

## **BAB I PENGANTAR**

### **1.1.Latar Belakang**

Kanker merupakan kumpulan sel abnormal yang tumbuh dengan cepat, tidak terkendali, tidak terbatas, tidak terkoordinasi dan invasi ke jaringan sekitarnya serta tidak berfungsi fisiologis. Data *global action against cancer* dari *World Health Organization* menyatakan bahwa kematian akibat kanker mencapai angka 45% dari tahun 2007 hingga 2030, yaitu sekitar 7,9 juta jiwa menjadi 11,5 juta jiwa. Di Indonesia, menurut laporan Riskesdes 2013 prevalensi kanker mencapai 0,14% dan menjadi penyakit nomor tiga setelah asma dan penyakit paru obstruksi kronis untuk penyakit tidak menular. Tahun 2013 di Indonesia didapatkan bahwa kanker leher rahim menduduki peringkat pertama dari seluruh kasus kanker yaitu sebesar 17,2%, diikuti kanker payudara 12,2%, kanker kulit 5,9%, kanker nasofaring 5,3%, kanker rektum 4,9%, kanker ovarium 4,9%, kanker kelenjar limfe 4,3%, kanker kolon 3%, kanker tiroid 3%, dan kanker kelenjar lunak 2,6% (Mihardja dkk, 2013).

Penurunan angka prevalensi penderita kanker di Indonesia mutlak diperlukan khususnya dengan metode terapi yang memberikan efek samping minimal (Castano *et al*, 2005), khusus kanker payudara yang merupakan penyakit kanker dengan prevalensi penderita urutan kedua terbesar. Pengobatan kanker dewasa ini dapat dilakukan dengan berbagai cara, yaitu terapi hormon, kemoterapi, radioterapi, pembedahan dan terapi kombinasi, tetapi dari beberapa jenis pengobatan tersebut masih memiliki kekurangan. Terapi hormon akan memberikan efek kepada pasien yaitu menurunkan kadar hormon dalam tubuh atau mampu menghentikan tubuh menggunakan hormon. Efek jangka panjang terapi hormon dapat menyebabkan pembekuan darah, penipisan tulang, perubahan pada penglihatan dan kanker rahim. Pengobatan dengan radioterapi tidak selektif dan tidak aman bagi sel-sel normal serta dapat menimbulkan rasa mual dan muntah, kulit menghitam di bagian tubuh yang terkena radiasi, rambut rontok, merasa kelelahan, gangguan menstruasi pada perempuan, gangguan terhadap jumlah dan kualitas sperma pada laki-laki, serta timbul berbagai masalah kulit.

Pembedahan pada umumnya tidak efektif untuk sel yang telah mengalami metastasis, Pengobatan secara kemoterapi belum memberikan hasil optimal karena kerja obat yang tidak spesifik sehingga merusak sel normal dan menimbulkan rasa sakit. Alternatif lain dalam pengobatan kanker diperlukan untuk menghasilkan pengobatan dan penyembuhan yang aman. teknik diagnosis dan terapi kanker saat ini diarahkan pada metode yang minimal invasif, salah satu contoh metode pendamping terapi kanker yang minimal invasif adalah teknik spektroskopi optik dan *photodynamic therapy* (PDT) laser (Alyssa *et al*, 2013).

PDT adalah metode terapi dengan memanfaatkan kombinasi *photosensitizer* dan sebuah sumber cahaya atau foton. Kombinasi antara keduanya diharapkan memberikan reaksi antara foton, *photosensitizer* dan oksigen yang berada pada sel biologi atau sel kanker. Mekanisme kualitatif PDT secara umum terbagi dalam tiga keadaan reaksi sederhana yaitu: cahaya yang mengenai molekul *photosensitizer* (keadaan dasar) akan membentuk molekul *photosensitizer* tereksitasi. Keadaan kedua jika molekul *photosensitizer* tereksitasi bereaksi dengan  $^3\text{O}_2$  akan menjadi molekul *photosensitizer* dasar. Keadaan ketiga adalah  $^1\text{O}_2$  bereaksi dengan sistem biologis akan menjadi  $^3\text{O}_2$  sistem biologis mengalami kerusakan yang pada prinsipnya adalah reaksi kimia yang terjadi antara  $^1\text{O}_2$  dan situs aktif dari sistem biologis (Castano *et al*, 2004)

