraikan pada bab metode penelitian.

Tahap pelaksanaan penelitian

Pada tahap 1 penelitian difokuskan untuk menemukan frekuensi efektif dan daya lethal paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh *MRSA* melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram sel *MRSA*.

5.6.2 Populasi dan sampel penelitian

a. Populasi

Populasi penelitian adalah 1 liter suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang telah dibiakan dalam labu elenmeyer.

b. Sampel

Sampel penelitian adalah 100 ml suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang diambil dari populasi. Jumlah ulangan ditentukan berdasarkan rumus replikasi sampel dari Federer:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

dengan t : banyaknya perlakuan

r : replikasi/ulangan

Jika banyaknya perlakuan yang direncanakan 10 macam frekuensi (t = 10), maka diperoleh r = 2,67 dibulatkan menjadi r = 3,



sedangkan daya divariansi 5 macam perlakuan diperoleh $r = 4,75$ dibulatkan menjadi $r = 5$

Untuk mengetahui apakah sampel yang telah diambil berdistribusi normal atau diambil dari populasi normal perlu diuji dengan uji normalitas. Untuk mengetahui homogenitas data dari variabel perlu uji homogenitas (Putri, 2013).

5.6.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Pembuatan proposal, penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 9 bulan. Kegiatan ditempat penelitian meliputi:

1. Laboratorium Instrumentasi Biofisika Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya

Kegiatan yang dilakukan dilaboratorium ini merupakan persiapan untuk menunjang percobaan yang akan saya lakukan. Kegiatan tersebut meliputi :

- a. Mendisain piranti penguat daya pembangkit gelombang ultrasonik (Lampiran 1)
- b. Mengkalibrasi peralatan signal generator dan osiloskop

2. Laboratorium Institut Tropical Disease Universitas Airlangga

Kegiatan yang dilakukan di laboratorium ini merupakan kelanjutan dari kegiatan di laboratorium Instrumentasi Biofisika Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya. Kegiatan tersebut meliputi :

- a. Penyediaan suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*
- b. Membuat Media kultur suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*



c. Serangkaian percobaan mengenai pengaruh antara persen kematian Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* dengan frekuensi, dan daya paparan gelombang ultrasonik.

3. Laboratorium Mikroskop Elektron Universitas Negeri Malang

Kegiatan yang dilakukan di laboratorium ini adalah mengamati dengan mikroskop elektron (SEM) perubahan bentuk, dan ukuran, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* sebelum diberi perlakuan (kontrol) dan sesudah diberi perlakuan.

4. Laboratorium Mikroskop Elektron Universitas Gajamada Yogyakarta

Kegiatan yang dilakukan di laboratorium ini adalah mengamati dengan mikroskop elektron (TEM) perubahan struktur Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* sebelum diberi perlakuan (kontrol) dan sesudah diberi perlakuan.

5. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran UWKS

Kegiatan yang dilakukan di laboratorium ini adalah mengamati perubahan warna MRSA dengan menggunakan pewarnaan gram. Perubahan warnanya dibandingkan dengan MRSA kontrol.

6. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UWKS

Kegiatan yang dilakukan di laboratorium ini adalah mengamati hasil pewarnaan gram yang telah dibuat.

5.6.4 Variabel dan Indikator Penelitian

a. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini: frekuensi, dan daya paparan gelombang ultrasonik.



2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini : persen kematian *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, tingkat kerusakan sel akibat dipapari gelombang ultrasonik.

3. Variabel terkendali

- Pada percobaan menemukan frekuensi efektif : daya gelombang ultrasonik, bentuk sinyal function generator (square), kultur murni MRSA, lama inkubasi, media bakteri, pH air garam fisiologis.
- Pada percobaan menemukan daya lethal : frekuensi efektif (dari Percobaan terdahulu), bentuk sinyal function generator (square), Kultur murni MRSA, lama inkubasi, media bakteri, pH air garam fisiologis.

b. Indikator penelitian

Tampilan fisik *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang telah mati setelah terpapar gelombang ultrasonik diamati dengan menggunakan mikroskop elektron, tampilan fisik tersebut meliputi kerusakan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* akibat stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia. Indikator kerusakannya adalah perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel MRSA yang telah terpapar gelombang ultrasonik.

5.6.5 Definisi Operasional Variabel

- Gelombang ultrasonik adalah gelombang mekanik yang frekuensinya lebih dari 20 kHz, gelombang ini tidak dapat didengar oleh manusia.
- Frekuensi efektif paparan gelombang ultrasonik adalah jumlah gelombang tiap detik yang dipancarkan gelombang ultrasonik yang



mampu membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* paling banyak.

- Daya efektif paparan gelombang ultrasonik adalah energi per satuan waktu yang dipancarkan oleh gelombang ultrasonik, yang mampu membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* paling banyak.

- Persen kematian *MRSA* adalah perbandingan antara jumlah kematian *MRSA* dengan jumlah *MRSA* semula (kontrol).

- Stres mekanik adalah tegangan elastis yang disebabkan oleh gaya lateral yang ditimbulkan oleh gelombang ultrasonik yang menyebabkan pergeseran atau kerusakan sel bakteri.

- Kavitasi adalah proses terbentuknya gelembung mikro dalam medium. Oleh gelombang ultrasonik, yang akan meledak dengan mengirimkan gelombang kejut yang dapat merusak sel bakteri.

- Efek kimia adalah efek timbulnya hidrogen peroksida pada medium akibat pemaparan gelombang ultrasonik dan ozon yang bersifat bakterisidal.

5.6.6 Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- *Function generator* berfungsi untuk pengatur frekuensi dan pembangkit tegangan.

- *Osiloskop* berfungsi sebagai pengukur frekuensi dan tegangan yang dikeluarkan oleh *function generator*.

- *Tweeter piezoelectric* berfungsi untuk pembangkit gelombang Ultrasonik.



- *Power amplifier* berfungsi sebagai penguat daya yang dikeluarkan oleh *function generator*.

- *Spektrofotometer* berfungsi untuk mengukur keparapan suspensi *MRSA*. (OD)

- Mikroskop elektron berfungsi untuk mengamati tingkat kerusakan sel *MRSA* sebelum dan setelah dipapari gelombang ultrasonik.

- *Autoclave* berfungsi untuk mensterilkan peralatan yang akan digunakan untuk penelitian.

- *Microwave* untuk memasak media yang digunakan untuk mengkultur *MRSA*.

- *Colony counter* berfungsi untuk menghitung jumlah koloni *MRSA* secara manual.

- Neraca digital berfungsi untuk mengetahui massa media kultur yang akan digunakan.

- *Stopwatch* digunakan untuk mengukur lamanya percobaan dilakukan.

- *O s e* digunakan untuk mengambil bakteri.

- Inkubator berfungsi untuk menginkubasi *MRSA*

- Peralatan yang terbuat dari gelas : cawan petri (diameter 10 cm), tabung reaksi, tabung elenmeyer, 400 ml, gelas ukur 400 ml, mikro pipet, gelas obyek, gelas penutup, dan pembakar bunsen.

b. Bahan penelitian

- Isolat *MRSA*

- *Luria bertani broth*

- *Chromagar MRSA powder*

- *Crystal violet*



- Safranin

- Lugol

- Air gratis

- Alkohol 95%

- Aquades

- K a p a s

- Almunium foil

- Plastik wrap

5.6.7 Alur dan prosedur penelitian

a. Alur penelitian

Pada penelitian tahap 1 difokuskan pada pemanfaatan gelombang ultrasonik untuk membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, dengan mencari frekuensi efektif dan daya efektif paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Parameter yang diamati adalah kerusakan *Methicillien Resistant Staphylococcus aureus* akibat stres mekanik, kavitasi, serta efek kimia. Alur penelitian tahap1 ditunjukkan oleh gambar 4.1 di bab 4

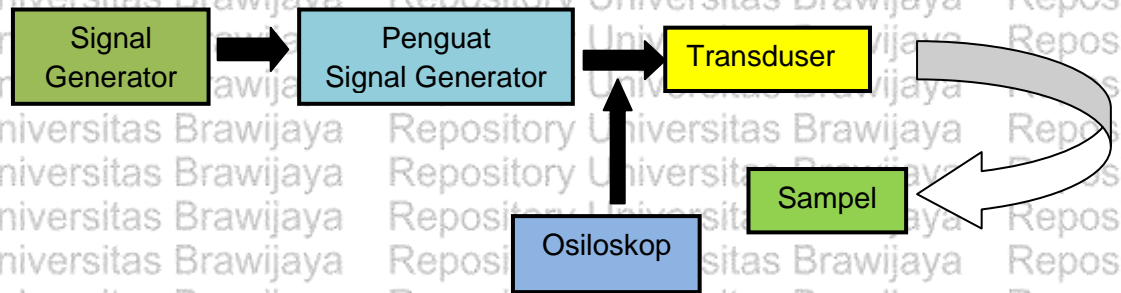
b. Prosedur penelitian

Proses penelitian ini diawali dengan mendesain pembangkit gelombang ultrasonik dan pembuatan kultur *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Pembangkit gelombang ultrasonik menggunakan *tweeter piezoelectico*, karena pembangkit ini mengubah energi listrik menjadi energi akustik. *Tweeter piezoelectico* dipilih karena dapat digunakan untuk membangkitkan gelombang ultrasonik baik di zat padat



maupun fluida disamping itu transduser jenis ini banyak dijual di pasaran.

Gambar 5.4 adalah diagram blok percobaan dengan gelombang ultrasonik. Uraian fungsi masing-masing blok beserta fungsinya ditunjukkan pada tabel 5.2



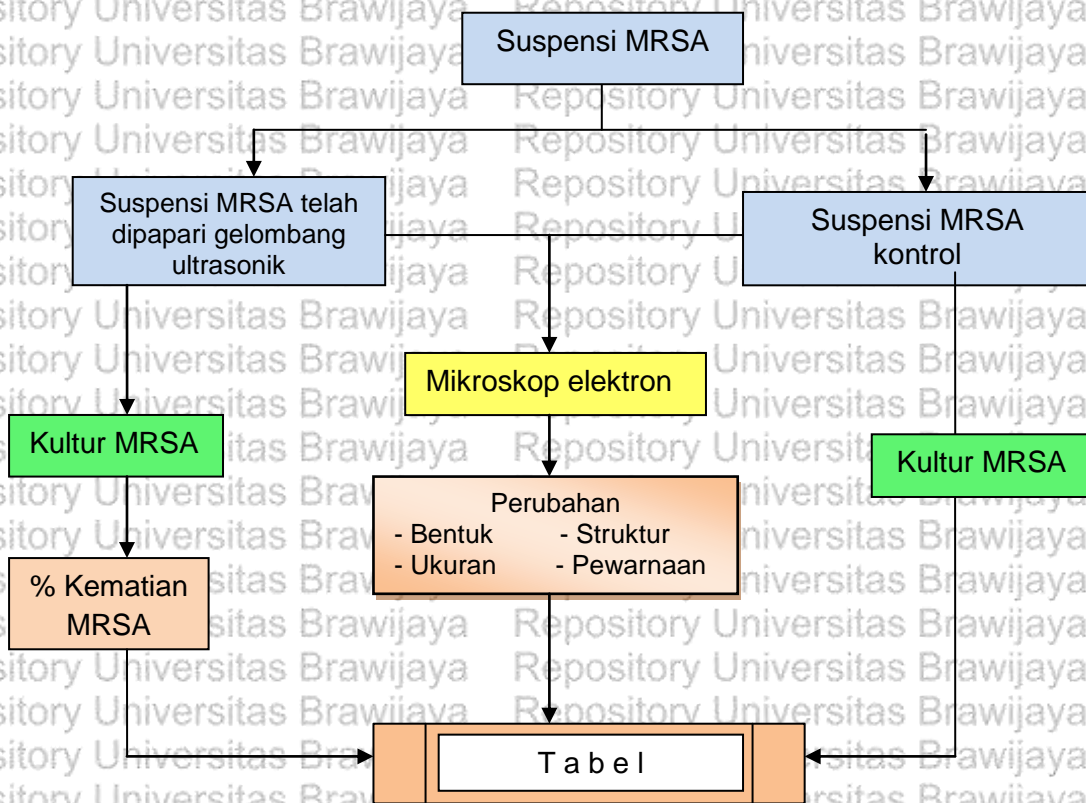
Gambar 5.4 Diagram blok percobaan dengan gelombang ultrasonik

Tabel 5.2 Uraian masing-masing blok beserta fungsinya

Nama blok	Fungsi
Signal Generator	Pembangkit isyarat listrik dengan daya rendah dan frekuensi bervariasi
Penguat signal generator	Penguat getaran listrik yang berasal dari signal generator serta meningkatkan daya listrik sehingga diperoleh getaran dengan daya tinggi
Osiloskop	Pengukur frekuensi dan tegangan listrik yang dikeluarkan oleh penguat signal generator
Transduser	Pembangkit gelombang ultrasonik yang mengubah isyarat listrik menjadi suara
S a m p e l	Bagian dari populasi, yaitu sejumlah bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang berada dalam aquades yang akan dipapari dengan gelombang ultrasonik.

Prosedur untuk menentukan frekuensi dan daya efektif

Pada penelitian ini cara pengumpulan data untuk menentukan frekuensi dan daya efektif paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh MRSA. Prosedur pengumpulan datanya ditunjukkan pada Gambar 5.5



Gambar 5.5 prosedur pengumpulan data penelitian tahap 1

a. Menemukan frekuensi efektif paparan gelombang ultrasonik

1. Merangkai peralatan seperti pada Gambar 5.4
2. Menghubungkan function generator dan osiloskop dengan sumber listrik.
3. Mengatur daya pada posisi 2 watt
4. Mengambil masing – masing 0,2 ml suspensi *MRSA* kemudian dimasukkan kedalam 3 cawan petri yang berisi media Chromagar *MRSA* , yang digunakan sebagai kontrol.
5. Memasukkan cawan petri tersebut ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Memapari suspensi *MRSA* berturut - turut dengan gelombang ultrasonik yang berfrekuensi 21 kHz, 22 kHz, 30 kHz. selama 2 menit.



7. Mengambil suspensi *MRSA* masing - masing 0,2 ml kemudian dimasukkan ke dalam 3 cawan petri yang berisi *Chromagar MRSA*

8. Cawan petri ini diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C, yang digunakan sebagai perlakuan.

9. Mengambil 40 ml suspensi *MRSA* kemudian dimasukkan ke dalam 4 buah tabung sentrifuge, kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit.

10. Masing – masing 0,5 ml ekstrak suspensi *MRSA* yang berada di ujung tabung sentrifuge diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil.

11. Mengambil suspensi *MRSA* diambil dengan menggunakan ose kemudian diletakkan di kaca obyek untuk diwarnai dengan dengan pewarnaan gram (prosedur pewarnaan di lampiran 13).

12. Mengambil ekstrak suspensi *MRSA* dengan menggunakan ose kemudian diletakkan di atas kaca penutup yang akan diamati dengan menggunakan mikroskop elektron.

13. Mengamati tingkat kerusakan *MRSA* dengan menggunakan mikroskop elektron.

14. Setelah diinkubasi selama 24 jam, menghitung jumlah koloni *MRSA* kontrol dan perlakuan, kemudian memasukkan hasilnya kedalam tabel ompong.

15. Menghitung persen kematian *MRSA* .

16. Mencari pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian *MRSA*.

17. Membuat grafik antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian *MRSA*.

18. Menentukan frekuensi efektif paparan gelombang ultrasonik,



yaitu frekuensi paparan gelombang ultrasonik yang menyebabkan menyebabkan persen kematian MRSA terbesar.

19. Mengamati dan memfoto MRSA dengan mikroskop elektron meliputi: perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram
20. Memasukkan hasil pengamatan kedalam tabel ompong.

b. Memukan daya efektif paparan gelombang ultrasonik

1. Merangkai peralatan seperti pada Gambar 5.4
2. Menghubungkan function generator dan osiloskop dengan sumber listrik.
3. Mengatur function generator frekuensi efektifnya 26 kHz.
4. Mengambil masing – masing 0,2 ml suspensi MRSA kemudian dimasukkan kedalam 5 cawan petri yang berisi media *Chromagar MRSA*, yang digunakan sebagai kontrol.
5. Memasukkan cawan petri tersebut ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Memapari suspensi MRSA berturut – turut dengan gelombang ultrasonik yang berdaya 2 watt, 3 watt, 4 watt, 5 watt, dan 6 watt dalam waktu 2 menit.
7. Mengambil suspensi MRSA masing - masing 0,2 ml kemudian dimasukkan ke dalam lima cawan petri yang berisi *Chromagar MRSA*.
8. Cawan petri ini diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C, yang digunakan sebagai perlakuan.
9. Mengambil 40 ml suspensi MRSA kemudian dimasukkan ke dalam 4 buah tabung sentrifuge, kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit.



10. Masing-masing 0,5 ml ekstrak suspensi *MRSA* yang berada di ujung tabung sentrifuge diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil
11. Mengambil suspensi *MRSA* diambil dengan menggunakan ose kemudian diletakkan di kaca obyek untuk diwarnai dengan dengan pewarnaan gram (prosedur pewarnaan di lampiran 11 nomer 1.)
12. Mengambil ekstrak suspensi *MRSA* dengan menggunakan ose kemudian diletakkan di atas kaca penutup kemudian difiksasi.
13. Mengamati tingkat kerusakan *MRSA* dengan menggunakan mikroskop elektron (*SEM dan TEM*)
14. mengambil ekstrak suspensi *MRSA* kemudian diletakkan di kaca obyek untuk diberi warna dengan pewarnaan gram (prosedur pewarnaan di lampiran 11 nomer 2)
15. Setelah diinkubasi selama 24 jam, menghitung jumlah koloni *MRSA* kontrol dan perlakuan, kemudian memasukkan hasilnya kedalam tabel ompong.
16. Menghitung persen kematian *MRSA*.
17. Mencari pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian *MRSA*.
18. Membuat grafik antara daya paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian *MRSA*.
19. Menentukan daya lethal paparan gelombang ultrasonik, yaitu daya paparan gelombang ultrasonik yang menyebabkan kematian *MRSA* sebesar 100 %.
20. Mengamati dan memfoto sel *MRSA* dengan mikroskop elektron



meliputi: perubahan bentuk, ukuran, struktur, sedangkan pewarnaan gram diamati dengan layar monitor 24 inci.

21. Memasukkan hasil pengamatan ke dalam tabel ompong.

5.6.8 Prosedur Pengamatan Hasil Penelitian

a. Pengamatan makroskopik

Pengamatan koloni MRSA, pengamatan ini dilakukan sebelum dan sesudah suspensi MRSA dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi dan daya yang bervariasi, untuk memperoleh frekuensi dan daya efektif paparan gelombang ultrasonik. MRSA di kultur di media selektif Chromagar MRSA. Dari hasil ini akan ditentukan prosen kematian MRSA.

b. Pengamatan mikroskopik

Suspensi MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi dan daya yang berbeda, akan diamati tingkat kerusakan selnya dengan menggunakan mikroskop elektron. Hal ini digunakan sebagai indikator untuk mengetahui mekanisme kematian MRSA.

5.6.9 Teknik Analisis Data

Analisis data merupakan bagian yang amat penting dalam metode ilmiah, karena dengan analisislah, data tersebut dapat diberi makna yang berguna dalam memecahkan masalah penelitian. Data mentah yang telah dikumpulkan perlu dipecahkan dalam kelompok-kelompok, diadakan kategorisasi, serta diolah sedemikian rupa, sehingga data tersebut mempunyai arti untuk menjawab masalah dan bermanfaat untuk menguji hipotesis (Nazir, 2005). Setelah data disusun dalam kelompok-kelompok serta hubungan yang terjadi dianalisis, perlu dibuat penafsiran-penafsiran terhadap hubungan yang terjadi dan



membandingkan dengan fenomena-fenomena lain diluar penelitian tersebut. (Nazir, 2005).

a. Uji normalitas dan homogenitas

- **Uji normalitas** berguna untuk menentukan data yang telah dikumpulkan berdistribusi normal atau diambil dari populasi normal.

Uji statistik normalitas yang dapat digunakan diantaranya Chi-Square, Kolmogorov Smirnov, Lilliefors, Shapiro Wilk.

- **Uji homogenitas** adalah pengujian mengenai sama tidaknya variansi-variansi dua buah distribusi atau lebih. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data dalam variabel x dan y bersifat homogen atau tidak (Putri, 2013).

b. Uji Avova

Uji ini digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan atau tidak antar kelompok tersebut, dengan kata lain pada uji ini mencari pengaruh variabel bebas terhadap variabel terganggunya.

c. Uji Regresi

Uji ini bertujuan untuk membuat estimasi rata-rata dan nilai variabel terganggunya dengan didasarkan pada variabel bebasnya. Pada umumnya pengaruh variabel bebas terhadap variabel terganggunya dinyatakan dengan grafik fungsi.

5.7 Hasil Dan Analisis Data

Pengaruh frekuensi dan daya paparan gelombang terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati dan OD



5.7.1 Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap jumlah koloni *MRSA* yang teramati

Tabel 5.3 Hasil pengamatan pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap jumlah koloni *MRSA* yang diamati dengan quebec coloni counter

No.	Frek (kHz)	Jumlah koloni <i>MRSA</i> kontrol (...) x 5.10 ⁵ CFU/ml			Jumlah koloni <i>MRSA</i> perlakuan (...) x 5.10 ⁵ CFU/ml			OD
		N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃	
1.	21	171	155	164	135	162	155	0,013
2.	22	215	160	198	152	200	198	0,019
3.	23	202	199	191	180	176	168	0,026
4.	24	190	202	199	180	168	140	0,026
5.	25	183	250	171	165	158	161	0,028
6.	26	203	210	194	127	180	147	0,029
7.	27	208	199	187	168	139	147	0,017
8.	28	224	201	184	191	174	156	0,015
9.	29	203	200	197	186	192	177	0,010
10.	30	199	197	202	184	189	181	0,011

5.7.1.1 Analisis pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian *MRSA*

Dari tabel 5.3 diolah menjadi tabel 5.4 yaitu pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian *MRSA*.

Persen kematian (% K) didefinisikan : $\% K = \frac{(N_k - N_p)}{N_k} \times 100 \%$

Dengan N_k : Jumlah populasi *MRSA* kontrol

N_p : Jumlah populasi *MRSA* perlakuan



Tabel 5.4 Hasil perhitungan pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap % kematian MRSA

No.	Frekuensi (kHz)	Jumlah koloni MRSA kontrol (....) x 5.10 ⁵ CFU/ml	Jumlah koloni MRSA perlakuan (....) x 5.10 ⁵ CFU/ml	Kematian MRSA (%)
1.	21	163,3 ± 8,0	150,6 ± 14,0	5,08
2.	22	191,0 ± 28,2	183,3 ± 27,2	4,01
3.	23	197,3 ± 5,7	174,7 ± 6,1	11,40
4.	24	197,0 ± 6,2	162,7 ± 20,5	17,41
5.	25	201,3 ± 42,6	161,3 ± 3,5	19,85
6.	26	202,3 ± 8,0	151,3 ± 26,8	25,19
7.	27	296,7 ± 10,5	226,7 ± 15,0	23,57
8.	28	198,0 ± 20,1	173,6 ± 17,5	12,29
9.	29	199,7 ± 3,0	185,0 ± 4,1	7,36
10.	30	290,7 ± 2,5	184,7 ± 4,0	7,33

Tabel 5.4 akan dilakukan uji: normalitas, homogenitas, Anova, dan regresi

a Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$).

Tabel hasil uji normalitas

Frekuensi (kHz)	Shapiro – Wilk Statistic	Sig.	Keterangan
Kontrol	0,895	0,370	Data berdistribusi normal
21 kHz	0,928	0,482	Data berdistribusi normal
22 kHz	0,781	0,070	Data berdistribusi normal
23 kHz	0,964	0,637	Data berdistribusi normal
24 kHz	0,949	0,567	Data berdistribusi normal
25 kHz	0,993	0,843	Data berdistribusi normal
26 kHz	0,980	0,731	Data berdistribusi normal
27 kHz	0,937	0,516	Data berdistribusi normal
28 kHz	1,000	0,968	Data berdistribusi normal
29 kHz	0,987	0,780	Data berdistribusi normal
30 kHz	0,980	0,726	Data berdistribusi normal



Berdasarkan Tabel hasil uji normalitas, dapat diketahui bahwa semua kelompok data berdistribusi normal. Hal ini karena nilai Sig. lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Sebagai contoh, untuk kelompok data MRSA yang dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 25 kHz nilai sig. yang dihasilkan adalah 0,843. Nilai ini lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga diputuskan bahwa kelompok data kontrol berdistribusi normal.

b. Uji homogenitas

Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Statistic*. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	7	1,000

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata - rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata jumlah koloni MRSA yang teramati antar kelompok frekuensi paparan gelombang ultrasonik.

H_0 : Tidak ada pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan

jumlah koloni MRSA yang teramati.

H_1 : Ada pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan

jumlah koloni MRSA yang teramati.

Kriteria penerimaan hipotesis : Tolak H_0 dan terima H_1 jika nilai signifikansi

$P < \alpha$ (tingkat kepercayaan $\alpha = 0,05$), demikian juga sebaliknya.

Tabel hasil uji Anova

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	415.117	207.559	12.04	0.005
Error	7	120.657	17.237		
Total	9	535.774			

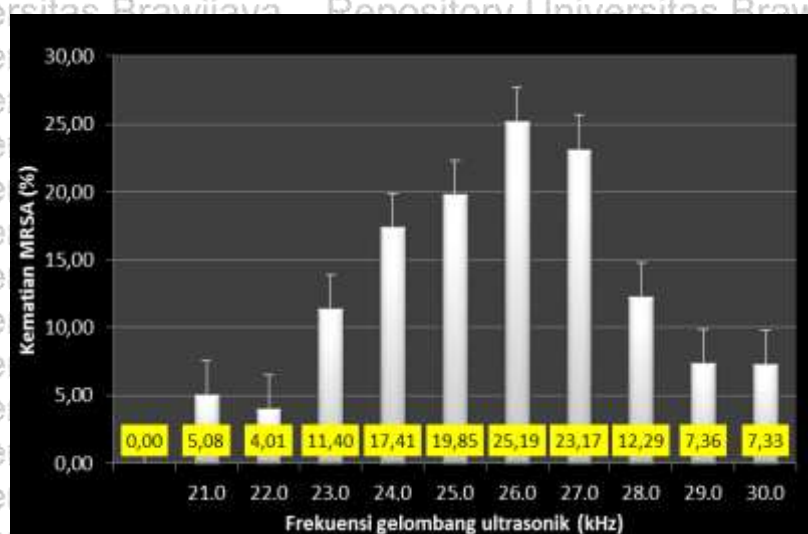
Berdasarkan tabel hasil uji Anova di atas diperoleh, nilai P-value = 0.005.

Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value $< \alpha$, sehingga tolak H_0 .

Artinya, ada pengaruh paparan gelombang ultrasonik dengan beragam frekuensi terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati. Selanjutnya, untuk mengetahui

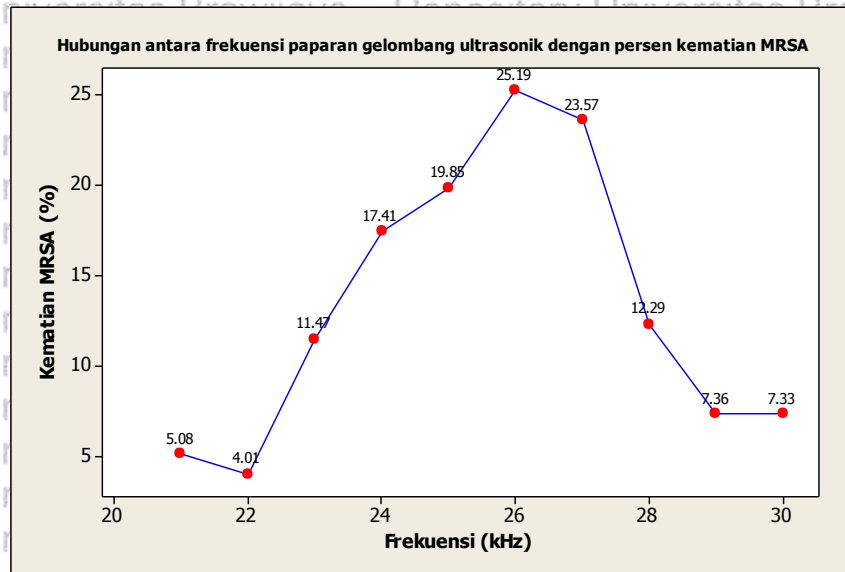
pola sebaran data pada tabel 5.4 pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian akan ditampilkan diagram batang dan grafik regresi di bawah ini.

- **Diagram batang**



Gambar 5.5 Diagram batang Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA yang cenderung berbentuk parabolik.

d. Uji regresi



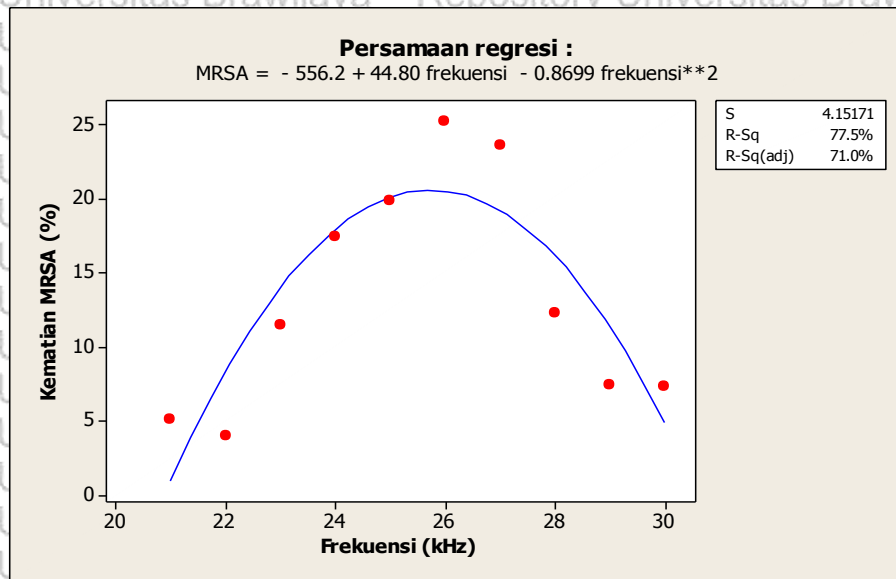
Gambar 5.6 Grafik sebaran pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA

Dari grafik 5.6 diatas terlihat bahwa persen kematian MRSA terkecil terjadi pada saat dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 22 kHz sebesar 4,01%, dan persen kematian terbesar terjadi saat dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz dengan persen kematian sebesar 25,19 %. Jadi dengan demikian frekuensi efektif paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh MRSA dengan daya 2 watt dan waktu paparan 2 menit adalah 26 kHz.

Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA maka digunakan analisis regresi.

Berdasarkan Gambar 5.6 pola hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian MRSA cenderung membentuk pola hubungan kuadratik, sehingga digunakan analisis regresi kuadratik. Berdasarkan pengolahan data di *software* MINITAB, diperoleh output sebagai berikut :

- **Grafik persamaan regresi**



Gambar 5.7 persamaan garis regresi antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan persen Kematian.

Gambar 5.7 menunjukkan hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian MRSA digambarkan dengan titik merah, sedangkan garis biru menggambarkan hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan prediksi persen kematian MRSA berdasarkan pendekatan model regresi kuadratik. Selain berupa grafik, regresi kuadratik juga menampilkan output berikut :

Tabel 5.5 Hasil uji regresi Kematian MRSA versus frekuensi

Polynomial Regression Analysis: MRSA versus frekuensi				
The regression equation is				
MRSA = - 556.2 + 44.80 frekuensi - 0.8699 frekuensi**2				
S = 4.15171 R-Sq = 77.5% R-Sq(adj) = 71.0%				
Sequential Analysis of Variance				
Source	DF	SS	F	P
Linear	1	15.544	0.24	0.638
Quadratic	1	399.574	23.18	0.002



Berdasarkan tabel di atas, diperoleh nilai P-value = 0.002. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value < α . Artinya, model regresi kuadratik yang telah dibuat bisa digunakan. Persamaan regresi kuadratik yang diperoleh untuk menduga persen kematian MRSA (K) berdasarkan frekuensi (f) adalah

$$K(f) = -556,2 + 44,8f - 0,87f^2$$

dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 77,5%.

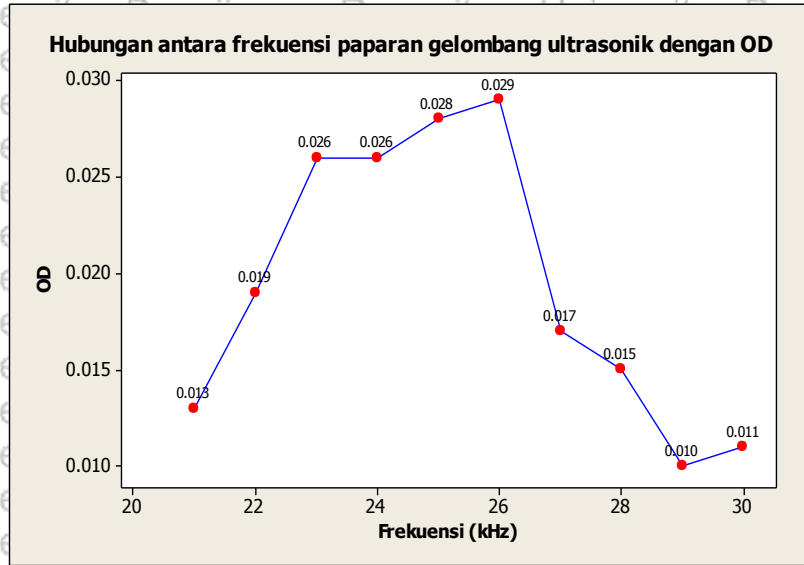
5.7.1.2 Analisis pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap OD suspensi MRSA

Berdasarkan data yang diperoleh, hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan OD dinyatakan dengan tabel 5.3 diperoleh tabel 5.6

Tabel 5.6 Pengaruh frekuensi terhadap OD suspensi MRSA

No.	Frekuensi (kHz)	OD
1.	21	0,013
2.	22	0,019
3.	23	0,026
4.	24	0,026
5.	25	0,028
6.	26	0,029
7.	27	0,017
8.	28	0,015
9.	29	0,010
10.	30	0,011

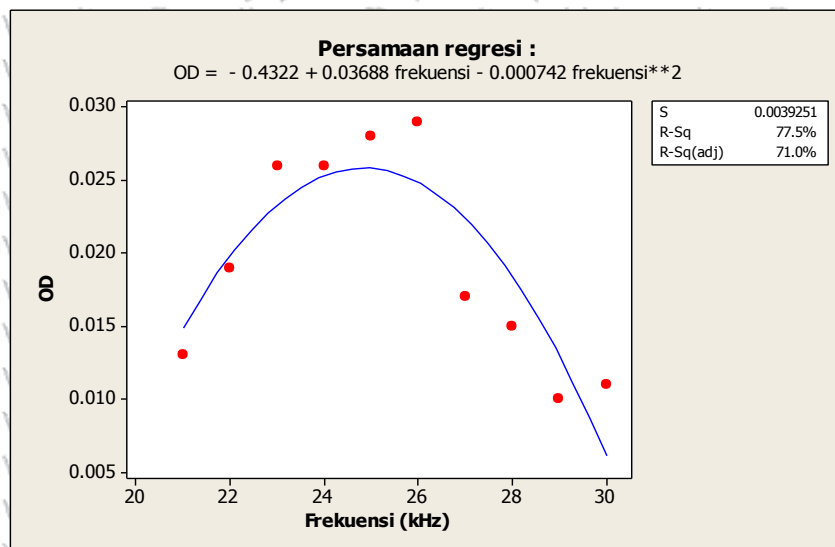
Berdasarkan data yang diperoleh, hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA digambarkan sebagai grafik berikut:



Gambar 5.8 grafik sebaran Pengaruh frekuensi paparan terhadap OD suspensi MRSA

Gambar 5.8 menunjukkan bahwa pola hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA cenderung membentuk pola hubungan kuadratik. Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh frekuensi terhadap OD suspensi MRSA maka digunakan analisis regresi kuadratik dan diperoleh output sebagai berikut:

- Grafik persamaan regresi



Gambar 5.9 Persamaan regresi antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA.

Gambar 5.9 menunjukkan hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA digambarkan dengan titik merah, sedangkan garis biru menggambarkan hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan prediksi OD suspensi MRSA berdasarkan pendekatan model regresi kuadratik. Selain berupa grafik, regresi kuadratik juga menampilkan output berikut:

Tabel 5.7 Hasil uji regresi frekuensi dengan OD

Polynomial Regression Analysis: OD versus frekuensi

The regression equation is
 $OD = - 0.4322 + 0.03688 \text{ frekuensi} - 0.000742 \text{ frekuensi}^2$

S = 0.00392506 R-Sq = 77.5% R-Sq(adj) = 71.0%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	0.0003706	0.0001853	12.03	0.005
Error	7	0.0001078	0.0000154		
Total	9	0.0004784			

Sequential Analysis of Variance

Source	DF	SS	F	P
Linear	1	0.0000795	1.60	0.242
Quadratic	1	0.0002910	18.89	0.003

kuadratik yang telah dibuat bisa digunakan. Persamaan regresi kuadratik yang diperoleh untuk menduga OD berdasarkan frekuensi (f) adalah:

$$OD(f) = - 0.432 + 0.037f - 0.0007f^2$$

5.7.1.3 Indikator kematian MRSA

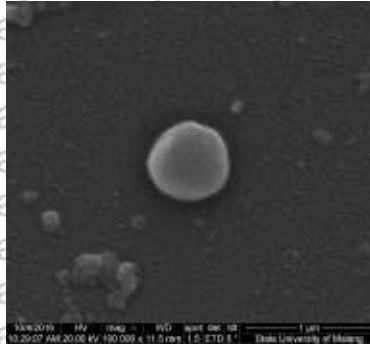
Indikator kematian sel MRSA akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik beragam frekuensi adalah : Perubahan bentuk sel MRSA, ukuran sel MRSA , struktur sel MRSA dan pewarnaan sel MRSA.



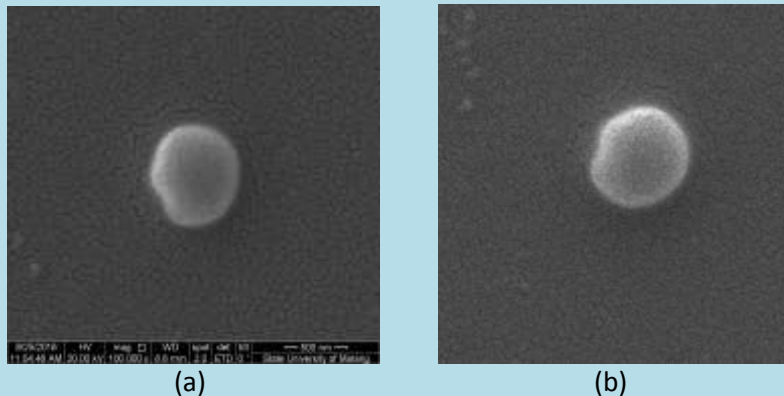
1. Perubahan bentuk sel *MRSA*

Perubahan bentuk akibat dipapari *MRSA* dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bulat dan tidak bulat. Perubahan bentuk sel menyebabkan kematian *MRSA*.

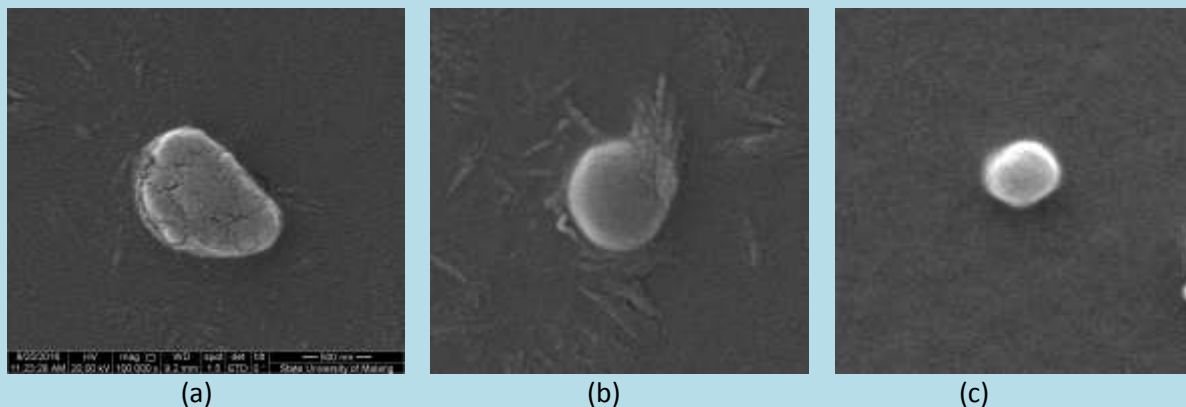
Berikut ini perubahan bentuk *MRSA* akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi yang bervariasi (perbesaran 100.000 kali, skala 1 μm)



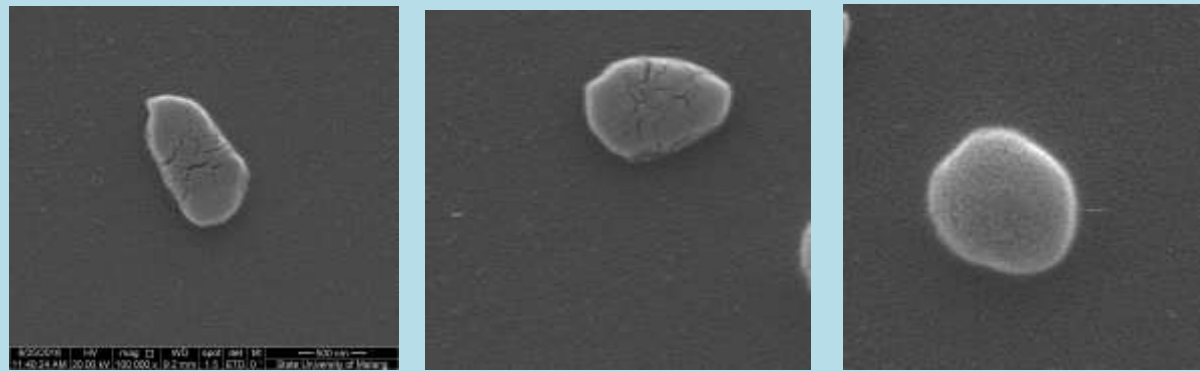
Gambar 5.10 Gambar sel *MRSA* kontrol



Gambar 5.11 Sel *MRSA* yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 21 kHz, terlihat ada perubahan bentuk ada cekungan dipermukaan dinding *MRSA* yang disebabkan adanya kavitasi ekstrasellular



Gambar 5.12 Sel *MRSA* yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 22 kHz, Pada gambar (a) sel *MRSA* mengalami pemanjangan, dan (c) mengalami pengecilan akibat stres mekanik, dan (b) terdapat berkas pecahan dari dalam sel *MRSA* akibat kavitasi intrasellular.

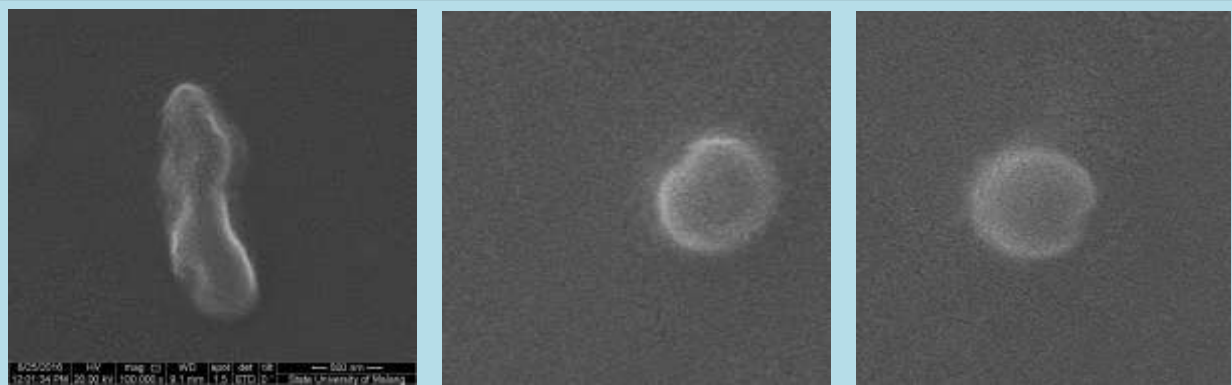


(a)

(b)

(c)

Gambar 5.13 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 23 kHz. Dari gambar di atas terlihat bahwa sel MRSA mengalami pemanjangan akibat stres mekanik

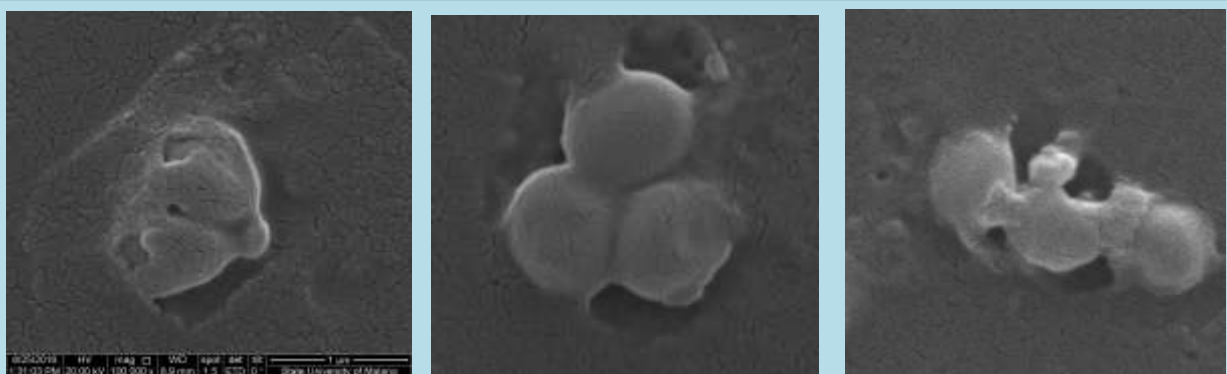


(a)

(b)

(c)

Gambar 5.14 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 24 kHz. pada gambar (a) sel MRSA terpuntir akibat turbulensi larutan, sedang gambar (b) dan (c) mengalami kerusakan pada dinding selnya

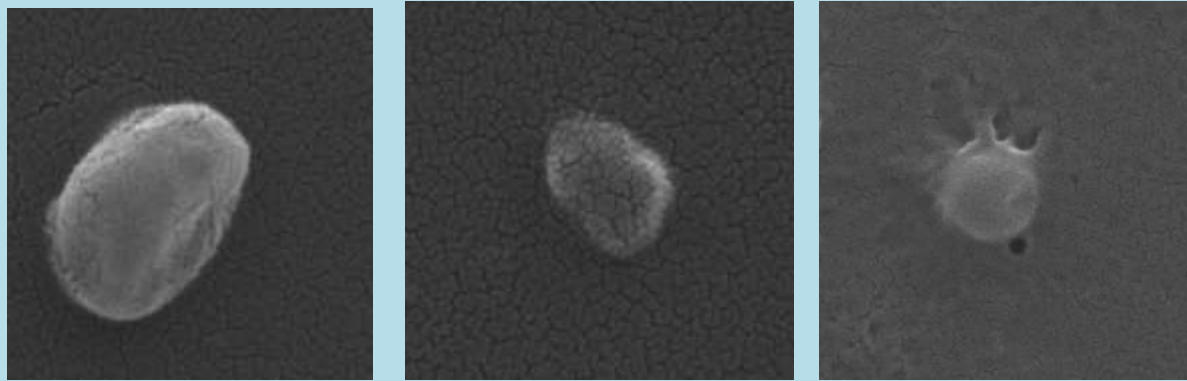


(a)

(b)

(c)

Gambar 5.15 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 25 kHz, pada gambar (a) sel MRSA mengalami kerusakan secara kimia (b) ada ledakan akibat kavitasi di dalam sel MRSA dan kerusakan dinding sel akibat reaksi kimia (c) terdapat kerusakan sel akibat kavitasi intraselular.

