

PENGARUH OZONATED WATER SEBAGAI ANTISEPTIK DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS (in vitro)

Yulita Kristanti & Desy

Bagian Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Latar Belakang. Penelitian seputar ozonated water akhir-akhir ini cukup banyak diminati karena bahan ini mempunyai potensi antibakteri yang menjanjikan. **Tujuan** penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ozonated water pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus Aureus*. **Metode Penelitian.** Penelitian ini dilakukan dengan cara mencampurkan 1 ml larutan bakteri 10^6 CFU/ml dengan 10 ml ozonated water konsentrasi 4 ppm selama 10 detik (kelompok I), 20 detik (kelompok II), 30 (kelompok III) dan 40 detik (kelompok IV), akuades (kontrol negatif), iod (kontrol positif) kemudian semua diencerkan dengan akuabides 10ml. Selanjutnya dari masing-masing kelompok diambil 0,01 ml untuk ditanam pada MHA, inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dalam anaerobic jar kemudian dilakukan penghitungan koloni. Data dianalisis dengan anava satu jalur dilanjutkan dengan uji LSD. **Hasil.** Anava satu jalur memperlihatkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Uji LSD menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok I, II, III, IV dengan kelompok V (akuades) Terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok I dan kelompok VI (iod). Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok II, III, IV terhadap kelompok VI (iod). Uji korelasi Produk Momen Pearson menunjukkan adanya korelasi negatif yang sangat kuat. **Kesimpulan.** Ozonated water 4 ppm memiliki daya antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Semakin lama waktu kontak, daya anti bakterinya semakin besar. *Maj Ked Gi*; Juni 2012; 19(1): 25-28

Kata kunci: ozonated water, antiseptik, *Staphylococcus Aureus*

ABSTRACT

Background. Some previous research show that the antibacterial effect of ozonated water is very promising. **The aim** of this study was to know the antibacterial effect of ozonated water on *Staphylococcus aureus*. **Method.** One ml of 10^6 CFU/ml *S. aureus* suspension was mixed with 10 ml ozonated water for 10second (group I), 20second (group II), 30 second (group III), 40 second (group IV) As negative control *S. aureus* was mixed with aquadest (group V), and as positive control *S. aureus* was mixed with iod (group VI). Furthermore, 0,01 ml from each group was cultivated on MHA, incubated for 24 hours- 37°C followed by colony counting. Data was analyzed using one way anova followed by LSD. **Result.** One way anova show significant difference among the groups and LSD test show significant mean difference between group I, II, III, IV and V. Significant difference can also be seen between group I and V. No significant difference between group II, III, IV and VI. Product Momen Test show strong negative correlation. **Conclusion:** Ozonated water 4 ppm has antibacterial effect on *S. aureus*. The longer the contact time, the stronger the antibacterial effect. *Maj Ked Gi*; Juni 2012; 19(1): 25-28

Key words: ozonated water, antiseptic, *Staphylococcus Aureus*

PENDAHULUAN

Untuk mendukung keberhasilan perawatan endodontik bedah, seringkali peran obat kumur tidak dapat diabaikan. Hal ini oleh karena obat kumur yang beredar di pasaran biasanya memiliki potensi anti bakteri yang cukup signifikan dalam mengurangi jumlah koloni bakteri di rongga mulut.

Akhir-akhir ini ozonated water mulai banyak diminati oleh kalangan medis karena bahan inipun ternyata mempunyai potensi antibakteri yang cukup menjanjikan. Ozonated water adalah air yang mengandung ozon. Ozone yang terlarut di dalam air sebesar $1\mu\text{g/ml}$ merupakan antimikroba. Ozonated water mempunyai sifat antimikroba terhadap bakteri gram-positif, bakteri gram-negatif, yeasts dan spora¹. Peneliti terdahulu telah meneliti efek ozonated water

terhadap mikroorganisme rongga mulut pada plak gigi secara in vitro. Setelah terpapar dengan ozonated water 4 mg/L selama 10 detik, hampir tidak ditemukan adanya pertumbuhan mikroorganisme plak gigi².