Bagian dari PDT yang perannya sangat besar adalah *photosensitizer*. Persyaratan *photosensitizer* yang baik adalah memiliki kemurnian tinggi dan komposisi kimia yang diketahui, mudah di produksi, nilai *quantum yield* tinggi, absorpsi kuat pada 630 – 800 nm, *extinction coefficient* 50.000 – 100.000 /M cm, toksisitas rendah dan stabil (Ormond & Freeman, 2013). Selain persyaratan yang 7 tersebut maka selektif merupakan syarat bagi *photosensitizer* yang akan dimanfaatkan sebagai bahan PDT (Shuxin *et al*, 2018). Bahan *photosensitizer* dapat berupa bahan anorganik dan organik, bahan organik yang dimanfaatkan sebagai *photosensitizer* seperti klorofil telah dilakukan oleh peneliti terdahulu seperti pengujian klorofil a untuk PDT (Braga *et al*, 2018), pengujian aktivitas antikanker berbagai daun dilakukan terhadap MCF7 and A549 (Bukke *et al*, 2018), Pembuatan klorofil hybrid dengan emas (Rizzi *et al*, 2018), dengan

*cyclodextrin/chlorophyll* yang dibuat menjadi supramolekul (Dentuto *et al*, 2007), dengan *Chlorin-PEI-Celulose* yang disintesis dalam bentuk nanokristal (Drogat *et al*, 2012). Klorofil juga digunakan untuk terapi *acne* (Song, 2014), serta untuk bioimaging (Mitra *et al*, 2014). Protoporphyrin IX dan GNPs (*Gold nano particles*) (Hosein *et al*, 2014) juga digunakan sebagai *photosensitizer* pada kanker serviks. Komposit klorofil diaplikasikan untuk terapi kanker oleh Maoquan *et al*, 2013 dengan metode fototermal.

Penggunaan klorofil sebagai sumber *photosensitizer* karena ketersediaan klorofil di alam sangat melimpah terutama di Indonesia sebagai negara tropis. Tanaman yang dapat menghasilkan klorofil yang cukup banyak dan tidak mengganggu keperluan manusia adalah purun tikus (*E. dulcis*) karena tumbuhan tersebut merupakan gulma. Gulma tersebut juga menghasilkan senyawa lain seperti selulosa dan serat yang dapat dimanfaatkan sebagai material lain seperti biokomposit (Wianto, dkk, 2012). Purun tikus atau nama ilmiahnya *E. dulcis* dalam ilmu taksonomi termasuk famili *cyperaceae* merupakan tumbuhan khas lahan rawa. *E. dulcis* banyak dijumpai di daerah pasang surut yang bertanah sulfat masam. Hasil ekstraksi purun tikus didapatkan senyawa - senyawa selulosa, lignin, dan klorofil. Kandungan klorofil total dengan spektrofotometri adalah 2,673 mg/g (Wianto *et al*, 2015), kandungan ini merupakan tertinggi dibandingkan dengan gulma lainnya dibandingkan dengan alang-alang yaitu 2,3 mg/g (Setiari & Nurchayati, 2010).

Kendala penerapan klorofil sebagai *photosensitizer* adalah rendahnya kestabilan klorofil dan sifat hidrofobik yang tinggi,. Klorofil memiliki tingkat kestabilan yang rendah karena banyaknya ikatan rangkap sehingga dalam proses diperlukan modifikasi untuk mendapatkan klorofil stabil seperti menggunakan zat tambahan  $ZnCl_2$  Penambahan asam sitrat,  $Na_2CO_3$ , magnesium karbonat 1%,  $CaCO_3$ , dimetilanilina (Ozkan & Bilek, 2015), untuk ekstraksi klorofil klorofil a yang stabil melalui proses asam (Budiyanto *et al*, 2008), selain itu modifikasi klorofil dapat di lakukan dengan berbagai metode seperti derivatisasi, substitusi dan *coating* atau dengan metode *nano metal organic frameworks* (NMOF) (Maoquan *et al*, 2014). Substitusi telah dilakukan dengan mengganti logam yang