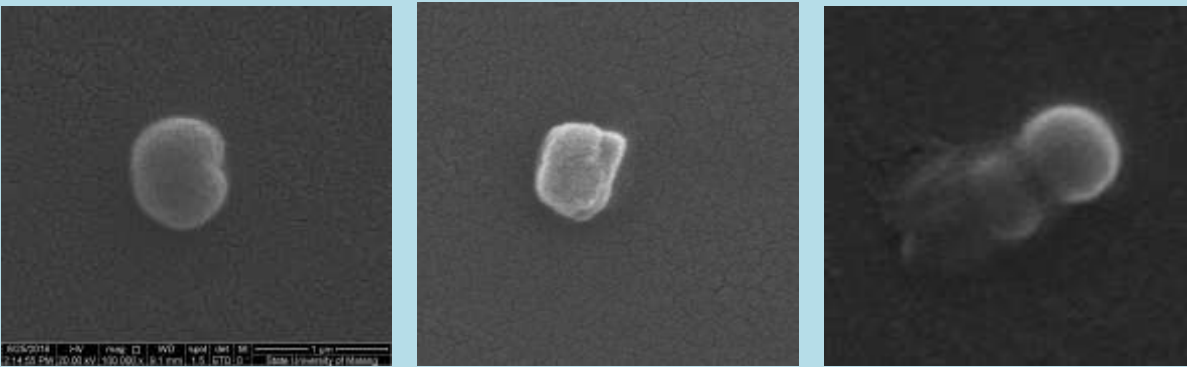


(a)

(b)

(c)

Gambar 5.16 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz (a) dan (b) mengalami stres mekanik berupa regangan dan pengkerutan (c) terjadi tekanan dari dalam sel akibat kavitasitas intraselular dan efek kimia

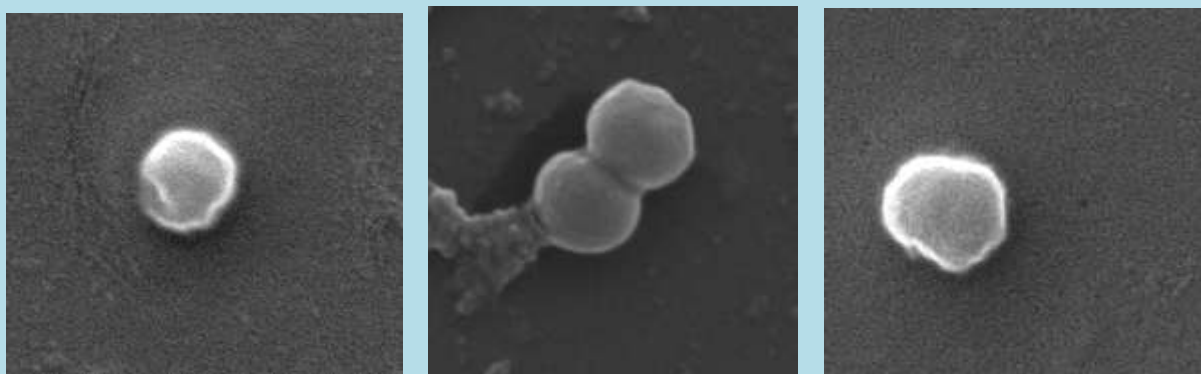


(a)

(b)

(c)

Gambar 5.17 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 27 kHz, (a) dan (b) terjadi perubahan bentuk akibat stres mekanik, (c) terjadi kerusakan dinding sel akibat efek kimia

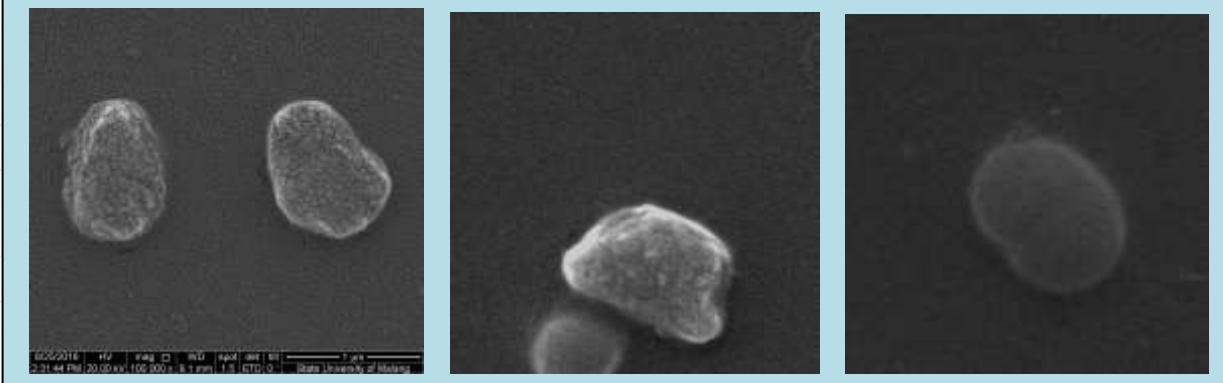


(a)

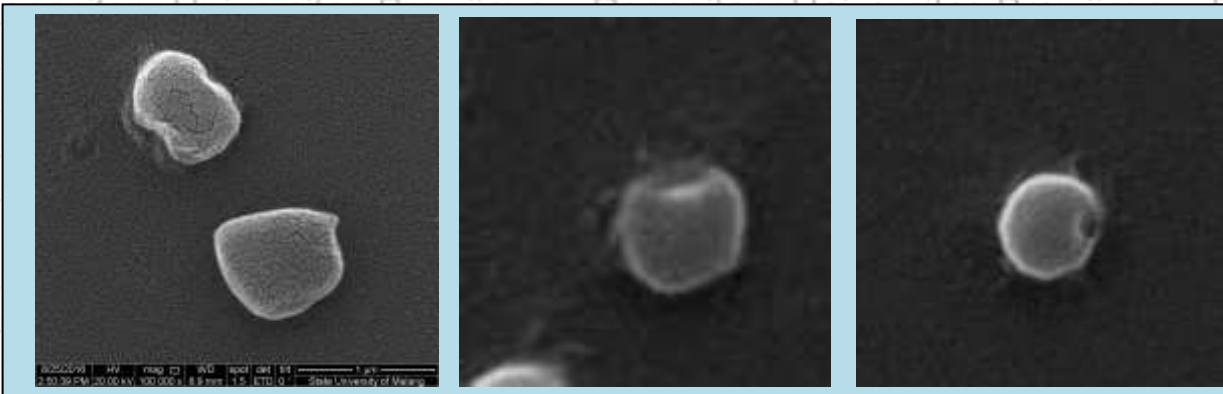
(b)

(b)

Gambar 5.18 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 28 kHz, (a) dan (b) sel sobek akibat stres mekanik, (b) dinding sel mengalami kebocoran akibat kerusakan dinding sel akibat kavitasitas intraselular.



(a) (b) (c)
Gambar 5.19 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 29 kHz, sel mengalami peregangan sehingga sel menjadi bertambah besar dan terjadi keretakan pada dinding sel, sehingga sel tidak dapat kembali kekeadaan semula



(a) (b) (c)
Gambar 5.20 Sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 30 kHz, (a) sel MRSA mengalami perubahan bentuk dan retak di permukaan dinding sel, (b) dan (c) sel mengalami sobek akibat stres mekanik atau kavitasi ekstraselular.

perubahan bentuk sel MRSA

Hasil pengamatan menggunakan SEM terhadap perubahan bentuk dari bulat menjadi tidak bulat sel MRSA disajikan dalam Tabel 5.8

Tabel 5.8 Pengaruh frekuensi terhadap perubahan bentuk sel *MRSA*

No.	Frekuensi (kHz)	Perubahan bentuk sel <i>MRSA</i> (%)
1.	0 (kontrol)	3,57
2.	21	5,77
3.	22	5,00
4.	23	9,52
5.	24	18,18
6.	25	20,83
7.	26	26,09
8.	27	23,08
9.	28	14,29
10.	29	10,00
11.	30	7,41

Pada Tabel 5.8 terlihat bahwa perubahan bentuk terbesar terjadi pada frekuensi 26 kHz sebesar 26,09%. Indikator ini mendukung persen kematian *MRSA* terbesar yang ditimbulkan oleh frekuensi paparan gelombang ultrasonik juga terjadi pada frekuensi 26 kHz. perubahan bentuk ini disebabkan oleh stres mekanik, kavitasi, efek kimia dan gabungan diantara ketiganya, sedangkan ciri-ciri perubahan bentuknya dinyatakan pada Tabel L14.1 lampiran 14. Tabel 5.8 akan dianalisis menggunakan Uji : normalitas, homogenitas, Anova, dan regresi, serta akan ditampilkan dalam diagram batang dan persamaan regresinya.

a. Uji Normalitas

Analisis data Tabel 5.8, kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,955. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase *MRSA* yang berubah bentuk mengikuti distribusi normal.



b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	7	1,000

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata persentase MRSA yang berubah bentuk antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik.

Berikut adalah hasil Uji Anova yang telah diperoleh (tabel 5.9).

Tabel 5.9 Hasil analisis Anova dan regresi persen perubahan bentuk versus frekuensi

Regression Analysis: perubahan bentuk versus Frek, Frek^2

The regression equation is

$$\text{Persentase} = - 550 + 44.3 \text{ Frek} - 0.857 \text{ Frek}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-550.5	109.8	-5.02	0.002
Frek	44.263	8.685	5.10	0.001
Frek^2	-0.8568	0.1701	-5.04	0.002

S = 3.90836 R-Sq = 79.5% R-Sq(adj) = 73.6%

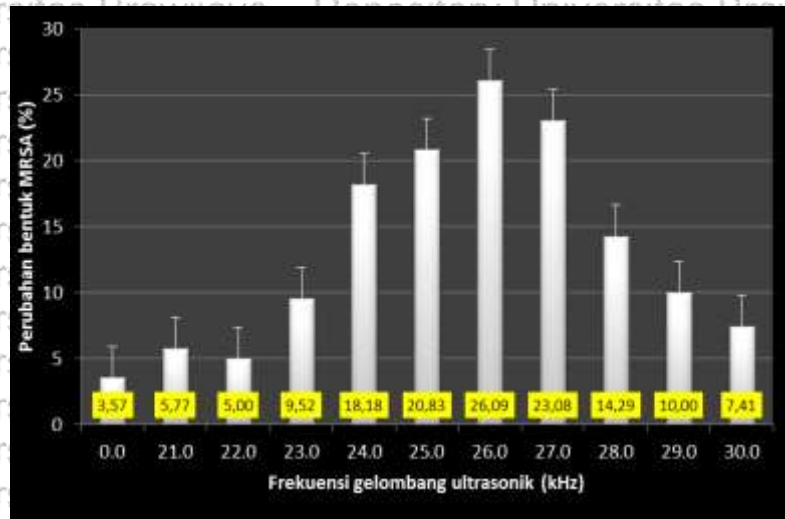
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	414.12	207.06	13.56	0.004
Residual Error	7	106.93	15.28		
Total	9	521.05			

Berdasarkan Tabel 5.9 dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,004. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan perubahan bentuk MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik. Dengan kata lain, perlakuan paparan gelombang ultrasonik tidak berpengaruh signifikan terhadap perubahan bentuk MRSA. Berikut ini adalah tampilan diagram batang dan persamaan regresi pengaruh frekuensi terhadap perubahan bentuk MRSA.

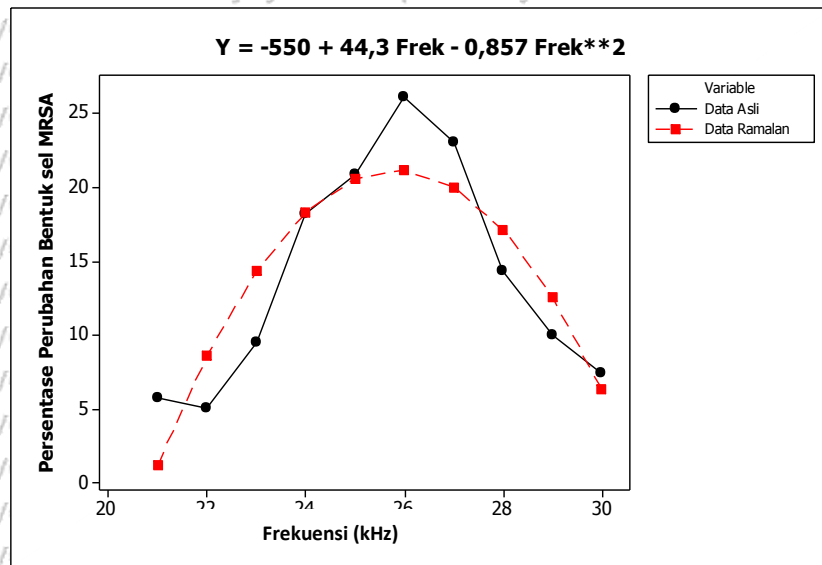


- Diagram batang



Gambar 5.21 Diagram batang pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap perubahan bentuk sel MRSA. perubahan bentuk terbesar terjadi pada frekuensi 26 kHz sebesar 26,09%

Berdasarkan data yang diperoleh, pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap perubahan bentuk sel MRSA digambarkan sebagai grafik berikut:



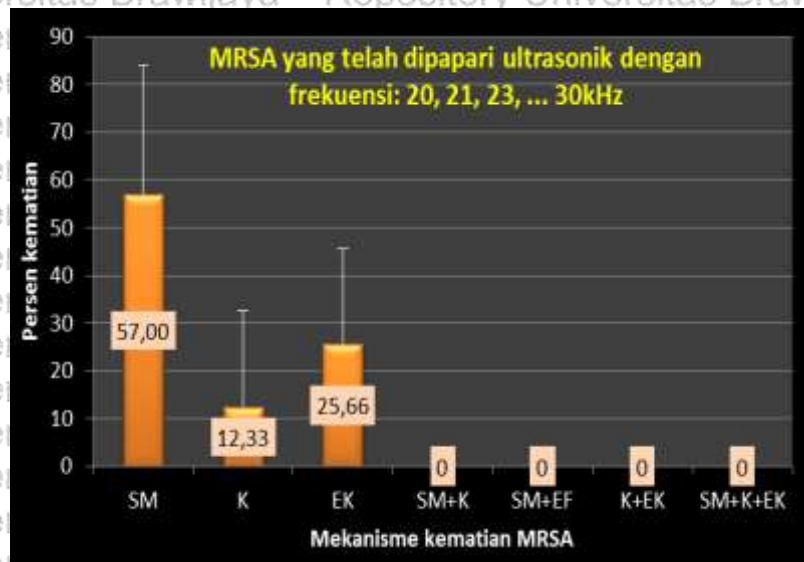
Gambar 5.22 grafik Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap perubahan bentuk MRSA



Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok gelombang ultrasonik sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok gelombang ultrasonik. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 79,5% yang berarti bahwa 79,5 % variasi persentase MRSA yang berubah bentuk (B) dipengaruhi oleh kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik sementara 20,5 % lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak dimasukkan dalam model regresi. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$B(f) = -550 + 44,3f - 0,857f^2$$

Perubahan bentuk yang terjadi disebabkan oleh paparan gelombang ultrasonik dinyatakan dalam tabel L14.1 lampiran 14, dan disajikan dalam diagram batang Gambar 5.23 di bawah ini.



Gambar 5.23 Mekanisme kematian MRSA terbesar akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi beragam adalah $(57,00 \pm 26,92)\%$ terjadi akibat stres mekanik

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Jika sel MRSA berada di dalam medan gelombang ultrasonik maka akan mengalami perubahan bentuk akibat pola rambatannya yang berbentuk rapatan dan renggangan sehingga bentuknya mengalami perubahan seperti tampak pada gambar 5.6 sampai gambar 5.16. Akibat perubahan bentuk tersebut menyebabkan ukuran selnya juga mengalami perubahan. Berikut ini adalah tabel hasil pengamatan perubahan ukuran (diameter maksimum) sel MRSA.

Tabel 5.10 Diameter maksimum sel MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan beragam frekuensi

Diameter maksimum MRSA (nm)											
No.	0 kHz kontrol	21 kHz	22 kHz	23 kHz	24 kHz	25 kHz	26 kHz	27 kHz	28 kHz	29 kHz	30 kHz
1.	692,7	742,9	737,2	898,7	903,8	822,7	816,5	906,6	699,5	682,2	709,6
2.	746,6	833,4	759,9	832,8	749,2	617,5	690,8	630,4	718,8	690,8	600,7
3.	762,7	803,9	1020	675,4	1226	834,5	771,5	594,4	600,7	803,9	808,1
4.	766,6	672,8	651,6	999,0	680,3	746,4	744,7	742,9	700,0	809,7	719,7
5.	680,3	709,6	1007	604,6	1577	560,5	834,5	704,2	699,5	792,7	677,8

Sebelum dianalisis menggunakan uji Anova Tabel 5.11 akan dilakukan uji: normalitas dan homogenitas.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$).



Tabel hasil uji normalitas

Frekuensi (kHz)	Shapiro – Wilk Statistic	Sig.	Keterangan
Kontrol	0,842	0,172	Data berdistribusi normal
21 kHz	0,960	0,807	Data berdistribusi normal
22 kHz	0,853	0,204	Data berdistribusi normal
23 kHz	0,959	0,804	Data berdistribusi normal
24 kHz	0,912	0,477	Data berdistribusi normal
25 kHz	0,891	0,361	Data berdistribusi normal
26 kHz	0,963	0,827	Data berdistribusi normal
27 kHz	0,928	0,586	Data berdistribusi normal
29 kHz	0,774	0,149	Data berdistribusi normal
30 kHz	0,974	0,902	Data berdistribusi normal

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa semua kelompok data berdistribusi normal. Hal ini karena nilai Sig. pada semua kelompok data lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Nilai Sig. Sehingga disimpulkan bahwa data terdistribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	7	1,000



Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata diameter maksimum sel MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 5.11 Hasil uji Anova perbedaan diameter maksimum MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan beragam frekuensi

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	21988	10994	1.13	0.375
Residual Error	7	68078	9725		
Total	9	90066			

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai *P-value.* yang dihasilkan adalah sebesar 0,375. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata diameter maksimum MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik. Dengan kata lain, perlakuan paparan gelombang ultrasonik tidak berpengaruh signifikan terhadap diameter maksimum MRSA. Selanjutnya akan ditampilkan



diagram batang dan persamaan regresi antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan diameter maksimum MRSA

Tabel 5.12 Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap diameter maksimum MRSA

No.	Frekuensi (kHz)	Rerata diameter maksimum MRSA \pm SD (nm)
1.	0 (kontrol)	729,78 \pm 40,45
2.	21	752,52 \pm 66,09
3.	22	835,14 \pm 167,82
4.	23	802,10 \pm 161,33
5.	24	1027,26 \pm 372,38
6.	25	716,32 \pm 122,71
7.	26	771,60 \pm 57,49
8.	27	715,70 \pm 121,76
9.	28	683,70 \pm 47,14
10.	29	755,86 \pm 63,68
11.	30	703,18 \pm 74,95

Sebaran data pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap rata-rata diameter maksimum MRSA akan diuji : normalitas, homogenitas, Anova serta akan ditampilkan dalam bentuk diagram batang dan grafik.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,783. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter maksimum MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data



homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	7	1,000

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol, yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata diameter maksimum sel MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 5.13 Hasil uji Anova dan regresi antara diameter maksimum MRSA versus frekuensi

Regression Analysis: Diameter versus Frekuensi, Frek^2

The regression equation is
 Persentase = - 666 + 130 Frekuensi - 2.84 Frek^2

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-666	2738	-0.24	0.815
Frekuensi	129.9	216.7	0.60	0.568
Frek^2	-2.842	4.243	-0.67	0.525

S = 97.5033 R-Sq = 25.5% R-Sq(adj) = 4.2%

Analysis of Variance

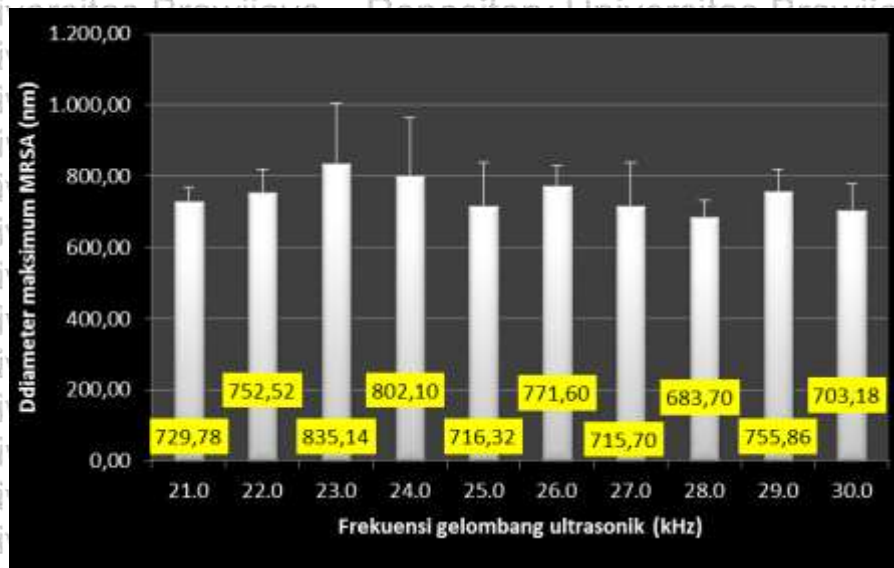
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	22757	11379	1.20	0.357
Residual Error	7	66548	9507		
Total	9	89305			

dihasilkan adalah sebesar 0,357. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata diameter maksimum MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik.

Dengan kata lain, perlakuan paparan gelombang ultrasonik tidak berpengaruh signifikan terhadap diameter maksimum MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data diameter maksimum MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik yang digunakan dengan data ramalannya maka ditampilkan diagram batang dan grafik berikut.

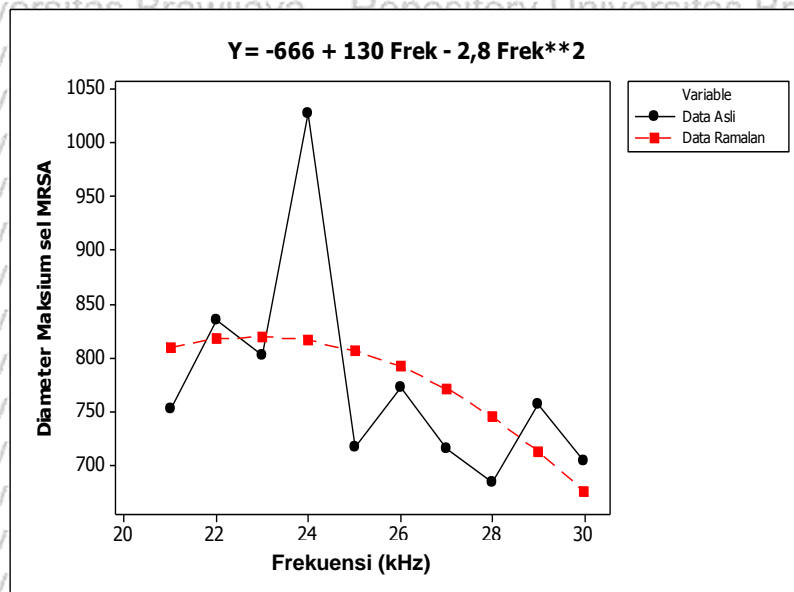


Diagram batang



Gambar 5.24 Diagram batang antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan rerata diameter maksimum MRSA yang besarnya tidak beraturan.

Grafik persamaan regresi



Gambar 5.25 Grafik pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap rerata diameter maksimum MRSA

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok gelombang ultrasonik sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok gelombang

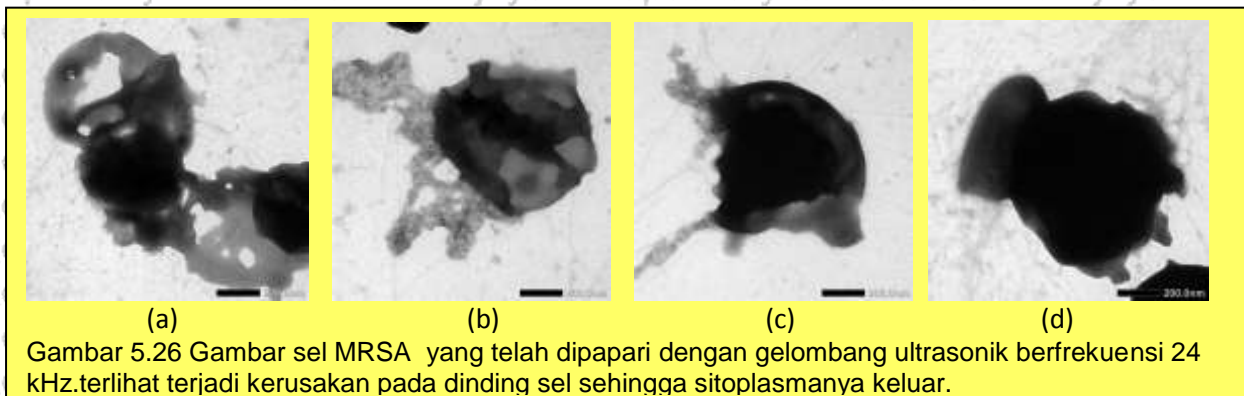


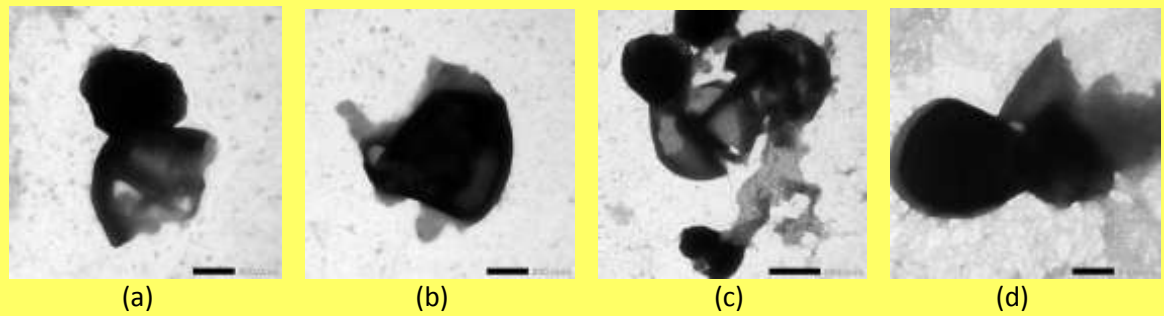
ultrasonik. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 25,5% yang berarti bahwa 25,5% variasi diameter maksimum sel MRSA (D_m) dipengaruhi oleh kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik sementara 74,5 % lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak dimasukkan dalam model regresi. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$D_m(f) = -666 + 130f - 2,8f^2$$

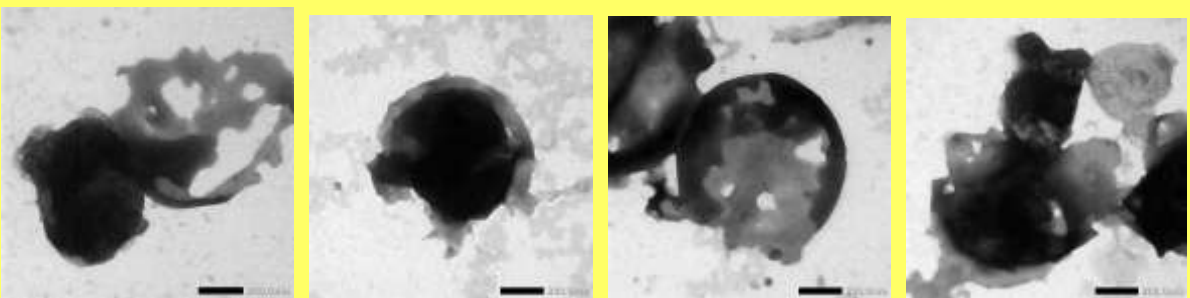
3. Perubahan struktur sel MRSA

Salah satu indikator kematian sel MRSA adalah perubahan struktur MRSA, perubahan struktur ini dapat diamati dengan menggunakan Transmmission Electron Mikroskope (TEM). Foto TEM dilakukan di Departemen Kimia FMIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Berikut hasil TEM sel MRSA yang diamati dengan perbesaran 20.000 x, skala 200 nm

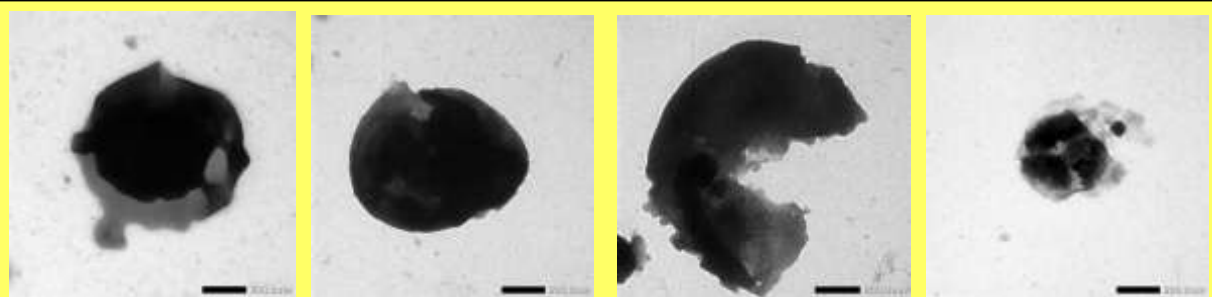




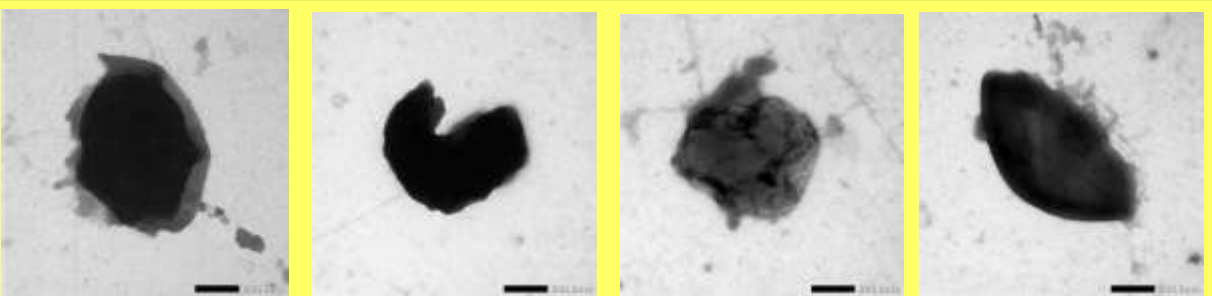
Gambar 5.27 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 25 kHz, tampak sel kehilangan bentuk (a), (b), dan (d) akibat efek kimia. Sedangkan (c) sebagian dinding sel terlempar akibat kavitasi intrasellular.



Gambar 5.28 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz, sel mengalami perubahan bentuk dan struktur akibat efek kimia.



Gambar 5.29 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 27 kHz, sel robek akibat stres mekanik (b), sel mengalami kerusakan parah akibat kavitasi intrasellular.



Gambar 5.30 Gambar sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 28 kHz, sel mengalami efek kimia (a) dan kavitasi yang menyebabkan bagian sel terpisah dari yang lain..



Berikut ini adalah gambar pewarnaan gram untuk mengetahui persen kematian sel MRSA akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan beragam frekuensi. MRSA yang masih hidup berwarna ungu dan yang telah mati berwarna merah muda (pink). MRSA diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dan diamati dengan menggunakan monitor 30 inchi, dan hasilnya berda di lampiran 20. Pada Tabel 5.14 ini adalah data hasil pengamatan dari pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen MRSA pink.

Tabel 5.14 Pengaruh frekuensi paparan terhadap kematian MRSA melalui perubahan pewarnaan sel MRSA

No.	Frekuensi (kHz)	MRSA pink (%)
1.	0 (kontrol)	0
2.	21	7,35
3.	22	4,76
4.	23	10,53
5.	24	12,50
6.	25	19,12
7.	26	25,00
8.	27	23,53
9.	28	13,79
10.	29	9,09
11.	30	8,57

Tabel 5.15 ini akan dilakukan uji : normalitas, homogenitas, Anova, dan regresi dan selanjutnya akan ditampilkan sebagai diagram batang dan persamaan regresinya.



a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,638. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase kematian MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan ANOVA harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	7	1,000

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata persentase kematian sel

MRSA antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 5.15 Hasil analisis uji Anova dan regresi antara persentase MRSA pink versus frekuensi

Regression Analysis: Persentase MRSA pink vs Frekuensi, Frek^2

The regression equation is
 MRSA Pink = - 453 + 36.5 Frekuensi - 0.703 Frek^2

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-453.0	126.8	-3.57	0.009
Frekuensi	36.45	10.04	3.63	0.008
Frek^2	-0.7033	0.1966	-3.58	0.009

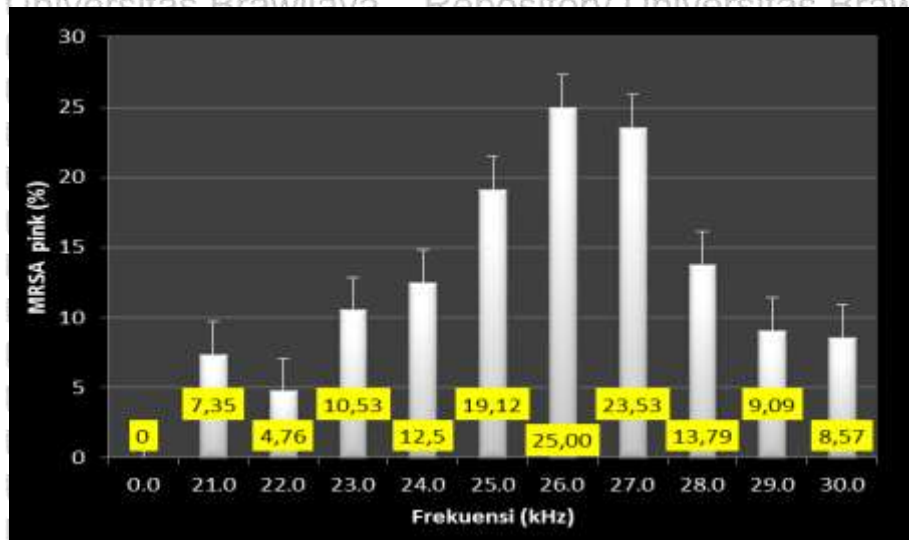
S = 4.51711 R-Sq = 67.0% R-Sq(adj) = 57.5%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	289.42	144.71	7.09	0.021
Residual Error	7	142.83	20.40		

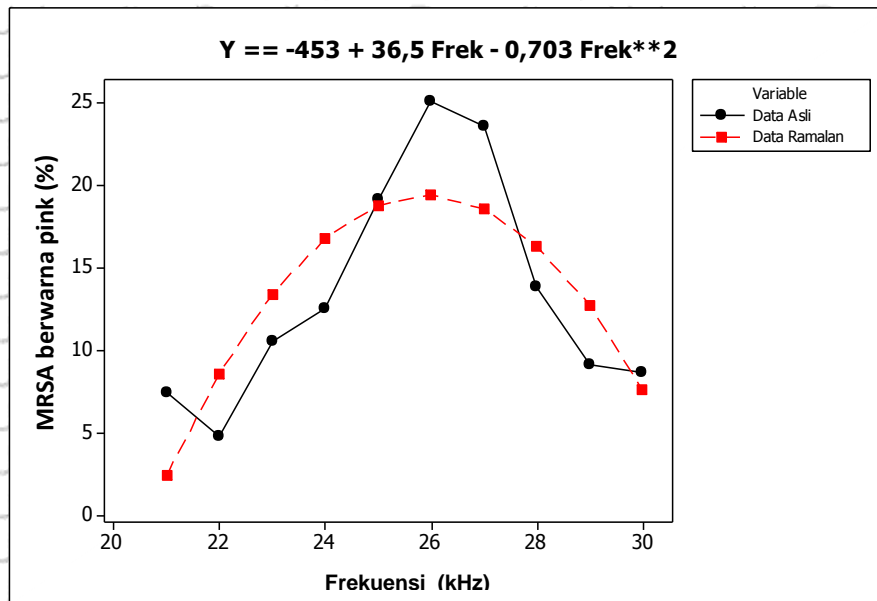
Berdasarkan Tabel 5.15 dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,021. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan rata-rata persentase MRSA yang mati antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik. Dengan kata lain, perlakuan paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persentase kematian MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data persentase MRSA Pink (mati) antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik yang digunakan dengan data ramalannya maka ditampilkan pada diagram batang dan grafik berikut.

Diagram batang



Gambar 5.31 Diagram batang antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan prosentase MRSA berwarna pink terbesar terjadi pada frekuensi 26 kHz.

Persamaan garis regresi



Gambar 5.32 Grafik regresi pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan perubahan warna sel MRSA menjadi berwarna pink, berbentuk parabolik dengan perubahan warna terbesar pada frekuensi 26 kHz.

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok gelombang ultrasonik sementara garis hitam adalah

garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok gelombang ultrasonik. Nilai R^2 yang dihasilkan adalah 67% yang berarti bahwa 67% variasi persentase kematian sel MRSA yang berwarna pink (M_p) dipengaruhi oleh kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik sementara 33 % lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak dimasukkan dalam model regresi. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$M_p(f) = -453 + 36,5 f - 0,703 f^2$$

5.7.2 Analisis Pengaruh Daya Paparan Gelombang Ultrasonik Terhadap Populasi MRSA Yang teramati dan OD Suspensi MRSA

Untuk percobaan selanjutnya suspensi MRSA akan dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi efektif 26 kHz, waktu konstan 2 menit, serta daya paparan 2 watt, 3 watt, ... 6 watt. Hasil pengamatannya ditampilkan pada tabel 5.16

Tabel. 5.16 Pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap jumlah koloni MRSA dan OD

No.	Daya (watt)	Jumlah koloni MRSA (...) $\times 5.10^5$ CFU/ml					Jumlah koloni MRSA perlakuan (...) $\times 5.10^5$ CFU/ml					OD
		N_1	N_2	N_3	N_4	N_5	N_1	N_2	N_3	N_4	N_5	
1.	2	123	122	137	119	135	107	101	104	111	98	0,014
2.	3	129	170	153	130	141	85	109	107	84	80	0,017
3.	4	161	166	175	170	183	75	96	75	99	102	0,019
4.	5	211	313	233	220	214	67	112	108	88	99	0,025
5.	6	181	195	198	193	208	62	59	45	61	59	0,037

Dari data tabel 5.16 akan diolah menjadi data Tabel 5.17 dan akan diuji dengan : Uji normalitas, uji homogenitas, dan uji anova



a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.*

lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Dari hasil pengolahan data diperoleh:

Tabel hasil uji normalitas

Daya (watt)	Shapiro – Wilk Statistic	<i>Sig.</i>	Keterangan
Kontrol	0,939	0,658	Data berdistribusi normal
2	0,990	0,980	Data berdistribusi normal
3	0,805	0,088	Data berdistribusi normal
4	0,795	0,073	Data berdistribusi normal
5	0,923	0,552	Data berdistribusi normal
6	0,838	0,160	Data berdistribusi normal

Dari tabel di atas terlihat bahwa *sig.* Lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Ini berarti bahwa data terdistribusi normal. Untuk selanjutnya data akan diuji homogenitasnya

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	<i>Sig.</i>
2	2	1,000

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga



diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata jumlah koloni MRSA yang teramati antar kelompok daya paparan gelombang ultrasonik. Untuk menguji apakah daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA, maka digunakan uji hipotesis sebagai berikut :

H_0 : Daya paparan gelombang ultrasonik tidak berpengaruh terhadap persen kematian MRSA

H_1 : Daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap persen kematian MRSA

Kriteria penolakan H_0 adalah jika nilai P-value $< \alpha$.

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1411.6	1411.6	1679.05	0.000
Residual Error	3	2.5	0.8		
Total	4	1414.1			

Berdasarkan hasil output MINITAB di atas, diperoleh nilai P-value untuk daya adalah 0.000. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value $< \alpha$, sehingga tolak H_0 . Artinya, daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap jumlah koloni MRSA. Untuk mengetahui pengaruh daya terhadap persen kematian akan dilanjutkan uji regresi. Untuk selanjutnya analisis data diarahkan untuk mengetahui pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA.



5.7.2.1 Analisis pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA

Hasil analisis data Tabel 5.16 yang menghubungkan pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian, hasilnya disajikan pada Tabel 5.17

Tabel 5.17 Hasil perhitungan pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA

No.	Daya (watt)	Jumlah koloni MRSA kontrol (....) x 5.10 ⁵ CFU/ml	Jumlah koloni MRSA perlakuan (....) x 5.10 ⁵ CFU/ml	Kematian MRSA (%)
1.	2	127,2 ± 8,2	104,0 ± 5,1	22,96
2.	3	144,6 ± 17,2	93,0 ± 13,8	35,69
3.	4	171,0 ± 8,5	89,4 ± 13,3	47,72
4.	5	238,2 ± 42,7	94,8 ± 18,1	60,20
5.	6	178,0 ± 9,7	53,2 ± 6,9	70,10

Data dari Tabel 5.17 akan diuji dengan menggunakan uji: normalitas, homogenitas, Anova, dan regresi.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,940. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase kematian MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak, maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis



alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	2	1,000

Berdasarkan tabel uji homogenitas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Uji ini digunakan untuk mengetahui pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA. Hasil analisisnya dinyatakan dengan tabel berikut

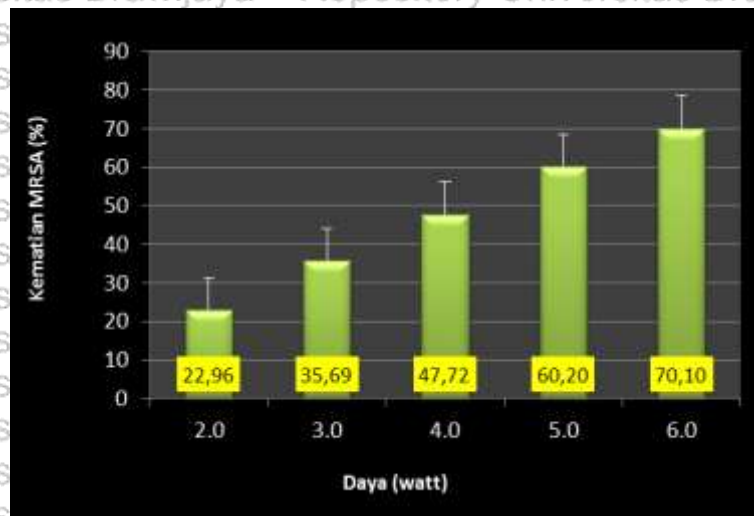
Tabel 5.18 Hasil uji Anova dan regresi antara daya versus persen kematian MRSA

Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1411.6	1411.6	1679.05	0.000
Residual Error	3	2.5	0.8		
Total	4	1414.1			
Predictor	Coef	SE Coef	T	P	
Constant	-0.188	1.230	-0.15	0.888	
Daya	11.8810	0.2899	40.98	0.000	



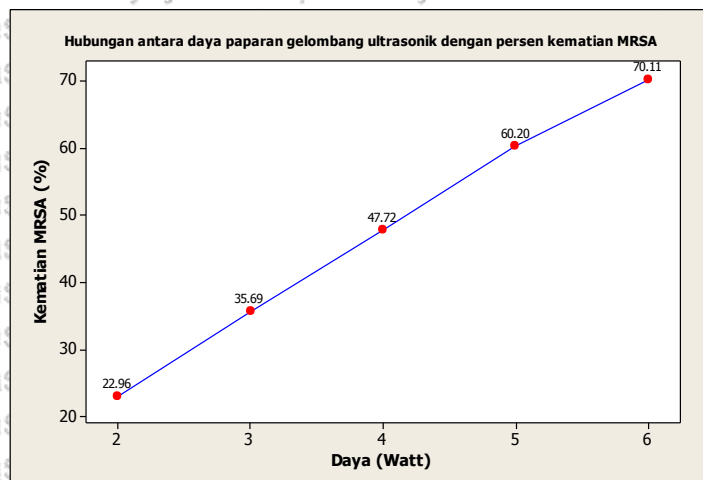
Berdasarkan hasil output MINITAB di atas, diperoleh nilai P-value untuk daya adalah 0.000. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value $< \alpha$, sehingga tolak H_0 . Artinya, daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA. Untuk mengetahui pengaruh daya terhadap persen kematian akan dilanjutkan menampilkan diagram batang dan grafik persamaan regresinya.

- Diagram batang



Gambar 5.33 Diagram batang pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA

- Grafik persamaan regresi



Gambar 5.34 Persamaan regresi antara daya dengan persen kematian MRSA



Pada grafik di atas menunjukkan bahwa daya paparan gelombang ultrasonik memiliki hubungan linier positif dengan persen kematian MRSA.

Artinya, semakin besar daya paparan gelombang ultrasonik maka semakin besar pula persen kematian MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh daya terhadap persen kematian MRSA digunakan analisis regresi linier menggunakan software MINITAB dan diperoleh output sebagai berikut :

Tabel 5.19 Hasil uji regresi antara daya paparan gelombang ultrasonik dengan persen kematian MRSA

Regression Analysis: kematian MRSA versus Daya					
The regression equation is					
MRSA = - 0.188 + 11.90 Daya					
Predictor	Coef	SE Coef	T	P	
Constant	-0.188	1.230	-0.15	0.888	
Daya	11.8810	0.2899	40.98	0.000	
S = 0.916899 R-Sq = 99.8% R-Sq(adj) = 99.8%					
Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1411.6	1411.6	1679.05	0.000
Residual Error	3	2.5	0.8		
Total	4	1414.1			

Untuk menguji apakah daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA, maka digunakan uji hipotesis sebagai berikut :

H_0 : Daya paparan gelombang ultrasonik tidak berpengaruh terhadap persen kematian MRSA

H_1 : Daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap persen kematian MRSA

Kriteria penolakan H_0 adalah jika nilai P-value < α .



Berdasarkan hasil output MINITAB di atas, diperoleh nilai P-value untuk daya adalah 0.000. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value $< \alpha$, sehingga tolak H_0 . Artinya, daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA. Persamaan model regresi linier yang menyatakan hubungan antara daya paparan gelombang ultrasonik (P) dan persen kematian MRSA (K) adalah:

$$K = -0,188 + 11,881 P$$

dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 99,8%. Artinya, apabila daya paparan gelombang ultrasonik meningkat sebesar 1 watt, maka persen kematian MRSA yang dihasilkannya rata-rata akan meningkat pula sebesar 11,881%. Dari persamaan tersebut diatas kematian MRSA sebesar 100% secara teoritis terjadi pada daya sebesar 8,432 watt, jadi dengan demikian daya lethal untuk membunuh semua MRSA adalah 8,432 watt.