Ozon terdapat di alam bebas. Di atmosfer ozon melindungi bumi dari bahaya radiasi sinar ultraviolet. Ozon diketahui mempunyai aksi antimikroba dan disinfektan terhadap bakteri, virus, jamur dan protozoa³. Ozon terdiri dari tiga atom oksigen, oksigen yang terkena radiasi sinar ultraviolet akan terurai menjadi dua atom oksigen, satu atom oksigen (O_1) akan bergabung dengan oksigen (O_2) lain maka terbentuklah ozon. Ozon bersifat tidak stabil, dapat terurai $\text{O}_2 + \text{O}_1$ dalam 20 menit, maka harus digunakan dalam 5-10 menit pertama untuk tetap mendapatkan manfaatnya.

O₁ disebut atom *singlet oxygen*, yang sangat reaktif pada substansi yang seharusnya tidak terdapat dalam tubuh, seperti mikroorganisme yang patogen (virus, bakteri, jamur) dan sisa metabolisme¹. Ozon akan menghancurkan dinding sel mikroorganisme. Mekanismenya adalah ozon akan bereaksi dengan ikatan rangkap pada asam lemak dari dinding dan membran sel bakteri, atau bereaksi dengan selubung protein virus⁴.

Ozon membunuh mikroorganisme dengan cara mengoksidasi dan menghancurkan dinding sel sehingga mampu membunuh mikroorganisme yang resisten seperti spora bakteri, kista dan virus dalam konsentrasi rendah dan waktu kontak yang singkat⁵. Penggunaan ozon tidak meninggalkan produk sisa yang berbahaya serta non-karsinogenik⁷.

Mekanisme disinfektan ozon adalah dengan cara mengoksidasi langsung atau merusak dinding sel yang mengakibatkan kebocoran dari unsur pokok sel, merusak unsur pokok dari asam nukleat yaitu pada cincin purin atau cincin pirimidin, serta putusnya ikatan utama antara karbon dan nitrogen. Setelah dioksidasi permeabilitas membran akan naik dan molekul ozon akan dengan mudah masuk dan merusak sel. Oksidasi dari ozon mengakibatkan kerusakan dinding sel dan membran sitoplasma mikroorganisme. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas bakterisidal *ozonated water* mengakibatkan kecacuan fungsi dan struktur membran sitoplasma^{2,8}.

Ozon sebagai disinfektan dapat menghancurkan virus dan bakteri lebih efektif daripada klorine, proses ozonisasi memerlukan waktu kontak yang pendek (kira-kira 10-30 menit). Pada dosis rendah ozon kurang efektif dalam menghancurkan beberapa jenis virus dan spora bakteri dan kista. Kerugian ozon adalah bahan ini sangat reaktif dan korosif⁹.

Ozon yang terlarut di dalam air sebesar 1µg/ml merupakan antimikroba dan akan terurai menjadi H₂O dan O₂^{1,9}. Ozon juga mempunyai antibakteri, antiinflamasi, anti parasit, anti-tumor dan antiviral⁷. Penggunaan *Ozonated water* akan lebih bermanfaat jika digunakan secepatnya setelah dibuat¹.

Ozon dalam tubuh akan terurai menjadi singlet oksigen (O₁) dan oksigen (O₂). Singlet oksigen berfungsi sebagai antioksidan untuk menetralkan radikal bebas. Ozon dalam darah akan meningkatkan kadar oksigen. Oksigen akan mengoksidasi bakteri dan sel-sel yang rusak. Oksigen tidak membahayakan, tetapi mengoptimalkan fungsi dan organ metabolisme tubuh¹⁰.

Aktivitas antimikroba *ozonated water* dipengaruhi oleh konsentrasi ozon, waktu kontak dan temperatur. Konsentrasi ozon 0,04 ppm dalam 4 menit dapat membunuh bakteri, virus dan jamur¹¹.

Ozon yang disimpan dalam es akan bertahan lebih lama dibandingkan jika berada dalam suhu kamar². Kadar 100 persen ozon dalam suhu kamar mudah sekali meledak. Dewasa ini ozon disimpan dalam

bentuk *ozonized water* atau *ozonized ice*. Ozon beracun bagi manusia bila dihirup pada konsentrasi 50 ppm selama 1 jam.