terdapat pada pusat klorofil yaitu  $Mg^{2+}$  dengan logam yaitu Ni, Cu, Zn dengan hasil panjang gelombang absorpsi 688 nm (Tamiaki *et al*, 2013<sup>a</sup>) serta Cu menjadi klorofilin sehingga klorofil menjadi stabil dan panjang gelombang menjadi 680 nm (Asmiyenti dkk, 2010). Logam Pd yang terdapat pada bakterioklorofil atau Tookad (Handoko *et al*, 2015) memiliki panjang gelombang absorpsi 758 nm dan lebih stabil. Klorofil hasil ekstraksi secara umum memiliki ukuran beragam, untuk meningkatkan efektivitas reaksi maka diperlukan homogenitas.

Metode modifikasi klorofil yang memungkinkan untuk di sintesis lebih sederhana dan dapat meningkatkan kestabilan yaitu *coating* seperti yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu tentang pelapisan klorofil dengan *pluronic* sebagai nanokomposit (Maoquon *et al*, 2014), *nanoscale coordination polymers (NCPs) and nanoscale metal-organic frameworks (NMOFs)* dengan logam yang digunakan adalah Au, Si dan Fe (He *et al*, 2015). Modifikasi klorofil dengan metode *coating* dapat menggunakan bahan lain yang dapat berinteraksi dengan klorofil. Hasil modifikasi tersebut dapat di gunakan sebagai *photosensitizer* yang dimanfaatkan dalam PDT dengan harapan memberikan tingkat kestabilan yang tinggi dan dapat dimanfaatkan. Protein juga dapat dimanfaatkan sebagai media untuk meningkatkan kestabilan klorofil, karena klorofil dapat melindungi kecepatan reaksi, albumin merupakan protein monomer yang larut dalam air atau garam. Albumin memiliki berat molekul sekitar 65 kD dan terdiri dari 584 asam amino tanpa karbohidrat (Oettl & Tsauber, 2007) memiliki sifat penstabil larutan. *Photosensitizer* hasil modifikasi diharapkan dapat memberikan efek peningkatan kestabilan karena ikatan rangkap yang mudah bereaksi di lindugi oleh albumin, dan meningkatkan nilai hidrofisilitas sehingga interaksi *photosensitizer* dapat sampai ke inti sel sebagai syarat apoptosis.

Selain *photosensitizer* sumber cahaya dalam PDT merupakan faktor yang berpengaruh dalam proses eksitasi elektron valensi, sedangkan sumber cahaya sendiri diharapkan memiliki sifat tidak merusak kulit, tidak menimbulkan luka, tidak menumbuhkan rasa sakit dan tidak mengakibatkan pendarahan. Sumber cahaya yang memiliki sifat tersebut tersebut adalah *light amplification by stimulated emission of radiation* atau laser. Laser yang digunakan dan

dikembangkan dalam PDT untuk sel kanker pada umumnya adalah cahaya merah dan inframerah (Ormond & Freeman, 2013).

Laser merupakan gelombang elektromagnetik ketika di pancarkan dan mengenai jaringan baik lunak maupun keras maka sinar tersebut akan terjadi fenomena refleksi, transmisi dan absorpsi oleh jaringan. Absorpsi merupakan hal terpenting yang dapat dilihat dalam fenomena tersebut karena berkaitan dengan interaksi antara sinar dan jaringan. Interaksi yang terpenting dalam paparan laser adalah interaksi fotokimia, fototermal, fotoablasi, interaksi produksi plasma dan *photodisruption* (Niemz, 2007). Interaksi fotokimia terjadi pada intensitas laser yang rendah antara  $0,01 - 10 \text{ W/cm}^2$  dan waktu paparan laser yang panjang yaitu dari  $1 - 10^3 \text{ s}$ . Fotokimia merupakan perubahan kimia yang disebabkan oleh cahaya dan hanya terjadi jika cahaya diabsorpsi oleh sistem. Perubahan kimia merupakan peristiwa yang muncul pada tingkatan molekuler akibat absorpsi oleh foton. Proses fotokimia memiliki kaitan erat dengan proses fotofisika, yang berperan dalam perubahan energi dan struktur elektronik akibat eksitasi molekul setelah peristiwa absorpsi.