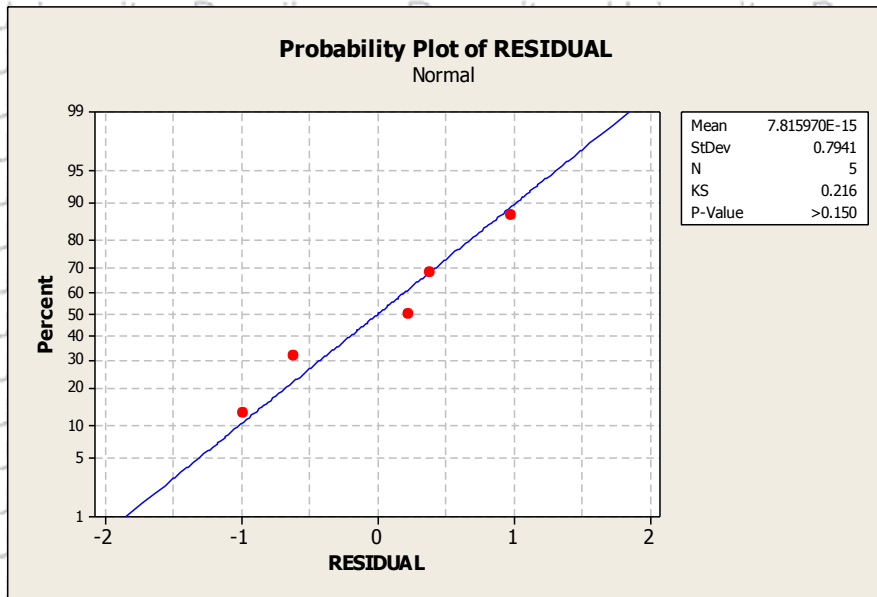
Dalam analisis regresi, ada asumsi bahwa distribusi residual model mengikuti distribusi Normal. Oleh karena itu dilakukan pemeriksaan kenormalan distribusi residual model yang telah dibuat dengan hipotesis sebagai berikut :

H_0 : Residual berdistribusi Normal

H_1 : Residual tidak berdistribusi Normal

Kriteria penolakan H_0 adalah jika nilai P-value $< \alpha$.

Uji Normalitas residual menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov pada software MINITAB diperoleh output sebagai berikut :



Gambar 5.35 Uji asumsi kenormalan residual

Berdasarkan output pada Gambar 5.35, dapat dilihat bahwa nilai P-value > 0.15. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value > α , sehingga terima H_0 . Artinya, Residual model yang dibuat telah mengikuti distribusi Normal. Jadi, sehingga model regresi linier yang telah dibuat bisa digunakan.

5.7.2.2 Analisis pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap OD suspensi MRSA

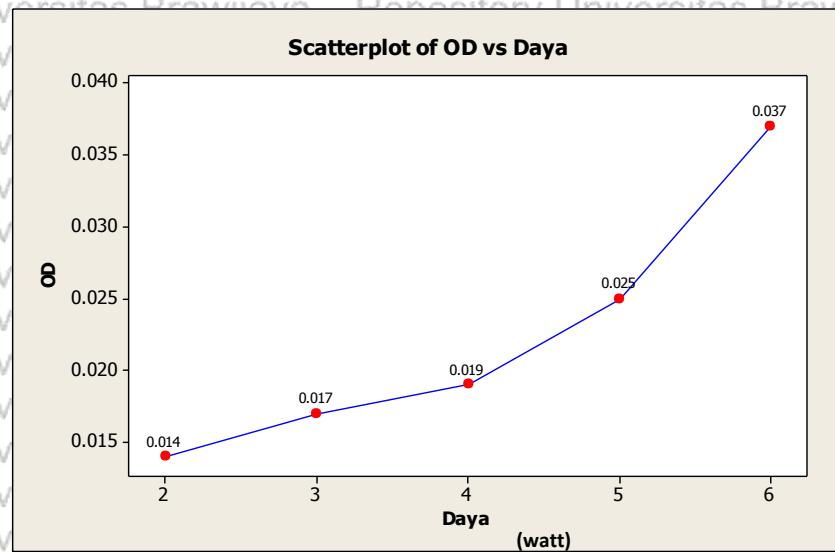
Dari hasil percobaan yang dinyatakan pada tabel 5.17 pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA dinyatakan pada Tabel 5.20

Tabel 5.20 pengaruh daya ultrasonik terhadap OD

No.	Daya (watt)	OD _{600 nm}
1.	2	0,014
2.	3	0,017
3.	4	0,019
4.	5	0,025
5.	6	0,037

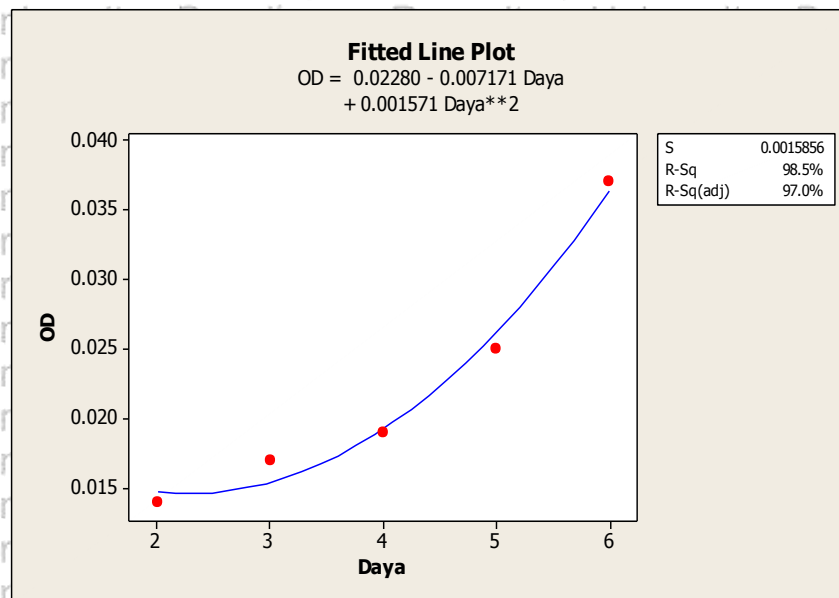


Berdasarkan data yang diperoleh, hubungan antara daya paparan gelombang ultrasonik dengan OD digambarkan sebagai berikut :



Gambar 5.36 Sebaran data antara daya paparan gelombang ultrasonik dengan OD suspensi MRSA

- Grafik persamaan regresi



Gambar 5.37 Grafik regresi antara dengan daya dengan OD

Dari gambar terlihat bahwa $R^2 = 98,5\%$ artinya bahwa daya paparan gelombang ultrasonik (P) berpengaruh sangat signifikan terhadap OD suspensi MRSA. Persamaan regresi nya adalah :

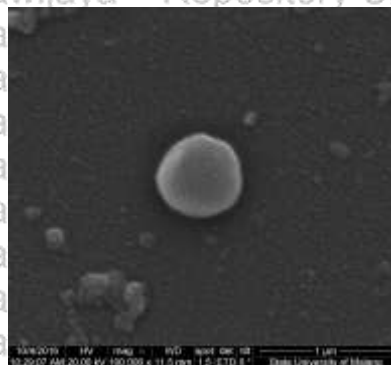
$$OD(P) = 0,0228 - 0,007171.P + 0,001571.P^2$$

5.7.2.3 Indikator kematian MRSA

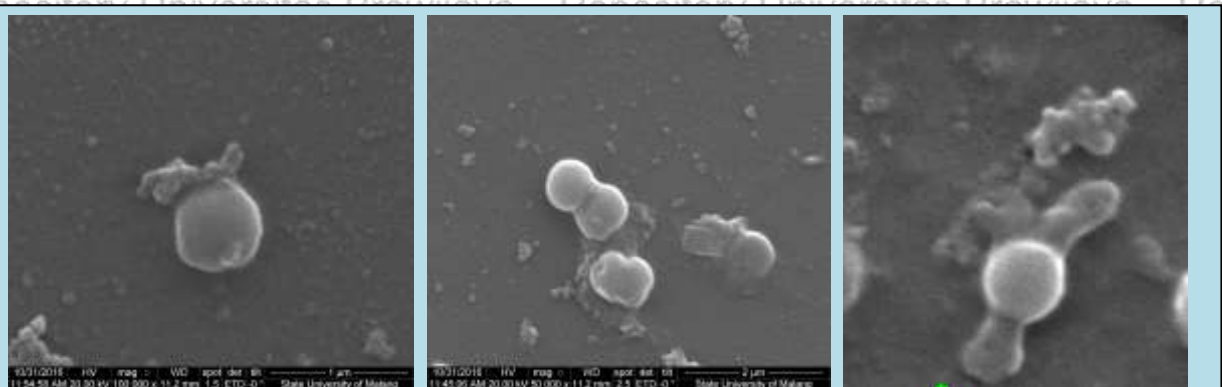
Indikator kematian MRSA adalah : Perubahan bentuk sel MRSA, ukuran sel MRSA struktur sel MRSA dan Pewarnaan sel MRSA.

1. Perubahan bentuk sel MRSA

Kerusakan sel MRSA disamping disebabkan oleh frekuensi paparan gelombang ultrasonik juga dapat terjadi akibat daya paparan gelombang ultrasonik. Daya gelombang ultrasonik ini berasal dari konversi energi listrik. frekuensi yang digunakan adalah frekuensi efektif yaitu 26 kHz, sedang dayanya beragam. Gambar berikut ini adalah kerusakan sel yang disebabkan oleh pemaparan gelombang ultrasonik berdaya 2, 3, 4, 5, 6, dan 8,4 watt dengan waktu paparan 2 menit, yang diamati dengan perbesaran 100.000 x, skala 1 μm



Gambar 5.38 Gambar sel MRSA kontrol

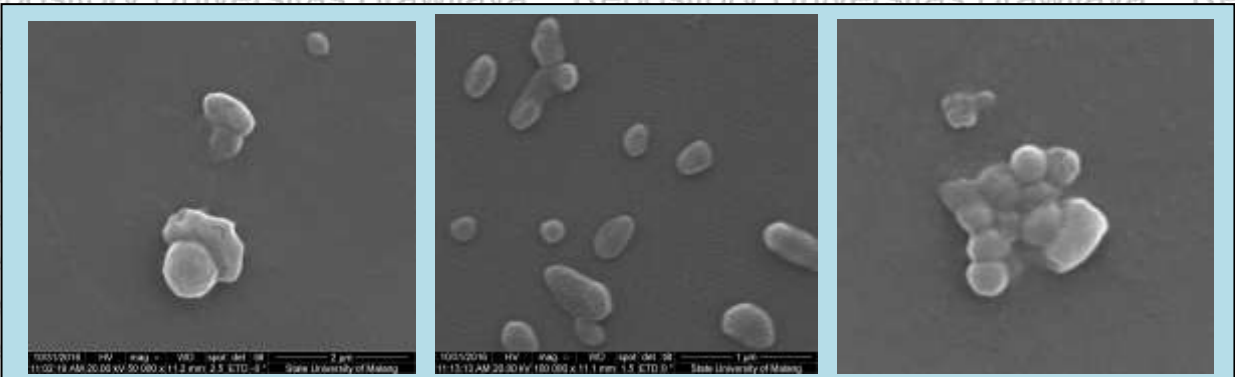


(a)

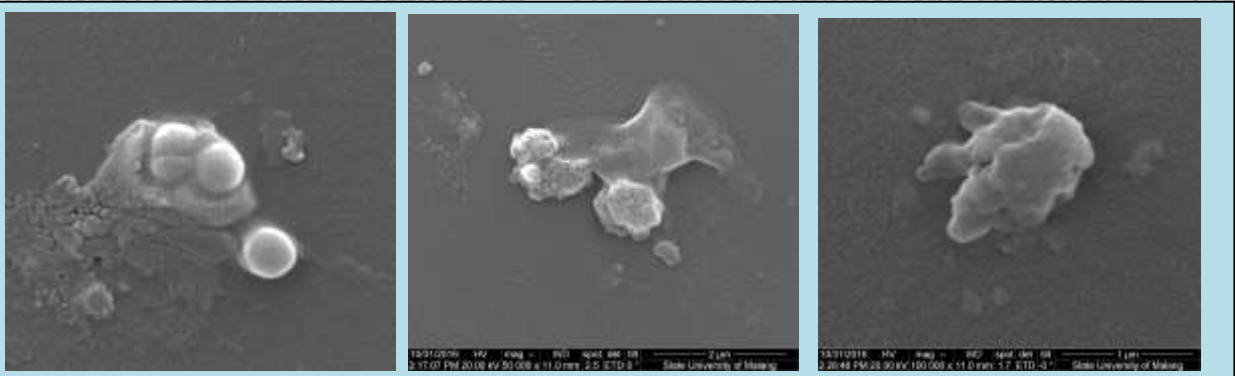
(b)

(c)

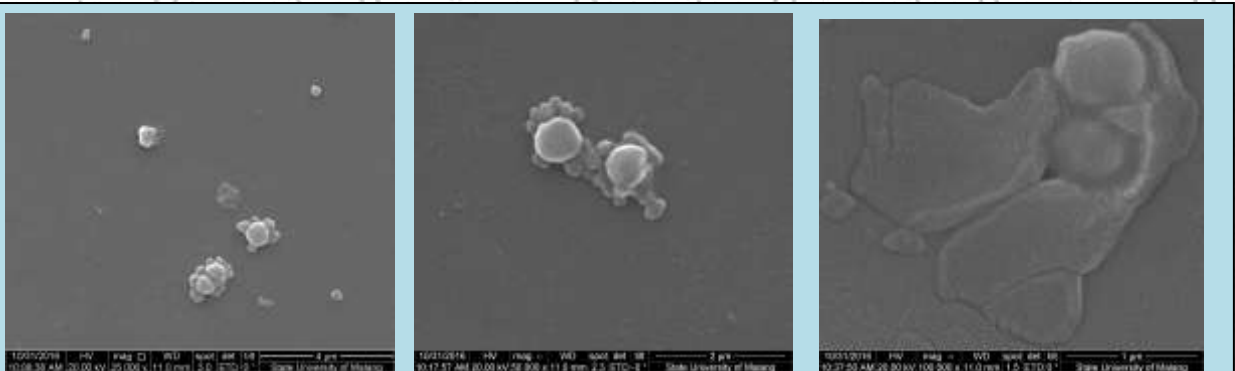
Gambar 5.39 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 2 watt. Kerusakan terjadi akibat kavitasi intrasellular gambar (a), dan efek kimia gambar (b) dan (c).



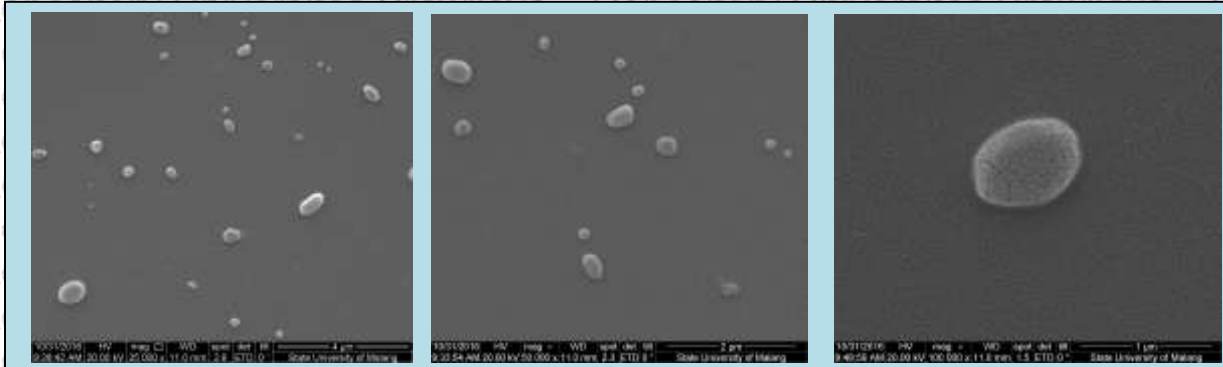
(a) (b) (c)
 Gambar 5.40 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 3 watt. Kerusakan sel terjadi secara kavitasi yang ditandai dengan kepingan-kepingan, sel gambar (b), efek kimia yang ditandai dengan sitoplasma yang keluar disekitar sel, gambar (a) dan (c)



(a) (b) (c)
 Gambar 5.41 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 4 watt. Kerusakan sel terjadi akibat efek kimia, gambar (a) dan (c), dan gabungan stres mekanik, kavitasi dan efek kimia, gambar (c)



(a) (b) (c)
 Gambar 5.42 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 5 watt. Kerusakan sel terjadi akibat efek kimia yang ditandai dengan keluarnya ditoplasma di sekitar sel dan bentuk sel tidak beraturan.

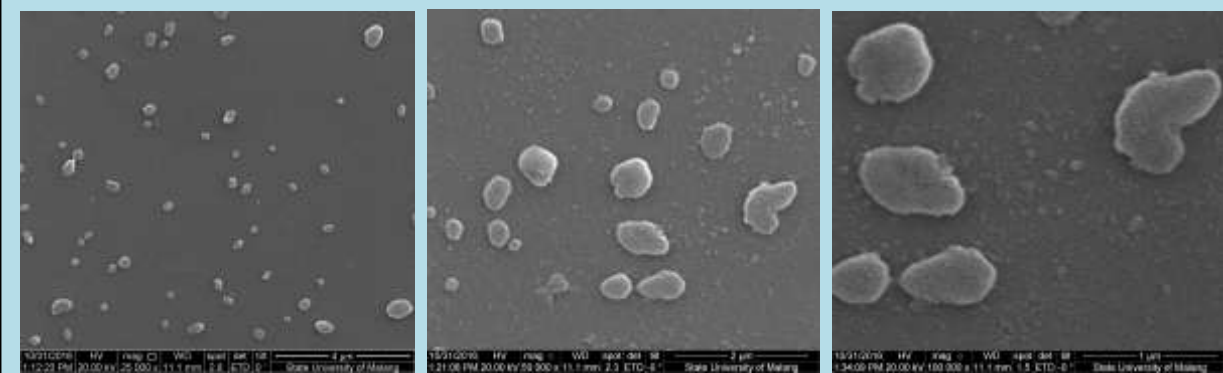


(a)

(b)

(c)

Gambar 5.43 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 6 watt. Kerusakan sel terjadi akibat stres mekanik, yang ditandai dengan retakan dinding sel, gambar (c), dan kavitasi gambar (a) dan (c).



(a)

(b)

(b)

Gambar 5.44 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya 8,4 watt. Kerusakan sel terjadi secara kavitasi, yang ditandai dengan keping-keping sel dengan ukuran beragam.

Analisis perubahan bentuk sel MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan daya beragam

Dari hasil pengamatan morfologi sel MRSA dengan menggunakan scanning electron microscope (SEM) di departemen Fisika FMIPA Universitas Negeri Malang diperoleh hasil yang tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.21 Perubahan bentuk MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan daya beragam

No.	Daya (watt)	MRSA yang berubah bentuk (%)
1.	0 (kontrol)	3,57
2.	2,0	38,46
3.	3,0	41,67
4.	4,0	53,33
5.	5,0	68,00
6.	6,0	83,93
7.	8,4	98,51

Tabel 5.21 akan dinyatakan dalam diagram batang dan selanjutnya akan dilakukan uji : normalitas, homogenitas, dan Anova, selanjutnya data tersebut akan ditampilkan dengan diagram batang dan grafik regresi

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,996. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase perubahan bentuk sel MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	3	1,000

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata persentase perubahan bentuk sel MRSA antar kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik.

Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 5.22 Hasil uji Anova dan regresi antara daya versus persentase perubahan bentuk

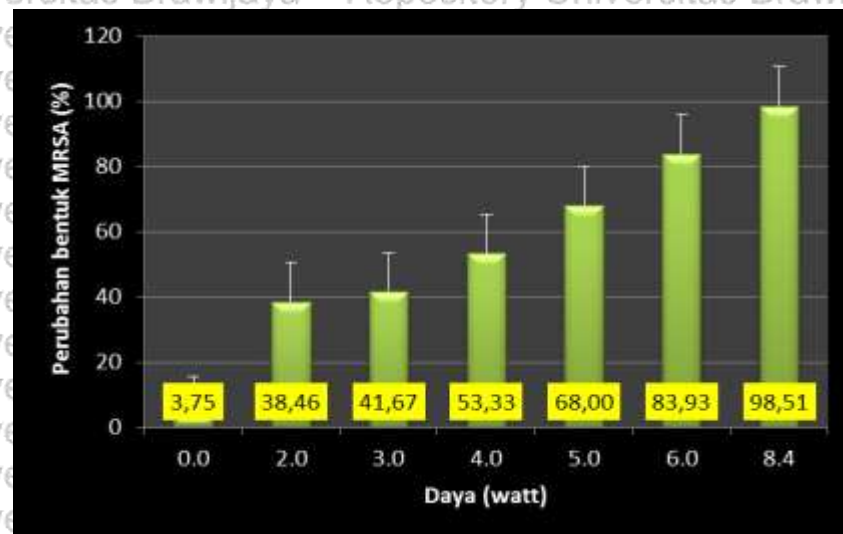
Regression Analysis: Perubahan bentuk versus daya, daya^2					
The regression equation is					
Persentase = 10.5 + 12.4 daya - 0.178 daya^2					
Predictor	Coef	SE Coef	T	P	
Constant	10.46	12.59	0.83	0.467	
Frekuensi	12.366	5.354	2.31	0.104	
Frek^2	-0.1779	0.5034	-0.35	0.747	
S = 5.28214		R-Sq = 97.2%		R-Sq(adj) = 95.3%	
Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2889.9	1445.0	51.79	0.005
Residual Error	3	83.7	27.9		
Total	5	2973.7			



Berdasarkan Tabel 5.22 di atas dapat diketahui bahwa nilai P -value.

yang dihasilkan adalah sebesar 0,005. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan rata-rata persentase perubahan bentuk MRSA antar kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Dengan kata lain, perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persentase perubahan bentuk MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data persentase perubahan bentuk MRSA antar kelompok daya perlakuan paparan gelombang ultrasonik yang digunakan dengan data ramalannya maka ditampilkan dalam diagram batang grafik berikut.

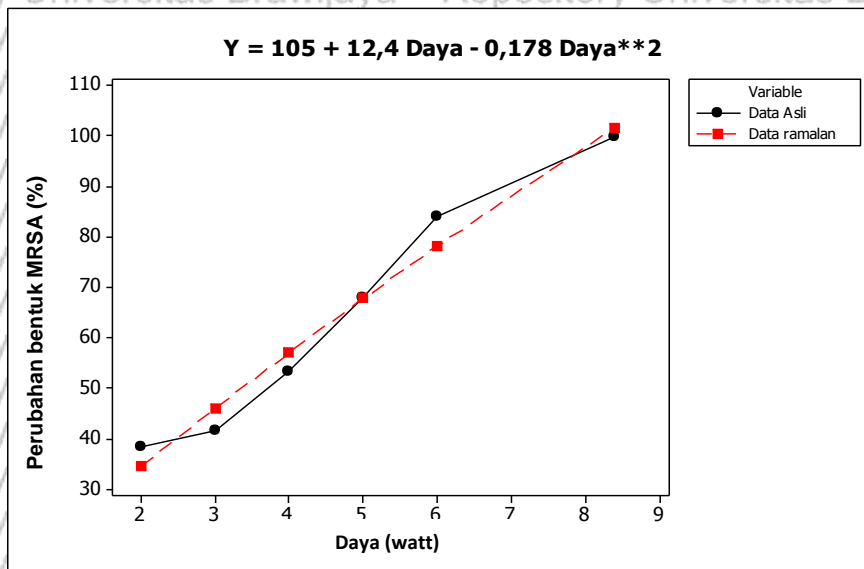
- Diagram batang



Gambar 5.45 Diagram batang antara daya gelombang ultrasonik dengan perubahan bentuk, semakin besar daya paparan gelombang ultrasonik semakin besar perubahan bentuk sel yang terjadi.



- Persamaan garis regresi

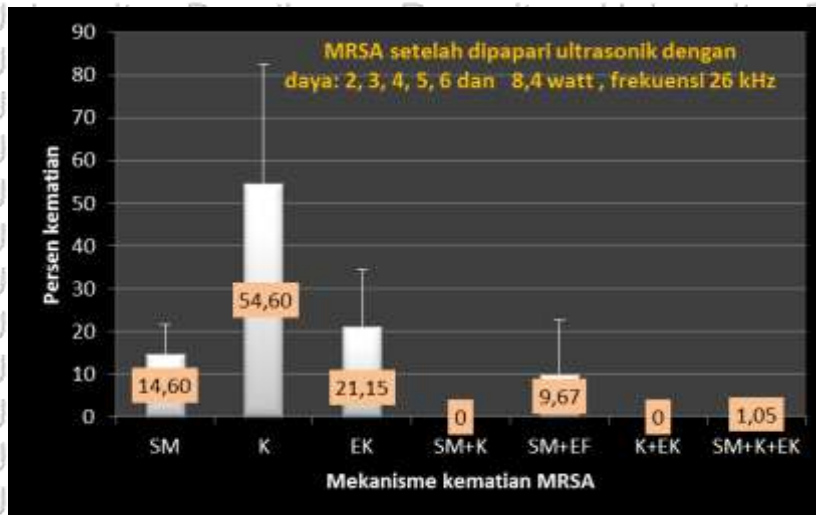


Gambar 5.46 grafik pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik dengan perubahan bentuk sel MRSA, pengaruhnya dinyatakan dengan persamaan $Y = 105 + 12,4P - 0,178P^2$

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok daya paparan gelombang ultrasonik sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok daya paparan gelombang ultrasonik. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 97,2% yang berarti bahwa 97,2% variasi persentase perubahan bentuk sel MRSA (B) dipengaruhi oleh kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$B (P) = 10,5 + 12,4.P - 0,178.P^2$$

Perubahan sel MRSA akibat dipapari dengan frekuensi 26 kHz dengan daya beragam yang dinyatakan pada lampiran L15 halaman 332 akan disajikan dalam bentuk diagram batang yang tampak pada gambar 5.47



Gambar 5.47 Perubahan bentuk sel MRSA yang dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz dan daya beragam terbesar disebabkan karena kavitasi, sebesar $(54,60 \pm 27,81)\%$.

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Suspensi MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz (frekuensi efektif) dengan daya: 2 watt, 3 watt, 4 watt, 5 watt, dan 6 watt. Menyebabkan perubahan bentuk dan ukuran sel MRSA, indikator dari perubahan ukuran sel MRSA adalah terjadinya perubahan diameter maksimum MRSA, hasil dari pengamatan perubahan diameter maksimum sel MRSA dengan menggunakan SEM disajikan oleh tabel 5.23 berikut ini

Tabel 5.23 Diameter maksimum MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan beragam daya

No.	Diameter maksimum MRSA (nm)						
	Kontrol (0 watt)	2,0 watt	3,0 watt	4,0 watt	5,0 watt	6,0 watt	8,4 watt
1.	692,7	588,0	268,7	764,9	247,3	261,4	213,7
2.	746,6	148,0	212,1	685,9	249,0	302,2	313,3
3.	762,7	518,4	617,5	560,5	250,7	408,4	334,2
4.	766,6	634,3	730,8	654,9	304,2	826,1	259,2
5.	680,3	700,5	495,4	549,8	145,7	307,2	252,6



Untuk mengetahui pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik dianalisis, dan hasilnya tampak pada Tabel 5.24 dibawah ini.

Tabel 5.24. Pengaruh daya terhadap diameter maksimum sel MRSA

No.	Daya (watt)	Rerata diameter maksimum MRSA (nm)
1.	0 (kontrol)	729,78 ± 40,45
2.	2	517,84 ± 194,23
3.	3	464,90 ± 222,10
4.	4	643,20 ± 89,91
5.	5	239,38 ± 57,58
6.	6	421,06 ± 232,81
7.	8,4	280,10 ± 54,39

Analisis perubahan ukuran sel MRSA akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan daya beragam

Tabel 5.24 akan ditampilkan dalam bentuk diagram batang, kemudian dilakukan uji : normalitas, homogenitas, Anova dan regresi. Dan selanjutnya akan ditampilkan dalam diagram batang dan persamaan regresi.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,933. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data rerata diameter sel MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis

alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	3	1,000

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata diameter sel MRSA antar kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh adalah:

Tabel 5.25 Hasil uji Anova dan regresi antara daya paparan ultrasonik versus diameter maksimum MRSA

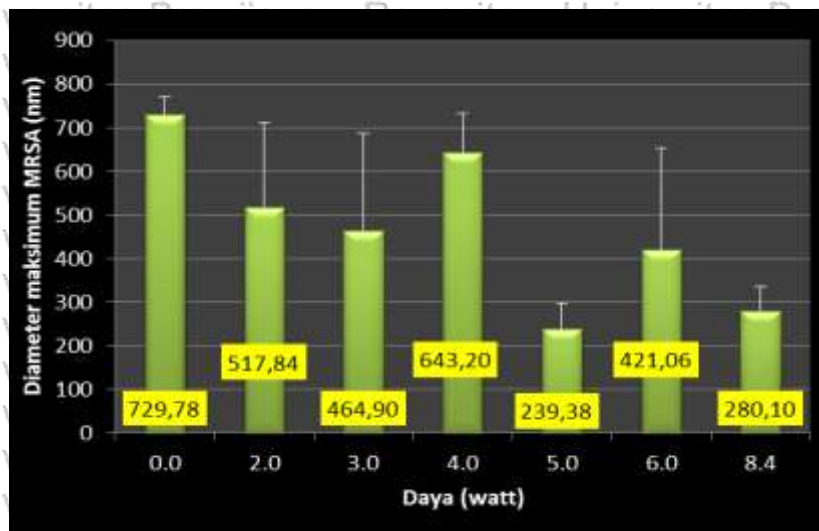
Regression Analysis: Diameter maksimum versus Daya, Daya^2					
The regression equation is					
Persentase = 603 - 32 Daya - 0.9 Daya^2					
Predictor	Coef	SE Coef	T	P	
Constant	602.8	362.5	1.66	0.195	
Daya	-31.9	154.2	-0.21	0.849	
Daya^2	-0.94	14.50	-0.06	0.952	
S = 152.124		R-Sq = 39.6%		R-Sq(adj) = 0.0%	
Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	45468	22734	0.98	0.470
Residual Error	3	69425	23142		
Total	5	114893			



Berdasarkan Tabel 5.25 di atas dapat diketahui bahwa nilai *P-value*, yang dihasilkan adalah sebesar 0,470. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata diameter maksimum sel MRSA antar kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Dengan kata lain, perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik tidak berpengaruh signifikan terhadap rerata diameter maksimum sel MRSA.

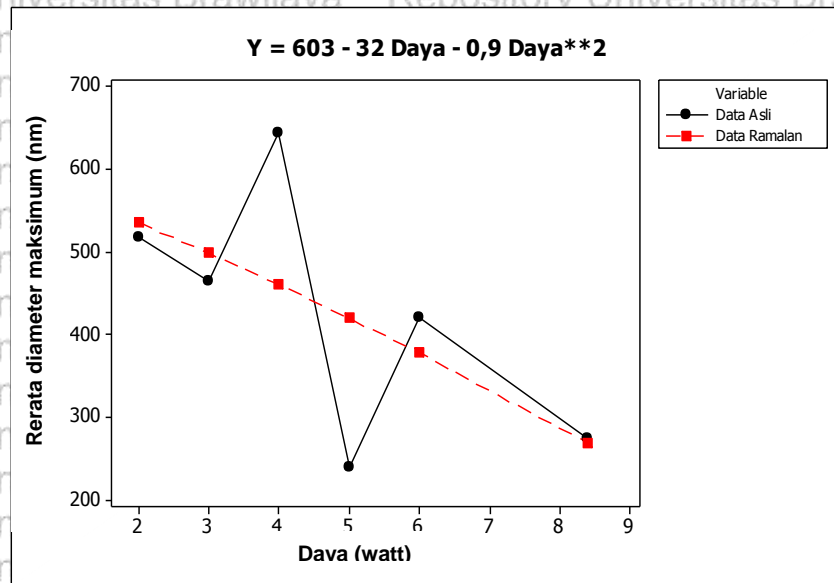
Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data rerata diameter maksimum antar kelompok daya perlakuan paparan gelombang ultrasonik yang digunakan dengan data prediksinya maka ditampilkan diagram batang (Gambar 5.47), dan persamaan regresinya (Gambar 5.48).

- Diagram batang



Gambar 5.48. Diagram batang antara daya gelombang ultrasonik terhadap rerata diameter maksimum MRSA.

- Grafik persamaan regresi



Gambar 5.49 Persamaan regresi pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap rerata diameter maksimum sel MRSA

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok daya paparan gelombang ultrasonik sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok daya paparan gelombang ultrasonik. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 39,6% yang berarti bahwa 39,6% variasi rerata diameter maksimum sel MRSA dipengaruhi oleh kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

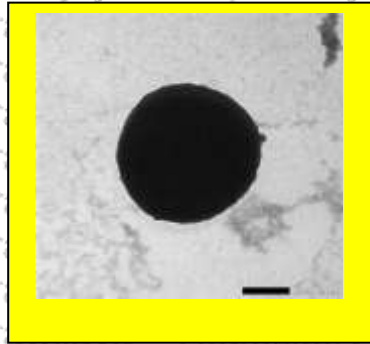
$$D_m (P) = 603 - 32 P - 0,9 P^2$$

3. Perubahan struktur sel MRSA

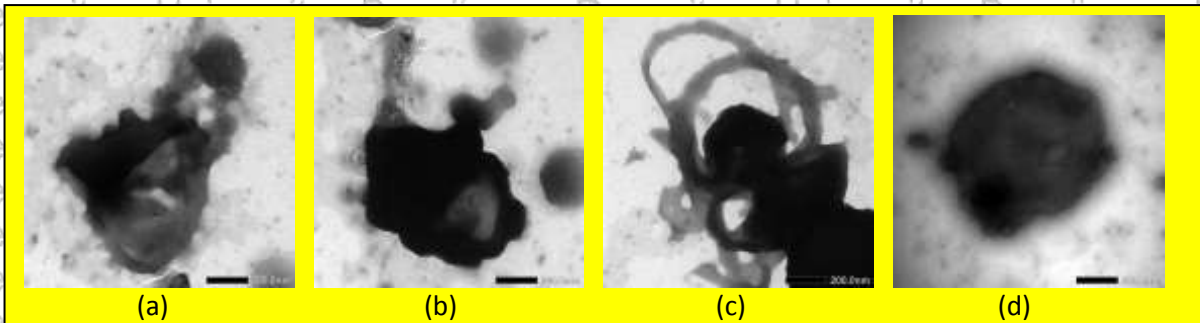
Suspensi MRSA yang dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 KHz, dengan daya beragam dalam waktu 2 menit akan menyebabkan perubahan struktur sel. Hal ini terjadi akibat adanya medan ultrasonik di dalam suspensi tersebut. Berikut adalah hasil pengamatan



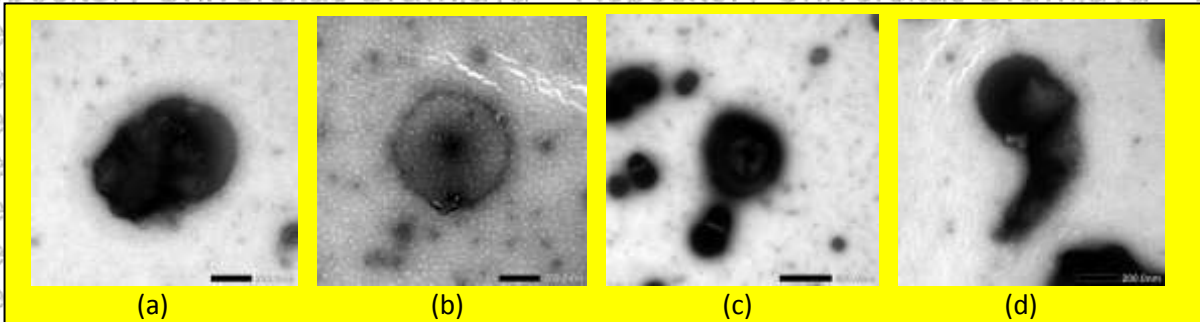
perubahan struktur sel MRSA dengan menggunakan TEM dengan perbesaran 20.000 kali, skala 200 nm



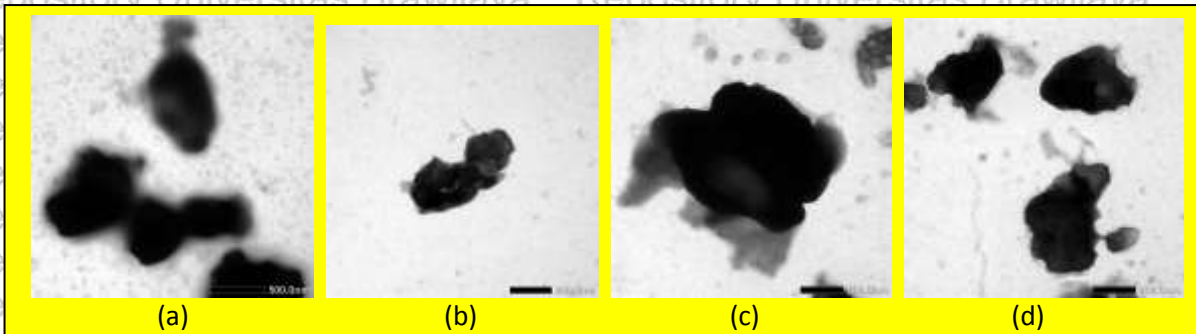
Gambar 5.50 Sel MRSA kontrol



Gambar 5.51 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, berdaya 4 watt. Perubahan struktur sel terjadi akibat: kavitasi, gambar (a), dan efek kimia gambar (b) terlihat sitoplasma mulai keluar dan ada bagian sel yang tampak transparan, gambar (c) sitoplasma telah keluar semua sehingga tampak rangka sel.



Gambar 5.52 Sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, berdaya 6 watt. Perubahan struktur sel terjadi akibat: kavitasi intrasellular yang menyebabkan dinding sel menjadi lebih tipis, gambar (a), dan keping-keping sel gambar (c). Stres mekanik menyebabkan sel menjadi bertambah panjang gambar (d)



Gambar 5.53 Sel MRSA yang telah dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, berdaya 8,4 watt. Perubahan struktur sel terjadi karena: Stres mekanik, sel menjadi lonjong dan terjadi retakan gambar (c), dan kavitasi gambar (a), (b), dan (c).

4. Perubahan pewarnaan sel MRSA

Berikut ini adalah hasil percobaan tentang perubahan pewarnaan sel MRSA setelah dipapari dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz dengan daya beragam. MRSA yang hidup berwarna ungu sedang jika mati berwarna pink (merah muda). Gambar MRSA hasil pewarnaan disajikan pada lampiran 20

Analisis perubahan pewarnaan sel MRSA akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan daya beragam

Berikut ini adalah data hasil percobaan pewarnaan gram terhadap suspensi MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, daya beragam dalam waktu 2 menit.

Tabel 5.26 Perubahan pewarnaan gram sel MRSA dengan daya beragam

No.	Daya (watt)	MRSA pink (%)
1.	0	4,22
2.	2	21,57
3.	3	35,85
4.	4	48,27
5.	5	61,02
6.	6	69,66
7.	8,4	100,00



Tabel 5.26 diatas akan ditampilkan dalam bentuk diagram batang, dan selanjutnya akan dilakukan uji : normalitas, homogenitas, dan Anova, selanjutnya ditampilkan dengan diagram batang dan persamaan regresi.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,538. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase MRSA Pink mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan ANOVA harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	3	1,000

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05.

Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.



c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan persentase MRSA Pink antar kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 5.27 Hasil uji Anova dan regresi antara daya versus persen perubahan warna

Regression Analysis: MRSA pink versus Daya, Daya²

The regression equation is

$$\text{Persentase} = -3.95 + 13.4 \text{ Daya} - 0.133 \text{ Daya}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-3.945	3.865	-1.02	0.382
Daya	13.430	1.644	8.17	0.004
Daya ²	-0.1330	0.1546	-0.86	0.453

$$S = 1.62195 \quad R\text{-Sq} = 99.8\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 99.7\%$$

Analysis of Variance

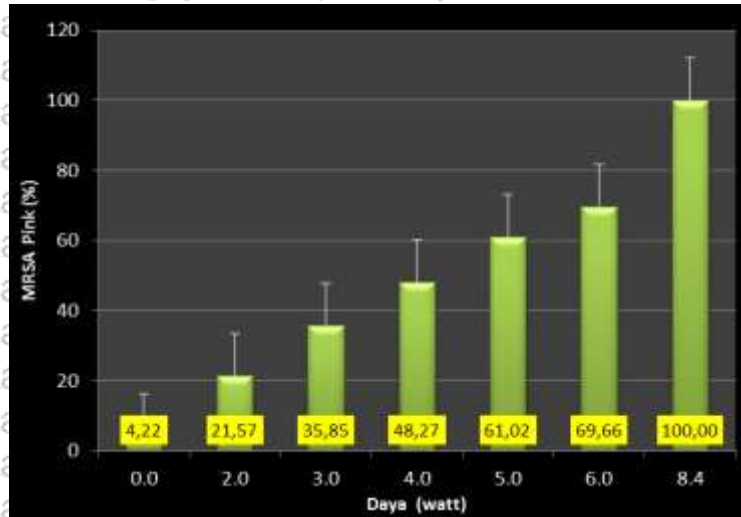
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	3791.1	1895.5	720.54	0.000
Residual Error	3	7.9	2.6		
Total	5	3799.0			

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,000. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan persentase MRSA Pink antar kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik. Dengan kata lain, perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persentase MRSA Pink. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data persentase MRSA Pink antar kelompok daya perlakuan paparan



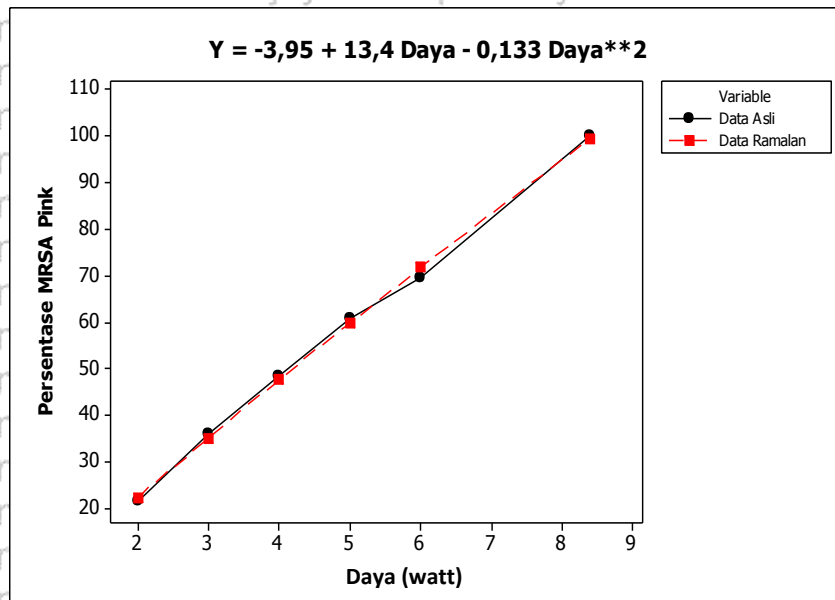
gelombang ultrasonik yang digunakan dengan data ramalannya maka ditampilkan grafik berikut.

- **Diagram batang**



Gambar 5.54 Diagram batang pengaruh daya gelombang ultrasonik terhadap MRSA berwarna pink

- **Grafik persamaan regresi**



Gambar 5.55 Pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persentase MRSA berwarna pink



Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok daya paparan gelombang ultrasonik sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok daya paparan gelombang ultrasonik. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 99,8% yang berarti bahwa 99,8% variasi persentase MRSA pink (W) dipengaruhi oleh kelompok perlakuan daya paparan gelombang ultrasonik sedangkan 0,2% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikutkan dalam pemodelan. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$W(P) = -3,95 + 13,4.P - 0,133.P^2$$

5.8 Pembahasan Penelitian Tahap 1

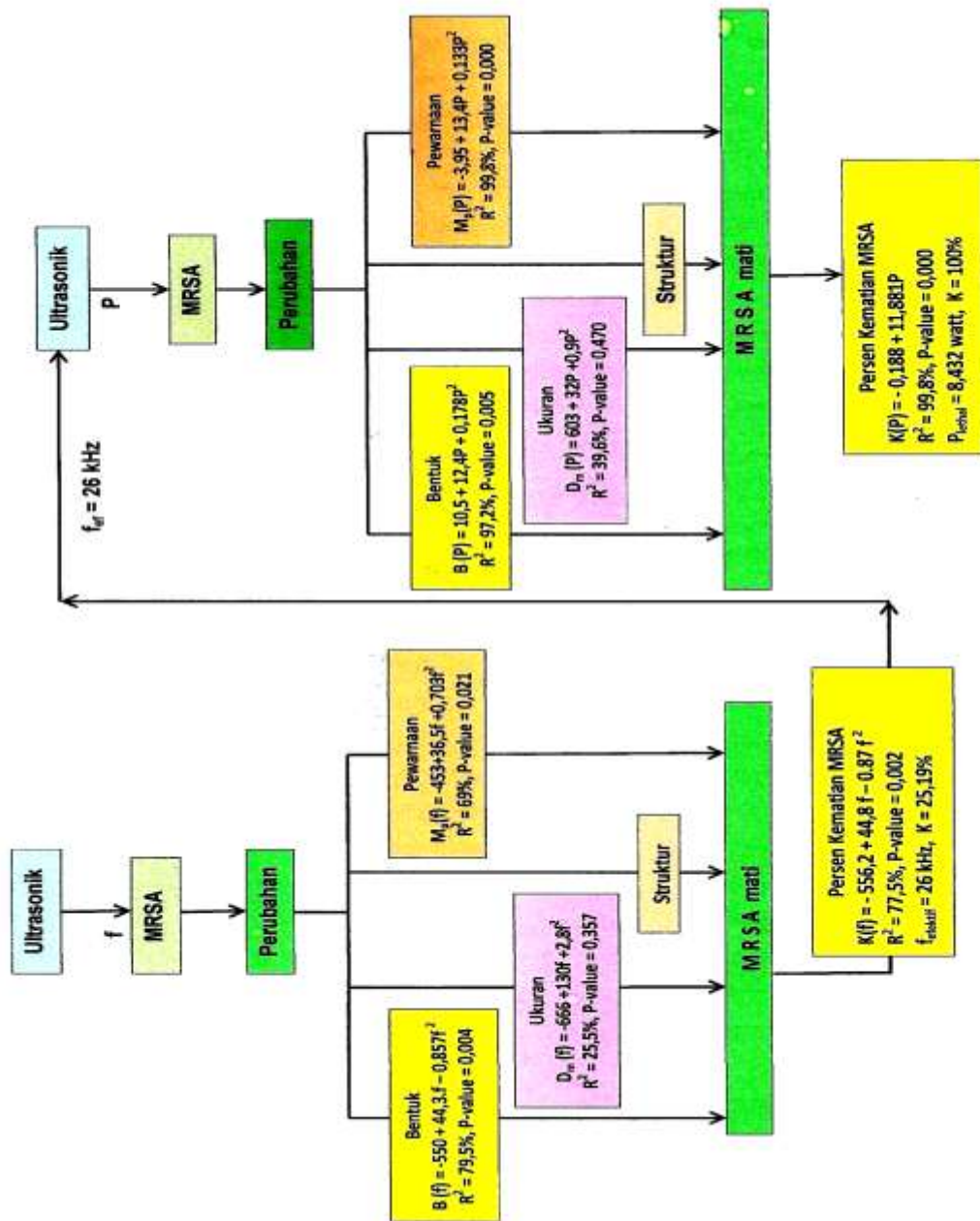
Pada penelitian tahap 1 ditemukan fakta bahwa pola hubungan antara frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA mengikuti kurva berbentuk parabolik, sedangkan daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA merupakan kurva linier. Untuk menjelaskan pengaruh antara variabel bebas dan terikatnya didukung dengan indikator kematian MRSA yang berupa perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram.