Staphylococcus aureus adalah kokus gram positif dengan diameter 0,8 sampai 1,0 mikron, tersusun dalam kelompok tidak teratur dengan formasi seperti anggur, ditemukan dalam bentuk kokus tunggal atau kokus berpasangan, tidak berspora, tidak bergerak, tidak berkapsul dan pada media agar ditunjukkan dengan timbulnya koloni berwarna kuning emas¹².

Staphylococcus aureus dalam rongga mulut dapat menyebabkan infeksi dentoalveolar akut, kista rahang, abses endodontik, parotitis, lesi mukosa mulut dan stomatitis¹³. *Staphylococcus aureus* merupakan kuman patogen karena dapat mengkoagulasi plasma, bersifat hemolitik dan meragikan manitol. Kuman ini di dalam tubuh manusia menghasilkan eksotoksin, leukosidin, enterotoksin dan koagulase. Enterotoksin sebagai penyebab penting keracunan makanan¹⁴.

Iodine potassium iodide mampu membunuh mikroorganisme *broad spectrum* dalam saluran akar, namun memperlihatkan toksisitas yang rendah. *Iodine* bertindak sebagai oksidator yang cara kerjanya bereaksi dengan gugus sulfhidril dari enzim bakteri, memecah ikatan disulfid. Kombinasi *iodine* dengan klorhexidindapat membunuh secara efektif bakteri yang resisten terhadap kalsium hidrosid. Salah satu kerugiannya adalah bahwa pada beberapa pasien yang rentan, *iodine* dapat menimbulkan reaksi alergi.

Antibakteri adalah zat yang dapat memusnahkan bakteri, khususnya yang merugikan manusia sedangkan disinfektan adalah suatu bahan kimia yang mampu mematikan sel vegetatif suatu mikroorganisme, dan digunakan untuk benda mati. Antiseptik adalah bahan yang mampu melawan infeksi, mencegah pertumbuhan atau kerja mikroorganisme dengan cara menghambat pertumbuhan serta aktivitasnya. Antiseptik digunakan untuk makhluk hidup¹⁴.

Disinfektan yang ideal selain dapat membunuh bentuk vegetatif suatu mikroorganisme, juga mempunyai waktu kontak singkat, efektif pada temperatur kamar, tidak korosif, tidak toksik terhadap manusia dan ekonomis. Satu hal yang membedakannya dengan antiseptik yaitu bahwa bahan ini mempunyai sifat toksisitas selektif yang artinya bersifat toksik terhadap mikroorganisme patogen namun tidak toksik terhadap sel manusia¹⁵.

Antibakteri ada yang bersifat bakteriostatik, yaitu mampu menghambat pertumbuhan bakteri; dan ada yang bersifat bakterisid, yaitu mampu mematikan bakteri. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM). Kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh bakteri dikenal sebagai kadar bunuh minimal (KBM)¹⁵.

Mekanisme kerja antibakteri antara lain : (1) mengganggu metabolisme sel bakteri, (2) menghambat sintesis dinding sel bakteri, (3) mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, (4) menghambat sintesis protein sel bakteri, dan (5) menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri ¹⁶.

Berdasarkan uraian latar belakang maka timbul permasalahan apakah *ozonated water* dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus Aureus*.

METODE PENELITIAN

Pembuatan *ozonated water* dilakukan di Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) Yogyakarta. Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* dibuat sesuai dengan standar Brown III 10⁸ CFU/ml kemudian diencerkan hingga 10⁶ CFU/ml.

S. aureus 10⁶ CFU/ml 0,01ml dicampurkan dengan 10ml *ozonated water* konsentrasi 4ppm selama 10detik (kelompok I), 20 detik (kelompok II),30 detik (kelompok III), 40 detik (kelompok IV) kemudian diencerkan dengan akuabides 10 ml. Sebagai kontrol digunakan akuades (kelompok V) dan iod (kelompok VI). Dari masing-masing tabung reaksi diambil larutan uji sebanyak 0,01ml, diteteskan pada media MHA, dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk masing-masing waktu pencampuran bakteri dan ozon dilakukan 3 kali replikasi pada media MHA. Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam terjadi pertumbuhan koloni *S. aureus*. Perhitungan jumlah koloni dengan persamaan

$$\text{Jumlah koloni bakteri} = \frac{\text{Jumlah koloni perhitungan} \times \text{Jumlah pengenceran}}{\text{Volume(ml)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil rerata dan simpangan baku jumlah koloni *S. aureus* setelah perlakuan *ozonated water* 4 ppm 10, 20, 30 detik dan kontrol (CFU/ml)