Penelitian tentang variasi dosis energi laser dan target kanker telah dilakukan penelitian seperti dilakukan oleh Ibrahim *et al* (2015) dengan *photosensitizer* porfirin dan sel Hela sebagai target dengan dosis  $10 \text{ J/cm}^2$  dan konsentrasi  $1 - 10 \text{ }\mu\text{M}$  mampu memberikan apoptosis pada sel tersebut sampai dengan 53%. Al-Khafazi *et al* (2010), pada penelitian tersebut melaporkan bahwa iradiasi laser He Ne dengan dosis  $3,6 - 14,4 \text{ J/cm}^2$  yang dikenakan pada sel Hep-2 (*larynx carcinoma*) dan AMN3 (*Murine mamary adenocarcinoma*) mampu menyebabkan sel mengalami prolifirasi kemudian sel mengalami kerusakan. Penelitian Liu *et al* (2012) menggunakan laser He - Ne pada dosis energi  $2,8 - 18,82 \text{ J/cm}^2$  dengan *photosensitizer* HMME (*Hematophorpyrin mono methyl eter*) yang di kenakan pada sel CHMm (*Canine breast Cancer*) mampu menyebabkan sel mengalami apoptosis. Penelitian Souza *et al* (2009) tentang PDT dengan panjang gelombang 630 nm dengan *photosensitizer* 5 ALA (*5-aminolaevulinic acid*) terhadap kanker kulit non melanoma pada manusia didapatkan bahwa dosis energi  $100 - 200 \text{ J/cm}^2$  memiliki tingkat respon kesembuhan mencapai 90 %.

Apoptosis adalah mekanisme alamiah yang dialami oleh sel berupa kematian sel yang terprogram dari sebuah sel. Apoptosis diperlukan untuk proses

pertumbuhan atau perkembangan sel, jaringan atau organ lebih lanjut. Menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri seperti sel yang terinfeksi oleh virus, kerusakan DNA maupun sel kanker, sehingga apoptosis terjadi kematian sel yang terprogram dan inti mengalami fragmentasi yang kemudian mengirimkan sinyal kepada sel yang berada didekatnya untuk difagosit. Dalam terapi fotodinamik, proses yang terjadi adalah fotosensitizer melokalisasi di jaringan kanker dan laser difokuskan pada lesi sehingga terbentuk *reactive oxygen spesies* (ROS). ROS kemudian menginduksi kematian apoptosis. Apoptosis merupakan kematian terprogram yang terorganisasi, sehingga dalam patologi hanya kematian apoptosis yang dibolehkan (Rode, 2008). Menurut Castano *et al* (2005) terapi fotodinamik memberikan respon stress akut yang melibatkan kerusakan mitokondria, sitokrom c dan mengaktifasi caspases (reseptor kematian)

Proses apoptosis pada sel secara umum dimulai dari masuknya material luar seperti *photosensitizer* melalui membran sel dan menuju mitokondria sebagai pusat energi dari sebuah sel. Jika *photosensitizer* di berikan foton maka akan terjadi perubahan oksigen dari *triplet* menjadi *singlet* dan akan mempengaruhi sistem yang ada di mitokondria dan terbentuk kanal yang menjadi tempat masuknya ion  $Ca^{2+}$ . Ketika ion ini masuk maka keluarlah sitokrom c. Sitokrom c akan membentuk kompleks dan berikatan dengan protein dan akan memotong protein lain. *Caspase 3* yang muncul dari reaksi tersebut akan bereaksi dan memotong DNA. Jumlah kematian secara apoptosis tergantung dari konsentrasi *photosensitizer* dan dosis laser yang diberikan (Castano *et al*, 2005).