Menurut Cracnell (1980) dan Prijo (1989), energi total persatuan volume (ϵ) dan daya (P) yang dibawa gelombang ultrasonik melalui medium dinyatakan dengan persamaan:

$$\epsilon = 2 \pi^2 f^2 U_0^2 \rho \quad \text{dan} \quad P = 2 \pi^2 f^2 U_0^2 \rho c A$$

Dengan: f : frekuensi (Hz)
 U_0 : amplitudo (m)
 ρ : massa jenis medium (kg/m^3)
 c : kecepatan ultrasonik (m/s)
 A : luas permukaan (m^2)

Dari persamaan tersebut diatas terlihat bahwa energi persatuan volume sebanding dengan kuadrat frekuensi ($\epsilon \sim f^2$). Jika kematian MRSA sebanding dengan energi gelombang ultrasonik, maka hasil yang diperoleh dari percobaan ini sudah sesuai secara teoritis. Frekuensi paparan gelombang ultrasonik berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA (P-value = 0,002) dengan frekuensi efektif 26 kHz. Pengaruhnya dinyatakan dengan persamaan: $K(f) = -556,2 + 44,8f - 0,87f^2$ dengan $R^2 = 77,5\%$



Gambar 5.55 Bagan hasil penelitian pengaruh paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA



Hal ini didukung oleh pengamatan mikroskopis yang digunakan sebagai indikator kematian MRSA yang memberikan kurva yang sama dengan persen kematian MRSA bila dipapari dengan **frekuensi** beragam, yaitu:

1. Perubahan bentuk sel MRSA

Bentuk MRSA dikatakan berubah jika berbeda dari MRSA kontrol (bulat) menjadi tidak bulat (oval, persegi, atau tidak beraturan). Hal ini disebabkan oleh perubahan tekanan yang disebabkan oleh gelombang ultrasonik yang menyebabkan stres mekanik, kavitasi atau efek kimia yang mengakibatkan kerusakan dinding MRSA dengan probabilitas yang sama ke segala arah. Hasil uji regresi pengaruh frekuensi terhadap perubahan bentuk (B) dinyatakan dengan persamaan:

$$B(f) = -550 + 44,3 f + 0,857 f^2 \text{ dengan } R^2 = 79,5\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,004.$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa frekuensi berpengaruh signifikan terhadap perubahan bentuk MRSA, frekuensi hanya berpengaruh sebesar 79,5% sedangkan yang 20,5% dipengaruhi oleh variabel lain.

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Ukuran MRSA berubah jika diameter maksimumnya tidak sama dengan diameter maksimum MRSA kontrol. Jika MRSA masuk ke dalam medan gelombang ultrasonik maka diameter MRSA akan membesar jika berada dalam pola regangan, dan mengecil jika berada dalam pola rapatan, sehingga MRSA mempunyai kemungkinan yang sama untuk membesar atau mengecil. Hasil uji regresi pengaruh frekuensi terhadap perubahan ukuran, dinyatakan dengan diameter maksimum MRSA (D_m):

$$D_m(f) = -666 + 130f + 2,8f^2 \text{ dengan } R^2 = 25,5\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,357.$$



Dari persamaan di atas terlihat bahwa P-value $> \alpha$ ini berarti bahwa frekuensi berpengaruh tidak signifikan terhadap perubahan diameter maksimum MRSA, frekuensi hanya berpengaruh sebesar 25,5% sedangkan yang 74,5% dipengaruhi oleh variabel lain. Perubahan bentuk terbesar sel MRSA yang dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi beragam disebabkan stres mekanik sebesar $(57,00 \pm 26,92)\%$, sedangkan yang disebabkan oleh pemaparan dengan daya beragam perubahan bentuk terbesarnya disebabkan oleh kavitasi sebesar $(56,60 \pm 27,81)\%$.

3. Perubahan struktur sel MRSA

Perubahan struktur ini dapat diamati dengan TEM, tetapi hasil pengamatan ini tidak dapat dikuantisasi, berbeda dengan pengamatan morfologi MRSA dengan SEM. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa terjadi perubahan struktur dari semula berbentuk bulat berwarna hitam (gambar 5.25) menjadi berubah tidak seperti MRSA kontrol. Perubahan struktur sel MRSA disebabkan karena stres mekanik menyebabkan pergeseran dinding sel, kavitasi menyebabkan ledakan dari dalam sel MRSA, dan efek kimia terjadi akibat reaksi dinding sel dengan hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik. Semua ini bermuara pada keluarnya sitoplasma, sehingga sel MRSA berubah menjadi transparan.

4. Perubahan warna sel MRSA

Untuk membedakan antara MRSA yang masih hidup dengan yang sudah mati dilakukan dengan menggunakan pewarnaan gram, sehingga tampak bahwa sel MRSA yang hidup berwarna ungu dan yang mati berwarna pink (merah muda). Dari hasil percobaan pengaruh frekuensi



paparan gelombang ultrasonik terhadap MRSA yang berwarna pink (M_p) diperoleh hasil:

$$M_p(f) = -453 + 36,5f + 0,703f^2 \text{ dengan } R^2 = 69,0\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,021.$$

Dari hasil percobaan ditemukan bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa frekuensi berpengaruh signifikan terhadap perubahan pewarnaan sel, sedangkan pengaruhnya sebesar 69,0% sedangkan yang 31% dipengaruhi oleh variabel lain.

Disamping indikator tersebut diatas juga diperkuat oleh pengaruh frekuensi paparan gelombang ultrasonik terhadap OD suspensi MRSA yang kurvanya juga berbentuk parabola ($P\text{-value} = 0,005$). Ini berarti bahwa semakin banyak MRSA yang mati nilai OD makin besar sehingga suspensi MRSA makin keruh.

Pengaruhnya dinyatakan dengan persamaan:

$$OD(f) = -0,432 + 0,037f - 0,0007f^2 \text{ dengan } R^2 = 77,5\%$$

Hasil pengamatan pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik, dengan frekuensi efektif 26 kHz dan waktu paparan 2 menit terhadap persen kematian MRSA merupakan persamaan regresi dengan bentuk kurva linier. Jika daya sebanding dengan amplitudonya ($P \sim U_0$), ini berarti jika daya diperbesar maka amplitudo (U_0) gelombang ultrasonik membesar sehingga sel MRSA akan mengalami simpangan yang makin bertambah. Hal ini akan memperparah kerusakan sel, dari hasil uji regresi diperoleh pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian (K) dinyatakan dengan persamaan:

$$K(P) = -0,188 + 11,881P, \text{ dengan } R^2 = 99,8\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,000.$$



Dari hasil percobaan diatas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh sangat signifikan terhadap persen kematian MRSA, sedangkan pengaruhnya sebesar 99,8% dari perhitungan menggunakan persamaan tersebut di atas, diperoleh daya lethal sebesar 8,432 watt. Hasil ini didukung oleh pengamatan mikroskopik dengan SEM, TEM dan pewarnaan gram. Kerusakan sel MRSA diakibatkan oleh stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel.

Kerusakan akibat stres mekanik ditandai terjadinya perubahan bentuk dan ukuran sel akibat perapatan dan peregangan sel serta sobeknya dinding sel. Kerusakan sel karena kavitasi ditandai dengan adanya serpihan sel dengan ukuran kecil-kecil dalam jumlah yang banyak, atau ukuran besar dalam jumlah yang sedikit, kerusakan sel yang disebabkan efek kimia ditandai dengan keluarnya sitoplasma akibat dinding sel berlubang karena reaksi kimia sehingga sel tidak dapat mempertahankan bentuk semula.

Hasil pengamatan makroskopis (jumlah populasi MRSA) ini didukung oleh pengamatan mikroskopis yang digunakan sebagai indikator kematian MRSA, meskipun bentuk kurvanya berbeda. Indikator kematian MRSA yakni:

1. Perubahan bentuk sel MRSA

Akibat peristiwa stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia, sel MRSA mengalami perubahan bentuk, yang semula berbentuk bulat menjadi tidak bulat (oval, persegi, atau tidak beraturan). Secara matematik pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap perubahan bentuk (B) dinyatakan dengan persamaan:

$$B(P) = 10,5 + 12,4P + 0,17P^2 \text{ dengan } R^2 = 97,2\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,005.$$



Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa daya berpengaruh signifikan terhadap perubahan bentuk MRSA, perubahan bentuk yang dipengaruhi oleh daya sebesar 97,2%, sedangkan sisanya 2,8% dipengaruhi oleh variabel lain. Perubahan bentuk sel MRSA terbesar disebabkan oleh kavitas sebesar $(56,60 \pm 27,81)\%$

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Tolak ukur perubahan ukuran sel MRSA jika diameter maksimumnya mengalami perubahan dibandingkan dengan diameter maksimum kontrol. Hal ini terjadi akibat pola rambatan gelombang ultrasonik di medium, sehingga diameter maksimum sel MRSA dapat membesar atau mengecil. Pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap perubahan ukuran dinyatakan dengan persamaan:

$$D_m(P) = 603 + 32P + 0,9P^2 \text{ dengan } R^2 = 39,6\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,470.$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} > \alpha$ ini berarti bahwa daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh tidak signifikan terhadap perubahan diameter maksimum MRSA, daya hanya berpengaruh sebesar 39,6% sedangkan yang 60,4% dipengaruhi oleh variabel lain. Meskipun demikian pengaruh daya terhadap perubahan ukuran masih lebih besar dibandingkan pengaruh frekuensi terhadap perubahan ukuran sel MRSA.

3. Perubahan struktur sel MRSA

Kuantisasi hasil pengamatan perubahan struktur sel MRSA dengan TEM yang teramati tidak dapat dikuantisasi, berbeda dengan pengamatan morfologi sel MRSA dengan SEM. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa terjadi perubahan struktur dari semula berbentuk bulat



berwarna hitam (kontrol) berubah menjadi tidak seperti MRSA kontrol. Perubahan struktur kontrol. disebabkan oleh stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

4. Perubahan pewarnaan sel MRSA

Untuk membedakan antara MRSA yang masih hidup dengan yang sudah mati dilakukan dengan menggunakan pewarnaan gram, sehingga tampak bahwa sel MRSA yang hidup berwarna ungu dan yang mati berwarna pink (merah muda). Dari hasil uji regresi pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap MRSA yang mati berwarna pink (M_p) diperoleh hasil:

$$M_p(P) = -3,95 + 13,4.P + 0,133.P^2 \text{ dengan } R^2 = 99,8\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,000.$$

Dari hasil percobaan diatas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa daya paparan gelombang ultrasonik berpengaruh sangat signifikan terhadap perubahan pewarnaan sel, sedangkan pengaruhnya sebesar 99,8% sedangkan hanya 0,2% dipengaruhi oleh variabel lain.

Disamping indikator di atas juga didukung oleh OD suspensi MRSA yang dipengaruhi oleh daya paparan gelombang ultrasonik ($P\text{-value} = 0,002$). Pengaruhnya dinyatakan dengan $OD(P) = 0,0228 - 0,0072.P + 0,0016.P^2$ dan $R^2 = 98,5\%$. Ini berarti bahwa semakin banyak MRSA yang mati nilai OD semakin besar atau suspensi MRSA makin keruh.



5.9 Kesimpulan

Dari percobaan tahap 1 dapat disimpulkan:

1. Frekuensi efektif paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh MRSA *in vitro* dengan daya 2 watt dan waktu paparan 2 menit adalah 26 kHz dengan persen kematian MRSA sebesar 25,19%.
2. Daya lethal paparan gelombang ultrasonik untuk membunuh MRSA *in vitro* dengan frekuensi 26 kHz dan waktu paparan 2 menit adalah 8,432 watt.
3. Sel MRSA yang dipapari gelombang ultrasonik dengan daya beragam mempunyai kerusakan yang lebih parah jika dibandingkan dengan tingkat kerusakan akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi beragam. Hal ini ditandai dengan kepingan sel MRSA yang hancur akibat dipapari dengan daya beragam dibandingkan dengan frekuensi beragam.

5.10 Saran

1. Agar penelitian ini menjadi lebih sempurna maka diperlukan percobaan dengan mengkombinasikan beragam frekuensi paparan gelombang ultrasonik dengan beragam daya paparan gelombang ultrasonik secara simultan untuk memperoleh frekuensi dan daya optimum untuk membunuh MRSA *in vitro*.
2. Diperlukan percobaan lanjutan untuk membunuh MRSA dengan menggunakan metode kimia (Ozon) dan membandingkan kerusakan sel MRSA dengan menggunakan metode ultrasonik.



BAB 6

PENELITIAN TAHAP 2

Pengaruh Ozon Terhadap Kematian *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) In Vitro* Dengan Indikator Perubahan Bentuk, Ukuran, Struktur, dan Pewarnaan Sel

6.1 Latar Belakang Masalah

Ozon (O_3), gas ditemukan di pertengahan abad kesembilan belas, adalah molekul yang terdiri dari tiga atom oksigen dalam struktur dinamis tidak stabil. Gas ini tidak berwarna, tajam dalam bau dan eksplosif dalam bentuk cair atau padat. Ozon memiliki waktu paruh 40 menit pada $20^\circ C$ dan sekitar 140 menit pada $0^\circ C$. Fungsi dasarnya adalah untuk melindungi manusia dari efek berbahaya dari radiasi ultraviolet. Konsentrasi ozon yang terjadi kurang dari $20 \mu g/m^3$ dari permukaan bumi pada, konsentrasi ini sempurna sesuai dengan kehidupan. Meskipun O_3 memiliki efek berbahaya, namun para peneliti percaya memiliki banyak efek terapi (DiPaolo *et al*, 2004; Evis & Ekta, 2011).

Awal permulaan generator ozon medis ditemukan, memungkinkan untuk melakukan uji klinis yang tepat dari toksisitas ozon sebagai bahan evaluasi. (Bocci, 1999). Ozon memiliki kapasitas untuk mengoksidasi senyawa organik, dan memiliki efek toksik pada saluran pernapasan ketika dalam bentuk gas (Evis & Ekta, 2011). Pada penggunaan medis gas yang dihasilkan dari oksigen medis diberikan secara tepat dosis terapinya dan tidak pernah melalui inhalasi. Dan menganjurkan bahwa ozon memiliki manfaat untuk kesehatan yang sangat baik bagi karies gigi, menurunkan kolesterol darah dan stimulasi respon antioksidan, memodifikasi oksigenasi dalam beristirahat otot dan digunakan dalam pengobatan komplementer dan hipoksia iskemik sindrom (Clavo, 2003; Bocci, 2006).



Mekanisme kerja ozon untuk membunuh mikroorganisme adalah dengan inaktivasi bakteri, virus, jamur, ragi dan protozoa: terapi Ozon mengganggu integritas amplop sel bakteri melalui oksidasi fosfolipid dan lipoprotein. Pada jamur, ozon menghambat pertumbuhan sel pada tahap tertentu. Dengan virus, ozon merusak kapsid virus dan mengganggu siklus reproduksi dengan mengganggu virus ke sel kontak dengan peroksidasi. Lapisan enzim yang lemah pada sel-sel yang membuat virus rentan terhadap invasi oleh ozon yang menyebabkan rentan terhadap oksidasi dan eliminasi dari tubuh, yang kemudian menggantikan mereka dengan sel-sel sehat. (Evis & Ekta, 2011).

6.2 Masalah Penelitian

1. Bagaimana pengaruh dosis paparan ozon terhadap persen kematian *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dan berapa dosis letalnya?
2. Bagaimana mekanisme kematian MRSA akibat dipapari ozon melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan ukuran, bentuk, struktur dan pewarnaan sel MRSA?

6.3 Tujuan Penelitian

6.3.1 Tujuan umum

Menemukan pengaruh dosis paparan ozon terhadap tingkat kerusakan sel *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

6.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan apakah ada pengaruh antara dosis paparan ozon dengan persen kematian *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dan menemukan besar dosis letalnya..



2. Menemukan mekanisme kematian MRSA akibat dipapari ozon melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia dengan indikator perubahan ukuran, bentuk, struktur dan pewarnaan sel MRSA.

6.4 Manfaat Penelitian

6.4.1 Manfaat Akademis

1. Memberikan informasi ilmiah terkait dengan pemanfaatan ozon untuk Membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* beserta mekanismenya.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme terbunuhnya *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

6.4.2 Manfaat Praktis

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai penelitian pendahuluan untuk mengaplikasikan metode ultrasonik - ozon untuk mempercepat proses penyembuhan luka kronis.
2. Dapat digunakan sebagai desinfeksi air minum dengan menggunakan Ozon.

6.5 Kerangka Teori

Staphylococcus aureus merupakan kuman penyebab penyakit yang sering terjadi di masyarakat maupun sebagai infeksi nosokomial. Kolonisasi *Staphylococcus aureus* seringkali tidak bergejala dan hidup secara komensal pada hidung dan kulit manusia (Fournier & Philpott, 2005). *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan penyakit berkat kemampuannya melakukan pembelahan, dan menyebar luas ke dalam jaringan serta mampu memproduksi bahan ekstra seluler seperti katalase, koagulase, eksotoksin,



lekosidin, toksin eksfoliatif, Toksin Sindroma Syok Toksik (Toxic Shock Syndrome Toxin), enterotoksin dan enzim Lain (Brooks *et al*, 2001).

Dinding sel bakteri yang kompleks, struktur elastis bertanggung jawab atas bentuk sel. Dinding sel melindungi plasma yang rapuh (sitoplasma) membran melindungi bagian dalam sel dari perubahan yang merugikan pada lingkungan luar. Dinding sel bakteri terdiri dari jaringan makromolekul yang disebut peptidoglikan (juga dikenal sebagai murein). Peptidoglikan terdiri dari disakarida dan polipeptida. Bagian disakarida terdiri dari monosacchadides disebut N-asetilglukosamin (NAG) dan asam N-acetylmuramic (NAM) (dari Nurus, yang berarti dinding), yang berhubungan dengan glukosa (Tortora *et al*, 2007). Mekanisme kerusakan dinding sel bakteri akibat ozon ditunjukkan Gambar

5.1.

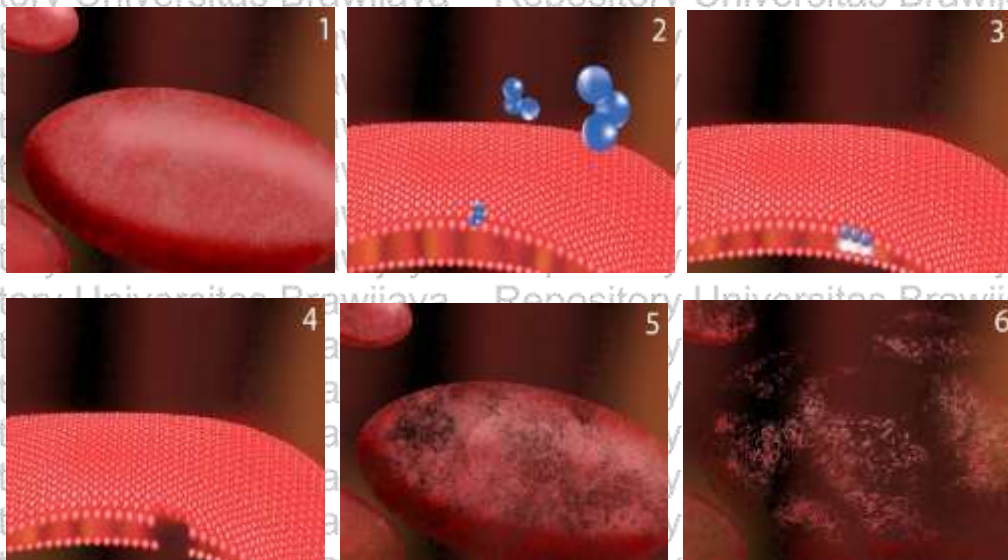
Banyak alternatif untuk pengobatan luka kronis terinfeksi dengan ozon yang telah dijelaskan dalam literatur, tetapi peran nyata dari berbagai bahan yang dioleskan, tetap belum dipastikan (Atiyeh *et al*, 2009; Lipski & Hoey, 2009).

Aplikasi topikal antibiotik telah menunjukkan keberhasilan terbatas dalam pengelolaan luka yang terinfeksi, tanpa hasil yang konklusif (Locman *et al*, 2010). Dalam beberapa tahun terakhir, berbagai percobaan in vitro dan in vivo dan klinis telah meneliti efek bakterisida dari aplikasi topikal ozon dalam situasi yang berbeda, termasuk pengelolaan luka yang terinfeksi (Bialoszewski & Kowalewski, 2003).

Ozon adalah oksidan kuat dan disinfektan penting, yang bekerja pada mikroorganisme dengan cara oksidasi bahan biologisnya. Telah dilaporkan bahwa O_3 dapat digunakan sebagai zat bakterisida dalam berbagai bentuk, seperti larutan garam diozon, air ozonized (Fontes *et al*, 2012), minyak diozon (Kim *et al*, 2009), ozon terkait dengan bahan lain (Dmitrieva *et al*, 2009) dan



lebih sering campuran gas O_3/O_2 (Aydogan & Gurol, 2006). Penggunaan topikal ozon juga telah dilaporkan untuk dekontaminasi lingkungan dalam situasi yang beragam : dalam bidang odontologi (Johansson *et al*, 2009), dan dalam klinis seperti dalam pengobatan luka yang terinfeksi (Kim, 2009). Gas ozon juga telah berpotensi dipertimbangkan untuk desinfeksi lingkungan rumah sakit, yang dapat menjadi sumber mikroorganisme untuk pasien dan dokter (Davies *et al*, 2011). Namun, dosis minimal yang efektif antibakteri ozon gas untuk aplikasi topikal belum ditentukan secara jelas (Fontes *et al*, 2012). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan apakah dosis rendah ozon serta waktu paparan minimum yang mampu membunuh MRSA terbesar. Di bawah ini adalah ilustrasi yang dihasilkan komputer bagaimana ozon membunuh bakteri sehat.



Gambar 6.1 Mekanisme kerusakan dinding bakteri akibat ozon: 1. Sebuah sel bakteri sehat 2. Bila dizoom lebih dekat, Ozon (biru muda) datang mengenai dinding sel. Dinding sel sangat penting untuk bakteri karena memastikan organisme dapat mempertahankan bentuknya 3. Sebagian molekul ozon melakukan kontak dengan dinding sel, reaksi disebut ledakan oksidatif terjadi yang secara harfiah menciptakan sebuah lubang kecil di dinding sel 4. Sebuah lubang yang baru dibuat pada dinding sel bakteri telah terluka 5. Bakteri mulai kehilangan bentuknya sementara molekul ozon terus menciptakan lubang di dinding sel 6. Setelah ribuan tabrakan ozon di atas hanya beberapa detik, dinding bakteri tidak bisa mempertahankan bentuknya dan sel mati (Leusink, 2010).



6.6 Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan fokus pemanfaatan ozon untuk membunuh Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* melalui efek kimia yang ditimbulkannya. Dosis ozon diubah-ubah sedangkan waktu dan volume suspensi dibuat konstan.

6.6.1 Rancangan Penelitian

a. Tahap persiapan

Kegiatan pada tahap ini adalah:

- Mensetting generator ozon terkait dengan dosis ozon yang dihasilkan sebagai fungsi waktu.
- Mensiapkan suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*

b. Tahap pelaksanaan penelitian

Pada tahap ini, kegiatan penelitian difokuskan untuk menemukan dosis efektif ozon untuk membunuh Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, persen kematian, perubahan profil protein dan mengamati tingkat kerusakan sel bakteri yang ditimbulkan.

6.6.2 Populasi dan sampel penelitian

a. Populasi

Populasi penelitian adalah 1 liter suspensi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* yang telah dibiakan dalam tabung elenmeyer sebanyak 1 liter.

b. Sampel

Sampel penelitian adalah 100 ml suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang diambil dari populasi. Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus replikasi sampel dari Federer:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$



dengan t : banyaknya perlakuan
 r : replikasi/ulangan

Uji normalitas dan homogenitas diperlukan untuk mengetahui apakah sampel diambil dari populasi sudah berdistribusi normal atau sudah homogen.

6.6.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian direncanakan dalam waktu 1` bulan. Untuk menentukan dosis efektif ozon untuk membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium Gastroenteritis dan Samonellosis Institut Tropical Disease Universitas Airlangga Surabaya, untuk mengamati persen kematian MRSA Sedangkan pengamat Dan pemotretan gambar terkait dengan tingkat kerusakan sel MRSA dilakukan di Laboratorium Mikroskop Elektron Universitas Negeri Malang (pengamatan SEM), dan Universitas Gajamada (pengamatan TEM)

6.6.4 Variabel dan Indikator Penelitian

6.6.4.1 Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian tahap 2 ini adalah waktu paparan ozon yang digunakan untuk memapari sampel suspensi MRSA

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dari penelitian tahap 2 ini adalah persen kematian MRSA, dan tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari ozon dengan dengan waktu paparan yang berbeda.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah: kultur murni MRSA,



lama inkubasi, media bakteri, pH air garam fisiologis, lama paparan ozon.

6.6.4.2 Indikator penelitian

Indikator kematian MRSA pada penelitian tahap 2 adalah tingkat kerusakan sel MRSA yang telah mati setelah terpapar ozon yang berupa perubahan bentuk, ukuran, struktur serta pewarnaan sel.

6.6.5 Definisi operasional variabel

- Ozon adalah gas yang terdiri dari tiga atom oksigen, tidak berwarna yang mampu menginaktivasi bakteri.
- Dosis efektif ozon adalah jumlah ozon yang terlarut dalam volume suspensi MRSA, yang menyebabkan persen kematian MRSA terbanyak.
- Persen kematian MRSA adalah perbandingan antara jumlah kematian MRSA dengan jumlah MRSA semula (kontrol).

6.6.6 Alat dan Bahan Penelitian

6.6.6.1 Alat penelitian

- Generator ozon berfungsi untuk memproduksi ozon.
- Pengatur dosis ozon berfungsi mengatur dosis ozon selalu konstan sesuai dengan yang dikehendaki.
- *Spektrofotometri* berfungsi untuk mengukur keparatan suspensi MRSA.
- Mikroskop elektron berfungsi untuk mengamati tingkat kerusakan sel MRSA sebelum dan setelah dipapari ozon
- *Autoclave* berfungsi untuk mensterilkan peralatan yang akan digunakan untuk penelitian.
- *Microwave* untuk memasak media yang digunakan untuk mengkultur



MRSA.

- *Colony counter* berfungsi untuk menghitung jumlah koloni MRSA secara manual.

- Neraca digital berfungsi untuk mengetahui massa media kultur yang akan digunakan.

- *Stopwatch* digunakan untuk mengukur waktu

- *O s e* digunakan untuk mengambil bakteri.

- Inkubator berfungsi menginkubasi MRSA

- Peralatan yang terbuat dari gelas : cawan petri (diameter 10 cm), tabung reaksi, tabung elenmeyer, 400 ml, gelas ukur 400 ml, mikro pipet, gelas obyek, gelas penutup, dan pembakar bunsen.

6.6.6.2 Bahan penelitian

- Isolat MRSA

- *Luria bertani broth*

- *Chromagar MRSA*

- *Crystal violet*

- *Saffranin*

- *L u g o l*

- Air grafis

- Alkohol 95%

- Aquades

- K a p a s

- Almunium foil

- Plastik wrap

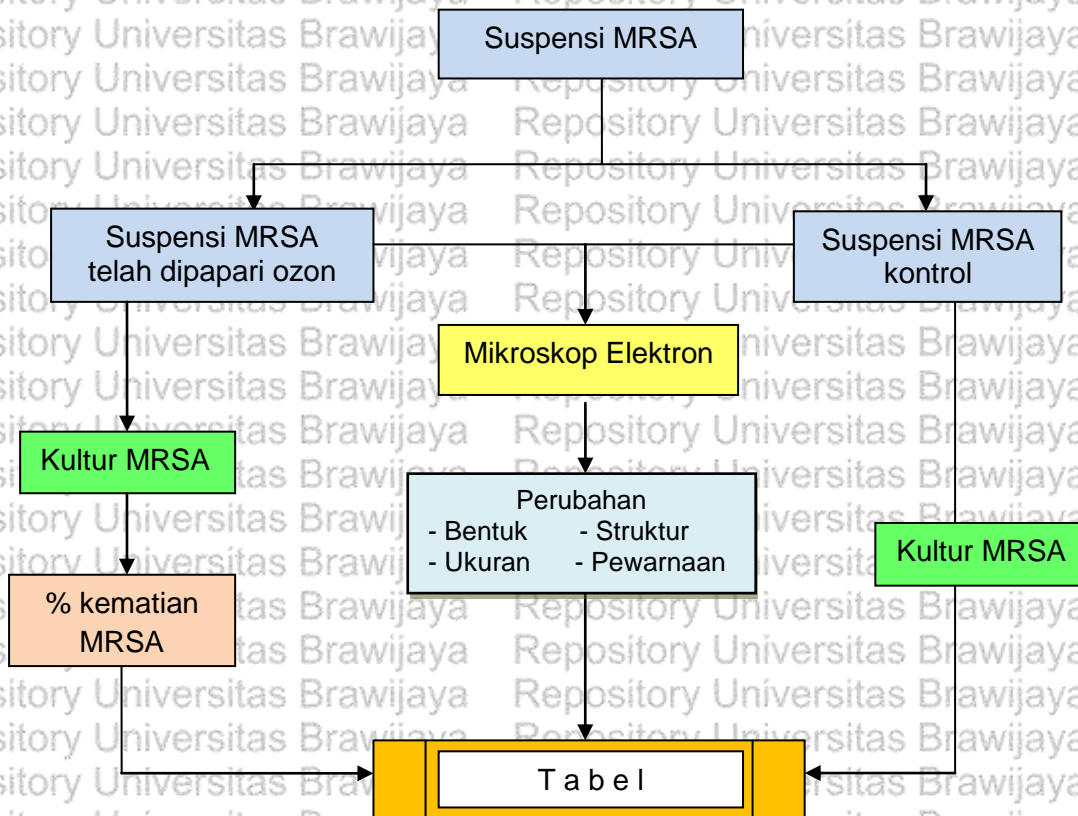
6.6.7 Alur dan Prosedur Penelitian

6.6.7.1 Alur penelitian

Pada penelitian tahap 2 difokuskan pada pemanfaatan ozon untuk membunuh MRSA, dengan mencari dosis efektif paparan ozon yang menyebabkan persen kematian MRSA terbesar. Indikator yang diamati adalah persen kematian MRSA, perubahan profil protein sel MRSA dan kerusakan sel bakteri meliputi : bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan (gambar 4.2)

6.6.7.2 Prosedur penelitian

Pada penelitian ini cara pengumpulan data diarahkan untuk menentukan dosis efektif paparan ozon untuk membunuh MRSA serta tingkat kerusakan sel, dinyatakan dengan gambar 6.3



Gambar 6.2. Prosedur pengumpulan data penelitian tahap 2



Menentukan dosis lethal paparan ozon

1. Menghubungkan generator ozon sengan sumber tegangan
2. Mengambil masing – masing 0,2 ml suspensi MRSA kemudian dimasukkan kedalam 5 cawan petri yang berisi Chromagar MRSA, yang digunakan sebagai kontrol.
3. Memasukkan cawan petri tersebut ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
4. Memapari suspensi MRSA berturut- turut dipapari dengan ozon dengan waktu paparan 5 detik, 10 detik, 15 detik, 20 detik, 25 detik, 30 detik, 35 detik dan 40 detik. Mengambil suspensi MRSA masing- masing 0,2 ml kemudian dimasukkan ke dalam empat cawan petri yang berisi Chromagar MRSA.
5. Cawan petri ini diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C, yang digunakan sebagai perlakuan.
6. Setelah diinkubasi selama 24 jam, menghitung jumlah koloni MRSA kontrol dan perlakuan, kemudian memasukkan hasilnya kedalam tabel ompong.
7. Menghitung persen kematian MRSA
8. Mengambil 40 ml suspensi MRSA yang telah diberi perlakuan dimasukkan ke dalam 4 tabung sentrifuge kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm dalam waktu 15 menit.
9. 9,5 ml suspensi MRSA dibuang sehingga tinggal 0,5 ml ekstrak suspensi MRSA.
10. Memasukkan ekstrak suspensi MRSA ke dalam tabung reaksi kecil dengan menggunakan mikro pipet.
11. Mengambil suspensi MRSA diambil dengan menggunakan ose



kemudian diletakkan di kaca obyek untuk diwarnai dengan pewarnaan gram (prosedur pewarnaan di lampiran 11).

12. Mengamati hasil pewarnaan gram dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000 kali.

13. Mengambil ekstrak suspensi MRSA dengan menggunakan ose kemudian diletakkan di cover glass untuk diamati menggunakan mikroskop elektron.

14. Mengamati tingkat kerusakan sel MRSA dengan menggunakan mikroskop elektron.

6.6.8 Teknik analisis data

a. Uji Normalitas dan Homogenitas

- **Uji normalitas** digunakan untuk menentukan data yang telah dikumpulkan berdistribusi normal atau diambil dari populasi normal.

Uji normalitas yang dapat digunakan diantaranya Chi-Square, Kolmogorov Smirnov, Lilliefors, Shapiro Wilk.

- **Uji homogenitas** digunakan untuk mengetahui apakah data dari variabel x dan y bersifat homogen atau tidak.

b. Uji Anova

Uji Anova merupakan pengembangan dari uji-T yang digunakan untuk menuji rata-rata dari dua sampel. Tetapi perbedaan dasarnya adalah terletak dari banyaknya kelompok sampel. Untuk dapat diuji Anova data harus terdistribusi normal dan homogen.

c. Uji regresi

Uji ini digunakan untuk mengetahui hubungan fungsional antara variabel bebas dan tergantung. Pada penelitian tahap 2, variabel bebasnya



konsentrasi ozon dan waktu kontak, sedangkan variabel tergantungnya % kematian bakteri *Staphylococcus aureus*.

6.7 Hasil Dan Analisis Data

6.7.1 Menemukan Karakteristik Generator Ozon

Setiap generator ozon mempunyai karakteristik tertentu tergantung dari fungsi yang diinginkan. Gas ozon yang dihasilkan oleh tegangan listrik yang tinggi yang menyebabkan kutub anoda dan katoda terjadi kilatan listrik. Berikut ini adalah karakteristik generator ozon yang akan peneliti gunakan.

Spesifikasi Generator Ozon

Dibuat oleh : West technology co., ltd

Model : CHS – 212

Voltage : AC 110 or 220 \pm 10%

Power consumption : 15 watt

Ozone output : 400 mg / h

Ozone max working time : 30 min / per time

Net weight : 0,69 kg

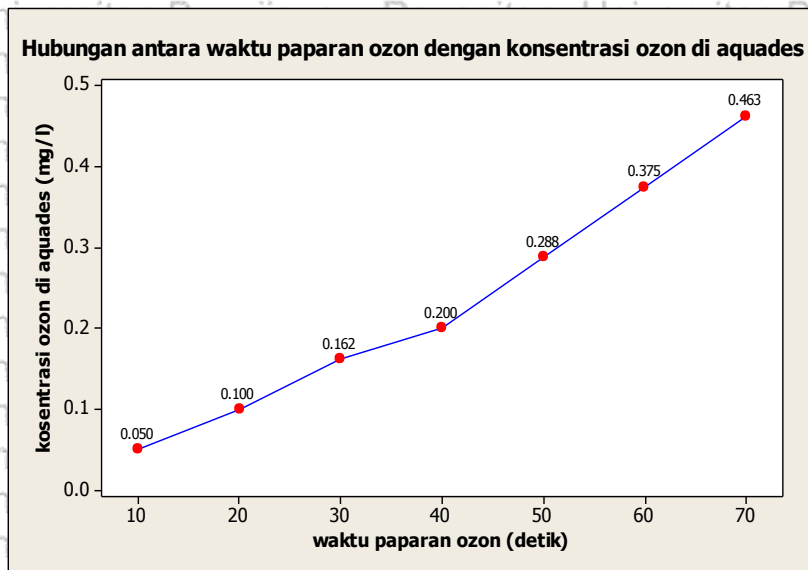
Products size : 27.5 x 18 x 6 cm

Dari spesifikasi tersebut terlihat bahwa generator ozon ini menghasilkan 400 mg ozon dalam waktu 1 jam, jika dipasang pada tegangan 110 atau 220 volt dengan daya 15 watt dengan masa kerja 30 menit sekali dipakai. Untuk menyesuaikan dengan kondisi percobaan yang saya lakukan maka, perlu dicari konsentrasi ozon yang terlarut dalam air sebagai fungsi waktu.

Tabel 6.1 Pengaruh waktu paparan ozon dengan konsentrasi ozon di aquades

No	Waktu (detik)	Konsentrasi ozon (mg/l)				Rerata ± SD
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	
1.	10	0,05	0,05	0,05	0,05	0,050 ± 0,000
2.	20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,100 ± 0,000
3.	30	0,15	0,20	0,15	0,15	0,162 ± 0,025
4.	40	0,20	0,20	0,20	0,20	0,200 ± 0,000
5.	50	0,30	0,30	0,25	0,30	0,288 ± 0,025
6.	60	0,35	0,35	0,40	0,40	0,375 ± 0,029
7.	70	0,45	0,45	0,50	0,45	0,463 ± 0,025

Jika data ini di plot pada grafik hubungan waktu paparan ozon terhadap konsentrasi ozon di aquades, hasilnya sebagai berikut :



Gambar 6.3. Pengaruh waktu paparan terhadap konsentrasi ozon

Hubungan antara waktu paparan ozon dengan konsentrasi ozon di aquades pada Gambar 6.3 menunjukkan hubungan linier positif. Artinya, semakin lama waktu paparan ozon maka semakin besar konsentrasi ozon di aquades.

Untuk mengetahui pengaruh waktu paparan ozon terhadap konsentrasi ozon di aquades di gunakan uji Anova, maka digunakan uji hipotesis sebagai berikut :



H_0 : Waktu paparan ozon tidak berpengaruh terhadap konsentrasi ozon di aquades

H_1 : Waktu paparan ozon berpengaruh terhadap konsentrasi ozon di aquades

Kriteria penolakan H_0 adalah jika nilai P-value $< \alpha$.

Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh waktu paparan ozon terhadap konsentrasi ozon di aquades maka digunakan analisis regresi linier menggunakan software MINITAB dan diperoleh output sebagai berikut :

Tabel 6.2 Hasil uji Anova dan regresi konsentrasi ozon versus waktu

Regression Analysis: kosentrasi versus waktu

The regression equation is
 kosentrasi = - 0.0396 + 0.00684 waktu

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-0.03957	0.01858	-2.13	0.086
waktu	0.0068393	0.0004156	16.46	0.000

S = 0.0219894 R-Sq = 98.2% R-Sq(adj) = 97.8%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	0.13097	0.13097	270.86	0.000
Residual Error	5	0.00242	0.00048		
Total	6	0.13339			

Berdasarkan hasil output MINITAB di atas, diperoleh nilai P-value untuk waktu adalah 0.000. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0,05$, maka nilai P-value $< \alpha$, sehingga tolak H_0 . Artinya, waktu paparan ozon berpengaruh signifikan terhadap konsentrasi ozon di aquades. Persamaan model regresi linier yang menyatakan



hubungan antara waktu paparan ozon (t) dan konsentrasi ozon di aquades (C) adalah: $C(t) = -0,0396 + 0,00684t$, dari persamaan ini terlihat bahwa jika $t = 0$ detik maka $C(0) = -0,0396$ hal ini tidak mungkin terjadi, sehingga persamaan regresinya menjadi: $C(t) = 0,00684.t$, dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 98.2%. Artinya, apabila waktu paparan ozon bertambah sebesar 1 detik, maka konsentrasi ozon di aquades yang dihasilkannya rata-rata akan bertambah pula sebesar 0.00684 mg/liter.

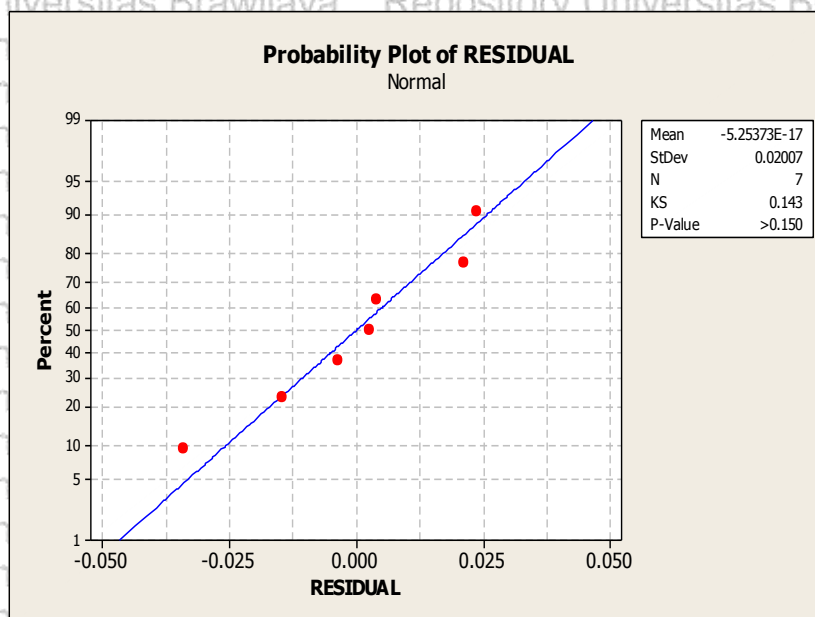
Dalam analisis regresi, ada asumsi bahwa distribusi residual model mengikuti distribusi Normal. Oleh karena itu dilakukan pemeriksaan kenormalan distribusi residual model yang telah dibuat dengan hipotesis sebagai berikut :

H_0 : Residual berdistribusi Normal

H_1 : Residual tidak berdistribusi Normal

Kriteria penolakan H_0 adalah jika nilai P-value $< \alpha$.

Uji Normalitas residual menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov pada software MINITAB diperoleh output sebagai berikut :



Gambar 6.4 Uji asumsi kenormalan residual



Berdasarkan output pada Gambar 6.4 dapat dilihat bahwa nilai P-value > 0.15. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value > α , sehingga terima H_0 .

Artinya, Residual model yang dibuat telah mengikuti distribusi Normal. Jadi, asumsi kenormalan residual pada suatu model regresi linier telah dipenuhi sehingga model regresi linier yang telah dibuat bisa digunakan

6.7.2 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA

100 ml suspensi MRSA dipapari dengan ozon dengan waktu 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, dan 40 detik. Konsentrasi ozon yang dihasilkan generator ozon merupakan fungsi waktu, jadi dengan diketahuinya waktu paparan ozon akan dapat diketahui konsentrasinya. Berikut adalah data hasil percobaan yang telah dilakukan:

Tabel. 6.3 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap jumlah koloni MRSA dan OD

No	Waktu (detik)	Jumlah Koloni MRSA Kontrol (...) x 5.10 ⁵ CFU/ml				Jumlah Koloni MRSA Perlakuan (...) x 5.10 ⁵ CFU/ml				OD
		N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	
		1.	5	466	244	510	472	270	339	
2.	10	375	324	260	320	252	271	195	250	0,005
3.	15	241	234	200	233	137	147	155	167	0,048
4.	20	201	209	213	219	145	125	141	137	0,041
5.	25	246	200	193	159	75	101	74	137	0,004
6.	30	248	231	241	212	38	25	40	33	0,003
7.	35	221	210	214	218	0	2	6	3	0,011
8.	40	309	268	248	243	0	0	3	2	0,005

Data pada Tabel 6.3 di atas akan dianalisis dengan menggunakan uji : normalitas, homogenitas, dan Anova. Tabel 6.3 akan dianalisis menjadi Tabel 6.4 yang akan disajikan dibawah ini.



a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$).

Tabel hasil uji normalitas

Waktu (detik)	Shapiro – Wilk Statistic	<i>Sig.</i>	Keterangan
Kontrol	0,939	0,658	Data berdistribusi normal
5 detik	0,990	0,980	Data berdistribusi normal
10 detik	0,805	0,088	Data berdistribusi normal
15 detik	0,795	0,073	Data berdistribusi normal
20 detik	0,923	0,552	Data berdistribusi normal
25 detik	0,838	0,160	Data berdistribusi normal
30 detik	0,990	0,980	Data berdistribusi normal
35 detik	0,805	0,088	Data berdistribusi normal
40 detik	0,795	0,073	Data berdistribusi normal

Berdasarkan Tabel uji normalitas di atas dapat diketahui bahwa semua kelompok data berdistribusi normal. Hal ini karena nilai *Sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Sebagai contoh, untuk kelompok data kontrol nilai *sig.* yang dihasilkan adalah 0,658. Nilai ini lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga diputuskan bahwa kelompok data kontrol berdistribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.



df1	df2	Sig.
2	5	1,000

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05.

Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Uji anova akan dilakukan pada Tabel 6.2. Untuk mengetahui pengaruh paparan ozon dengan beragam waktu paparan terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati maka digunakan uji Anova dengan hipotesis sebagai berikut :

H_0 : Tidak ada pengaruh paparan ozon dengan beragam waktu paparan terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati

H_1 : Ada pengaruh paparan ozon dengan beragam waktu paparan terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati

Kriteria penolakan H_0 adalah jika nilai P-value $< \alpha$.

Berikut ini adalah hasil uji Anova menggunakan *software* MINITAB :

Tabel hasil uji Anova waktu paparan terhadap jumlah populasi MRSA

One-way ANOVA: Kontrol, 5 dtk, 10 dtk, 15 dtk, 20 dtk, 25 dtk, 30 dtk, ...

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	8	462922	57865	64.58	0.000
Error	27	24192	896		
Total	35	487114			

S = 29.93 R-Sq = 95.03% R-Sq(adj) = 93.56%

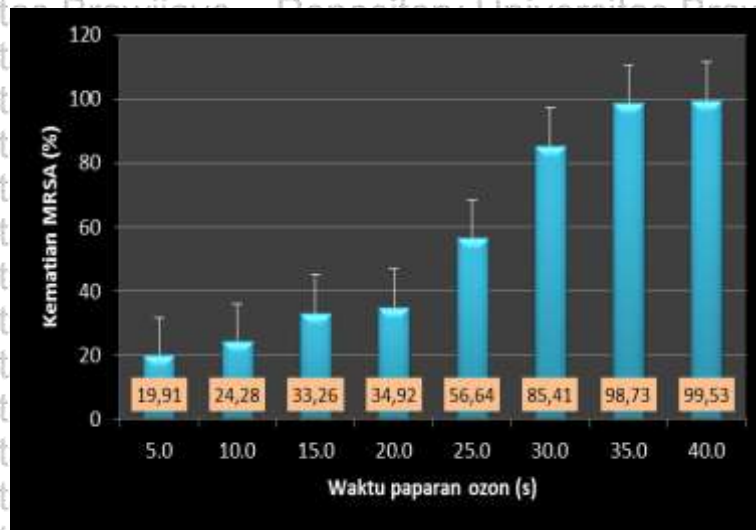
Berdasarkan hasil yang diperoleh, nilai P-value = 0.000. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value < α , sehingga tolak H_0 . Artinya, ada pengaruh paparan ozon dengan beragam waktu paparan terhadap jumlah populasi MRSA yang teramati atau dapat dikatakan bahwa ada perbedaan rata-rata jumlah populasi MRSA yang teramati dalam berbagai waktu paparan ozon yang diberikan. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruhnya secara spesifik dilanjutkan dengan uji regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA.