Kelompok	Σx	\bar{x}	A
10 detik	947	236,75	133,89299
20 detik	227	56,75	35,16983
30 detik	55	13,75	11,44188
40 detik	6	1,5	1,73205
Kontrol aquades	387	387	0,00000
Kontrol iod	1	1	0,00000
Anova			P <0,05 **
LSD			P <0,05 **

Keterangan :

- Σx = Jumlah koloni untuk tiap kelompok percobaan
- \bar{x} = Rerata koloni untuk tiap kelompok percobaan
- α = Simpangan baku koloni untuk tiap kelompok percobaan

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui rerata jumlah koloni *S. aureus* terbesar terlihat pada waktu kontak 10 detik yaitu 236,75 × 10² CFU/ml sedang-

kan rerata terkecil terlihat pada waktu kontak 40 detik yaitu 1,5 × 10² CFU/ml.

Hasil Analisis Variansi (ANOVA) satu jalur menunjukkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna (p<0,05) *ozonated water* dengan waktu pencampuran yang berbeda dan kontrol dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Berdasarkan hal tersebut maka H₀ yang menyatakan bahwa tidak ada pengaruh *ozonated water* 4ppm dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*, ditolak. H_a yang menyatakan ada pengaruh *ozonated water* 4ppm dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*, diterima. Selanjutnya dilakukan uji LSD dengan tingkat signifikansi 0,05 (LSD_{0,05}) untuk mengetahui signifikansi rerata perbedaan antar kelompok perlakuan o dan control. Hasilnya menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok I,II,III,IV dan kelompok V (kontrol negatif :akuades), antara kelompok I dan kelompok VI (kontrol positif:iod). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok II,III,IV dan kelompok VI(kontrol positif : iod)

Untuk melihat hubungan antara kenaikan waktu kontak *ozonated water* 4ppm terhadap pertumbuhan *S. aureus*, dilakukan analisis dengan uji Korelasi Momen Produk dari Pearson. Hasilnya menunjukkan terdapat korelasi yang bermakna (p<0,05) antara kenaikan waktu kontak *ozonated water* 4ppm dan pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Koefisien korelasi Pearson (r = -,847) menunjukkan kekuatan korelasi yang sangat kuat antara kedua variabel dengan arah korelasi yang berlawanan, sehingga semakin lama waktu pencampuran *ozonated water* 4 ppm, semakin sedikit pertumbuhan bakteri yang terjadi.

Angka rerata terendah terlihat pada kelompok 40 detik yaitu sebesar 1,5 X 10² CFU/ ml, sedangkan angka tertinggi terlihat pada kelompok 10 detik yaitu sebesar 236,75² CFU/ ml. Hal ini oleh karena ozon dalam air akan terurai dan bereaksi dengan molekul air membentuk OH-, yang dapat merusak enzim bakteri, DNA bakteri dan dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri sehingga menyebabkan kematian sel bakteri ¹⁰. Dengan demikian, semakin lama bakteri berkontak dengan *ozonated water*, semakin banyak ion hidroksil yang masuk, semakin meningkat proses oksidasi oleh ozon, sehingga kematian bakteri juga akan semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan peneliti sebelumnya bahwa semakin lama mikroorganisme berkontak dengan suatu agen antibakteri maka akan semakin banyak juga bakteri yang mati ¹⁴.

Ozon memiliki potensial oksidasi yang besar yang dapat merusak dinding sel dan membran sitoplasma bakteri, sehingga permeabilitas membran akan naik dan mikroorganisme akan mati ². Ozon akan terdisosiasi menjadi oksigen dan O nascent (O1) yang sangat reaktif sehingga dapat mengoksidasi dinding sel bakteri dengan berikatan pada ikatan rangkap asam lemak membran sitoplasma. Aki-

batnya terjadi penurunan tegangan permukaan dan kenaikan permeabilitas sehingga terjadi kebocoran sel. Selanjutnya ozon akan mudah masuk ke dalam sel dan O₁ merusak asam nukleat bakteri. Ozon akan merusak cincin pirimidin dan memutus ikatan antara cincin pirimidin dan gugus gula pada asam nukleat. Kerusakan asam nukleat ini akan berakibat pada kematian sel¹⁷. dan atom oksigennya akan bergabung dengan protoplasma sel dan merusak sel *S. aureus*.