Tabel 6..4 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA

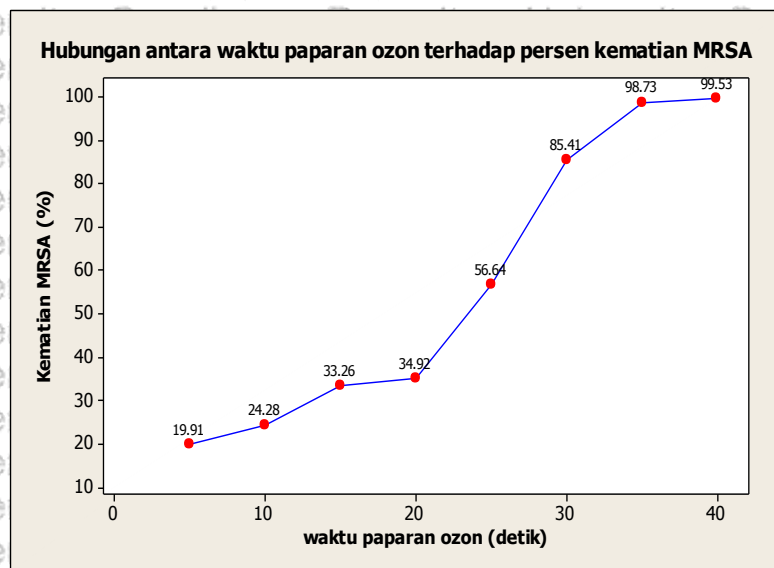
No.	Waktu paparan ozon (detik)	Jumlah koloni MRSA kontrol (...) x 5.10 ⁵	Jumlah koloni MRSA perlakuan (...) x 5.10 ⁵	Prosen kematian MRSA (%)
1.	5	423,0 ± 120,9	338,8 ± 74,4	19,91
2.	10	319,6 ± 47,1	242,0 ± 32,7	24,28
3.	15	227,0 ± 18,4	151,5 ± 12,7	33,26
4.	20	210,5 ± 7,6	137,0 ± 8,6	34,92
5.	25	199,5 ± 35,8	86,5 ± 14,0	56,64
6.	30	233,0 ± 15,6	34,0 ± 6,7	85,41
7.	35	215,8 ± 7,8	2,8 ± 2,5	98,73
8.	40	267,0 ± 30,0	1,3 ± 0,5	99,53

Jika data ini akan ditampilkan sebagai diagram batang dan grafik persamaan regresi pengaruh antara waktu paparan ozon dengan persen kematian MRSA sebagai berikut:

Diagram batang



Gambar 6.5. Sebaran data pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA yang disajikan dalam diagram batang

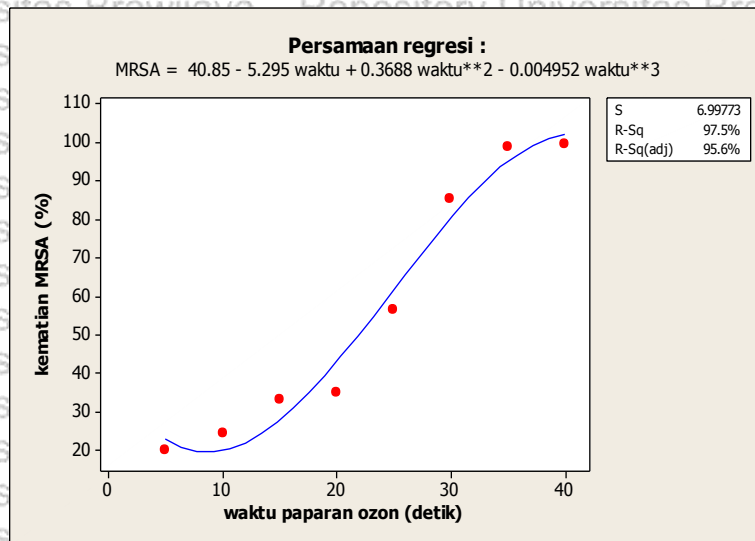


Gambar 6.6 Grafik sebaran data pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA

Gambar 6.6 menunjukkan bahwa pola hubungan antara waktu paparan ozon dengan persen kematian MRSA cenderung membentuk pola hubungan kubik. Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh waktu paparan ozon terhadap

persen kematian MRSA maka digunakan analisis regresi kubik dan diperoleh output MINITAB sebagai berikut :

Persamaan garis regresi



Gambar 6.7 persamaan regresi pengaruh waktu paparan terhadap persen kematian MRSA

Berdasarkan Gambar 6.7 dapat dilihat plot hubungan antara waktu paparan ozon dengan prediksi persen kematian MRSA berdasarkan regresi kubik yang digambarkan dengan garis biru, sedangkan titik-titik merah menyatakan hubungan antara waktu paparan ozon dengan persen kematian MRSA berdasarkan hasil pengamatan.

Selain berupa grafik, regresi kubik juga menampilkan output berikut:

Tabel 6.5 Hasil uji Anova dan regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA

Polynomial Regression Analysis: Persen Kematian MRSA versus waktu

The regression equation is
 $MRSA = 40.85 - 5.295 \text{ waktu} + 0.3688 \text{ waktu}^2 - 0.004952 \text{ waktu}^3$

S = 6.99773 R-Sq = 97.5% R-Sq(adj) = 95.6%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	3	7657.58	2552.53	52.13	0.001
Error	4	195.87	48.97		
Total	7	7853.45			

Sequential Analysis of Variance

Source	DF	SS	F	P
Linear	1	7304.36	79.82	0.000
Quadratic	1	125.63	1.48	0.278
Cubic	1	227.59	4.65	0.097

Berdasarkan Tabel 6.5, diperoleh nilai P-value = 0.001. Jika digunakan $\alpha = 5\% = 0.05$, maka nilai P-value < α , sehingga tolak H_0 . Artinya, model regresi kubik yang telah dibuat bisa digunakan. Persamaan regresi kubik yang diperoleh untuk menduga persen kematian MRSA (K) berdasarkan waktu paparan ozon (t) adalah

$$K(t) = 40,85 - 5,295 t + 0,3688t^2 - 0,004952t^3$$

dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 97.5%. Dari tabel terlihat bahwa dosis lethal terjadi pada saat $t = 40$ detik. Untuk mencari dosis lethalnya $t = 40$ detik dimasukkan ke dalam persamaan $C(t) = 0,00684.t$ diperoleh hasil $C = 0,274 \text{ mg/l}$. Jadi dengan demikian dosis lethalnya = 0,274 mg/l



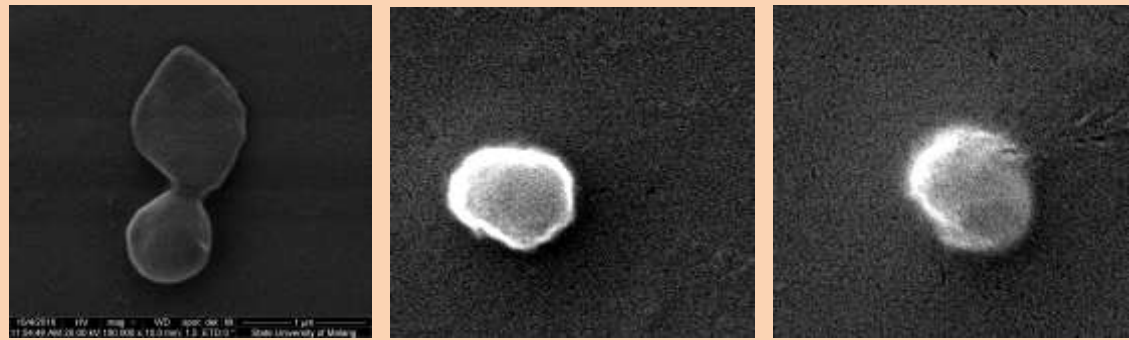
6.7.3 Indikator Kematian MRSA

Indikator kematian MRSA adalah : Perubahan bentuk sel MRSA, ukuran sel MRSA, struktur sel MRSA dan Pewarnaan sel MRSA

1. Perubahan bentuk sel MRSA

Perubahan bentuk akibat dipapari MRSA dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bulat dan tidak bulat. Berikut ini perubahan bentuk MRSA akibat dipapari ozon dengan waktu paparan yang beragam (perbesaran 100.000 kali, skala 1 μm)



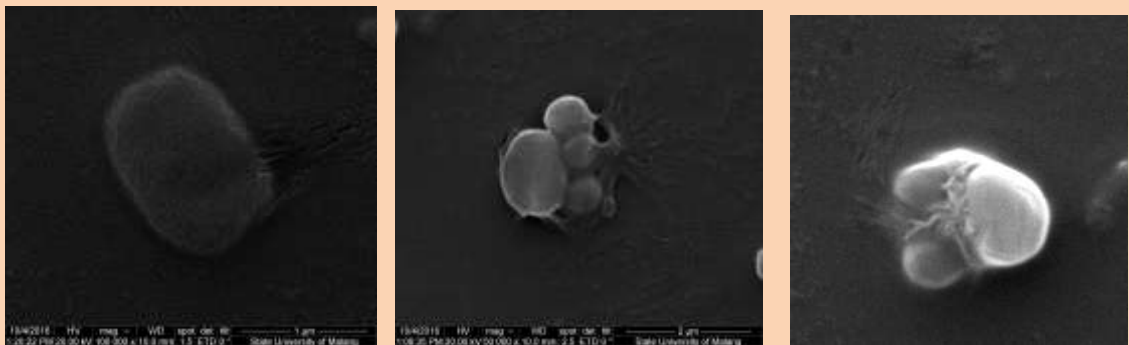


(a)

(b)

(c)

Gambar 6.10 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 10 detik . (a) sel mendapat tekanan tidak homogen dari dalam sehingga bentuk sel yang di atas tidak sama dengan yang dibawah, (b) dan (c) mengalami pengkerutan akibat medan tekanan ultrasonik

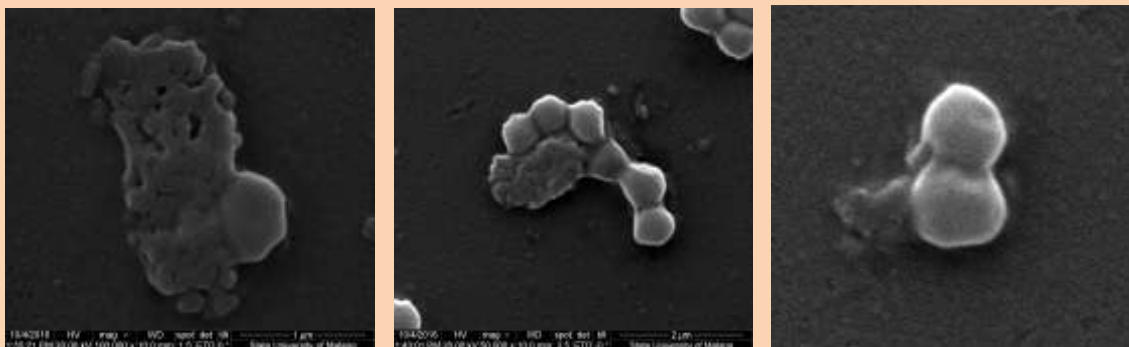


(a)

(b)

(c)

Gambar 6.11 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 15 detik . (a) bentuk selnya mengembung dengan dinding sel mengalami kebocoran, (b) dan (c) mengalami reaksi kimia sehingga disekeliling sel terdapat cairan yang lebih kental dibandingkan mediumnya.

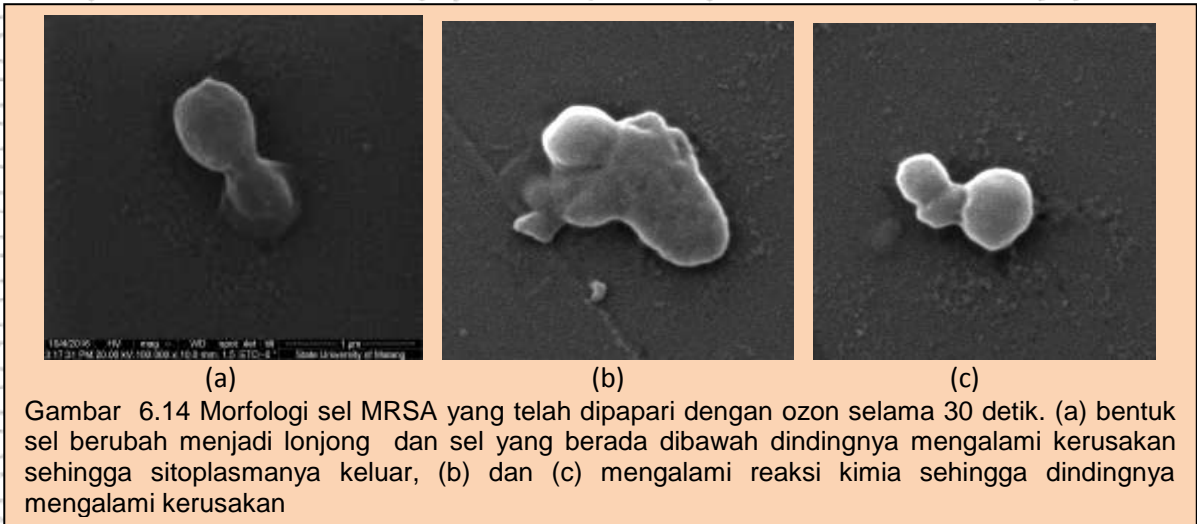


(a)

(b)

(c)

Gambar 6.12 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 20 detik. (a), (b), dan (c) mengalami reaksi kimia yang menyebabkan kerusakan dinding sel sehingga bentuk sel menjadi tidak teratur dan terdapat sitoplasma yang keluar sel.





(a) (b) (c)

Gambar 6.16 Morfologi sel MRSA yang telah dipapari dengan ozon selama 40 detik. (a) kerusakan dinding sel yang parah akibat reaksi kimia menyebabkan bentuk sel menjadi tidak teratur, (b) dan (c) ada bagian dinding sel yang berlubang dengan ditandai keluarnya sitoplasma dari dalam sel MRSA

Hasil rekapitulasi perubahan bentuk dari bulat menjadi tidak bulat akibat dipapari ozon dengan waktu paparan berbeda dinyatakan dalam Tabel 6.6 di bawah ini

Tabel 6.6 Perubahan bentuk MRSA yang telah dipapari ozon dengan beragam waktu

No.	Waktu paparan (s)	Perubahan bentuk sel MRSA (%)
1.	0 (kontrol)	4,17
2.	5 s	20,83
3.	10 s	25,00
4.	15 s	33,33
5.	20 s	36,67
6.	25 s	45,00
7.	30 s	66,67
8.	35 s	81,25
9.	40 s	90,00

Tabel 6.6 akan ditampilkan dalam diagram batang dan diuji menggunakan uji : normalitas, homogenitas, dan Anova, selanjutnya akan ditampilkan dalam diagram batang dan persamaan regresinya.



a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,984. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data rerata diameter maksimum sel MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	5	1,000

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk

mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rerata diameter maksimum sel MRSA antar kelompok perlakuan lama waktu. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 6.7 Hasil uji Anova dan regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap persentase perubahan bentuk sel MRSA

Regression Analysis: Perubahan bentuk versus Waktu paparan Ozon

The regression equation is

$$\text{Persentase} = 18.5 + 0.219 \text{ waktu} + 0.0414 \text{ waktu}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	18.543	5.800	3.20	0.024
Waktu	0.2193	0.5914	0.37	0.726
Waktu^2	0.04136	0.01283	3.22	0.023

S = 4.15722 R-Sq = 98.2% R-Sq(adj) = 97.5%

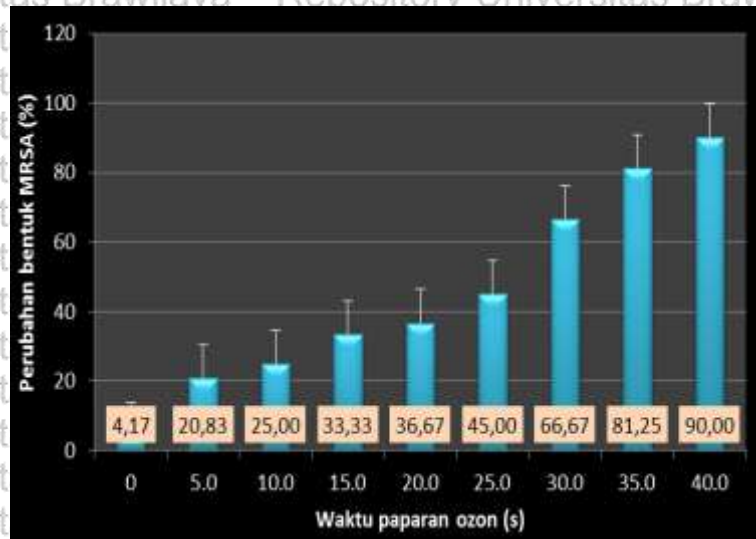
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	4724.3	2362.2	136.68	0.000
Residual Error	5	86.4	17.3		
Total	7	4810.7			

Berdasarkan Tabel 6.7 dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,000. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan perubahan bentuk sel MRSA antar kelompok perlakuan lama waktu. Dengan kata lain, perlakuan lama waktu berpengaruh signifikan terhadap perubahan bentuk sel MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data rerata diameter maksimum sel MRSA antar kelompok lama waktu dengan data ramalannya maka ditampilkan diagram batang dan grafik berikut.

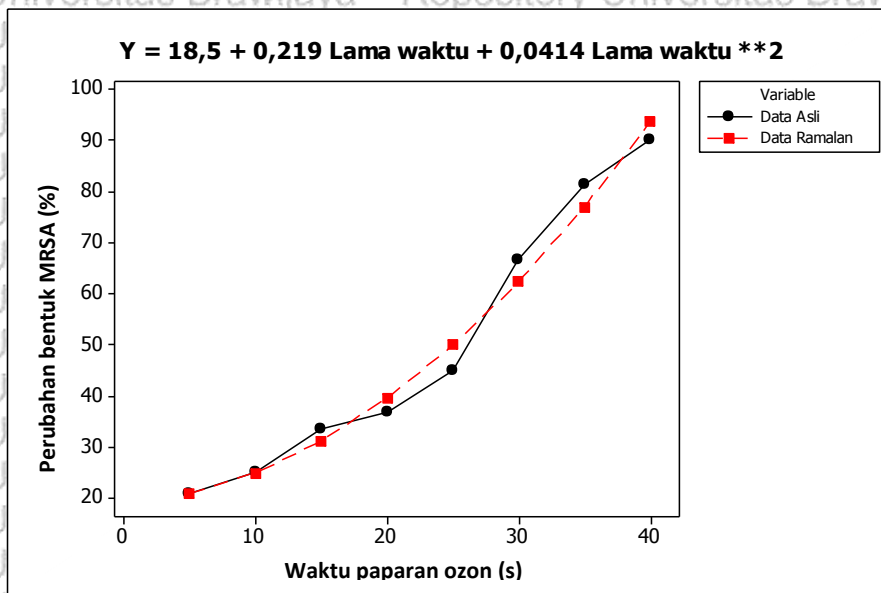


- Diagram batang



Gambar 6.17 Sebaran data antara waktu paparan ozon dengan perubahan bentuk MRSA yang dinyatakan dengan diagram batang

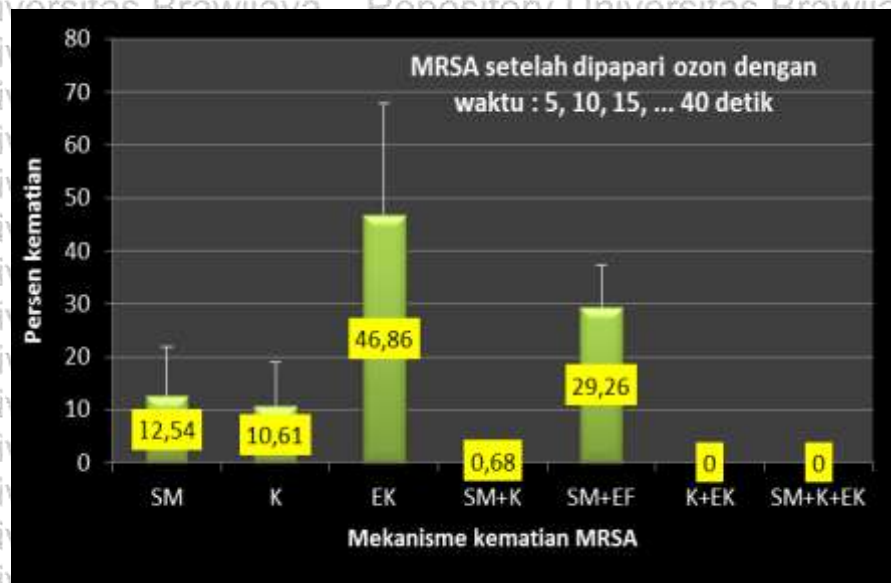
- Grafik persamaan regresi



Gambar 6.18 Grafik regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan bentuk sel MRSA

Persamaan garis regresi antara perubahan bentuk (B) dengan waktu paparan ozon dinyatakan dengan persamaan: $B(t) = 18,5 + 0,219t + 0,0414t^2$,

dengan $R^2 = 98,2\%$, ini berarti bahwa perubahan bentuk MRSA dipengaruhi oleh waktu paparan/dosis ozon, sedangkan 1,8% dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikuti dalam penelitian ini. Perubahan bentuk akibat stres mekanik, kavitasi, efek kimia atau kombinasi ketiganya dinyatakan pada lampiran 16 halaman 342, yang dinyatakan dalam diagram batang Gambar 8.19



Gambar 6.19 mekanisme kematian MRSA setelah dipapari dengan ozon, terlihat bahwa kematian MRSA terbesar akibat efek kimia sebesar $(46,86 \pm 20,88)\%$

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Bila sel MRSA dipapari dengan ozon maka dinding selnya akan mengalami reaksi dengan ozon sehingga akan mengalami kerusakan. Kerusakan ini mengakibatkan terjadinya perubahan ukuran sel MRSA, indikator perubahan ukuran dari sel MRSA adalah terjadinya perubahan diameternya. Berikut ini tabel hasil percobaan terkait dengan perubahan diameter maksimum MRSA akibat dipapari ozon dengan waktu yang beragam.



Tabel 6.8 Diameter maksimum sel MRSA akibat dipapari ozon dengan waktu yang beragam

No.	Diameter maksimum sel <i>MRSA</i> (nm)								
	K	Waktu paparan							
		5 s	10 s	15 s	20 s	25 s	30 s	35 s	40 s
1.	700,5	824,4	721,2	662,0	756,7	796,5	1629,0	839,0	743,6
2.	739,3	797,2	725,9	721,2	860,5	952,5	647,0	763,9	716,4
3.	621,7	723,0	641,1	758,7	808,0	796,7	783,1	786,7	637,3
4.	642,3	661,7	741,8	689,0	720,9	800,3	723,0	756,7	1384,0
5.	640,8	733,1	744,6	1512,0	839,0	1812,0	674,4	689,0	1555,0

Analisis pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen persen perubahan diameter maksimum sel MRSA

Untuk mengetahui pengaruh waktu paparan terhadap diameter maksimum sel MRSA tabel di atas akan diolah menjadi Tabel 6.9 di bawah ini

Tabel 6.9 Pengaruh waktu paparan terhadap diameter maksimum sel MRSA

No.	Waktu paparan (s)	Rerata diameter maksimum \pm SD (nm)
1.	0 (kontrol)	668,92 \pm 49,19
2.	5	747,88 \pm 64,33
3.	10	714,92 \pm 42,46
4.	15	868,58 \pm 361,49
5.	20	795,02 \pm 56,07
6.	25	1031,60 \pm 441,37
7.	30	1120,02 \pm 557,03
8.	35	767,06 \pm 54,25
9.	40	1007,26 \pm 428,06

Untuk menganalisis Tabel 6.9 untuk mencari pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan diameter maksimum akan dilakukan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan regresi.



a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase perubahan warna sel MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	5	1,000

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol, yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk

mengetahui ada atau tidaknya perbedaan persentase perubahan warna sel MRSA antar kelompok perlakuan lama waktu. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh:

Tabel 6.10 Hasil uji Anova dan regresi antara rerata diameter maksimum sel MRSA versus waktu paparan ozon

Regression Analysis: Diameter maksimum versus waktu, Waktu^2

The regression equation is

$$\text{Persentase} = 667 + 12.7 \text{ waktu} - 0.156 \text{ waktu}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	667.3	155.1	4.30	0.008
Frekuensi	12.68	15.82	0.80	0.459
Frek^2	-0.1559	0.3431	-0.45	0.669

S = 111.172 R-Sq = 37.0% R-Sq(adj) = 11.8%

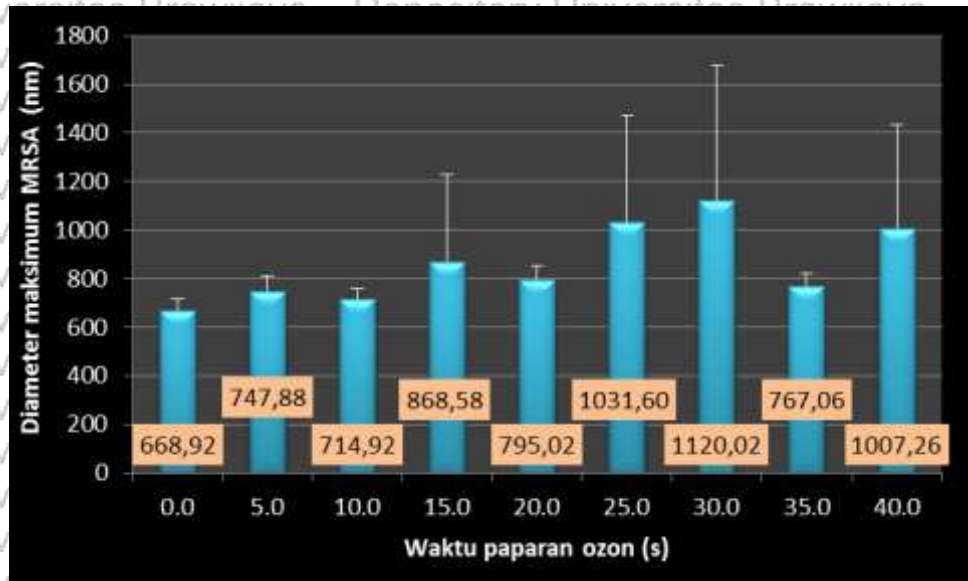
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	36243	18122	1.47	0.315
Residual Error	5	61796	12359		
Total	7	98039			

Nilai P-value = 0,315. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan persentase perubahan ukuran sel MRSA antar kelompok perlakuan lama waktu. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan ozon tidak berpengaruh signifikan terhadap diameter maksimum sel MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data rerata diameter maksimum sel MRSA (D_m) antar kelompok lama waktu paparan dan grafik regresinya.

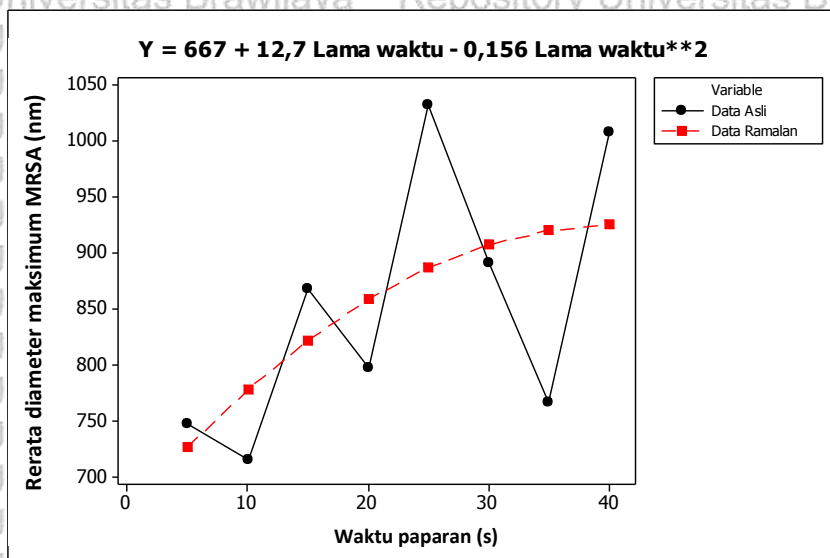


Diagram batang



Gambar 6.20 Diagram batang sebaran data antara waktu paparan ozon dengan rerata diameter maksimum sel MRSA

Grafik persamaan regresi



Gambar 6.21 Grafik regresi pengaruh waktu paparan ozon terhadap rerata diameter maksimum Sel MRSA

Garis merah pada Gambar 6.21 menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok lama waktu sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok lama

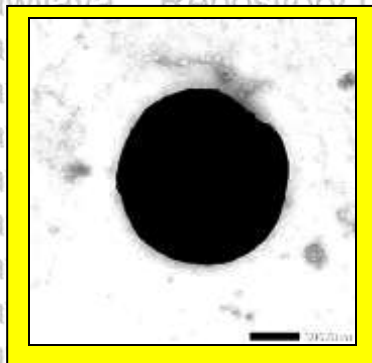


waktu. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 37% yang berarti bahwa 37% variasi rerata diameter maksimum sel MRSA (D_m) dipengaruhi oleh kelompok perlakuan lama waktu paparan ozon (t) sedangkan 63% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikutkan dalam pemodelan. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan:

$$D_m(t) = 667 - 12,7t + 0,156t^2$$

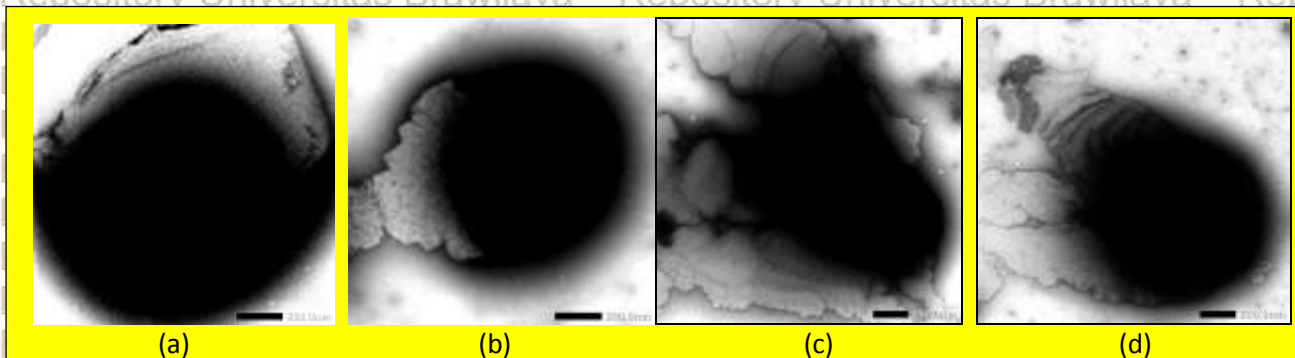
3. Perubahan struktur sel MRSA

Perubahan struktur sel MRSA akibat dipapari oleh ozon dengan beragam waktu akan diamati dengan menggunakan Transmision Electron Microscope (TEM). Berikut adalah perubahan struktur sel MRSA diamati dengan perbesaran 20.000 x



Gambar 6.22 Sel MRSA kontrol diamati dengan menggunakan TEM.

Tampak berwarna hitam karena di dalam sel masih berisi sitoplasma



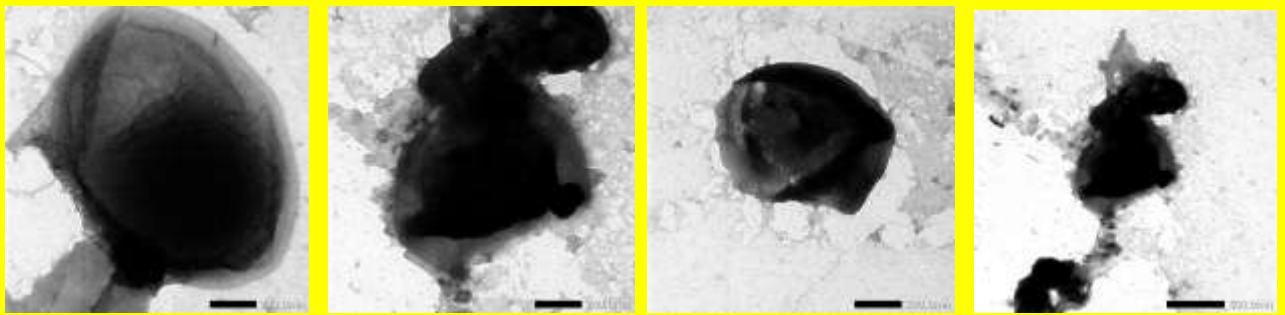
(a)

(b)

(c)

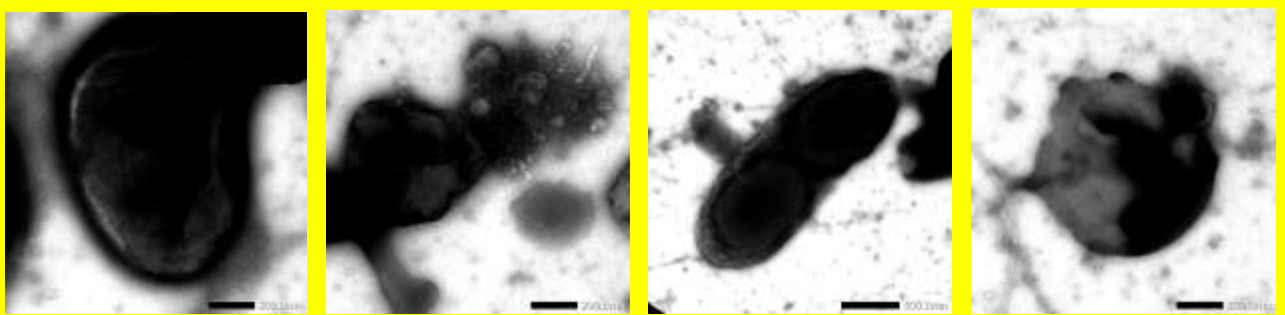
(d)

Gambar 6.23 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 10 detik, sebagian sitoplasmanya keluar dari dinding sel yang mengalami kerusakan akibat berinteraksi dengan ozon, bentuk sel menjadi tidak beraturan dan bagian dalam sel menjadi transparan



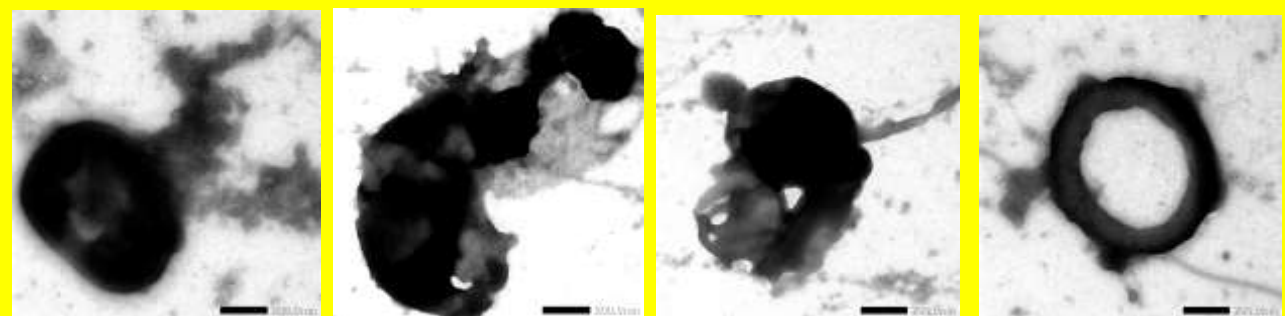
(a) (b) (c) (c)

Gambar 6.24 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 20 detik, akibat reaksi antara dinding sel dengan ozon, dinding sel menjadi berlubang sehingga sitoplasma sel akan keluar yang mengakibatkan sel menjadi transparan dan ada bagian sel yang terlempar sehingga bentuknya berubah dari MRSA kontrol



(a) (b) (c) (d)

Gambar 6.25 Sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 30 detik, interaksi dinding sel dengan ozon mengakibatkan kerusakan dinding sel akibatnya sitoplasma sel keluar yang menyebabkan sel menjadi transparan.



(a) (b) (c) (d)

Gambar 6.26 sel MRSA yang telah dipapari ozon dalam waktu 40 detik. Dinding sel MRSA yang berlubang akibat bereaksi dengan ozon menyebabkan sitoplasma keluar akibatnya : jika sebagian sitoplasma yang keluar maka tampak didalam sel agak terang, jika keluar semua bagian dalam sel akan menjadi terang

4. Perubahan pewarnaan sel MRSA

Berikut ini adalah gambar pewarnaan gram untuk mengetahui persen kematian sel MRSA akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan



beragam frekuensi. MRSA yang masih hidup berwarna ungu sedangkan yang telah mati berwarna merah muda (pink). MRSA diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dan diamati dengan menggunakan monitor 30 inchi, hasil pengamatan pada lampiran 22

Analisis pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen persen perubahan bentuk sel MRSA.

Rekapitulasi hasil percobaan perubahan pewarnaan sel akibat dipapari ozon dengan waktu beragam, warna sel MRSA hidup berwarna ungu berubah menjadi pink (mati). Data hasil penelitian terkait dengan perubahan warna MRSA disajikan pada lampiran 22.

Tabel 6.11 Pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen perubahan warna sel MRSA

No.	Waktu paparan ozon (detik)	MRSA pink (%)
1.	0 (kontrol)	0
2.	5	4,76
3.	10	23,91
4.	15	27,78
5.	20	49,29
6.	25	56,16
7.	30	68,66
8.	35	87,71
9.	40	95,45

Untuk menganalisis Tabel 6.11 untuk mencari pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan diameter maksimum akan dilakukan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan regresi.



a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 0,991. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase MRSA yang berubah bentuk mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
1	16	0,012

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai *sig.* adalah sebesar 0,012. Nilai ini kurang dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk tolak Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang beda atau tidak memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk

mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata persentase MRSA yang berubah bentuk antar kelompok perlakuan paparan gelombang ultrasonik.

Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh dari hasil pengolahan data:

Tabel 6.12 hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan ozon dengan perubahan warna sel MRA menjadi pink

Regression Analysis: MRSA pink versus waktu paparan ozon

The regression equation is

$$\text{MRSA} = - 3.93 + 2.50 \text{ ozon}$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-3.933	2.447	-1.61	0.152
ozon	2.4951	0.1028	24.27	0.000

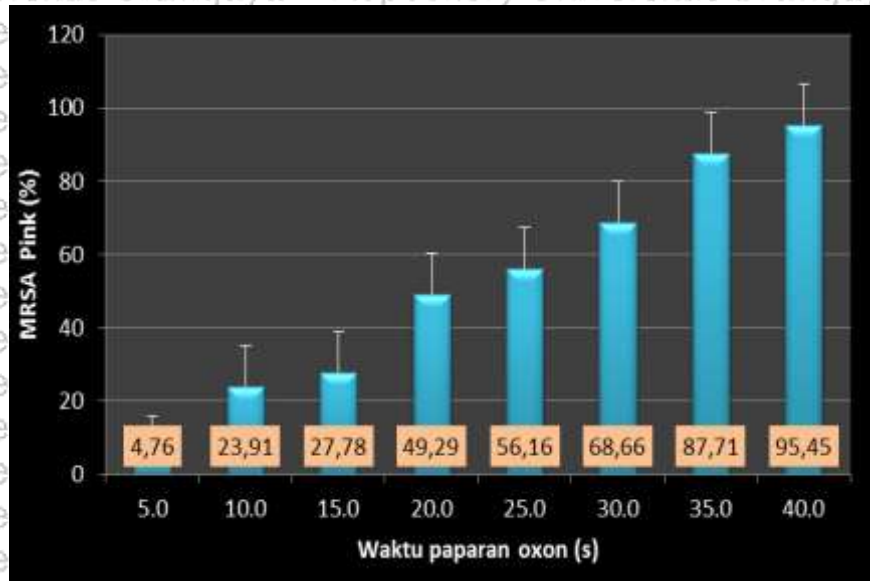
S = 3.98087 R-Sq = 98.8% R-Sq(adj) = 98.7%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	9338.3	9338.3	589.27	0.000
Residual Error	7	110.9	15.8		
Total	8	9449.2			

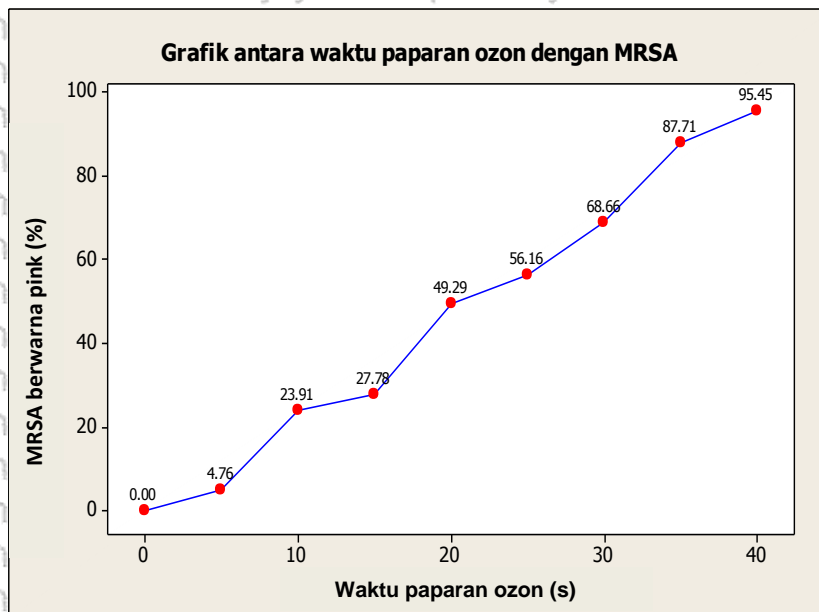
Berdasarkan Tabel 6.12 dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,000. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan rata-rata persentase MRSA yang berubah warna menjadi pink dengan waktu paparan ozon. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan ozon berpengaruh signifikan terhadap persentase perubahan warna MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data persentase MRSA yang berubah warna antar kelompok perlakuan paparan ozon yang digunakan dengan data ramalannya maka ditampilkan diagram batang dan grafik berikut :

Diagram batang



Gambar 6.27 Diagram batang antara waktu paparan ozon dengan MRSA berwarna pink, terlihat bahwa semakin bertambahnya waktu paparan ozon MRSA yang mati (MRSA pink) semakin banyak

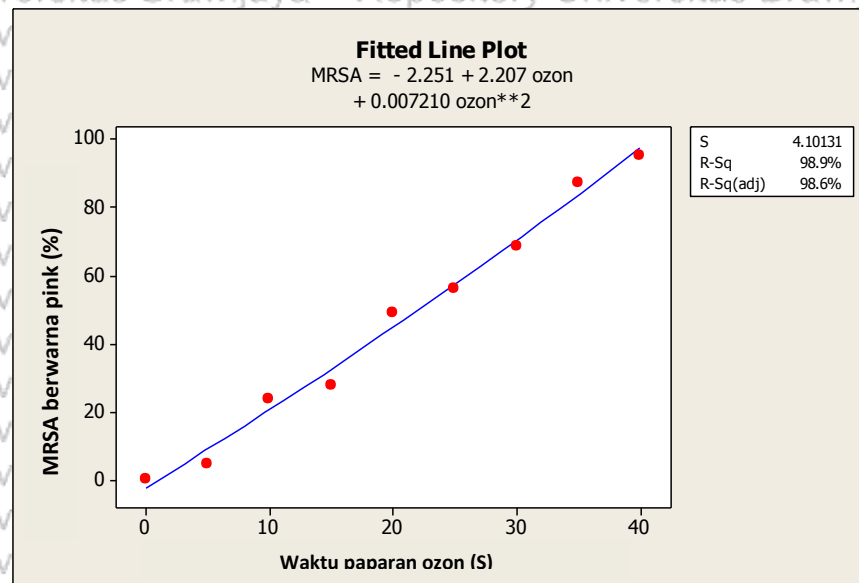
Sebaran data antara waktu paparan ozon dengan perubahan warna sel MRSA disajikan dalam gambar 6.28



Gambar 6.28 Grafik pengaruh waktu paparan ozon terhadap sel MRSA yang berubah menjadi pink



Grafik persamaan regresi



Gambar 6.29 Grafik pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan warna Sel MRSA dari ungu menjadi pink

Titik merah pada gambar 6.29 menunjukkan pola sebaran pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen perubahan warna sel MRSA. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 98,9% yang berarti bahwa 98,9 % variasi persentase MRSA yang berubah warna dari ungu menjadi pink (W) dipengaruhi oleh waktu paparan ozon (t), sementara 1,1 % lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak dimasukkan dalam model regresi. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$W(t) = -2,251 + 2,207 t + 0,007210 t^2$$

6.8 Pembahasan Percobaan Tahap 2

Ozon dihasilkan oleh generator ozon yang dibuat *West technology co., ltd*, yang menghasilkan ozon 400 mg/jam. Ini berarti bahwa jumlah ozon yang dihasilkan tergantung dari waktu paparan. Hasil pengamatan pengaruh waktu paparan ozon terhadap konsentrasi ozon di aquades(C) dinyatakan dengan persamaan:

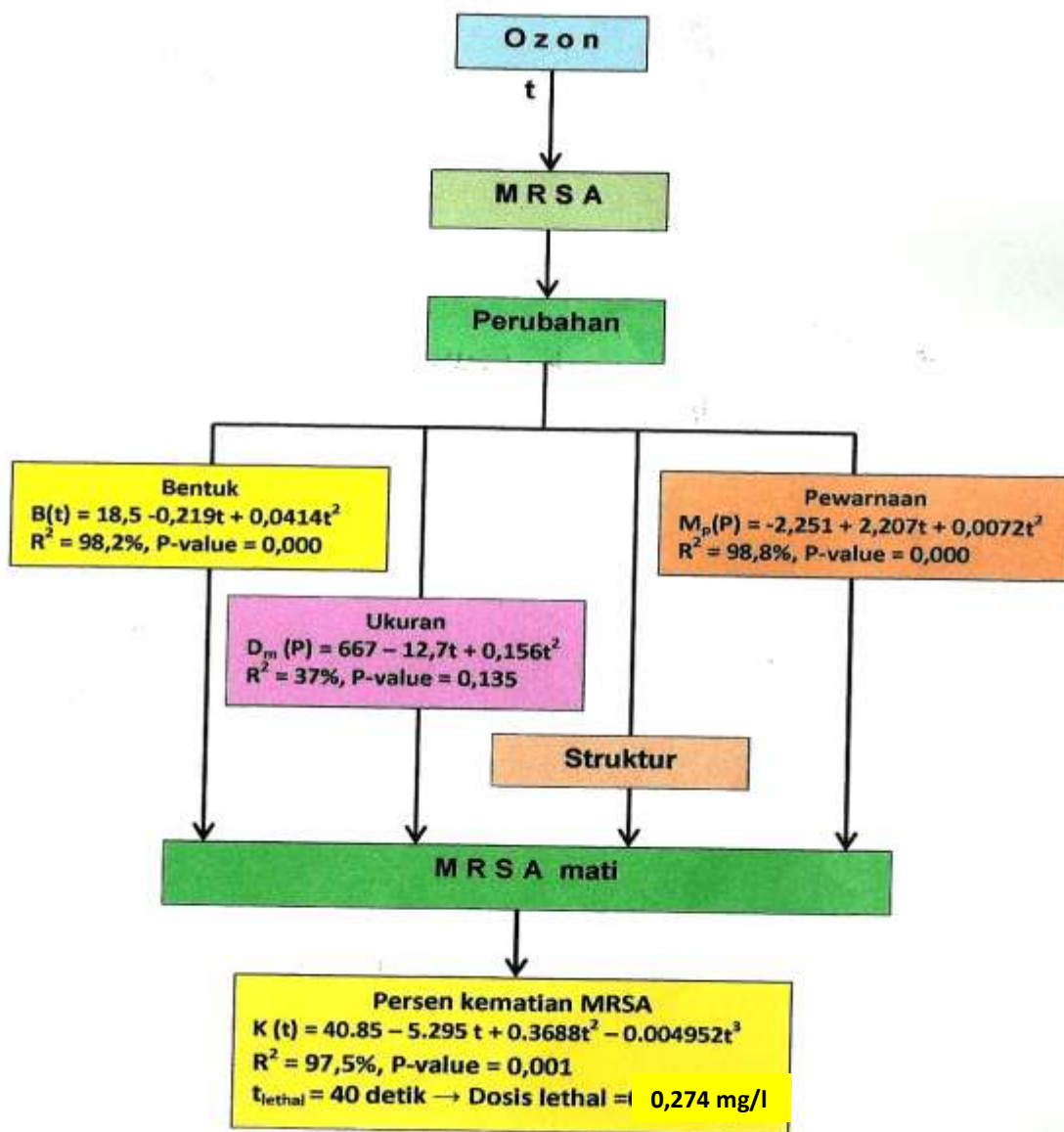
$C(t) = 0.00684t$ dengan $R^2 = 98,2\%$ dan $P\text{-value} = 0,000$. Dari persamaan tersebut di atas menunjukkan bahwa konsentrasi ozon di aquades mempunyai pengaruh sangat signifikan terhadap waktu paparan. Oleh karena itu untuk percobaan selanjutnya variabel bebasnya menggunakan waktu paparan, dan untuk mengetahui dosis ozon tinggal dikonversi ke persamaan tersebut diatas.

Menurut Leusink (2010), jika ozon mengenai dinding sel bakteri terjadi ledakan oksidatif yang dapat menciptakan lubang kecil di dinding sel, sehingga dinding sel tidak dapat mempertahankan bentuknya dan sel mati.

Dari hasil percobaan pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA (K) dinyatakan dengan persamaan:

$$K(t) = 40.85 - 5.295 t + 0.3688.t^2 - 0.004952.t^3$$

dengan $R^2 = 97,5\%$ dan $P\text{-value} = 0,000$. Dari hasil percobaan diatas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa waktu paparan ozon berpengaruh sangat signifikan terhadap persen kematian MRSA, sedangkan pengaruhnya sebesar 99,8%. Dari hasil percobaan persen kematian MRSA sebesar 99,63% terjadi saat dipapari ozon dalam waktu 40 detik. Untuk mencari dosis lethalnya $t = 40$ detik dimasukkan kedalam persamaan $C(t) = 0.00684t$ sehingga diperoleh dosis lethalnya = 0.274 mg/liter. Hasil ini didukung oleh pengamatan mikroskopik dengan SEM untuk mengamati morfologi dan ukuran sel MRSA, TEM untuk mengamati perubahan struktur sel, dan pewarnaan gram untuk mengamati perubahan warna sel MRSA dari ungu menjadi pink.



Gambar 6.30 Bagan hasil penelitian pengaruh waktu paparan ozon terhadap persen kematian MRSA

Dari Gambar 6.30 terlihat bahwa persen kematian MRSA pada pengamatan makroskopis (kultur MRSA di Chromagar MRSA) didukung oleh pengamatan miroskopik, yang meliputi perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan sel.



1. Perubahan bentuk sel MRSA

Akibat efek kimia, sel MRSA mengalami perubahan bentuk, yang semula berbentuk bulat menjadi tidak bulat (oval, persegi, atau tidak beraturan). Hasil uji regresi pengaruh waktu paparan ozon (t) terhadap perubahan bentuk (B) dinyatakan dengan persamaan:

$$B(t) = 18,5 - 0,219t + 0,0414t^2 \text{ dengan } R^2 = 98,2\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,000.$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa waktu paparan ozon berpengaruh sangat signifikan terhadap perubahan bentuk MRSA, perubahan bentuk yang dipengaruhi oleh waktu paparan ozon sebesar 98,2%, sedangkan sisanya 1,8% dipengaruhi oleh variabel lain. Perubahan bentuk Sel MRSA terbanyak akibat efek kimia sebesar $(46,86 \pm 20,88)\%$

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Perubahan ukuran sel MRSA adalah perubahan diameter maksimum sel MRSA akibat dipapari ozon dalam waktu beragam, dibandingkan dengan diameter maksimum MRSA kontrol. Pengaruh waktu paparan ozon terhadap perubahan ukuran dinyatakan dengan persamaan regresi:

$$D_m(t) = 667 - 12,7t + 0,156t^2 \text{ dengan } R^2 = 37\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,135.$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} > \alpha$ ini berarti bahwa waktu paparan ozon berpengaruh tidak signifikan terhadap perubahan diameter maksimum MRSA, waktu paparan ozon hanya berpengaruh sebesar 37% sedangkan yang 63% dipengaruhi oleh variabel lain.



3. Perubahan struktur sel MRSA

Kuantisasi hasil pengamatan perubahan struktur sel MRSA dengan TEM yang teramati tidak dapat dilakukan, berbeda dengan pengamatan morfologi sel MRSA dengan SEM. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa terjadi perubahan struktur dari semula berbentuk bulat berwarna hitam (MRSA kontrol) menjadi berubah tidak seperti MRSA kontrol. Probabilitas terbesar perubahan struktur sel MRSA disebabkan oleh efek kimia.

4. Perubahan warna sel MRSA

Perbedaan warna sel MRSA masih hidup dan yang sudah mati adalah yang masih hidup berwarna ungu, sedangkan yang sudah mati berwarna pink (merah muda). Dari hasil percobaan pengaruh waktu paparan ozon terhadap MRSA yang berwarna pink (M_p) diperoleh hasil:

$$M_p(t) = -2,251 + 2,207t + 0,007t^2 \text{ dengan } R^2 = 98,8\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,000$$

Dari hasil percobaan diatas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha$ ini berarti bahwa waktu paparan ozon berpengaruh sangat signifikan terhadap perubahan pewarnaan sel, sedangkan pengaruhnya sebesar 98,8% sedangkan hanya 1,2% dipengaruhi oleh variabel lain.

6.9 Kesimpulan

Dari hasil percobaan tahap 2 dapat disimpulkan bahwa:

1. Ada pengaruh sangat signifikan antara dosis paparan ozon terhadap persen kematian MRSA, dan dosis lethalnya adalah 0,274 mg/liter.
2. Kematian MRSA terjadi secara nekrosis. Kematian MRSA sebagian besar terjadi akibat efek kimia, dinding sel mengalami kerusakan sehingga menimbulkan lubang yang mengakibatkan sitoplasma



keluar melalui lubang tersebut. Hal ini ditandai dengan perubahan bentuk yang semula bulat menjadi tidak bulat, ukurannya berbeda dari sel kontrol, strukturnya selnya berubah dari gelap menjadi transparan, serta pewarnaan selnya berubah dari ungu menjadi merah muda. Perubahan bentuknya sebagian besar disebabkan oleh efek kimia.

6.10 Saran

- Otomatisasi generator ozon untuk mengatur waktu paparan ozon yang teliti sangat diperlukan.
- Untuk menimbulkan kerusakan sel MRSA yang lebih parah, diperlukan penelitian yang melibatkan gabungan metode fisika dan kimia, metode tersebut adalah kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon yang digunakan untuk memapari MRSA secara simultan.



BAB 7

PENELITIAN TAHAP 3

Ultrasonik - Ozon Untuk Membunuh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Melalui Stres Mekanik, Kavitasi, Dan Efek Kimia**7.1 Latar Belakang Masalah**

Metode ultrasonik-ozon adalah metode yang relatif baru, yaitu suatu metode yang menggabungkan antara gelombang ultrasonik dengan gas ozon.

Gelombang ultrasonik adalah gelombang mekanik yang frekuensinya lebih dari 20 kHz. Gelombang ini mampu membunuh bakteri melalui stres mekanik, kavitasi, serta efek kimia (Ackerman, 1988; Hudori, 2002; Dehghani & Hadi, 2005; Srinivasa & Linga, 21013), sedangkan ozon mampu mengoksidasi berbagai jenis bakteri, spora, jamur, protozoa, bahan organik lainnya (Sastroasmoro *et al*, 2004; Seidler *et al*, 2008; Jani *et al*, 2012).

Bila suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terpapar oleh gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan. Bakteri tersebut akan mengalami kerusakan secara fisika dan kimiawi. Kerusakan fisika yang ditimbulkan oleh gelombang ultrasonik, berupa sters mekanik, kavitasi, peningkatan suhu medium, serta timbulnya hidrogen peroksida. Sedangkan Ozon menyebabkan kerusakan dinding sel bakteri akibat terjadinya oksidasi. Untuk mengetahui efektivitas dan hasil dari metode ini diperlukan penelitian yang seksama, tampilan fisik bakteri yang telah mati diperlukan untuk mengetahui penyebab kematian bakteri *MRSA*



7.2 Masalah Penelitian

1. Bagaimana pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan Ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik kavitasi dan efek kimia?
2. Bagaimana tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan?
3. Bagaimana tingkat kerusakan sel MRSA akibat paparan gelombang ultrasonik, ozon, dan kombinasi gelombang ultrasonik - ozon, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan perubahan warna sel MRSA?

7.3 Tujuan Penelitian

7.3.1 Tujuan umum

Mencari pengaruh kombinasi paparan gelombang ultrasonik-ozon sebagai metode alternatif untuk membunuh *Methicillin Resistan Staphylococcus aureus in vitro*.

7.3.2 Tujuan khusus

1. Menemukan pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia.
2. Mengamati dan menganalisis tingkat kerusakan sel MRSA akibat dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan.
3. Membandingkan dan menganalisis tingkat kerusakan sel MRSA akibat paparan gelombang ultrasonik, ozon, dan kombinasi gelombang ultrasonik - ozon, dengan indikator perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan perubahan warna sel MRSA.



7.4 Manfaat Penelitian

7.4.1 Manfaat Akademis

1. Dapat digunakan sebagai informasi ilmiah sebagai metode alternatif

Untuk membunuh dan mengendalikan pertumbuhan MRSA.

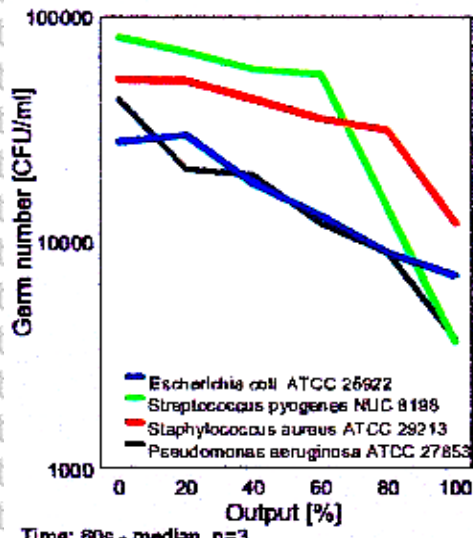
2. Untuk melengkapi data metode pengendalian mikroorganisme secara fisika pada teks book mikrobiologi.

7.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai penelitian pendahuluan untuk memanfaatkan metode ultrasonik-ozon untuk mempercepat proses penyembuhan luka kronis

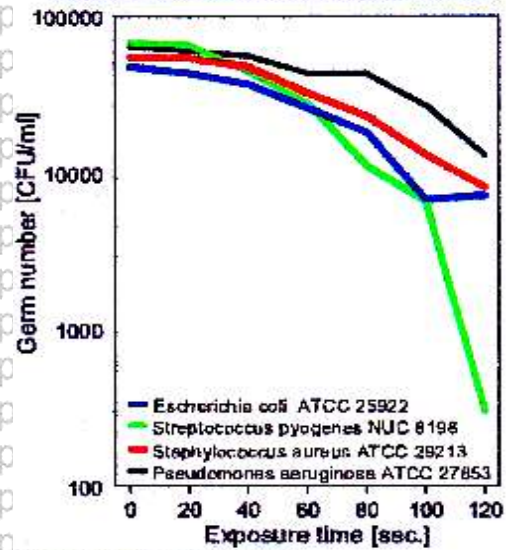
7.5 Kerangka Teori

Gelombang ultrasonik dapat membunuh infeksi bakteri, virus, dan jamur dan meninggalkan tempat tidur luka pembedahan steril. Beberapa makalah telah menunjukkan sonoca 180 efektivitas dalam pemberantasan agen sulit seperti *Staphylococcus aureus*, *streptokokus pyogenes*, dan *pseudomonas aeruginosa*. Efek bakterisidal sangat bermanfaat untuk menyembuhkan luka yang sulit untuk disembuhkan. (Torke, 2004). Dengan Menggunakan berbagai tes diterapkan pada kondisi standar, dimungkinkan untuk membuktikan efek bakterisidal dari gelombang ultrasonik frekuensi rendah yang dihasilkan oleh sonoca 180 in vitro. Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 7.1

**Bactericides' dependence on the output**

Time: 60s - median, n=3

(a)

Time dependence of the bactericides

Output: 60% - median, n=3

(b)

Gambar 7.1 Grafik Hasil paparan gelombang ultrasonik terhadap bakteri. Semua strain bakteri menunjukkan penurunan: (a) efek bakterisidal yang dicapai tergantung pada tingkat output yang dipilih. (b) waktu paparan (Schulze *et al*, 2004).

Dari Gambar 7.1(a) di atas terlihat bahwa semakin besar output dari probe yang berbentuk batang semakin besar pula populasi bakteri yang tereduksi. Besarnya bakteri yang tereduksi tidak linier dengan outputnya. Bakteri *Streptococcus pyogenes* NUC 8198 mempunyai gradien paling negatif dibandingkan bakteri yang lain. Hubungan antara waktu paparan gelombang ultrasonik dengan jumlah bakteri ditunjukkan pada grafik pada Gambar 6.1(b) terlihat bahwa semakin lama waktu paparan gelombang ultrasonik jumlah bakteri yang tereduksi semakin besar, tetapi penurunan ini tidak linier. Penurunan yang tajam terlihat pada bakteri *Streptococcus pyogenes* NUC 8198.

Ozon merupakan germisida kuat, hanya dibutuhkan beberapa mikrogram per liter saja untuk bisa membunuh kuman. Pada konsentrasi H_2O $1\ g/m^3$ suhu $1^\circ C$, ozon dapat menginaktivasi Coliform, *Staphylococcus aureus* dan *Aeromonas hydrophilia* dengan cepat. Kecepatan inaktivasi



enterovirus lebih cepat lagi dibandingkan dengan E. Coli. Pada bakteri, ozon mengganggu integritas kapsul sel bakteri melalui oksidasi fosfolipid dan lipoprotein. Ozon juga terbukti dapat berinteraksi dengan protein (Sunnen, 2005).

Pada suatu studi yang menyelidiki efek ozon terhadap E. Coli, ditemukan bukti bahwa ozon dapat berpenetrasi ke dalam membran sel, bereaksi dengan substansi sitoplasma dan mengubah circular plasmid DNA tertutup menjadi circular DNA terbuka, yang dapat mengurangi efisiensi proliferasi bakteri (sunnen, 2005). Ozon juga dapat berpenetrasi ke kapsul sel bakteri, mempengaruhi secara langsung integritas cytoplasmic, dan mengganggu beberapa tingkat kompleksitas metabolik. Bakteri yang rentan terhadap efek desinfeksi ozon: *Salmonella*, *Streptokokus*, *Shigela*, *Legionella pneumophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacteria*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Eschericia Coli* (Sunnen, 2000).

Pada virus, ozon merusak kapsid virus dan mengganggu siklus reproduksi dengan menghambat kontak virus ke sel melalui peroksidasi. Kebanyakan penelitian tentang efek virus difokuskan pada kemampuannya untuk memecah molekul lipid. Pada suatu studi, polio virus tipe 1 dipaparkan dengan ozon 0,21 mg/liter pada pH 7,2. Setelah 30 detik, 99% dari virus menjadi inaktif (kehilangan kemampuannya untuk bereplikasi dalam sel host), tapi tetap mempertahankan integritas strukturalnya. Dari analisa komponen virus terlihat adanya kerusakan pada rantai polipeptida dan protein kapsul yang dapat mengakibatkan hilangnya kemampuan untuk mempertahankan struktural dan pecahnya single stranded RNA menjadi dua bagian yang mengakibatkan terjadinya gangguan replikasi. Peneliti



lain pada percobaan yang sama Menyimpulkan bahwa terapi ozon dapat merusak kapsid virus (Sastroasmoro dkk, 2004).

Metode ultrasonik-ozon adalah gabungan antara gelombang ultrasonik dan ozon yang digunakan untuk membunuh bakteri. Dari paparan diatas metode pengendalian bakteri dengan menggunakan gelombang ultrasonik membnerikan hasil yang baik. Demikian juga dengan pemanfaatan ozon untuk mereduksi bakteri juga terbukti efektif untuk membunuh bakteri. Bagaimana jika kedua metode tersebut digabungkan? Untuk mengetahui akibat paparan gelombang ultrasonik-ozon terhadap persen kematian bakteri *Staphylococcus aureus* melalui sterss mekanik, kavitasi, serta efek kimia diperlukan penelitian untuk membuktikannya.

7.6 Metode Penelitian

7.6.1 Rancangan penelitian

a. Tahap Persiapan

Persiapan pada penelitian tahap 3 ini meliputi:

- Seting peralatan yang akan digunakan
- Mensiapkan suspensi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

b. Tahap Pelaksanaan Penelitian

Pada penelitian tahap 3 ini, merupakan gabungan antara Penelitian tahap 1 dan 2. Frekuensi, dan daya efektif yang telah ditemukan pada percobaan tahap 1, digabungkan dengan dosis efektif ozon. Penelitian tahap 3 diarahkan untuk mencari tingkat kerusakan sel akibat pemaparan gelombang ultrasonik dan ozon secara bersama-sama, serta mengetahui perubahan profil protein Methicillin Resistant *Staphylococcus* dibandingkan dengan kontrol.



7.6.2 Populasi dan Sampel Penelitian

a. Populasi

Populasi penelitian ini adalah 1 liter suspensi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* yang telah dibiakan dalam tabung elenmeyer.

b. Sampel

Sampel penelitian : 100 ml bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang diambil dari populasi. Jumlah replikasi ditentukan berdasarkan rumus replikasi sampel dari Federer:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

dengan t : banyaknya perlakuan

r : replikasi/ulangan

Uji normalitas dan homogenitas diperlukan untuk mengetahui apakah sampel diambil dari populasi sudah berdistribusi normal atau sudah homogen.

7.6.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian direncanakan dalam waktu 2 bulan Untuk menentukan dosis efektif ozon untuk membunuh MRSA dilakukan di Labolatorium Gastroenteritris dan Samonellosis Institut Tropical Desease Universitas Airlangga Surabaya, untuk mengamati persen kematian MRSA. Sedangkan pengamatan dan pemotretan gambar terkait dengan tingkat kerusakan sel MRSA dilakukan di Laboratorium Mikroskop Elektron Universitas Negeri Malang (pengamatan SEM), dan Universitas Gajahmada (pengamatan TEM).

7.6.4 Variabel dan indikator penelitian

Variabel penelitian tahap 3 meliputi gabungan dari penelitian tahap 1 dan tahap 2. Generator ultrasonik di setting pada frekuensi efektif (26 kHz) dan daya lethal (8,4 watt) (hasil penelitian tahap1), waktu paparan ozon divariasi



kemudian dipaparkan pada suspensi MRSA. Menentukan persen kematian MRSA beserta kerusakan sel MRSA pada tahap 3 akan dibandingkan dengan kerusakan sel bakteri tahap 1 dan 2.

7.6.4.1 Variabel penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian tahap 3 adalah : durasi waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon.

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian tahap 3 ini adalah % kematian MRSA, dan tingkat kerusakan sel MRSA.

c. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah: kultur murni MRSA, lama inkubasi, media bakteri, pH air garam fisiologis, frekuensi dan daya gelombang ultrasonik.

7.6.4.2 Indikator penelitian

Indikator penelitian tahap 3 adalah kerusakan fisik sel MRSA yang telah mati setelah terpapar gelombang ultrasonik-ozon, yang meliputi : Kerusakan sel MRSA akibat stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia yaitu perubahan : bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram sel MRSA.

7.6.5 Definisi Operasional Variabel

- Metode ultrasonik – ozon adalah suatu metode yang menggabungkan antara gelombang ultrasonik dengan ozon yang digunakan untuk memapari suspensi MRSA.

- Dosis gabungan antara gelombang ultrasonik dan ozon adalah waktu paparan gelombang ultrasonik dan ozon untuk membunuh MRSA



in vitro melalui stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.

- Persen kematian bakteri MRSA adalah pebandingan antara jumlah bakteri yang mati dengan jumlah bakteri kontrol.

7.6.6 Alat dan Bahan Penelitian

7.6.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- *Function generator* berfungsi untuk pengatur frekuensi, dan pembangkit pembangkit tegangan.
- *Osiloskop* berfungsi sebagai pengukur frekuensi dan tegangan yang dikeluarkan oleh *function generator*.
- *Tweeter piezoelectric* berfungsi untuk pembangkit gelombang ultrasonik
- *Power amplifier* berfungsi sebagai penguat daya yang dikeluarkan oleh *function generator*.
- Generator ozon berfungsi untuk menghasilkan gas ozon.
- *Optical density* berfungsi untuk mengukur kerapatan suspensi MRSA.
- Mikroskop elektron berfungsi untuk mengamati tingkat kerusakan sel MRSA sebelum dan setelah dipapari gelombang ultrasonik.
- *Autoclave* berfungsi untuk mensterilkan peralatan yang akan digunakan untuk penelitian.
- *Microwave* untuk memasak media yang digunakan untuk mengkultur MRSA.
- *Colony counter* berfungsi untuk menghitung jumlah koloni MRSA secara manual.
- Neraca digital berfungsi untuk mengetahui massa media kultur yang akan digunakan.
- *Stopwatch* digunakan untuk mengukur lamanya percobaan dilakukan.



- Ose digunakan untuk mengambil bakteri dari tabung reaksi
- Inkubator berfungsi untuk mengikubasi kultur MRSA
- Peralatan yang terbuat dari gelas : cawan petri (diameter 10 cm), tabung reaksi, tabung elenmeyer, 400 ml, gelas ukur 400 ml, mikro pipet, gelas obyek, gelas penutup, dan pembakar bunsen.

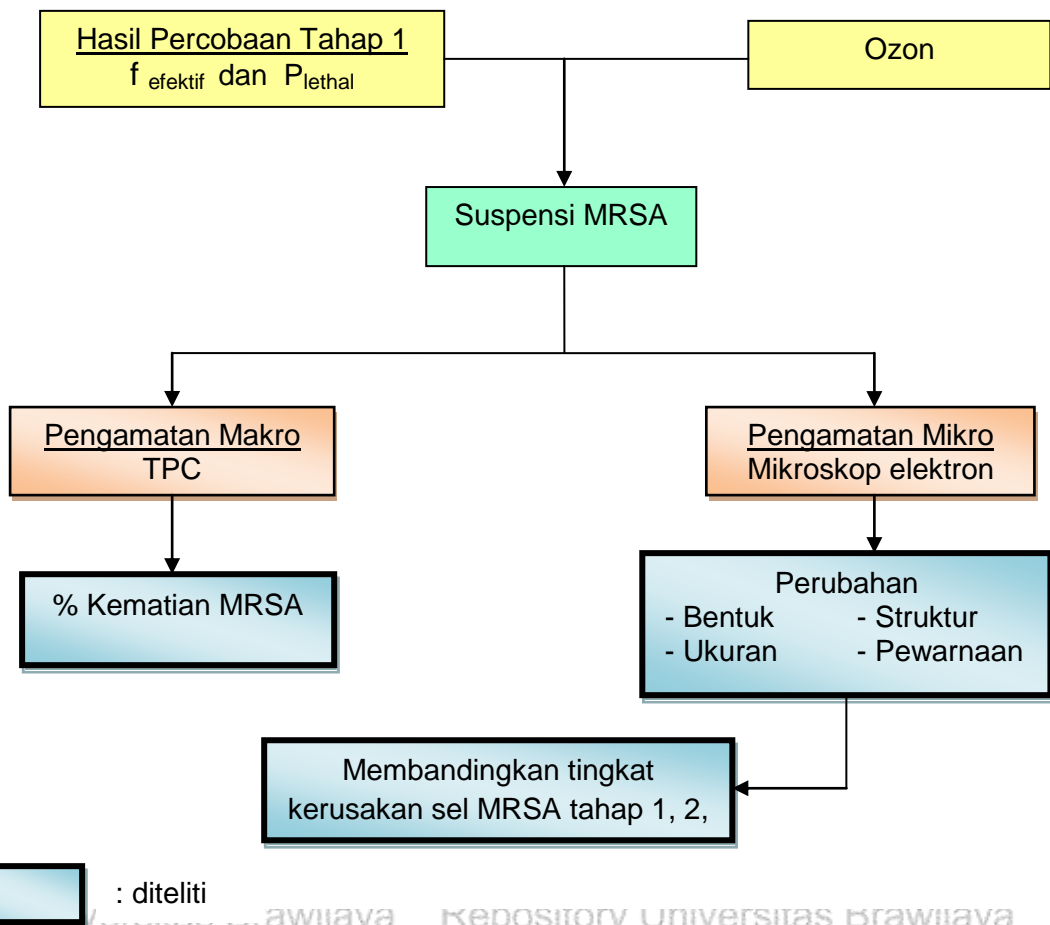
7.6.6.2 Bahan penelitian

- Isolat MRSA
- *Luria bertani broth*
- *CHROMagar MRSA*
- *Crystal violet*
- *Safranin*
- *Lugol*
- Air gratis
- Alkohol 70% dan 90%
- Aquades
- K a p a s dan plastik wrap
- Almunium foil

7.6.7 Alur dan Prosedur Penelitian

7.6.7.1 Alur penelitian

Pada penelitian tahap 3 difokuskan pada pemanfaatan gelombang ultrasonik dan ozon secara bersamaan untuk membunuh MRSA, dengan mencari waktu paparan minimum yang mampu menimbulkan persen kematian MRSA. maksimum. Parameter yang diamati adalah kerusakan bakteri MRSA akibat stress mekanik, kavitasi, serta efek kimia. Berikut ini alur penelitian tahap 3 (Gambar 7.2).

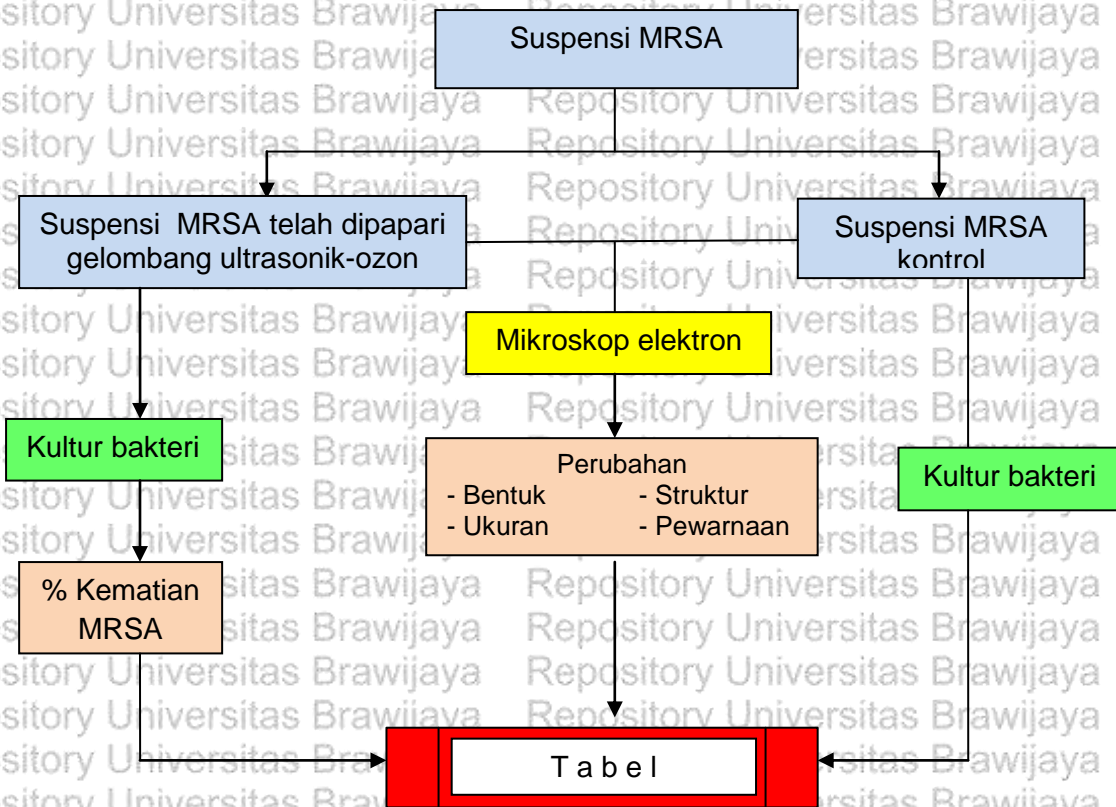


: diteliti

Gambar 7.2 Alur penelitian tahap 3. Suspensi MRSA dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik (frekuensi efektif = 26 kHz dan daya lethal = 8,4 watt) dan ozon selama: 10, 20, 30, dan 40 detik. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan menggunakan metode TPC untuk mengetahui persen kematian MRSA. Pengamatan secara mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektron untuk mengetahui perubahan bentuk dan ukuran (SEM), struktur (TEM) serta pewarnaan gram untuk mengetahui perubahan warna sel MRSA.

7.6.7.2 Prosedur Penelitian

Pada penelitian tahap 3 prosedur penelitian, diarahkan untuk mengetahui: % kematian MRSA, dan tingkat kerusakan sel MRSA. Hasil ini dibandingkan dengan percobaan tahap 1, 2, dan 3. Gambar 6.2 di bawah ini adalah prosedur pengumpulan data tahap 3.



Gambar 7.3. Prosedur pengumpulan data penelitian tahap 3

Percobaan tahap 3 merupakan gabungan hasil dari percobaan tahap 1 dan tahap 2. Mengambil suspensi MRSA pada tabung elenmeyer sebagian dibuat sebagai kontrol dan sebagian diberi perlakuan berupa paparan gelombang ultrasonik-ozon dengan waktu paparan tetap, frekuensi dan daya lethal telah diperoleh dari percobaan tahap 1, sedangkan waktu paparan dibuat beragam. Setelah dipapari dengan gelombang ultrasonik-ozon, bakteri perlakuan dan kontrol dikultur dalam cawan petri yang berisi Chromagar MRSA. Pengamatan tingkat kerusakan selnya dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektron.

Prosedur untuk menemukan tingkat kerusakan sel MRSA akibat kombinasi paparan gelombang ultrasonik dan ozon

1. Merangkai peralatan seperti pada gambar 5.4
2. Menghubungkan function generator, osiloskop, penguat daya



gelombang ultrasonik dan generator ozon dengan sumber tegangan listrik.

3. Mengambil masing - masing 0,2 ml suspensi MRSA kemudian dimasukkan kedalam 6 cawan petri yang berisi Chromagar MRSA , yang digunakan sebagai kontrol.

4. Memasukkan cawan petri tersebut ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

5. Memapari 100 ml suspensi MRSA dengan frekuensi efektif 26 kHz, daya lethal 8,4 watt, dan ozon dengan waktu paparan berturut-turut 10 , 20 , 30 dan 40 detik.

6. Mengambil suspensi MRSA masing - masing 0,2 ml kemudian dimasukkan ke dalam 6 cawan petri yang berisi Chromagar MRSA.

7. Cawan petri ini diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C, yang digunakan sebagai perlakuan.

8. Setelah diinkubasi selama 24 jam, menghitung jumlah koloni MRSA kontrol dan perlakuan, kemudian memasukkan hasilnya kedalam tabel ompong.

9. Menghitung persen kematian MRSA

10. Mengambil 40 ml suspensi MRSA yang telah diberi perlakuan dimasukkan ke dalam 4 tabung sentrifuge kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm dalam waktu 15 menit.

11. 9,5 ml suspensi MRSA dibuang sehingga tinggal 0,5 ml ekstrak suspensi MRSA.

12. Memasukkan ekstrak suspensi MRSA ke dalam tabung reaksi kecil dengan menggunakan mikro pipet.

13. Mengambil suspensi MRSA diambil dengan menggunakan ose



kemudian diletakkan dikaca obyek untuk diwarnai dengan pewarnaan gram (prosedur pewarnaan di Lampiran 11).

14. Mengamati hasil pewarnaan gram dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000 kali.

15. Mengambil ekstrak suspensi MRSA dengan menggunakan ose kemudian diletakkan di cover glass untuk diamati menggunakan mikroskop elektron (SEM).

16. Mengamati tingkat kerusakan sel MRSA dengan menggunakan mikroskop elektron.

17. Mengamati dan memfoto MRSA dengan mikroskop elektron meliputi : perubahan bentuk, ukuran, struktur, dan pewarnaan gram.

7.6.8 Teknik analisis data

a. Uji normalitas dan homogenitas

- **Uji normalitas** digunakan untuk menentukan data yang telah dikumpulkan berdistribusi normal atau diambil dari populasi normal.

Uji normalitas pada penelitian tahap 3 ini menggunakan Shapiro Wilk.

- **Uji homogenitas** digunakan untuk mengetahui apakah data dari variabel bebas : waktu paparan ultrasonik dan ozon dan variabel tergantug: persen kematian MRSA, bersifat homogen atau tidak.

b. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat pengaruh/perbedaan rata-rata yang signifikan atau tidak antar kelompok penelitian yang digunakan.



c. Uji regresi

Uji ini digunakan untuk mengetahui hubungan fungsional antara variabel bebas dan tergantung. Pada penelitian tahap 3, variabel bebasnya waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, sedangkan variabel tergantungnya adalah % kematian bakteri *MRSA*.

7.7 Hasil Dan Analisis Data

Data hasil paparan terhadap 100 ml suspensi *MRSA* dipapari dengan dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon secara simultan, gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz, berdaya 8,4 watt dan waktu paparan 10, 20, 30, 40 detik, disajikan pada Tabel 7.1

Tabel 7.1 Data dari hasil percobaan tahap 3.

Waktu (detik)	Jumlah koloni <i>MRSA</i> kontrol (...) x 10 ⁵ CFU/ml						Jumlah koloni <i>MRSA</i> perlakuan (...)) x 10 ⁵ CFU/ml						OD
	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₅	N ₆	N ₁	N ₁	N ₁	N ₁	N ₁		
10	258	278	258	241	263	247	174	182	175	161	183	176	0,004
20	247	254	239	240	252	249	97	91	101	99	104	99	0,017
30	221	190	238	216	221	211	17	20	14	18	21	13	0,016
40	244	251	257	237	249	245	0	2	0	0	1	1	0,013

7.7.1 Pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian *MRSA*

Dari Tabel 7.1 akan dicari pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian *MRSA* dengan indikator perubahan: bentuk, ukuran, struktur, dan perubahan warna sel. Hasil analisis Tabel 7.1 akan disajikan pada Tabel 7.2

Tabel 7.2 pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dengan persen kematian MRSA

No.	Waktu (detik)	Jumlah koloni MRSA Kontrol (...) x 5.10 ⁵	Jumlah koloni MRSA perlakuan (...) x 5.10 ⁵	Kematian MRSA (%)
1.	10	257,5 ± 12,91	175,2 ± 7,88	31,96
2.	20	246,8 ± 6,18	98,5 ± 4,37	60,01
3.	30	216,2 ± 15,72	17,2 ± 3,19	92,04
4.	40	247,2 ± 6,82	0,7 ± 0,16	99,71

Dari Tabel 7.2 diatas akan diuji dengan menggunakan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan selanjutnya akan ditampilkan dalam bentuk diagram batang dan persamaan garis regresinya.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai sig. lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai sig. sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase kematian sel MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	1	1,000



Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05.

Sehingga diputuskan untuk terima hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan persentase kematian sel MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh:

Tabel 7.3 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan presentase kematian MRSA

Regression Analysis: Persentase Kematian versus waktu, Waktu^2

The regression equation is

$$\text{Persentase} = -13.4 + 4.90 \text{ Waktu} - 0.0510 \text{ Waktu}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-13.37	17.64	-0.76	0.587
Waktu	4.900	1.609	3.04	0.202
Waktu^2	-0.05095	0.03169	-1.61	0.354

S = 6.33702 R-Sq = 98.6% R-Sq(adj) = 95.9%

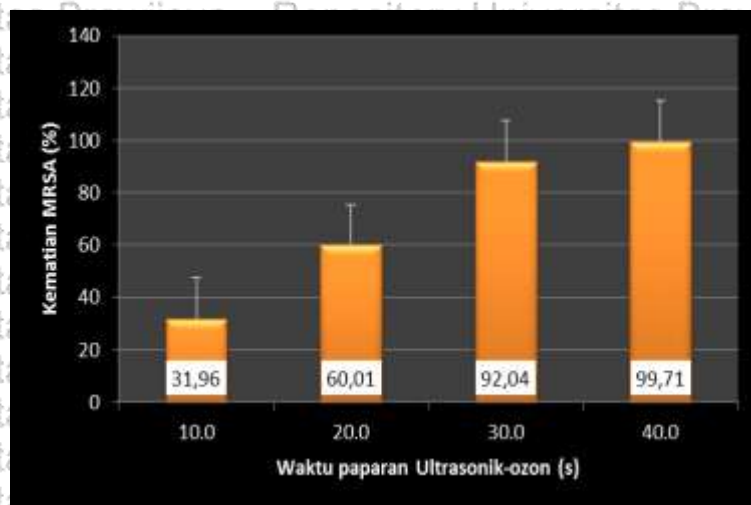
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2871.7	1435.8	35.75	0.017
Residual Error	1	40.2	40.2		
Total	3	2911.8			



Berdasarkan Tabel 7.3 di atas dapat diketahui bahwa nilai *P-value*, yang dihasilkan adalah sebesar 0,017. Nilai ini lebih kecil dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan persentase kematian sel MRSA antar kelompok perlakuan akibat waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon berpengaruh signifikan terhadap persentase kematian sel MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data persentase kematian sel MRSA antar kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon dengan data ramalannya maka ditampilkan dalam diagram batang dan grafik persamaan regresinya

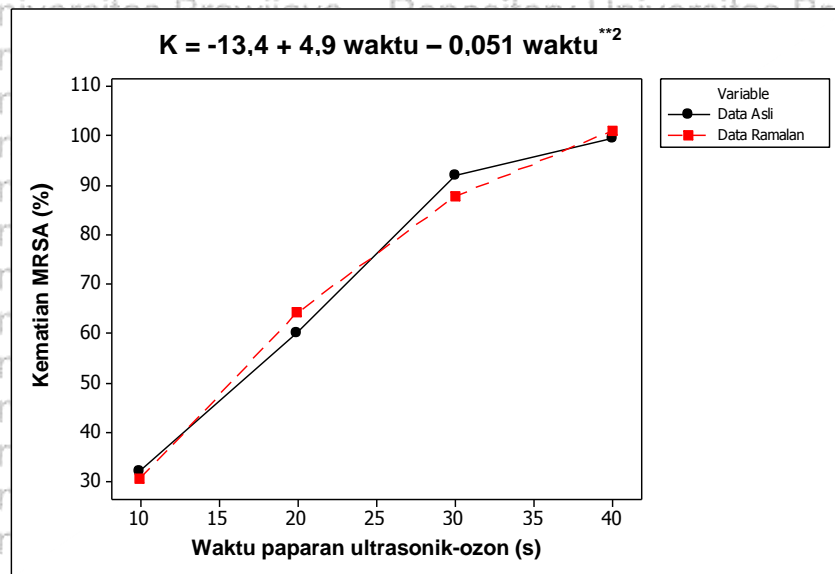
- Diagram batang



Gambar 7.4 Sebaran data antara waktu paparan gelombang ultrasonik dan ozon dengan persen kematian MRSA yang dinyatakan dengan diagram batang.



- Grafik persamaan regresi



Gambar 7.5 Grafik regresi pengaruh waktu kombinasi paparan gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon (t).

Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 98,6% yang berarti bahwa 98,6% variasi persentase kematian sel MRSA (K) dipengaruhi oleh kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon sedangkan 1,4% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikutkan dalam pemodelan. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$K(t) = -13,4 + 4,9.t - 0,0510.t^2$$

7.7.2 Pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap OD suspensi MRSA

Tabel 7.4 adalah hasil dari percobaan pemaparan 100 ml suspensi MRSA dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon.



Tabel 7.4 antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap OD

No.	Waktu (s)	Optical density (OD)
1.	10	0,004
2.	20	0,017
3.	30	0,016
4.	40	0,013

Tabel 7.4 diatas akan diuji dengan menggunakan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan regresi, selanjutnya akan ditampilkan dalam diagram batang dan grafik persamaan regresinya.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data OD mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	1	1,000



Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan OD antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 7.5 Hasil Uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan OD

Regression Analysis: OD versus Waktu, Waktu^2

The regression equation is

$$\text{OD} = -0.0140 + 0.00226 t - 0.000040 t^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-0.014000	0.007470	-1.87	0.312
Waktu	0.0022600	0.0006815	3.32	0.186
Waktu^2	-0.00004000	0.00001342	-2.98	0.206

S = 0.00268328 R-Sq = 93.1% R-Sq(adj) = 79.4%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	0.000097800	0.000048900	6.79	0.262
Residual Error	1	0.000007200	0.000007200		
Total	3	0.000105000			

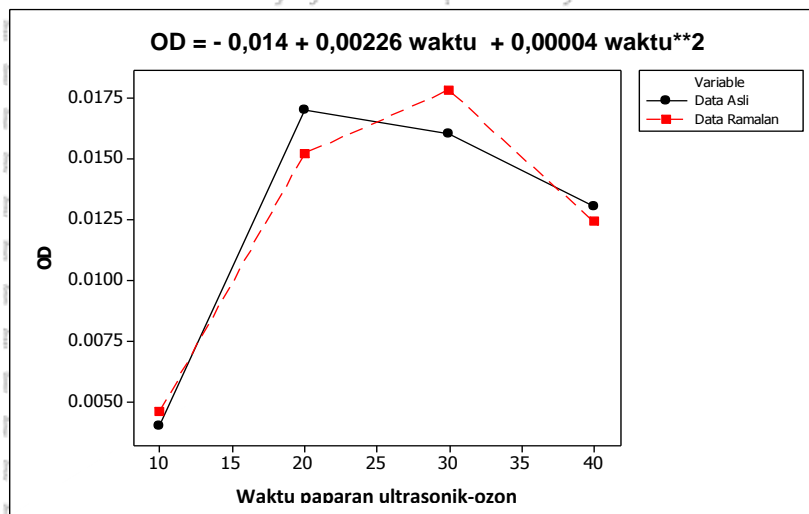
Berdasarkan Tabel 7.5 dapat diketahui bahwa nilai $P\text{-value} = 0,262$. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan OD antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang



ultrasonik-ozon. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon tidak berpengaruh signifikan terhadap OD.

Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data OD antar kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon dengan data ramalannya maka ditampilkan grafik berikut.

Persamaan garis regresi



Gambar 7.6 Grafik pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap OD suspensi MRSA.

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data prediksi dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon

sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok I waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Nilai

R-sq yang dihasilkan adalah 93,1% yang berarti bahwa 93,1% variasi OD dipengaruhi oleh kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon

sedangkan 6,9% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikuti dalam pemodelan. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$OD(t) = -0,0140 + 0,00226 t - 0,000040 t^2$$



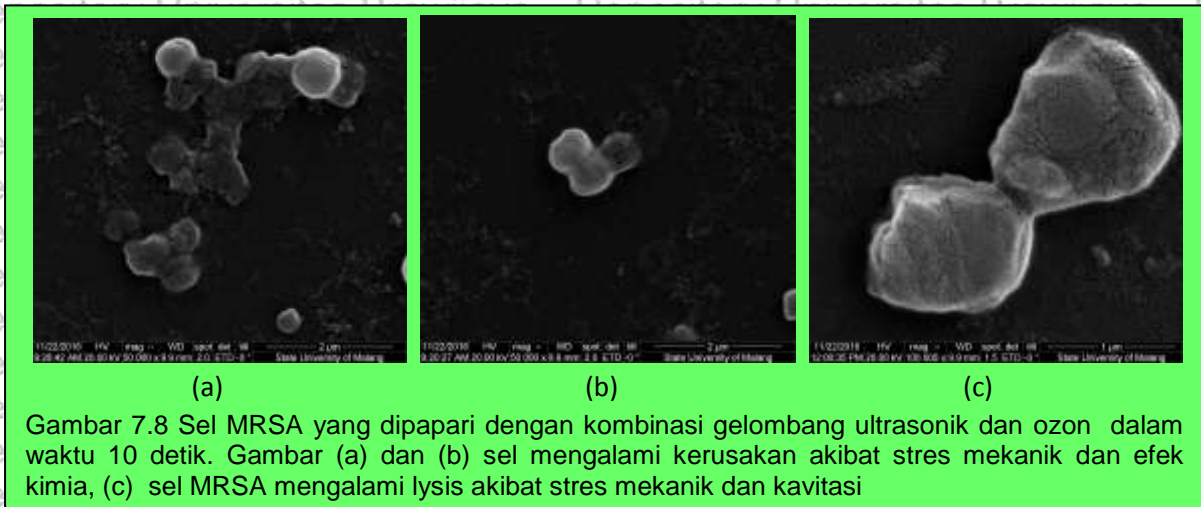
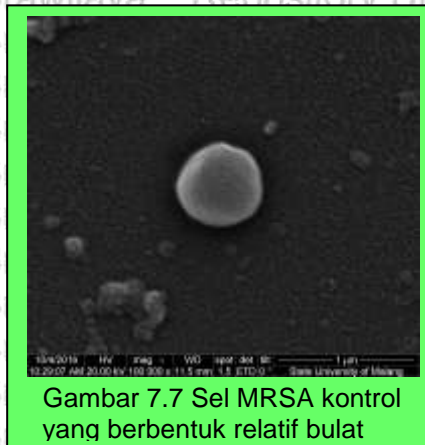
7.7.3 Indikator Kematian Sel MRSA

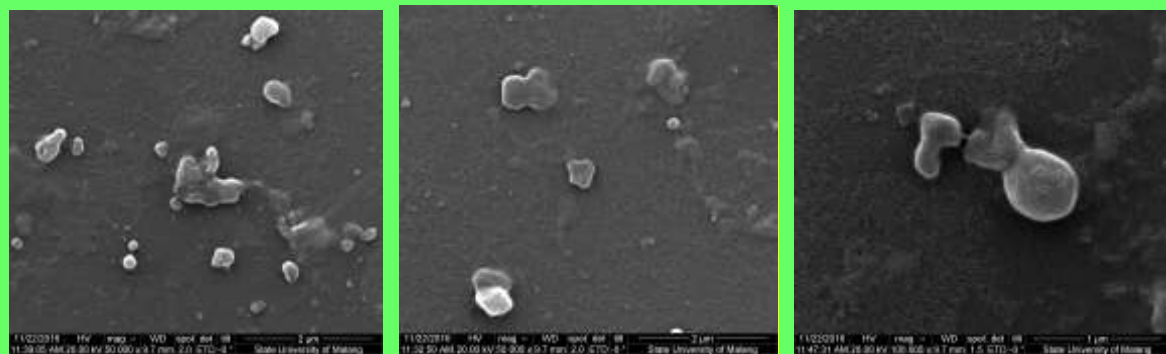
Indikator kematian MRSA adalah : Perubahan bentuk sel MRSA, ukuran sel MRSA, struktur sel MRSA dan Pewarnaan sel MRSA

1. Perubahan bentuk sel MRSA

Perubahan bentuk MRSA akibat dipapari oleh kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bulat dan tidak bulat.