Disosiasi ozon dalam air akan menghasilkan produk sekunder berupa OH⁻. OH⁻ ini akan berikatan dengan fosfolipid pada membran sitoplasma dan menyebabkan denaturasi protein sel menyebabkan kerusakan integritas membran sitoplasma sehingga terjadi kekacauan fungsi transport aktif dari sel dan berakibat kematian sel¹⁸.

KESIMPULAN

Ozonated water 4 ppm memiliki daya antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Semakin lama waktu kontak *ozonated water* 4ppm dengan *Staphylococcus aureus*, semakin besar daya anti bakterinya dalam menghambat pertumbuhan bakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adachi K, *Ozonated Water*. Available at : http://www.educate-yourself.org/ozone/ozone_art2.shtml, Accessed : 7/7/2006, 2003..
2. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T, Efficacy of Ozone on Survival and Permeability of Oral Microorganisms. *J. Oral Microbiology Immunology* 19:240-6, 2004:
3. Fukuizumi T, Yano J, Nagayoshi M, Kitamura C, Terashita M, Nishihara T, Antimicrobial Activity of Ozonated Water Against Dental Plaque [abstract], of the 79th General Session of the International Association for Dental Research, 2001, Available at <http://www.kavo.com/En/Downloads/healozone/biological-therapies-in-dentistry.pdf>. Accessed : 7/7/2006
4. Lehtola MJ, Miettinen IT, Vartiainen T, Myllykangas T, dan Martikainen PJ, Microbially Available Organic Carbon, Phosphorus, and Microbial Growth in Ozonated Drinking Water, *Water Res.* 35(7):1635-40, 2001.
5. Anonim, Use Of Ozone in the Fish Industry, Available at: http://onefish.org/cdsstatic/en/use_ozone_fish_industry_en_38402_105432.html, 1997,
6. Sugiarto AT, Ozon, Kawan atau Lawan, Available at : <http://www.chem-is-try.org>, 2003.
7. Thorp C, O₃ What is it and How it Work With Water and Air., Available at : <http://www.WPPINC.com/O3.htm>, 2006.
8. Environmental Protection Agency, Wastewater Technology Fact Sheet : Ozone Disinfection, Available at : <http://www.epa.gov/owm/mtb/ozone.pdf>, 1999.
9. Beck Protocol, Health from the Heart-Ozonated Water : Freshly Ozonating Water, Available at : <http://www.Sharinghealth.com/beckprotocol/ow.html>, 2006.
10. Juanita V, Kolom Preview Pasfm Healthcare : Terapi Ozone. Available at : <http://www.sinarharapan.co.id/ip-tek/kesehatan/2004/1001/kes2.html>, 2003.
11. Goddard R, This Information is in no Particular Order : What is Ozone., Available at : <http://www.wppinc.com/o3info.htm>, 2006.
12. White, R.R., Staphylococci, dalam Willet, N.P., White, R.R. and Rosen, S.: *Essential Dental Microbiology*, Prentice Hall International Inc., California, h. 153-156, 1991.
13. Rams TE, Feik D. and Slots J, Staphylococci in Human Periodontal Diseases, *Oral Microbiol Immunology.*, 1990:5(1):29-32
14. Pelezar MJ, and Chan ECS, *Dasar-Dasar Mikrobiologi II* (terj.), UI Press, Jakarta, h.486-99, 1998.
15. Gleason MJ, Molinari JA, Antiseptics and Disinfectants dalam Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ, (eds) : *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, 4thed., Mosby, A Harcourt Health Sciences Company, St.Louis, Philadelphia, London, Sydney, p.608. 1995.
16. Setiabudy, R dan Gan VHS, Antimikroba dalam Ganiswarna, S.G., (eds) : *Farmakologi dan Terapi*, ed.4, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, h.571-572, 1995.
17. McNair Scott, DB dan Leshner AC, Effect of Ozon on Survival and Permeability of Eschericia Coli, *J. Bacteriol* 85:567-76, 1963
18. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spano JCE, Marchesan MA, Pecora JD, Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite, *Braz Dent J.* 13(2):113-117, 2002