Berikut ini perubahan bentuk MRSA tersebut yang diamati dengan menggunakan SEM dengan waktu paparan yang beragam (perbesaran 100.000 kali, skala 1 μm)



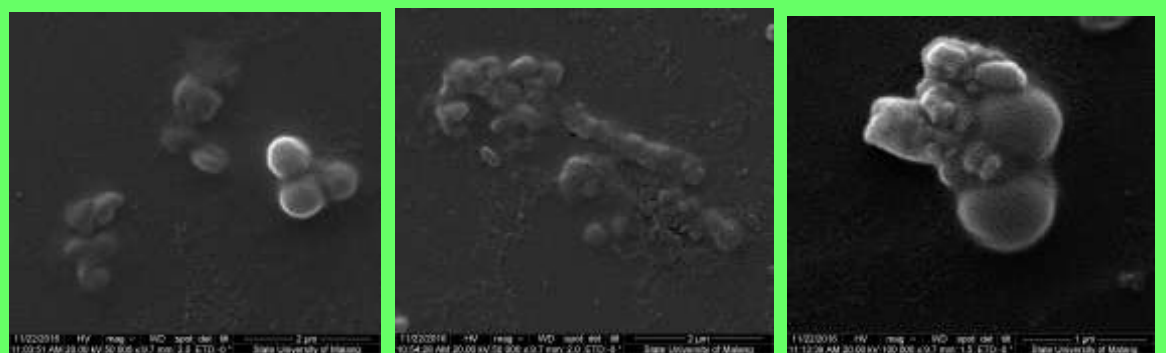


(a)

(b)

(c)

Gambar 7.9 Sel MRSA yang dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dalam waktu 20 detik. Pada gambar (a) dan (b) pecah menjadi kecil-kecil akibat kavitasi dan efek kimia, dan (c) mengalami kerusakan dinding sel dan serpihan sel MRSA

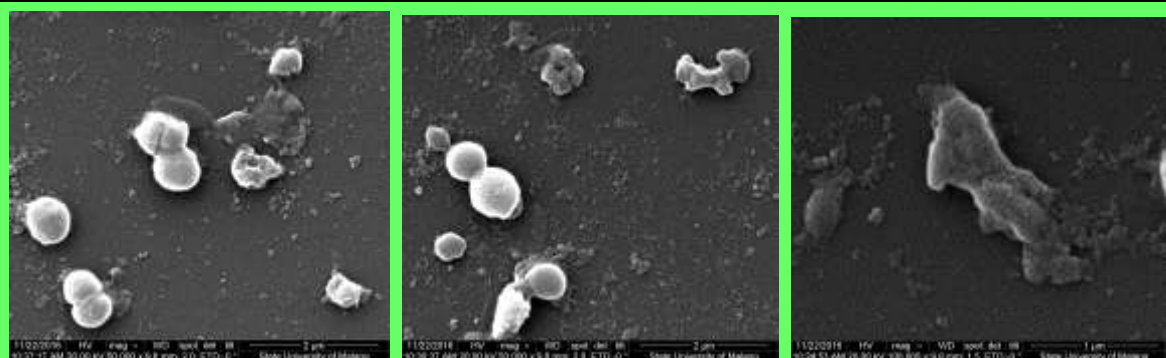


(a)

(b)

(c)

Gambar 7.10 Sel MRSA yang dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dalam waktu 30 detik. Pada gambar tersebut terlihat bahwa sel mengalami kerusakan dinding sel akibat efek kimia dan kavitasi



(a)

(b)

(c)

Gambar 7.11 Sel MRSA yang dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dalam waktu 40 detik. Pada gambar (a) dan (b) sel MRSA mengalami pemanjangan akibat stres mekanik, pecah menjadi kecil-kecil akibat kavitasi dan sebagian sitoplasmanya keluar disekitar akibat efek kimia, (c) kerusakan sel MRSA terjadi akibat stres mekanik dan efek kimia secara bersamaan.



Analisis pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen perubahan bentuk sel MRSA

Hasil rekapitulasi perubahan bentuk sel MRSA yang dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon dalam waktu 10, 20, 30, dan 40 detik disajikan pada tabel 7.6 di bawah ini.

Tabel 7.6 pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen perubahan bentuk

No.	Waktu	% perubahan bentuk
1.	10	34,96
2.	20	60,47
3.	30	90,74
4.	40	97,87

Tabel 7.6 akan diuji dengan menggunakan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan regresi, selanjutnya akan ditampilkan dalam diagram batang dan grafik persamaan regresinya.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data persentase perubahan bentuk MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang



digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	1	1,000

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05.

Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan persentase perubahan bentuk MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 7.7 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon dengan perubahan bentuk sel MRSA

Regression Analysis: Perubahan bentuk versus Waktu, Waktu^2

The regression equation is

$$\text{Persentase} = -6.7 + 4.49 \text{ waktu} - 0.0460 \text{ waktu}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-6.72	17.37	-0.39	0.765
Waktu	4.488	1.584	2.83	0.216
Waktu^2	-0.04595	0.03119	-1.47	0.380

S = 6.23863 R-Sq = 98.5% R-Sq(adj) = 95.4%

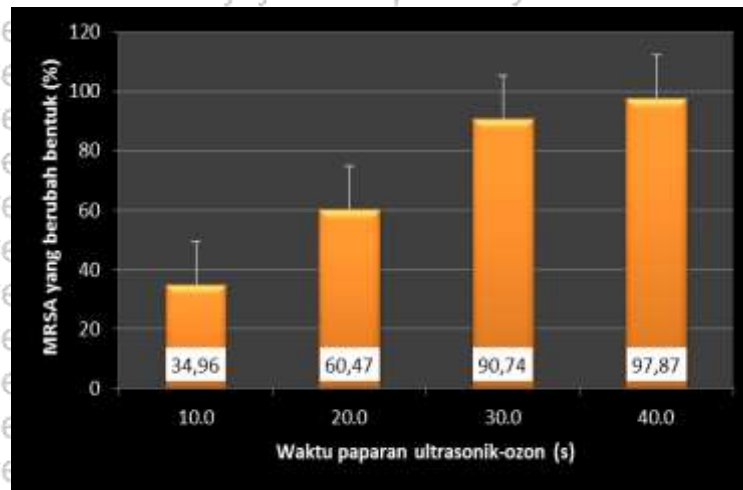
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2482.5	1241.3	31.89	0.124
Residual Error	1	38.9	38.9		
Total	3	2521.4			

Berdasarkan Tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,124. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan persentase perubahan bentuk MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon tidak berpengaruh signifikan terhadap persentase perubahan bentuk MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data persentase perubahan bentuk MRSA antar kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dengan data ramalannya maka ditampilkan dalam bentuk diagram batang dan grafik sebagai berikut:

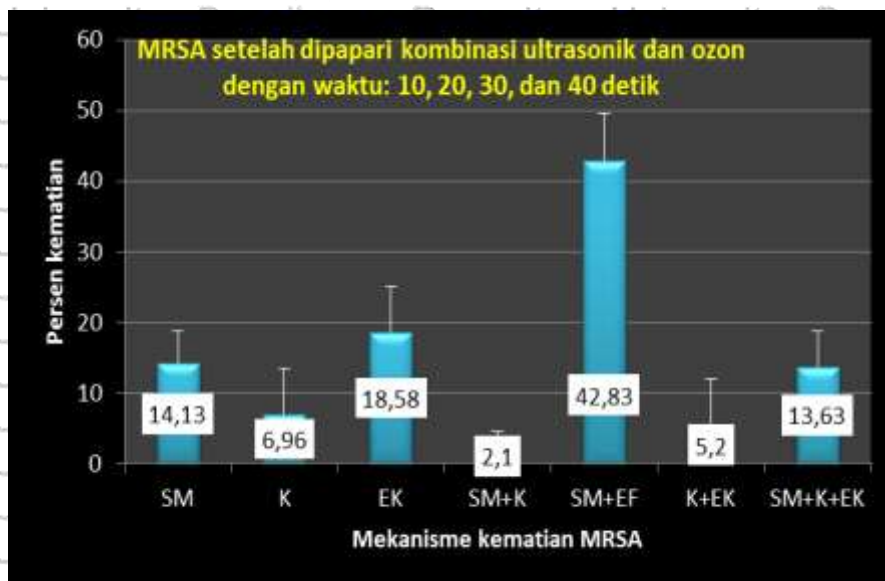


- Diagram batang



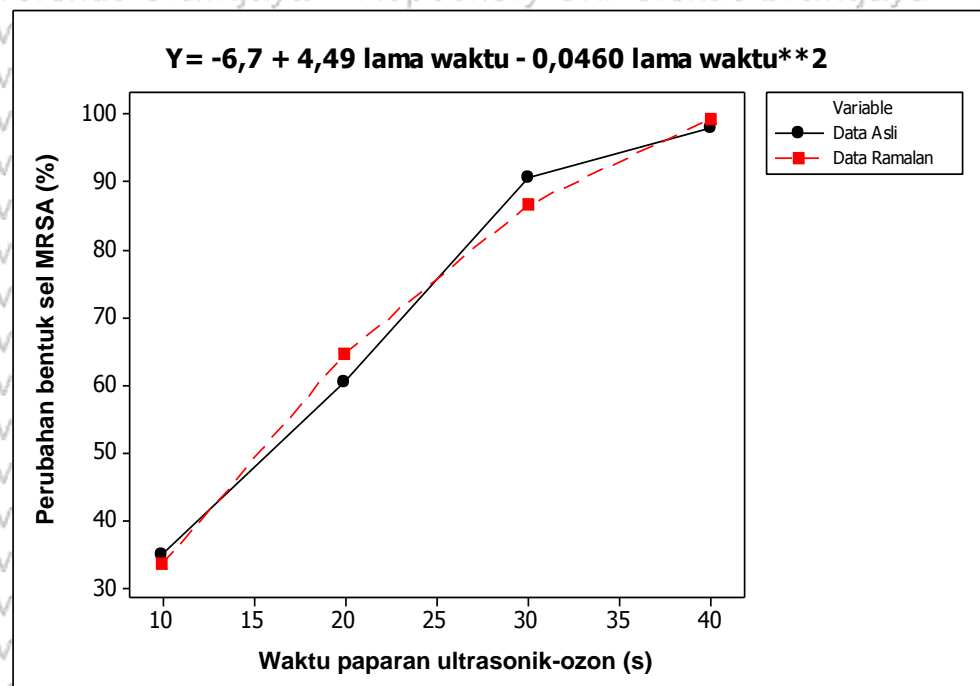
Gambar 7.12 Diagram batang antara waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon dengan perubahan bentuk sel MRSA

Perubahan bentuk sel MRSA dari bulat menjadi tidak bulat akibat dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dengan waktu beragam disajikan pada lampiran 17 halaman 347. Perubahan bentuknya disebabkan oleh stres mekanik, kavitasi, efek kimia dan kombinasi diantara ketiganya. Berikut ini adalah diagram batang mekanisme kematian terhadap persen kematian MRSA



Gambar 7.13 Perubahan bentuk sel MRSA yang menyebabkan kematian terbesar disebabkan oleh kombinasi stres mekanik dan efek kimia sebesar $(42,83 \pm 6,76)\%$.

- Grafik persamaan regresi



Gambar 7.14 Pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap persen perubahan bentuk sel MRSA

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dengan perubahan bentuk sel MRSA, sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon. Nilai R-sq yang dihasilkan adalah 91,5% yang berarti bahwa 91,5% variasi persentase perubahan bentuk (B) dipengaruhi oleh kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon (t) sedangkan 8,5% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikuti dalam pemodelan. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$B(t) = -6,7 + 4,49t - 0,0460t^2$$



2. Perubahan ukuran sel MRSA

Jika suspensi MRSA dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon dalam beragam waktu maka akan mati. Hal ini terlihat dari pengamatan makroskopis dengan menggunakan metode TPC, salah satu indikator kematian MRSA adalah mengalami perubahan ukuran. Perubahan ukuran pada percobaan yang saya lakukan adalah perubahan diameter maksimum sel MRSA.

Dalam Tabel 7.8 berikut ini adalah diameter maksimum sel MRSA kontrol dan yang telah diberi perlakuan.

Analisis pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap diameter maksimum sel MRSA

Tabel 7.8 Diameter maksimum MRSA akibat dipapari ultrasonik-ozon dengan waktu beragam

Diameter maksimum MRSA (nm)					
No	Kontrol (0 s)	10 s	20 s	30 s	40 s
1.	746,6	584,4	583,1	679,7	703,7
2.	766,6	686,9	769,8	661,7	733,1
3.	762,7	678,6	642,3	854,8	571,7
4.	700,5	504,4	579,6	679,6	701,8
5.	739,3	703,4	648,4	648,4	686,8
6.	640,8	723,0	682,2	682,2	660,5

Untuk mencari pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon Tabel 7.8 diubah menjadi Tabel 7.9 di bawah ini:



Tabel 7.9 Pengaruh waktu paparan gelombang ultrasonik-ozon terhadap diameter maksimum MRSA

No.	Waktu (s)	Diameter maksimum MRSA (nm)
1.	0	726,08 ± 47,97
2.	10	646,78 ± 84,62
3.	20	644,64 ± 76,98
4.	30	701,07 ± 76,46
5.	40	676,27 ± 56,44

Tabel 7.9 akan diuji dengan menggunakan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan regresi, selanjutnya akan ditampilkan dalam diagram batang dan grafik.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter maksimum MRSA mengikuti distribusi normal.

b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	1	1,000



Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05.

Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan Diameter maksimum MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

Tabel 7.10 Hasil uji Anova dan regresi antara waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon dengan diameter maksimum sel MRSA

Regression Analysis: Diameter maksimum versus Waktu, Waktu^2

The regression equation is

$$\text{Diameter maksimum} = 598 + 5.00 \text{ Waktu} - 0.072 \text{ Waktu}^2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	597.96	75.32	7.94	0.080
Waktu	5.000	6.871	0.73	0.600
Waktu^2	-0.0723	0.1353	-0.53	0.688

S = 27.0542 R-Sq = 61.5% R-Sq(adj) = 0.0%

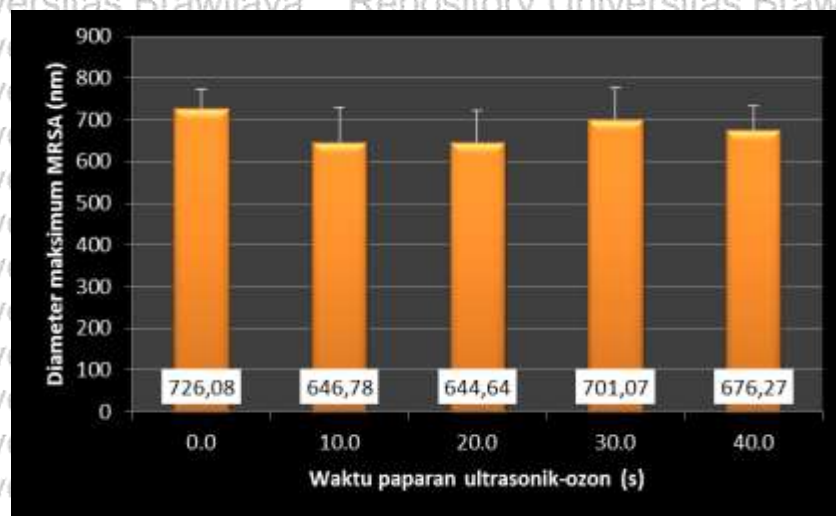
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	1169.9	584.9	0.80	0.620
Residual Error	1	731.9	731.9		
Total	3	1901.8			



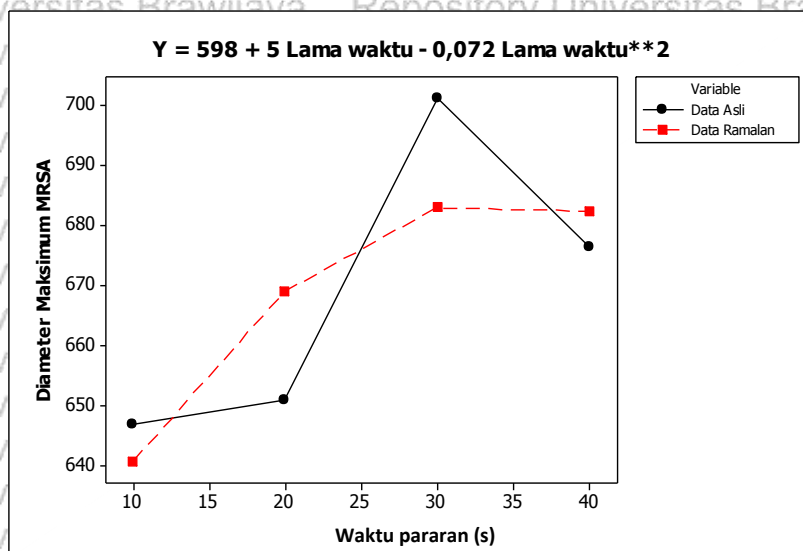
Berdasarkan Tabel 7.10 dapat diketahui bahwa nilai *P-value* yang dihasilkan adalah sebesar 0,620. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan diameter maksimum MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon tidak berpengaruh signifikan terhadap diameter maksimum MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data diameter maksimum MRSA antar kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon dengan data ramalannya maka ditampilkan dalam bentuk diagram batang dan grafik regresi sebagai berikut.

- Diagram batang



Gambar 7.15 Diagram batang antara waktu paparan ultrasonik-ozon dengan rerata diameter maksimum MRSA

Grafik persamaan regresi



Gambar 7.16 Grafiks pengaruh waktu paparan ultrasonik-ozon terhadap rerata diameter maksimum MRSA

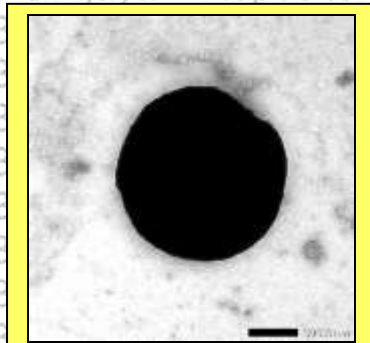
Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Nilai R^2 yang dihasilkan adalah 61,5%, yang berarti bahwa 61,5% variasi diameter maksimum MRSA dipengaruhi oleh kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon sedangkan 38,5% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikuti dalam pemodelan. Persamaan regresi yang dihasilkan

$$\text{Adalah } D_m(t) = 598 + 5,0t - 0,072t^2$$

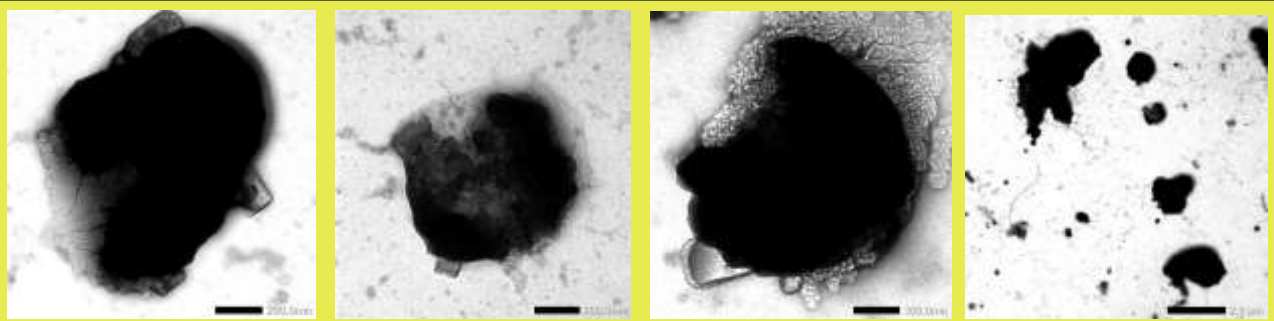


3. Perubahan struktur sel MRSA

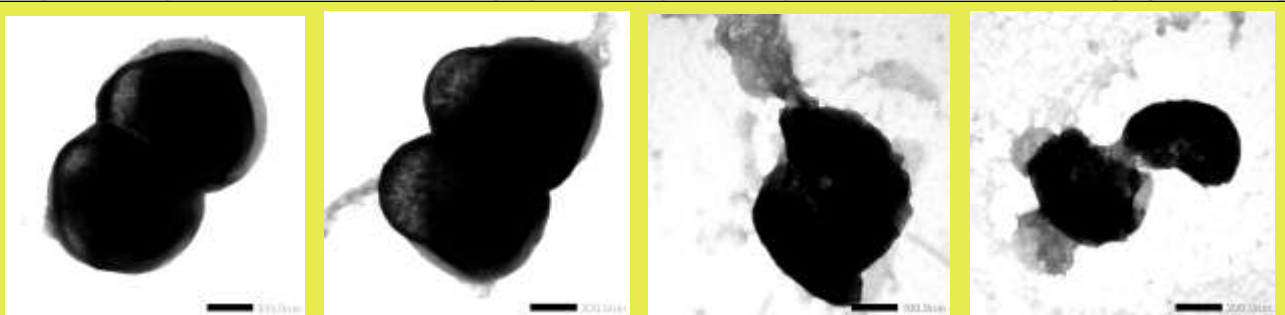
Perubahan struktur sel MRSA diamati dengan menggunakan transmission electron microscope (TEM) dengan perbesaran 20.000 x dan skala 200 nm. Berikut ini adalah gambar sel MRSA yang dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon.



Gambar 7.17 Sel MRSA kontrol



Gambar 7.18 sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, daya 8,4 watt, dan dipapari ozon secara simultan dalam waktu 20 detik. Terjadi kerusakan dinding sel akibat efek kimia, dan pecah menjadi berkeping-keping akibat kavitasi internal



Gambar 7.19 sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi 26 kHz, daya 8,4 watt, dan dipapari ozon secara simultan dalam waktu 40 detik. Pada gambar di atas terlihat bahwa pada bagian-bagian dinding sel akan mengalami penipisan dinding sel akibat reaksi kimia seperti akan pecah (gambar (a) dan (b)), pada gambar (c) terlihat sitoplasma keluar dari dalam sel, dan pecah menjadi bagian-bagian yang terlempar saling menjauh (gambar (d)).



Analisis pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap perubahan pewarnaan sel MRSA

Hasil pewarnaan sel MRSA dengan menggunakan pewarnaan gram ditunjukkan pada lampiran 24. Rekapitulasi hasil pewarnaan gram sel MRSA yang berubah dari ungu (MRSA hidup) menjadi pink (MRSA mati) ditampilkan pada Tabel 7.11 dibawah ini.

Tabel 7.11 Perubahan pewarnaan gram MRSA akibat dipapari gelombang ultrasonik-ozon dengan waktu beragam

No.	Waktu (s)	MRSA pink (%)
1.	0	4,19
2.	10	31,25
3.	20	60,32
4.	30	88,89
5.	40	98,75

Tabel 7.11 akan diuji dengan menggunakan uji: normalitas, homogenitas, Anova dan regresi, selanjutnya akan ditampilkan dalam diagram batang dan grafik persamaan regresinya.

a. Uji normalitas

Kelompok data dikatakan mengikuti distribusi normal jika nilai *sig.* lebih dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai *sig.* sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data perubahan pewarnaan gram MRSA mengikuti distribusi normal.



b. Uji homogenitas

Data antar kelompok yang akan dianalisis dengan Anova harus memiliki varians yang sama atau homogen. Untuk mengetahui apakah varians data homogen atau tidak maka dilakukan uji homogenitas. Hipotesis nol yang digunakan adalah bahwa data memiliki varians yang homogen dan hipotesis alternatifnya adalah data yang digunakan tidak memiliki varians yang sama atau homogen. Hasil uji homogenitas adalah sebagai berikut.

df1	df2	Sig.
2	1	1,000

Berdasarkan Tabel uji homogenitas di atas dapat diketahui bahwa nilai sig. adalah sebesar 1,000. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi alfa 0,05. Sehingga diputuskan untuk terima Hipotesis nol yang berarti bahwa data antar kelompok yang digunakan memiliki varian yang sama atau memenuhi asumsi homogenitas.

c. Uji Anova

Secara aplikatif, Anova digunakan untuk menguji rata-rata lebih dari dua sampel apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan/tidak antar kelompok penelitian yang digunakan. Uji Anova berikut dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan perubahan pewarnaan gram MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon. Berikut adalah hasil Uji Anova yang diperoleh.

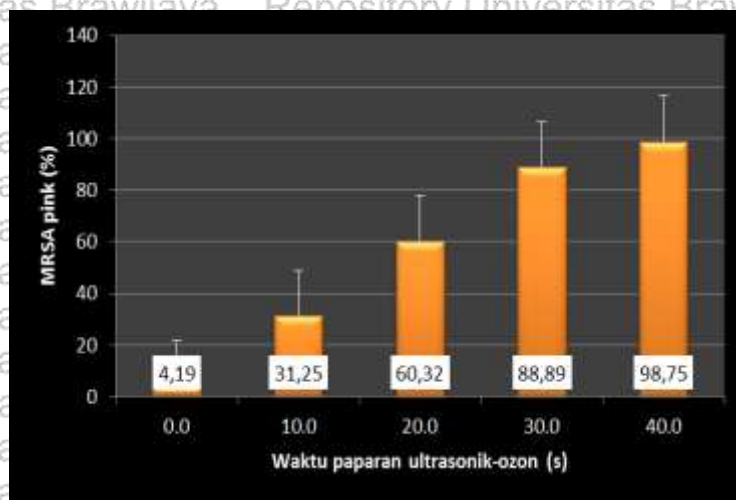
Tabel 7.12 Hasil uji Anova dan regresi pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon terhadap perubahan warna sel MRSA menjadi pink

Regression Analysis: MRSA pink versus Waktu, Waktu^2					
The regression equation is					
Persentase = - 12.0 + 4.71 Waktu - 0.0480 Waktu^2					
Predictor	Coef	SE Coef	T	P	
Constant	-11.98	11.34	-1.06	0.482	
Waktu	4.712	1.034	4.56	0.138	
Waktu^2	-0.04803	0.02036	-2.36	0.255	
S = 4.07188 R-Sq = 99.4% R-Sq(adj) = 98.2%					
Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2761.9	1381.0	83.29	0.077
Residual Error	1	16.6	16.6		
Total	3	2778.5			

Berdasarkan Tabel 7.12 dapat diketahui bahwa nilai *P-value*, yang dihasilkan adalah sebesar 0,077. Nilai ini lebih besar dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan perubahan pewarnaan gram MRSA antar kelompok perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Dengan kata lain, perlakuan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon tidak berpengaruh signifikan terhadap perubahan pewarnaan gram MRSA. Selanjutnya, untuk mengetahui perbandingan pola sebaran data perubahan pewarnaan gram MRSA antar kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon dengan data ramalannya maka ditampilkan dalam diagram batang dan grafik persamaan regresi sebagai berikut:

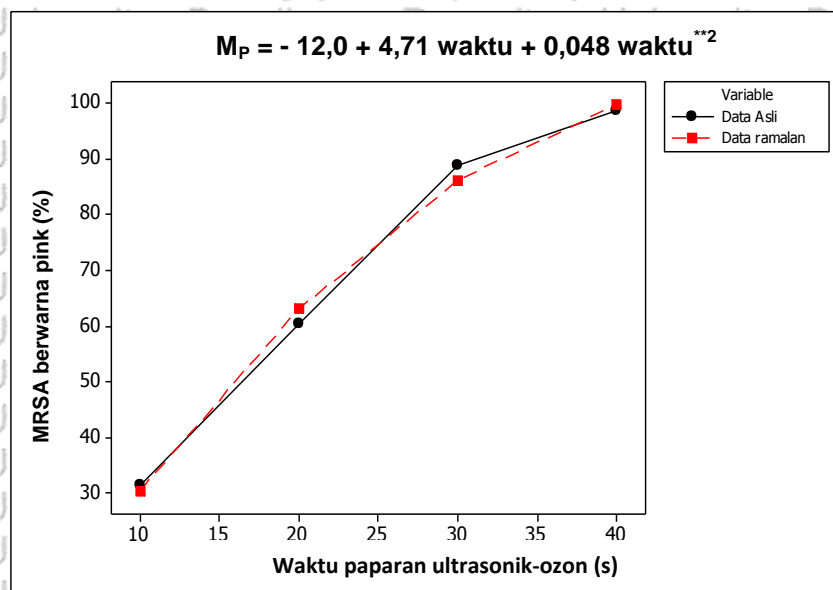


- Diagram batang



Gambar 7.20 Diagram batang antara waktu paparan kombinasi ultrasonik dan ozon terhadap MRSA berwarna pink

- Grafik persamaan regresi



Gambar 7.21 Grafik pengaruh waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon terhadap perubahan warna sel MRSA menjadi Pink

Garis merah menunjukkan garis regresi yang menghubungkan data ramalan dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon sementara garis hitam adalah garis yang menghubungkan antara data asli

dengan kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon. Nilai R^2 yang dihasilkan adalah 99,4% yang berarti bahwa 99,4% variasi perubahan pewarnaan gram MRSA (dari ungu menjadi pink) (W) dipengaruhi oleh kelompok waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik-ozon (t) sedangkan 0,6% lainnya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diikutkan dalam pemodelan. Berikut adalah persamaan regresi yang dihasilkan.

$$W(t) = -12 + 4,71t - 0,048t^2$$

7.8. Pembahasan Penelitian Tahap 3

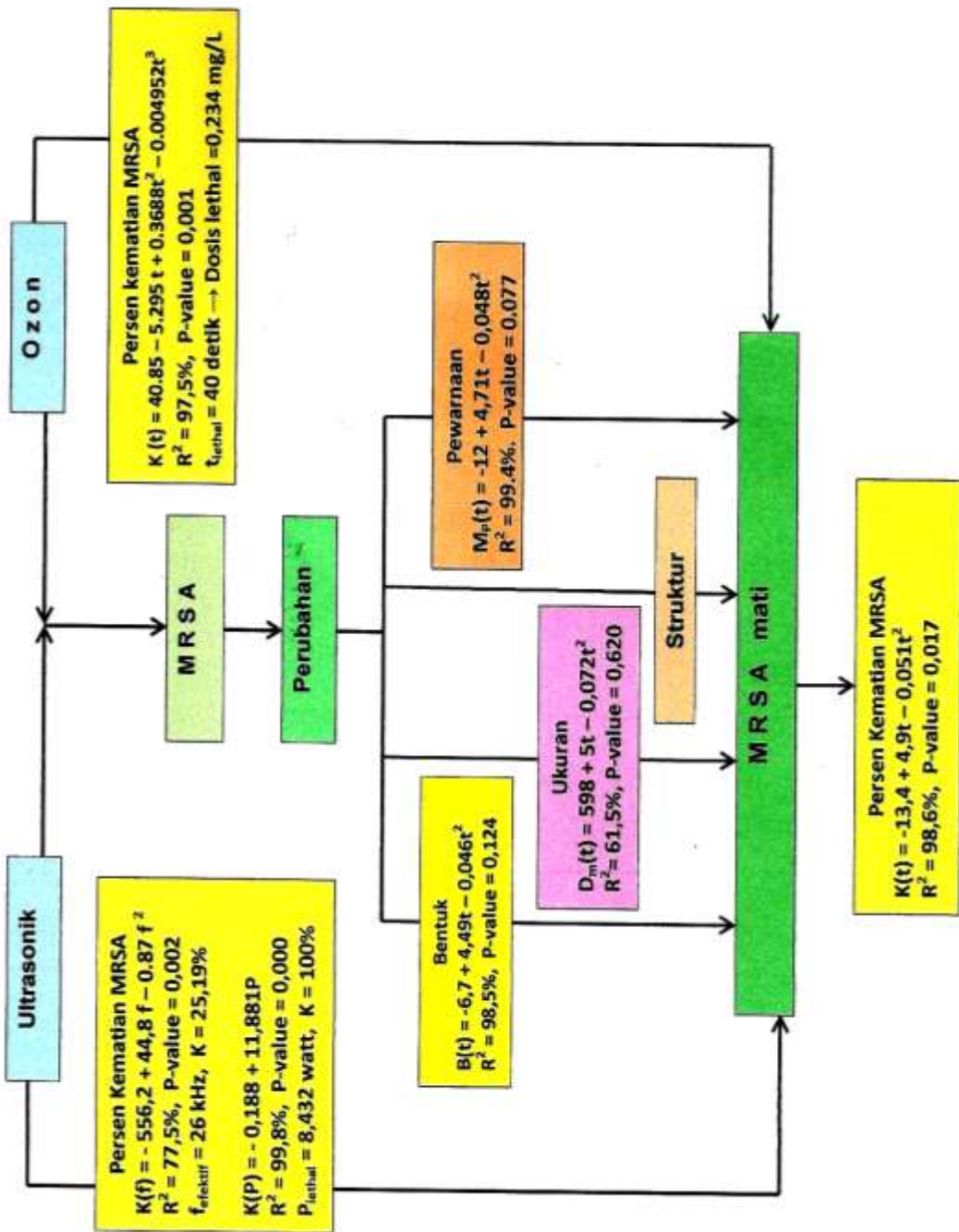
Percobaan tahap 3 merupakan gabungan antara percobaan tahap 1 dan tahap 2, yaitu memapari suspensi MRSA dengan gelombang ultrasonik berfrekuensi 26 kHz, berdaya 8,4 watt serta dipapari dengan waktu 10, 20, 30, dan 40 detik. Dari hasil pengamatan pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA diperoleh hasil: semakin besar waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, hasilnya hampir sama dengan yang hanya dipapari dengan ozon saja dalam durasi waktu yang sama. Jadi dengan demikian kombinasi paparan gelombang ultrasonik dan ozon efektif digunakan untuk membunuh MRSA *in vitro* jika waktu paparannya semakin kecil dari waktu lethal paparan ozon. Dari hasil percobaan diperoleh pengaruh kombinasi paparan gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA *in vitro* (K) dinyatakan dengan persamaan:

$$K(t) = -13,4 + 4,9t + 0,051t^2, \text{ dengan } R^2 = 98,6\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,017.$$

Dari hasil percobaan diatas terlihat bahwa $P\text{-value} < \alpha (0,05)$ ini berarti bahwa waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA, sedangkan pengaruhnya sebesar 98,6%, sedangkan yang 1,4% dipengaruhi oleh variabel lain. Hasil ini didukung oleh pengamatan mikroskopik yang masing-masing indikator memberikan



pengaruh dengan bentuk kurya kuadratis, dengan $P\text{-value} < 0,05$, kecuali perubahan ukuran MRSA. Kerusakan sel MRSA merupakan gabungan kerusakan fisika dan kimia. Bukti fisik kerusakan sel MRSA dapat di lihat pada gambar lampiran 15 untuk pengamatan dengan SEM, dan gambar lampiran 19 untuk pengamatan dengan TEM. Gambar 7.21 berikut adalah bagan hasil penelitian pengaruh waktu paparan ultrasonik-ozon terhadap persen kematian MRSA



Gambar 7.22 Bagan hasil penelitian pengaruh waktu paparan ultrasonik-ozon terhadap persen kematian MRSA

Indikator kematian sel MRSA ini sangat mendukung pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA.



1. Perubahan bentuk sel MRSA

Akibat peristiwa stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia, sel MRSA mengalami perubahan bentuk, yang semula berbentuk bulat menjadi tidak bulat (oval, persegi, atau tidak beraturan). Secara matematik pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap perubahan bentuk (B) dinyatakan dengan persamaan:

$$B(t) = -6,7 + 4,49t - 0,046t^2 \text{ dengan } R^2 = 98,5\%, \text{ dan } P\text{-value} = 0,124$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} > \alpha (0,05)$ ini berarti bahwa waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon berpengaruh tidak signifikan terhadap perubahan bentuk MRSA. Pengaruh kematian MRSA oleh kombinasi ultrasonik-ozon tidak sebanyak kematian MRSA yang ditimbulkan oleh paparan gelombang ultrasonik saja atau paparan ozon saja. MRSA yang dipapari oleh gelombang ultrasonik-ozon pasti mati sebanyak 98,5%, sedangkan 1,5% dipengaruhi variabel lain. Berikut ini adalah gambar pengaruh waktu paparan gelombang ultrasonik dan ozon terhadap persen kematian MRSA yang didukung oleh indikator kematian MRSA. Perubahan bentuk sel MRSA dari bulat menjadi tidak bulat sebagian besar diakibatkan oleh gabungan antara stres mekanik dan efek kimia sebesar: $(42,83 \pm 6,76)\%$.

2. Perubahan ukuran sel MRSA

Yang dimaksud dengan perubahan ukuran disini adalah perubahan diameter maksimum sel MRSA diameter dibandingkan dengan diameter maksimum kontrol. Hal ini terjadi akibat waktu paparan kombinasi ultrasonik-ozon, sehingga diameter maksimum sel MRSA



dapat membesar atau mengecil. Pengaruhnya dinyatakan dengan persamaan:

$$D_m(t) = 598 + 5t - 0,072t^2 \text{ dengan } R^2 = 61,5\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,620$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $P\text{-value} > \alpha (0,05)$ ini berarti bahwa waktu paparan gelombang ultrasonik dan ozon berpengaruh tidak signifikan terhadap perubahan diameter maksimum MRSA, hanya berpengaruh sebesar 61,5% sedangkan yang 38,5% dipengaruhi oleh variabel lain. Meskipun demikian pengaruh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon terhadap perubahan ukuran masih lebih besar dibandingkan pengaruh frekuensi dan daya paparan gelombang ultrasonik saja atau dosis ozon saja terhadap perubahan ukuran sel MRSA.

3. Perubahan struktur sel MRSA

Perubahan struktur sel MRSA diamati dengan menggunakan TEM. Sel MRSA dikatakan berubah jika hasil pengamatan perlakuan berbeda dengan kontrol, sel MRSA kontrol berbentuk bulat dan gelap. Kuantisasi hasil pengamatan perubahan struktur sel MRSA dengan TEM yang teramati tidak dapat dilakukan, berbeda dengan pengamatan morfologi sel MRSA dengan SEM. Perubahan struktur sel MRSA ini terjadi akibat paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon yang menyebabkan kerusakan sel MRSA. Dari hasil pengamatan Foto sel MRSA dengan TEM diketahui kerusakan itu akibat stres mekanik, kavitasi dan efek kimia.



4. Perubahan warna sel MRSA

Untuk membedakan antara MRSA yang masih hidup dengan yang sudah mati dilakukan dengan menggunakan pewarnaan gram, sehingga tampak bahwa sel MRSA yang hidup berwarna ungu dan yang mati berwarna pink (merah muda). Dari hasil percobaan pengaruh daya paparan gelombang ultrasonik terhadap MRSA yang berwarna pink (M_p) diperoleh hasil:

$$M_p(P) = -12 + 4,71t + 0,048t^2 \text{ dengan } R^2 = 99,4\% \text{ dan } P\text{-value} = 0,077$$

Dari hasil percobaan diatas terlihat bahwa $P\text{-value} > \alpha (0,05)$ ini berarti bahwa waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon tidak berpengaruh terhadap perubahan pewarnaan sel, sedangkan pengaruhnya sebesar 99,8% sedangkan hanya 0,2% dipengaruhi oleh variabel lain.

Kematian MRSA akibat paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon selain di dukung oleh indikator tersebut diatas. OD suspensi MRSA tidak dipengaruhi oleh waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik ($P\text{-value} = 0,262$). Hal ini disebabkan oleh ozon mampu menjernihkan suspensi MRSA, grafik regresi hubungan OD dan waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dinyatakan dengan: $OD(t) = -0,0140 + 0,00226t - 0,000040t^2$ dengan koefisien determinasi $R^2 = 93,1\%$.

7.9 Kesimpulan

Dari hasil analisis percobaan tahap 3 dapat disimpulkan, bahwa:

1. Waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA dengan $P\text{-value} = 0,017$.



2. Tingkat kerusakan terbesar akibat dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon adalah gabungan antara stres mekanik dan efek kimia. Hal ini ditandai dengan Sel MRSA membesar dengan retakan-retakan di permukaan sel dan sitoplasma serta organelnya keluar melalui lubang tersebut.

3. Pada perlakuan menggunakan gelombang ultrasonik: Frekuensi berubah dan daya tetap, kematian MRSA sebagian besar terjadi akibat stres mekanik. Frekuensi tetap dan daya berubah, kematian terbesar akibat kavitasi. Perlakuan menggunakan ozon, kematian terbesar MRSA disebabkan efek kimia. Dan perlakuan menggunakan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon, kematian MRSA terbesar disebabkan oleh gabungan stres mekanik dan efek kimia.

7.10 Saran

1. Untuk mengetahui efek kematian MRSA yang ideal akibat pengaruh Paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon diperlukan percobaan yang mengkombinasikan secara simultan antara frekuensi dan daya paparan gelombang ultrasonik dengan waktu paparan ozon.

2. Melakukan penelitian lanjutan terhadap MRSA yang masih hidup setelah diberi perlakuan terkait dengan sifat resistensi dan sensitivitas MRSA.



BAB 8

PEMBAHASAN UMUM

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) digunakan sebagai obyek penelitian karena beberapa dekade terakhir, insiden infeksi MRSA terus meningkat di berbagai belahan dunia. Prevalensi infeksi MRSA kini mencapai 70% di Asia, sementara di Indonesia pada tahun 2006 prevalensinya berada pada angka 23,5%. MRSA maupun infeksi luka operasi karena bakteri di Indonesia dapat terjadi salah satunya di ruang perawatan bedah (Mahmudah, 2013). Prevalensi MRSA di Rumah Sakit Atmajaya Jakarta pada tahun 2003 mencapai 47 %. Insiden MRSA di RSUP Dr. Moh. Hoesin Palembang mencapai 46%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan di ruang Intensive Care Unit (ICU) dan ruang perawatan bedah Rumah Sakit Umum Daerah Abdul Moeloek Lampung pada tahun 2013 menunjukkan bahwa terdapat MRSA positif sebanyak 26 sampel (38,24%) (Dwiyanti dkk., 2015).

Kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon digunakan sebagai metode alternatif karena metode gabungan ini dapat membunuh MRSA secara fisika dan kimia sekaligus. Gelombang ultrasonik mampu membunuh bakteri dengan cara stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia (Hudori, 2002), dan ozon mampu mengoksidasi berbagai jenis bakteri, spora, jamur, protozoa, bahan organik lainnya (Sastroasmoro *et al*, 2004; Seidler *et al*, 2008; Jani *et al*, 2012).

Metode non kontak adalah suatu metode pemaparan gelombang ultrasonik tanpa menyentuh medium dimana bakteri tersebut berada. Metode ini mempunyai kelemahan karena gelombang ultrasonik adalah gelombang mekanik jadi membutuhkan medium untuk merambat, semakin besar kerapatan medium semakin baik gelombang tersebut merambat. Udara adalah medium yang kurang



baik sebagai media rambatan gelombang, agar dapat mereduksi bakteri yang berada di medium tersebut diperlukan energi yang relatif besar dibandingkan dengan metode kontak langsung (Hudori, 2002; Dehghani & Hadi, 2005). Bentuk gelombang ultrasonik yang terbaik untuk mereduksi bakteri adalah berbentuk Square (Hudori, 2002). Oleh karena itu dalam penelitian ini penulis menggunakan metode kontak langsung dengan bentuk gelombang square untuk membunuh MRSA.

Gelombang ultrasonik di media cair menyebabkan efek mekanis (microstreaming, high shear force, gelombang kejut) dan reaksi sonokimia (radikal bebas, hidrogen peroksida), yang akhirnya mengakibatkan gangguan atau gangguan sel bakteri (Rastogi, 2011; Ashokkumar, 2011, Golmohamadi A. *et al*, 2013). Efek penghambatan gelombang ultrasonik pada sel mikroba bersifat multifaktorial, termasuk pembentukan pori, dinding sel yang menipis, gangguan membran sel, pelepasan kandungan sitoplasma, dan kerusakan pada struktur DNA (Carel *et al*, 2012; de São José *et al*, 2014).

Percobaan berada dalam keadaan phase pertumbuhan eksponensial (gambar 2.8), kondisi lingkungan tempat pertumbuhan MRSA dibuat ideal. MRSA kontrol dan yang telah diberi perlakuan dikultur pada media selektif yaitu Chromagar MRSA, selama dalam massa pertumbuhan ini bakteri lebih sensitif terhadap lingkungan yang buruk (Radji, 2015). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa MRSA yang dipapar dengan dengan gelombang ultrasonik, ozon, maupun kombinasi ultrasonik dan ozon menunjukkan penurunan jumlah koloninya (gambar 5.5, gambar 5.33, gambar 6.5, dan gambar 7.4), atau terjadi peningkatan persen kematiannya. Peningkatan persen kematiannya akibat dipapari gelombang ultrasonik dengan frekuensi beragam dan daya konstan grafik regresinya berbentuk kuadratis, jika dipapari dengan frekuensi tetap dan



daya beragam grafik regresinya berbentuk linier. Persen kemarian MRSA yang telah dipapari ozon dengan dosis yang beragam grafik regresinya berbentuk kubik, jika dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon grafik regresinya berbentuk kuadratis. Berikut ini akan penulis paparkan pembahasan penelitian tahap 1, 2, dan 3.

Hasil penelitian tahap 1, ditemukan fakta bahwa frekuensi paparan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap persen kematian MRSA (K) dengan $P\text{-value} = 0,002 < \alpha = 0,05$, dengan pengaruh yang dinyatakan dengan persamaan $K(f) = -556,2 + 44,8f + 0,87f^2$ dan frekuensi efektif = 26 kHz, daya gelombang ultrasonik 2 watt, dan waktu paparan 2 menit, menyebabkan kematian MRSA sebesar 25,19%. Hal ini didukung dengan indikator kematian sel MRSA yaitu perubahan: bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel MRSA.

Kematian sel ada 2 cara yaitu apoptosis dan nekrosis. Apoptosis terjadi kematian sel yang terprogram dan membran inti tidak ruptur, dan inti mengalami fragmentasi yang kemudian mengirimkan sinyal kepada sel yang berada didekatnya untuk difagosit. Sedangkan nekrosis adalah kematian sel yang dapat disebabkan oleh injury maupun infeksi. Pada nekrosis terjadi perubahan pada inti yang pada akhirnya dapat menyebabkan inti menjadi lysis dan membran plasma menjadi ruptur (Lumongga, 2008). Secara fisika massa sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis tetap, tetapi volume apoptosis mengecil, sedangkan nekrosis membesar. Jika massa jenis didefinisikan sebagai massa per volume maka sel yang mengalami apoptosis massa jenisnya lebih besar dari sel yang mengalami nekrosis.

Dari hasil pemaparan suspensi MRSA dengan frekuensi beragam dan diamati dengan SEM ditemukan bahwa kematian MRSA sebagian besar disebabkan karena nekrosis. Pada frekuensi 21, 22, dan 23 kHz, MRSA



mengalami stres mekanik hal ini terbukti dari perubahan bentuk MRSA, terjadi cekungan dipermukaan dinding sel dan mengalami pergeseran dinding sel sehingga sel berbentuk lonjong dan mengalami retakan di beberapa tempat (gambar 5.11, 5.12a, dan 5.13) tetapi ada juga sel MRSA yang mengalami pemampatan (gambar 5.12c). Pada frekuensi 24 kHz terlihat ada sel yang terpilin akibat turbulensi larutan (5.14a), disamping perubahan bentuk akibat stres mekanik. Pada frekuensi 25 kHz sel MRSA mengalami kavitasi, hal ini ditandai dengan adanya tekanan dari dalam sel yang menyebabkan sel menjadi berlubang (gambar 5.11b dan gambar 5.11c), disamping itu kematian sel akibat efek kimia juga terjadi yang ditandai dengan keluarnya sitoplasma disekitar sel (gambar 5.11a). Pada frekuensi 26 kHz kerusakan sebagian besar disebabkan karena stres mekanik yang menyebabkan ukuran sel menjadi membesar atau mengecil (gambar 5.16a, dan 5.16b) dan efek kimia yang ditandai dengan adanya sitoplasma yang keluar disekitar sel (gambar 5.16c). Pada frekuensi 27 dan 28 kHz sel mengalami kerusakan akibat stres mekanik (gambar 5.17a, 5.17b, dan gambar 5.18a, 5.18c), kavitasi (gambar 5.18b), dan efek kimia (gambar 3.17cb). Pada frekuensi 29 dan 30 kHz. hampir seluruh perubahan bentuk akibat stres mekanik (gambar 5.15 dan gambar 5.16).

Pada pengamatan dengan TEM, terlihat bahwa pada frekuensi 24 kHz sel mengalami perubahan struktur dibandingkan dengan sel MRSA kontrol (gambar 5.25), sel MRSA mengalami efek kimia yang menyebabkan dinding sel mengalami lysis yang menyebabkan sitoplasma keluar disekitar sel (gambar 5.26a, dan 5.26b). Pada gambar 5.26c dan 5.26d terlihat bahwa sel mengalami kavitasi, sehingga sebagian sel terlempar akibat ledakan yang berasal dari dalam tubuh sel MRSA. Hal ini ditandai dengan bagian sel yang masih berwarna hitam (sesuai dengan warna sel MRSA kontrol) dan disekitarnya terdapat sitoplasma MRSA.



Pada frekuensi 25 kHz, sel mengalami efek kimia yang ditandai keluarnya sitoplasma akibat dinding sel mengalami kebocoran yang disebabkan karena bereaksi dengan hidrogen peroksida sehingga bentuk sel mengalami perubahan (gambar 5.27a, 5.27b, dan 5.27d). Sel juga mengalami kavitasasi hal ini tampak jelas pada gambar 5.27c, bagian sel yang terlempar akibat tekanan dari dalam tubuh sel dan disertai keluarnya sitoplasma terdokumentasi dengan baik. Ini membuktikan bahwa kavitasasi dapat juga terjadi dalam sel MRSA, disamping terjadi diluar sel. Pada frekuensi 26 kHz, terjadi perubahan bentuk sel akibat efek kimia. Dinding sel sobek akibat stres mekanik dan sitoplasmanya keluar (gambar 5.28b dan 5.28d), sedangkan gambar 5.28a dan 5.28c menunjukkan sel MRSA yang telah kehilangan sitoplasmanya.

Pada pemaparan frekuensi 27 kHz, sel MRSA mengalami mengalami perubahan bentuk akibat kerusakan secara fisis yang ditandai dengan bergesernya dinding sel karena stres mekanik (gambar 5.29b) dan kavitasasi yang menyebabkan tekanan dari dalam sel MRSA yang menyebabkan terlemparnya materi sel MRSA sehingga tampak pecah (gambar 5.29c). Mengalami perubahan bentuk akibat efek kimia, yaitu keluarnya sitoplasma di luar sel MRSA (gambar 5.28a dan 5.28d). Pada frekuensi 28 kHz, terlihat bahwa sel mengalami peristiwa kavitasasi di dalam sel MRSA sehingga bagian-bagian sel MRSA yang terlempar akibat tekanan tersebut dapat diamati pada gambar 5.30

Dari uraian diatas membuktikan bahwa Konsep penyerapan energi ultrasonik oleh protein menyebabkan perubahan sifat protein. Menurut Hipotesis Johns (2002), frekuensi resonansi menjelaskan dua mekanisme biologis yang mungkin mengubah fungsi protein sebagai akibat dari penyerapan energi ultrasonik. Pertama, penyerapan energi mekanik oleh protein dapat menghasilkan pergeseran konformasi transient (memodifikasi struktur 3-dimensi) dan mengubah aktivitas fungsional protein. Kedua, resonansi atau stres mekanik



(atau keduanya) dapat memisahkan multimolecular kompleks, sehingga mengganggu fungsi kompleks. Dengan perubahan aktivitas ini dapat menyebabkan kematian sel.

Penelitian dilanjutkan dengan memapari suspensi MRSA dengan frekuensi efektif 26 kHz, dalam waktu 2 menit dengan daya beragam. Dari hasil analisis data terlihat bahwa daya paparan gelombang ultrasonik (P) berpengaruh sangat signifikan terhadap persen kematian MRSA (K), dengan $P\text{-value} = 0,000 < \alpha$ dengan pengaruh yang dinyatakan dengan persamaan $K(P) = -0,188 + 11,881P$ dan daya lethal sebesar 8,432 watt. Hasil penelitian ini didukung oleh indikator kematian sel dan hasil pengamatan sel MRSA dengan menggunakan SEM dan TEM.

Hasil pengamatan sel MRSA yang telah dipapari gelombang ultrasonik dengan daya beragam menggunakan SEM. Pada daya 2 watt, sel MRSA mengalami perubahan bentuk dan ukuran akibat stres mekanik (gambar 5.41b), sel pecah di dindingnya akibat kavitasi (gambar 5.41a), dan efek kimia (5.41c).

Pada daya 3 watt, kerusakan sel akibat stres mekanik terjadi pada sel tunggal atau koloni sel MRSA (gambar 5.42c), kerusakan akibat kavitasi meningkat karena jumlah sepihan sel semakin banyak (gambar 5.42b), dan efek kimia (gambar 5,42a). Pada daya 4 watt, terjadi perubahan morfologi sel akibat terjadinya kerusakan dinding sel yang sangat hebat, yang disebabkan efek kimia paparan gelombang ultrasonik yang ditandai dengan keluarnya sitoplasma dari dalam sel dan ketidakmampuan sel mempertahankan bentuk semula (gambar 5.43).

Pada daya 5 watt, kematian MRSA pada umumnya disebabkan kavitasi dan efek kimia yang ditandai dengan perubahan bentuk dan ukuran sel MRSA yang jauh lebih kecil dibandingkan sel kontrol (gambar 5.44). Pada daya 6 watt,



kematian MRSA disebabkan karena stres mekanik (gambar 5.45c) dan kavitasasi dengan energi yang semakin besar sehingga jumlah MRSA yang meledak semakin besar, yang ditandai dengan jumlah serpihan sel semakin banyak dibandingkan dengan sebelumnya (gambar 5.44a, dan 5.44b). Pada daya 8,4 watt, kematian MRSA didominasi oleh peristiwa kavitasasi dengan ditandai semua sel MRSA mengalami perubahan bentuk dan ukuran yang lebih kecil. Oleh karena itu daya sebesar 8.4 disebut daya lethal, yaitu daya paparan gelombang ultrasonik yang mampu membunuh seluruh MRSA.

Indikator kematian sel MRSA berikutnya adalah melakukan pengamatan struktur sel MRSA dengan menggunakan TEM. Pada daya 4 watt, kematian sel MRSA pada umumnya terjadi akibat kavitasasi, hal ini didukung oleh gambar 5.51a, 5.51b, dan 5.51d, dan efek kimia yang menyebabkan sitoplasma sel MRSA keluar semua dari dalam sel sehingga tinggal sel yang tidak mempunyai sitoplasma (gambar 5.51c). Pada daya 6 watt, kematian sel terbesar akibat kavitasasi yang ditandai dengan pecahan-pecahan sel MRSA yang berwarna hitam dengan sebagian sel terdapat sitoplasma disekelilingnya (gambar 5.52a, 5.52c, dan 5.52d), dan efek kimia yang menyebabkan sel MRSA kehilangan sitoplasmanya sehingga sel tidak berwarna/transparan (gambar 5.52b). Pada daya 8,4 watt, sebagian besar sel MRSA mati melalui peristiwa kavitasasi (gambar 5.53).

Pada penelitian tahap 1 ini, ternyata perubahan ukuran (diameter maksimum) MRSA secara statistik tidak dipengaruhi oleh frekuensi dan daya paparan gelombang ultrasonik sehingga ukuran sel MRSA menjadi bervariasi.

Tetapi hal ini tidak sepenuhnya benar, secara fisika kematian MRSA dipengaruhi oleh perubahan tekanan yang disebabkan oleh paparan gelombang ultrasonik $p = p_0 \sin \omega t$ yang besarnya dipengaruhi oleh frekuensi dan daya. Hal ini terbukti



P-value (daya) < P-value (frekuensi), semakin besar dayanya, varians semakin membesar.

Hasil penelitian tahap 2, berhasil ditemukan bahwa waktu paparan ozon berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA, dengan $P\text{-value} = 0,001 < \alpha$, sedangkan pengaruhnya yang dinyatakan dengan persamaan $K(t) = 40,85 - 5,295t + 0,3688t^2 - 0,004952t^3$ dan waktu paparan ozon yang mampu membunuh MRSA sebesar 99,53% adalah 40 detik atau dosis lethalnya = 0,274 mg/liter, Hal ini didukung dengan indikator kematian sel MRSA yaitu perubahan: bentuk, ukuran, struktur dan pewarnaan sel MRSA. Kematian selnya terjadi karena nekrosis, yang ditandai dengan pembengkakan sel kemudian mengalami lysis.

Untuk mendukung fakta bahwa waktu paparan ozon berpengaruh terhadap persen kematian MRSA, maka dilakukan pengamatan terhadap kematian sel dengan menggunakan mikroskop elektron dan pewarnaan gram. Pada pengamatan sel MRSA dengan menggunakan SEM, secara umum terlihat bahwa bentuk dan ukurannya mengalami perubahan.

Pada pemaparan suspensi MRSA dengan ozon selama 5 detik, ada sel MRSA yang mengalami penggembungan sehingga batas antara 2 sel tidak terlihat (gambar 6.9a dan 6.9b). Pada pemaparan ozon selama 10 detik, ada sel yang mengalami perubahan ukuran dan bentuk yang tidak sama akibat reaksi kimia dengan dinding sel MRSA, tetapi sel belum sampai mengalami lysis (gambar 6.10a), sedangkan Pada sel tunggal terlihat mengalami stres mekanik (gambar 6.9b, dan 6.9c). Pada pemaparan 15 detik, ada sel MRSA mengalami yang mengalami kebocoran dindingnya sehingga sitoplasmanya tampak mengalir keluar (gambar 6.11a), sedangkan pada gambar 6.11b dan 6.11c sekelompok sel yang mengalami lysis akibat efek kimia ozon. Pada pemaparan



20 detik, pada gambar 6.12 terlihat populasi sel mengalami lisis yang ditandai dengan keluarnya organel dan sitoplasma sel akibat efek kimia ozon. Pada pemaparan 25 detik, sel MRSA juga mengalami stres mekanik yang menyebabkan bentuk sel menjadi lonjong (gambar 6.13), disamping itu ada sel yang mengalami kebocoran akibat dindingnya rusak, sehingga sitoplasma dan organel sel mulai keluar (gambar 6.13b). Pada pemaparan 30 detik, sel MRSA mengalami kerusakan dinding sel akibat efek kimia ozon sehingga bentuk sel menjadi tidak menentu (gambar 6.14). Pada pemaparan 35 detik, kondisi sel MRSA hampir sama dengan perlakuan yang lalu, sel terkena efek kimia akibat pemaparan ozon yang menyebabkan kerusakan dinding sel menyebabkan lisis sehingga bentuk sel menjadi tidak beraturan (gambar 6.15). Pada pemaparan 40 detik, hampir seluruh MRSA mati (99,53%). Pemaparan 40 detik ini setara dengan dosis 0,274 mg/liter, sehingga dosis sebesar ini disebut dosis lethal.

Derajat kerusakan sel menjadi semakin parah, kerusakan terjadi di hampir seluruh permukaan sel (gambar 6.16a dan 6.16c), sedangkan gambar 6.16b menunjukkan bahwa kavitas juga terjadi peristiwa ini.

Indikator lain yang mendukung proses terjadinya kematian sel MRSA adalah perubahan struktur sel yang diamati dengan menggunakan TEM. Pada pemaparan ozon selama 10 detik, terlihat bahwa sel MRSA mengalami perubahan struktur akibat dinding sel mengalami reaksi kimia dengan ozon. Hal ini menyebabkan dinding sel mengalami kerusakan yang menyebabkan keluarnya sitoplasma dari dalam sel (gambar 6.22). Pada pemaparan 20 detik, kondisi sel tidak terlalu berbeda dengan pemaparan sel MRSA dalam waktu 10 detik, kematian sel MRSA didominasi akibat efek kimia. Pada pemaparan 30 detik, sebagian besar sel MRSA mati akibat efek kimia yang disebabkan oleh ozon (6.24a, 6.24c, dan 6.24d), dan stres mekanik (6.24b). Pada pemaparan ozon selama 40 detik, sel MRSA mengalami kerusakan pada dindingnya akibat efek



kimia ozon sehingga sitoplasmanya keluar disekitar sel tersebut (gambar 6.25a) yang berlangsung secara terus-menerus sehingga semua bagian dalam sel keluar (gambar 6.25b dan 6.25c).

Dari hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa semua indikator kematian sel mendukung bahwa waktu/dosis paparan ozon berpengaruh terhadap persen kematian MRSA, kecuali perubahan diameter maksimum sel MRSA. Hal ini disebabkan oleh pengaruh ozon yang menyebabkan sel menggebung sebelum lysis atau dinding sel meluruh akibat reaksi kimia yang terjadi antara ozon dengan molekul penyusun dinding sel MRSA.

Hasil penelitian tahap 3, menunjukkan bahwa waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon berpengaruh sangat signifikan terhadap persen kematian MRSA, dengan $P\text{-value} = 0,000 < \alpha$ dan pengaruhnya dinyatakan dengan persamaan $K(t) = -13,4 + 4,9t - 0,051t^2$ dengan t = waktu paparan gelombang ultrasonik-ozon. Hasil ini didukung oleh hasil pengamatan kerusakan sel MRSA dengan menggunakan mikroskop elektron dan pewarnaan gram.

Hasil pengamatan perubahan bentuk dan ukuran morfologi sel MRSA dengan menggunakan SEM diperoleh hasil sebagai berikut: pada paparan 10 detik, sel MRSA mengalami kerusakan yang disebabkan oleh stres mekanik dan efek kimia sekaligus (gambar 7.6), sel MRSA memanjang/menggebung disertai dengan adanya sitoplasma disekitar sel tersebut. Pada pemaparan 20 detik, sel mengalami kerusakan akibat stres mekanik, kavitasi dan efek kimia (gambar 7.7a dan 7.7b), sedangkan pada gambar 7.7c sel mengalami kerusakan akibat stres mekanik dan efek kimia. Pada pemaparan 30 detik, kerusakan sel MRSA terjadi karena efek kimia dan kavitasi, ada serpihan sel yang telah pecah dan sitoplasma disekitar sel (gambar 7.8). Pada pemaparan 40 detik, pada gambar



7.9c sel mengalami kerusakan akibat stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia sekaligus. Sel menjadi lebih panjang, ada bekas pecahan dari dalam sel akibat tekanan intrasellular, dan disekitar sel terdapat sitoplasma.

Perubahan struktur sel yang digunakan sebagai salah satu indikator kematian MRSA bisa diamati dengan menggunakan TEM. Dari hasil pengamatan terhadap 100 ml suspensi MRSA yang dipapari dengan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon dengan waktu beragam, diperoleh hasil: pada pemaparan 20 detik, sel MRSA mengalami perubahan struktur yang disebabkan oleh kavitasi yang ditandai dengan pecahnya sel akibat tenaga yang berasal dari dalam sel (gambar 7.15b) dan pecahan hasil sel yang meledak (gambar 7.15d). sel mengalami perubahan struktur akibat efek kimia (gambar 7.15a, dan 7.15c).

Pada pemaparan 40 detik, perubahan struktur sel disebabkan gabungan antara kavitasi dan efek kimia. Pada gambar 7.16a terlihat sel MRSA duplo yang akan meledak akibat gabungan dari efek kimia dan kavitasi. Sel MRSA meledak akibat kavitasi dengan bagian sel yang terpisah masih berada disekitarnya (gambar 7.16c dan 7.16d), pada gambar 7.26b terlihat bahwa struktur sel berubah akibat efek kimia yang ditandai dengan mengalirnya sitoplasma keluar sel. Kombinasi metode ultrasonik dan ozon ini baik jika diterapkan jika waktu paparannya dibuat semakin kecil dari dosis lethal ozon.

Mekanisme kematian MRSA

Mekanisme kematian MRSA yang akan dibuktikan pada penelitian ini melalui:

1. Stres mekanik

Efek stress mekanik. Bila bakteri berada di dalam medan ultrasonik yang intensif dalam frekuensinya tinggi maka bakteri akan menderita getaran yang hebat dan stress mekanik yang besar, pada dinding sel terjadi perapatan dan



peregangan yang diantaranya terjadi beda tekanan. Bila regangan pada dinding sel besar hingga batas elastisitasnya dilampaui maka dinding sel akan sobek dan bakteripun mati (Ackerman, 1988, Maskunah, 1989). Hasil yang teramati dengan menggunakan mikroskop elektron (SEM dan TEM), bahwa kerusakan sel MRSA dimulai dari merenggang atau memampatnya sel MRSA akibat perubahan tekanan, hal ini terlihat bahwa sel MRSA menjadi semakin lonjong dan lebar atau mengecil. Jika selnya membesar akan bersifat hipotonik, tetapi jika mengecil bersifat hipertonik. Kerusakan terjadi pada dinding sel, yang ditandai dengan retakan diseluruh permukaan sel MRSA, atau sobek dibagian tertentu dan MRSA pun mati.

2. Kavitasi

Kavitasi adalah suatu efek akibat radiasi gelombang ultrasonik di dalam cairan. Bila suatu cairan diiradiasi dengan gelombang ultrasonik maka tekanan di dalam cairan akan mengembang hingga tumbuh gelembung mikro (micro bubble). Bilamana amplitudo yang dipacu gelombang akustik relatif besar, ketidakhomogenan lokal di dalam cairan terjadi dan menimbulkan pertumbuhan secara serentak dari inti menjadi rongga dalam dimensi makroskopik. Gelembung tersebut tidak stabil pada kondisi konsentrasi energi yang besar berakibat pertumbuhan yang tidak stabil sehingga menyebabkan pecahnya gelembung (Young, 2002; Susilo B. *et al*, 2010).

Kavitasi umumnya terjadi pada ultrasonik frekuensi rendah yang digunakan untuk merusak membran dan melisiskannya (Scherba *et al*, 1991; Lillard, 1994; Raso *et al*, 1998; Vollmer *et al*, 1998; Belgrader *et al*, 1999; Singer *et al*, 1999; Cochran & Prausnitz, 2001). Hancurnya kavitasi yang dihasilkan ultrasonik dapat merusak dinding sel bakteri, komponen struktural dan fungsional oleh kavitasi intraseluler (Chandrapala, 2012)



Hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop elektron terlihat bahwa sel MRSA yang mengalami kavitasi di dalam sel, volumenya akan semakin membesar akibat tekanan hidrostatik larutan semakin kecil. MRSA bergerak ke permukaan suspensi sedemikian hingga sel bersifat hipertonik yang pada akhirnya pecah, hasil pengamatan dengan menggunakan SEM kepingan sel yang pecah terlihat dengan baik. Sedang pengamatan dengan menggunakan TEM makin terlihat dengan jelas proses awal pecah sampai saat pecahnya sel, yang menyebabkan struktur sel mengalami perubahan. Pecahan sel berwarna hitam (seperti warna sel MRSA kontrol) artinya bahwa sel mengalami ledakan tanpa sempat mengeluarkan sitoplasmanya. Hal ini sesuai dengan pendapat Piyasena et al (2003), menjelaskan bahwa kavitasi adalah proses dimana microbubbles terbentuk dan pecah dalam cairan. Sebagai hasilnya terjadi panas lokal sekitar 5500 ° C dan tekanan sampai 100 Mpa, yang menyebabkan inaktivasi mikroba lokal. Alasan utama untuk pemecahan sel mikroba adalah perubahan tekanan yang disebabkan oleh cavitation

3. Efek kimia

Mekanisme lain untuk menjelaskan interaksi gelombang ultrasonik dengan bakteri adalah pengaruh kavitasi. Pengaruh kavitasi dapat merusak ikatan molekul. Molekul H₂O yang pecah menjadi radikal-radikal H, OH dan HO₂ dan terjadilah H₂O₂. Dengan demikian di dalam air akan terdapat banyak H₂O₂ yang berfungsi sebagai disinfektan yang berfungsi mengoksidasi tubuh bakteri tersebut sehingga bakteri mati, efek ini disebut efek yang mematikan (*Lethal effect*). Efek ini dapat digunakan untuk menyembuhkan luka ditubuh manusia (Maskunah, 1989).

Dari hasil penelitian teramati bahwa, efek kimia dari H₂O₂ yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik dan ozon menyebabkan kerusakan dinding sel MRSA.



hidrogen peroksida dan ozon dapat bereaksi dengan dinding sel MRSA yang terbuat dari bahan organik. Menurut Leusink (2010), sebagian molekul ozon melakukan kontak dengan dinding sel, reaksi ini disebut ledakan oksidatif terjadi yang secara harfiah menciptakan sebuah lubang kecil di dinding bakteri yang semakin lama semakin banyak, sel kehilangan bentuk sementara reaksi tetap berlangsung. Pada akhirnya dinding sel bakteri tidak dapat mempertahankan bentuknya dan sel pun mati. Dari hasil pengamatan dengan menggunakan SEM, terlihat bahwa sel MRSA mengembang kemudian mengeluarkan sitoplasma melalui dinding sel yang rusak sehingga sel mengempis secara perlahan sehingga bentuknya menjadi tidak beraturan. Pengamatan menggunakan TEM, terlihat bahwa sel MRSA yang mati diawali dengan kerusakan dinding sel yang terlihat pecah atau berlubang, secara perlahan sitoplasmanya keluar dan sel MRSA yang semula gelap berubah menjadi terang/transparan. Jika sitoplasmanya keluar terus, ada sel MRSA yang berbentuk bulat tetapi ditengahnya terang berbentuk lingkaran. Perbandingan kerusakan sel MRSA pada percobaan tahap 1, 2, dan 3.ditampilkan pada tabel 8.1

Tabel 8.1 Perbandingan mekanisme kerusakan sel MRSA pada penelitian tahap 1, 2, dan 3

Mekanisme kematian	Penelitian tahap 1 (Ultrasonik)	Penelitian tahap 2 (Ozon)	Penelitian tahap 3 (Ultrasonik dan ozon)
Stres mekanik	Kerusakan di dinding sel MRSA yang mengalami pergeseran dan tidak mampu kembali seperti semula, sitoplasma keluar sel. Bentuk, ukuran, struktur dan warna sel berubah, Sel mengalami lisis.	Kerusakan dimulai dari dinding sel akibat bereaksi dengan ozon, sehingga terjadi kebocoran yang berlangsung terus menerus. Sel lysis dengan bentuk tidak beraturan beraturan	Kerusakan sel MRSA terjadi karena efek fisika dan kimia sekaligus. Sel menjadi bertambah besar dengan dinding sel menipis yang tidak homogen. Bagian yang paling tipis mengalami benjolan transparan yang makin lama makin
Kavitasi	Kerusakan berasal dari dalam sel MRSA akibat pecahnya gelembung. Kerusakan terjadi pada dinding, membran, dan sitoplasma. Kepingan sel yang mati terlihat dengan jelas	Kavitasi tidak terjadi. Jika ada letupan kecil pada sel hal ini akibat menipisnya dinding sel sehingga sel MRSA bersifat hipertonic.	membesar sebelum akhirnya pecah. Kerusakan terjadi pada dinding sel, peptidoglikan, membran sel, dan sitoplasma mengalir keluar sel MRSA.
Efek kimia	Kerusakan terjadi pada dinding sel bereaksi dengan hidrogen peroksida, yang diikuti keluarnya sitoplasma. sel mengalami lisis.	Sebagian besar MRSA mati karena efek kimia. Ozon akan mengoksidasi dinding, petidoglikan dan membran sel. Kebocoran akan terjadi dan sitoplasma keluar. Sel MRSA mati secara nekrosis.	



BAB 9

KESIMPULAN DAN SARAN

9.1 Kesimpulan

Berdasarkan metode, data, analisis hasil, dan pembahasan maka penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Frekuensi paparan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia, dengan frekuensi efektif 26 kHz, kematian MRSA terbesar akibat stres mekanik.
2. Daya paparan gelombang berpengaruh sangat signifikan terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia, dengan daya lethal 8,432 watt, kematian MRSA terbesar akibat kavitasi.
3. Kerusakan sel MRSA terbesar akibat dipapari dengan gelombang ultrasonik dengan frekuensi beragam dan daya tetap disebabkan oleh stres mekanik yang menyebabkan sel MRSA membesar sehingga batas elastisitasnya terlampaui. Sedangkan kerusakan terbesar akibat dipapari dengan frekuensi tetap dan daya beragam disebabkan oleh kavitasi. Kerusakannya ditandai dengan perubahan bentuk dari bulat menjadi tidak bulat, ukurannya berubah dari semula, struktur selnya mengalami perubahan, dan terjadi perubahan warna sel MRSA dari ungu menjadi pink.
4. Dosis paparan ozon berpengaruh sangat signifikan terhadap persen kematian MRSA melalui stres mekanik, kavitasi dan efek kimia, dengan dosis lethal sebesar 0,274 mg/liter. Kematian MRSA terbesar disebabkan oleh efek kimia.



5. Kematian MRSA terjadi secara nekrosis. Kematian MRSA sebagian besar terjadi akibat efek kimia, dinding sel mengalami kerusakan sehingga menimbulkan lubang yang mengakibatkan sitoplasma mengalir keluar melalui lubang tersebut. Hal ini ditandai dengan perubahan bentuk yang semula bulat menjadi tidak bulat ukurannya berbeda dari sel kontrol, strukturnya selnya berubah dari gelap menjadi transparan, serta pewarnaan selnya berubah dari ungu menjadi pink.
6. Waktu paparan kombinasi gelombang ultrasonik dan ozon berpengaruh signifikan terhadap persen kematian MRSA. Kematian MRSA terbesar disebabkan oleh gabungan antara stres mekanik dan efek kimia.
7. Kematian MRSA terjadi secara nekrosis, dengan kerusakan sel MRSA yang dimulainya dari dinding selnya mengembang dan tidak dapat kembali ke bentuk semula. Dinding sel berlubang sehingga sitoplasma mengalir keluar sel dan meluber disekitarnya.
8. Sel yang terpapar gelombang ultrasonik kerusakan sel MRSA pada umumnya terjadi karena: stres mekanik di dinding sel, kavitasi dari dalam sel, dan efek kimia dimulai dari reaksi dengan dinding selnya sehingga membentuk lubang tempat keluarnya sitoplasma sel MRSA. Jika sel MRSA dipapari ozon kerusakan selnya sebagian besar terjadi karena efek kimia yang menyebabkan terjadinya lubang di dinding sel. Sel MRSA dipapari gelombang ultrasonik dan ozon, sel mengalami kerusakan mulai dari dinding sel, peptidoglikan, membran, dan sitoplasma. Kerusakannya dapat disebabkan karena gabungan antara stres mekanik, kavitasi, dan efek kimia.



9.2 Saran

Berdasarkan metode, data, analisis hasil, dan pembahasan maka peneliti dapat memberikan saran-saran sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh paparan gelombang ultrasonik terhadap persen kematian MRSA yang lebih baik menggunakan dosis paparan, hal ini dapat dilakukan dengan cara: volume suspensi MRSA dibuat beragam, atau waktu paparannya dibuat beragam.
2. Generator ozon sebaiknya dipilih yang out put yang kecil, sehingga waktu paparan ozon dapat dibuat menjadi lebih lama. Dengan demikian jumlah titik sampenya akan semakin banyak.
3. Pada percobaan dengan menggunakan metode ultrasonik-ozon, sebaik letak transduser dan sumber ozon berada pada satu posisi, sehingga intensitas gelombang ultrasonik dan ozon homogen.
4. Metode ini dapat digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka kronis, dengan jalan memodifikasi metode ultrasonik-ozon dengan peralatan yang mampu menyemprotkan larutan tersebut ke luka kronis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackerman E. 1998. *Biophysical Science*. Englewood Cliffts, New Jersey, pp 288 – 393.
- Aderen K. & Hasan A., 2005, Nosocomial infection caused by MRSA in Palestine, in Microbiology drug Resistant Vol. 1, Departement of biological science, An Najah University of Palistine, pp 75-77.
- Aguilar J., Urday - Cornejo V., Donabedian S., Perri M. & Tibbetts R., 2010. Staphylococcus aureus meningitis: case series and literature review. *Medicine* 89: 117–125.
- Appelbaum P., 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in Methicillin -resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *International. J. Antimicrob. Agents* 30 (5): 398–408.
- Arias K. M. (2010). *Investigasi dan Pengendalian di Fasilitas Pelayanan Kesehatan*, EGC, Jakarta. hal 34 – 35.
- Ashokkumar M. 2011. The characterization of acoustic cavitation bubbles an overview. *Ultrason Sonochem* 18:864 – 872.
- Atiyeh B.S., Dibo S.A., & Hayek S.N. 2009. Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. *In Wound J.* 6:420-430.
- Aydogan A., & Gurol M.D. 2006. Application of gaseous ozone for inactivation of Bacillus subtilis spores. *J Air Waste Manag Assoc.* 56:179-185.
- Baidillah M.R. 2008. Aplikasi ultrasonik untuk pendeteksian keretakan dalam logam. Laporan penelitian. FMIPA UI. hal 7-8.
- Biatoszewski D., & Kowalewski M. 2003. Superficially, longer, intermittent ozone therapy in the treatment of the chronic, infected wounds. *Ortop Traumatol Rehabil.* 5:652-658.
- Belgrader P, Hansford D, Kovacs G T, Venkateswaran K, Mariella R J, Milanovich F, Nasarabadi S, Okuzumi M, Pourahmadi F, & Northrup MA. 1999. A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis. *Anal Chem* ;71(19):4232–4236.
- Bocci V. 1999. Biological and clinical effects of ozone: Has ozone therapy a future in medicine? *J Biomed Sci.* 56:270–279.
- Bocci V. 2006. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol/ Appl Pharmacol.* 16:493–504.



Bocci V.A., Zanardi L., & Valter Travagli, 2011, Ozone acting on human blood yields a hermetic dose-response relationship, *Journal of Translational Medicine*.9:66-77.

Brooks, G. F., Janet, S. B., Stephen, A. M., 2001, Jawetz, Melnick, & Adelberg's, Mikrobiologi Kedokteran, Alih bahasa oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E.B., Mertaniasih, N.M., Harsono, S., dan Alimsardjono, L., Penerbit Salemba Medika, Jakarta. pp 143-146.

Cameron J.R. & Skofronick J.G. 1999. *Physics of The Body*. Second Edition, Medical Physics Publishing, pp 286 – 290.

Carel J.A., Garcia - Perez J.V., Benedito J., & Mulet A. 2012. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. *J Food Eng* 110:200 –207.

Cesur S., Cokca F. 2004. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital staff and outpatients. *Infect Control Hosp Epidemiol. Feb; 25(2):169-71*

Chamber H.F., DeLeo F.R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* vol. 7 no. 9. pp. 629-641.

Cheeke J.D.N. 2002. *Fundamentals and Application of Ultrasonic Waves*, CRC Press. Boca Raton London. New York. Washington DC. pp 17-33.

Clavo B., Pérez J.L., López L., Suárez G., Lloret M., & Rodríguez V. 2003. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Complement Med*. 9:251–256.

Cochran S A, & Prausnitz M R. 2001. Sonoluminescence as an Indicator of Cell Membrane Disruption by Acoustic Cavitation. *Ultrasound in Med & Bio* ;27(6):841–850.

Cracnell A.P. 1980. *Ultrasonics*. Wykeham Publications London Ltd. pp 180-189.

Davies A., Pottage T., Bennett A., & Walker J. 2011. Gaseous and air decontamination technologies for *Clostridium difficile* in the healthcare environment. *J Hosp Infect*. 77:199-203.

Deftereos S. P, Michailidou E., Karagiannakis G.K., Grigoriadi S., Prassopoulos P. 2009. Hematogenous infantile infection presenting as osteomyelitis and septicarthritis: a case report. *Cases journal* 2: 8293-8297

DeLeo F.R. Chambers H.F. 2009. Reemergence of antibiotic - resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. Sep;119(9):2464-2474.



De Leo FR., Diep B.A., & Otto M. 2009. Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections. *Infect Dis Clin North Am*. Mar;23(1):17-34.

Dehghani & Hadi M. 2005. Effectiveness of ultrasound on the destruction of E. coli. *American Journal of Environmental Sciences*. 1:187-189.

Denis O., Jans B., & Deplano A., 2007, Epidemiology of MRSA Among Resident of Nursing in Belgium, Departement of Microbiology, Erasmus Hospital Brussel Belgium, pp 1- 4.

de São José JFB., de Andrade NJ, Ramos AM, Vanetti MCD, Stringheta PC, & Chaves JBP. 2014. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control* 45:36 –50

Dewiyanti A., Ratnawati H. & Puradisastra S. 2009. Perbandingan pengaruh ozon, getah jarak cina (*Jatropha Multifida L.*) dan povidone iodine 10% terhadap waktu penyembuhan luka pada mencit betina galur Swiss webster. *Jurnal kedokteran maranatha*. 8(2):132-137.

DiPaolo N, Bocci V, & Gaggioti E. 2004. Ozone therapy editorial review. *Int J Artificial Organs*. ;27:168–75.

Dmitrieva N.A., Zyrianova N.V., Grigor'ian A.S. & Vasilishina S.I. 2009. Microflora dynamics in purulent skin wound in rats after ozonized perftorane applications. *Stomatologiia (Mosk)*. 88:14-16.

Dwiyanti, R.D., Muhlisin,A., dan Muntaha A. 2015. MRSA dan VRSA Paramedis RSUD Ratu Zalecha Martapura. *Medical Laboratory Technology Journal*. Vol. 1(1), 27-33

Elvis A.M. & Ekta J.S. 2011. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. Jan-Jun; 2(1): 66–70.

Fontes B., Heimbecker A.M.C, Brito G.D.S, Costa, S.F, Heijden I.M.V., Levin A.S., & Rasslan S. 2012. Effect of low - dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. *BMC Infectious Diseases*, 12:358 doi:10.1186/1471-2334-12-358

Fournier A. & Philpott R., 2005, Recognition of Staphylococcus aureus by the Innate Immun System, *Clin.Microbial. Rev*. Vol.18(3):521-40.

Gérard V. & Sunnen M.D. 2003. SARS and ozone therapy: Theoretical considerations. Research report. pp.1-14.

Gianoli D.C. 2001. Fisika. Edisi ke 2. Alih bahasa Yuhilsa Hanum. Penerbit Erlangga Jakarta.

Goetghebeur M. Landry P.A. Han D. & Vicente C. 2007. Methicillinresistant



Staphylococcus aureus: A public health issue with economic consequences. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* Jan;18(1):27-34.

Golman D.A. & Huskin W.C., 2000, Control of Nosocomial Antimicrobial Resistant Bacteria, Clinical Infectious Disease No. 24, New York USA, pp 137-139.

Golmohamadi A., Moller G., Powers J., & Nindo C. 2013. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrason Sonochem* 20:1316–1323.

Golsby R.A., Kindt T.K., & Osborne B.A., 2003, Imonology, W.H. Freeman and Co. New York USA, pp 20-27.

Goberman G. L. 1988. Ultrasonics Theory and Applications. The English University Perss. 2-13

Goyal R., Das S., & Mathur M. 2002. Colonisation of methicillin resistant Staphylococcus aureus among health care worker in a tertiary care hospital of Delhi. *Indian J Med Sci.* Jul;56(7):321-4.

Halliday, Resnick, dan Walker. 2010. *Fisika Dasar Edisi ke 7.* Erlangga, Jakarta.

Harris L. G., Foster S. J., & Richard R. G. 2002. An introduction to staphylococcus aureus and techniques for identifying and quantifying aureus adhesin in relation to adhesion to biomaterial: review. *European Cells and Materials* Vol. 4: 39-60.

Hansra N. K., & Shinkai K. 2011. Cutaneous community - acquired and Hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Dermatologic therapy* 24: 263–272.

Herceg Z., Ksenija M., Šalamon B.S, Jambrak A.R., Vukušić T. & Kaliterna J. 2013. Effect of High Intensity Ultrasound Treatment on the Growth of Food Spoilage Bacteria. Original scientific paper. Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia. pp 8-11.

Hudori. 2002. Studi daya reduksi desinfektans gelombang ultrasonik terhadap bakteri *E. Coli* dengan variasi bentuk gelombang. *Logika.* 7:32-38.

Hoigne, J. and Bader, H. 1983. Rate constants of reaction of ozone with organic and anorganic compounds in water. Dissociating organic compounds. *Water Research*, 17, 185-194

Jani P., Patel G., Yadav P., Sant L., & Hitesh J. H. 2012. Ozone therapy : The alternative medicine of future. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 2(4):196-203.

J. Chandrapala, C. Oliver, S. Kentish, & M. Ashokkumar. 2012. "Ultrasonics in food

processing - food quality assurance and food safety," *Trends in Food Science & Technology*, vol. b 26, no.2, pp. 88–98.

J. Chandrapala, C. Oliver, S.Kentish, & M. Ashokkumar, 2012. " Ultrasonics in food processing," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 19, no. 5, pp. 975–983.

Johns L.D. 2002. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *Journal of Athletic Training*. 37(3): 293-299.

Johansson E., Claesson R., & Van Dijken J.W. 2009. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent*. 37:449-453.

Juliantina F.R., Citra D.A.M., Nirwani B., Nurmasitoh T., & Bowo E.T., 2009. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen pengganti bakterial terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. *Jurnal Kesehatan dan Kedokteran Indonesia*. 1:56-65.

Kim H.S, Noh S.U., Han Y.W., Kim K.M., Kang H., Kim H.O., Park Y.M. 2009. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Medical Sci*. 24:368-374.

Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA:the journal of the American Medical Association* 298: 1763–1771.

Kumar R., Yadav N., Rawat L. & Goyal M K, 2014. Effect of Two Waves of Ultrasonic on Waste Water Treatment. *J Chem Eng Process Technol*. 5(3): 1-6.

Kusuma S.A.F. 2009. *Staphylococcus aureus*. Karya tulis ilmiah. Fakultas Farmasi Universitas Pajajaran. hal 23-26.

Laura L.D., 2009, Antibiotic Resistance, Pediatric infectious Disease Fellow, United States, pp 10-13.

Leusink J. 2010. How does ozone kill bacteria?. *Ozone Journal*. 13:67-80.

Li J., Ahn J., Liu D., Chen S., Ye X., & Ding T. 2016. Evaluation of Ultrasound - Induced Damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Flow Cytometry and Transmission Electron Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*:82(6):1828-1837

Lillard H S. 1994. Decontamination of Poultry Skin by Sonication. *Food Technol – Chicago* ;48(12):72–73.

Lillard S. 2004. Ozone effects on specific bacteria, viruses & molds. Technical data. pp 1-2

Lipsky B.A., & Hoey C. 2009. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infec Dis*. 49:1541-1549.



- Lochman P., Plodr M., Páral J., & Smejkal K. 2010. Nanofiber micro-dispersed oxidized cellulose as a carrier for topical antimicrobials: first experience. *Surg Infect.* 11:29-32.
- Lowy F.D. 1998. Staphylococcus aureus infection. *N Engl Journal Med.* 339:520-532.
- Lumongga F., 2008. *Apoptosis.*, Departemen patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Hal 3-4.
- Mahmudah, R, Soleha, TU & Ekowati, C (2013), 'Identifikasi Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pada Tenaga Medis dan Paramedis di Ruang Intensivecare Unit (ICU) dan Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Umum Daerah Abdul Moeloek', *Medical Journal of Lampung University*, vol 2, pp. 71 -76.
- Mansyur M. & Sembiring N. 2009. *Aplikasi Gelombang Ultrasonik Untuk Menurunkan Jumlah Bakteri E. Coli Pada Proses Pengolahan Air Bersih*, Institut Teknologi Adhi Tama Surabaya. Tesis. hal 68-73.
- Maskunah. 1986. *Pengaruh Gelombang Ultrasonik Terhadap Bakteri Dan Suspensi.* Kolokium. Jurusan Fisika FMIPA Universitas Airlangga Surabaya. hal 1 – 10.
- Mason T.J. 2009. *Sonochemistry – Beyond Synthesis.* the faculty of health and life sciences, Coventry University, Coventry CV1 5FB. 1-10.
- Miller M.W., Miller D.L., Brayman A.A. 2001. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol.* 22(9):1131-54.
- Noci F., Ribeiro M., Cronin D.A., Morgan D.J., & Lyng J.G. 2009. Effect of thermosonication, pulsed electric field and their combination on inactivation of *Listeria innocua* in milk, *Int. Dairy J.* 19:30-35.
- Nurkusuma D. (2009). 'Faktor Yang Berpengaruh terhadap Kejadian *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Pada Kasus Infeksi Luka Pasca Operasi Di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang'. *Tesis Universitas Diponegoro.* Semarang.
- Otto M. 2010. Looking toward basic science for potential drug discovery targets against community - associated MRSA. *Medicinal research reviews* 30: 1–22.
- Patil S., Bourke P., Kelly B., Frías J.M., & Cullen P.J. 2009. The effects of acid Adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10:486–490.



Pelezar M.J. & Chan E.C.S. 1988. *Elements of Microbiology 2*. McGraw-Hill Book Company. pp 461 – 479.

Piyasena P, Mohareb E, & Mckellar RC. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol*; 87:207–216.

Prijo, T. A. 1989. *Studi tentang Cepat Rambat Gelombang Ultrasonik Dan Metode pengukurannya*, Kolokium, Jurusan Fisika FMIPA Universitas Airlangga Surabaya. pp 16 -27.

Rahardja K., & Tjay T.H., 2002. *Obat - obat Penting*, Edisi Kelima, PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta. pp 45-46

Raji M. 2015. Buku ajar Mikrobiologi, Penerbit Buku Kedokteran EGC Jaklatra. Hal 10, 34 – 36.

Radji, M., Malik, A. and Widyasmara, A., 2010. Rapid detection of Salmonella in food and beverage samples by polymerase chain reaction. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 6(2) 2010, pp. 166-170.

Raso J, Pagan R, Condon S, & Sala F J. 1998. Influence of Temperure and Pressure on the Lethality of Ultrasound. *Appl Env Micro*;64(2):465–471.

Rastogi N. K. 2011. Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51:705–722.

Rubin, M.B., 2001. The history of ozone. The Schonbein Period, 1839-1868. *Bulletin fot tke History of Chemistry*, 26(1), 40-56.

Sachdev D., Amladi S., Natraj G., Baveja S., Kharkar V., Mahajan S., & Khopkar U. 2003. An outbreak of methicillin –resistant Stpahylococcus aureus (MRSA) infection in dermatology indoor patiens. *Indian Journal of Dermatology*;69(6):377-80

Safdar N., & Maki D.G., 2002. The commonality of risk factor for nosocomial colonization and infection with antimicrobial - resistant Staphylococcus aureus, enterococcus, gram – negative basilli, clostridium difficile, and Candida. *Ann Intern Med*. Jun 4;136(11):834-44

Sari Y.D., Djannah S.N., & Nurani L.H., 2010, Uji aktivitas anti bakteri infusa daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara in Vitro terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan Escherichia coli ATCC 35218 serta profil kromatografi lapis tipisnya. *Kes Mas* vol. 4 (3):144-239.

Sastroasmoro S., Suseno U., Soebijanto N., Mardiati R., Utami W., Nasrul M., Arcan M., & Rahajeng N. 2004. *Terapi Ozon*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 4-15.

Schaumburg, F., Kock, R., Mellmann, A., Richter, L., Hasenberg, F.,



Kriegeskorte, A., Friedrich, A.W., Gatermann, S., Peters, G., von Eiff, C., & Becker, K. 2012. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3186–3192.

Scherba G, Weigel R M, & O'Brien W D. 1991, Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol* ;57:2079–2084.

Schultze C. H., Hulskamp T., Schikorski M., & Thies E. 2004. Option and restriction of ultrasonic-assisted wound debridement-UAW. Department of general, trauma, visceral surgery and phlebology Kreiskrankenhaus. Scientific Poster.

Seidler V., Linetskiy I., Hubalkova H., et al. 2008. Ozone and its usage in general medicine and dentistry-a review article. *Prag Med Rep.*;109:5e13.

Singer A J, Coby C T, Singer AHHCT Jr, & Tortora G T. 1999. The Effects of Low-Frequency Ultrasound on *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*;38:194 –196.

Sivasakthivel T & Reddy K.K.S.K. 2011. Ozone layer depletion and its effects: A Review. *International Journal of Environmental Science and Development*, 2(1):30-37.

Song, J.H., Hsueh, P.R., Chung, D.R., Ko, K.S., Kang, C.I., Peck, K.R., Yeom, J.S., Kim, S.W., Chang, H.H., Kim, Y.S., Jung, S.I., Son, J.S., So, T.M., Lalitha, M.K., Yang, Y., Huang, S.G., Wang, H., Lu, Q., Carlos, C.C., Perera, J.A., Chiu, C.H., Liu, J.W., Chongthaleong, A., Thamlikitkul, V., & Van, P.H., 2011. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1061–1069.

Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., & Mackenzie, F. M., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) : global epidemiology and harmonization of typing methods. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39, 273–282.

Srinivasa R.M., & Linga R.D. 2013. Ultrasonic dosimetry studies on disruption of Bacteria cultures – metaphorical study of ultrasound at 2 MHz and 10 MHz. *International Journal of Research in Pure and Applied Physics.* 3(3): 27-38.

Suharto dan Chatim A. 2014. Fisiologi Pertumbuhan Kuman. Penerbit Binarupa Aksara, Tangerang 36 – 37.

Sunnen G.V. 1998. Revised 2005. Ozone in medicine: Overview and future direction. *Journal of Advancement in Medicine.* 1 (3):159-174.



Sunnen G.V. 2000. The utilization of ozone for external medical applications. *Ozonics International*. 21:51-58.

Supranto, J. 2000. Teknik Sampling untuk Survei dan Eksperimen. Penerbit PT Rineka Cipta, Jakarta. 56 -57.

Swerdlow A.J., Challis L.J., Corgon D.N.M., Coulton L.A., Darby S.C., Duck F.A., Gowlad P., Lomas D.J, & Noble D. 2010. *Health Effects of Exposure to Ultrasound and Infrasound*. Report of Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, London, pp 7 -14.

Talaro K & Talaro A. 1993. *Foundation Microbiology*, Wm. C. Brown Communication, Inc. USA. pp 272-292.

Tavares, A., Miragaia, M., Rolo, J., Coelho, C., & de Lencastre, H., 2013. High Prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1269–1283.

Tjaniadi P., Lesmana M., & Subekti D. 2003. Antimicrobial Resistance of Bacterial Pathogens Associated with Diarrheal Patients in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 68(6): 666-10.

Tim mikrobiologi FK Universitas Brawijaya, *Bakteriologi medik*, Bayu media publishing. Malang. pp 15-17

Torke K. 2004. Healing wound through ultrasound. *Podiatry Management*. November/Desember:130-134.

Tortora G. J., Funke B. R., and Case C. L. 2007. *Microbiology*. Pearson Education Inc. San Francisco. pp 87-99.

Trisnobudi A. 2001. *Aplikasi Ultasonik*, Departemen Teknik Fisika. penerbit Institut Teknologi Bandung, pp 41 - 55.

Vollmer A C, Kwakye S, Halpern M, & Everbach E C. 1998. Bacterial Stress Responses to 1 MHz Pulsed Ultrasound in the Presence of Microbubbles. *Appl Envr Microbio*;64(10): 3927–3931.

Wahjono H., 2001; Faktor yang berpengaruh terhadap kejadian MRSA pada penderita dengan bakterimia di ruang perawatan intensif. Studi kasus di RSUP dr Hasan Sadikin dan RSUP dr Kariadi. Suatu kajian operasional terpadu, Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Pajajaran Bandung.

Wells P.N.T. 1983. *Biomedical Ultrasonics*. Academic Press Inc, London Ltd, pp 5 - 21.



Wenzel R. & Brewer T., 2002, A Guide to Infection Control in Hospital. 2st Edition, International society for Infectious disease, Boston USA, pp 4-10.

Widodo A. 1990. Pembersihan Kotoran Pada Benda Dengan Menggunakan Gelombang Ultrasonik. Kolokium 2. Jurusan Fisika FMIPA Universitas Airlangga Surabaya. hal 21-25.

Wilson J.W., Schurr M.J., LeBlanc C.L., Ramamurthy R., Buchanan K.L., & Nickerson C.A. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Medical Journal* ;78:216-224.

Wilson P., 2008, Handwashing Important to Prevent MRSA, University College Hospital Science News General Microbiology, London, pp 2-6.

Wirza E. 2008. Rekonstruksi Sinyal Akustik A –mode Menjadi B-mode Sebagai Dasar Sistem Pencitraan Ultrasonik. Laporan Penelitian FMIPA Universitas Indonesia. hal 12-13.

Xiao, M, Wang, H., Zhao, Y., Mao, L.L., Brown, M., Yu, Y.S., O'Sullivan, M.V., Kong F, & Xu, Y.C., 2013. National surveillance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in China highlights a still-evolving epidemiology with 15 novel emerging multilocus sequence types. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3638–3644.

Yatarif N. W. 2008. *Karakterisasi Sinyal Akustik Untuk Mendeteksi Keabnormalan Jaringan Tubuh Menggunakan Ultrasonik*. Laporan Penelitian FMIPA Universitas Indonesia, Jakarta. hal 18 – 23.

Young K. D. 2010. *Bacterial Cell Wall*. by John Wiley & Sons, Inc., or related companies. All rights reserved. pp 54-55.