Berdasarkan penelitian sebelumnya tersebut maka pada penelitian ini adalah melakukan ekstraksi klorofil, isolasi klorofil sehingga didapatkan klorofil murni dan melakukan modifikasi biomaterial *photosensitizer* dengan metode *coating* dengan albumin untuk mendapatkan klorofil yang stabil. *Photosensitizer* yang di dapatkan adalah klorofil ekstra, klorofil murni, klorofil termodifikasi *coating* dengan albumin sebagai *photosensitizer* baru, serta melakukan pemaparan secara invitro pada kultur sel kanker MCF7 dan T47D serta dibandingkan dengan sel normal dengan pemaparan menggunakan laser dioda merah dengan panjang

gelombang 654,3 nm (*range* PDT 630 - 800 nm) dengan dosis energi paparan 0 – 25 J/cm<sup>2</sup>. Tujuan penggunaan dosis energi tersebut diharapkan mendapatkan dosis energi optimum.

## 1.2.Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan penelitian klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) termodifikasi permukaan sebagai kandidat *photosensitizer* baru untuk aplikasi terapi fotodinamik laser pada sel kanker, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

- a. Bagaimana mendapatkan kemurnian ekstrak klorofil, isolat klorofil purun tikus (*E. dulcis*) dengan persentase > 95%?
- b. Bagaimana mendapatkan klorofil *coating* dengan metode modifikasi permukaan isolat klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) dengan albumin yang memiliki sifat stabil, selektif dan sifat hidrofisilitas tinggi?
- c. Bagaimana mendapatkan *photosensitizer* dengan panjang gelombang absorpsi kuat antara 630 – 800 nm, nilai *quantum yield* mendekati 1, *extinction coefficient* 50.000 – 100.000 /M cm, toksisitas rendah, komposisi kimia diketahui dan mudah di produksi?
- d. Bagaimana peningkatan inaktivasi sel kanker MCF7 dan T47D secara *invitro* dengan *photosensitizer* klorofil ekstrak, isolat dan termodifikasi?
- e. Bagaimana mekanisme inaktivasi sel kanker dan fase-fase kematian sel serta interaksi kimia dan fisika karena proses PDT dengan *photosensitizer*?

## 1.3.Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) termodifikasi permukaan sebagai kandidat *photosensitizer* baru untuk aplikasi terapi fotodinamik laser pada sel kanker ini adalah:

- a. Mendapatkan kemurnian ekstrak klorofil, isolat klorofil purun tikus (*E. dulcis*) dengan persentase > 95%.

- b. Mendapatkan klorofil *coating* dengan metode modifikasi permukaan isolat klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) dengan albumin yang memiliki sifat stabil, selektif dan sifat hidrofisilitas tinggi.
- c. Mendapatkan *photosensitizer* dengan panjang gelombang absorpsi kuat antara 630 – 800 nm, nilai *quantum yield* mendekati 1, *extinction coefficient* 50.000 – 100.000 /M cm, toksisitas rendah, komposisi kimia diketahui dan mudah di produksi.
- d. Mendapatkan data ilmiah peningkatan inaktivasi sel kanker MCF7 dan T47D secara *invitro* dengan *photosensitizer* klorofil ekstrak, isolat dan termodifikasi permukaan.
- e. Mendapatkan mekanisme inaktivasi sel kanker dan fase-fase kematian sel serta interaksi kimia dan fisika karena proses PDT dengan *photosensitizer*.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian modifikasi klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) sebagai kandidat *photosensitizer* baru untuk aplikasi terapi fotodinamik laser pada sel kanker diharapkan memberikan manfaat:

- a. Memberikan alternatif bahan *photosensitizer* baru organik dari gulma purun tikus yang melimpah keberadaannya di Indonesia.
- b. Meningkatkan nilai tambah prurun tikus sebagai gulma menjadi produk dengan manfaat yang tinggi.
- c. Mendapatkan produk biomaterial dengan metode sederhana yang memiliki sifat fisika dan kimia spesifik yang dapat dikembangkan dalam penelitian lanjutan dalam bidang terapi fotodinamik
- d. Mendapatkan informasi ilmiah tentang mekanisme ekstraksi klorofil serta modifikasi untuk mendapatkan klorofil yang murni dan stabil sehingga dapat digunakan sebagai *photosensitizer*.
- e. Mendapatkan biomaterial dari proses lanjutan dalam ekstraksi gulma purun tikus
- f. Mendapatkan bahan *photosensitizer* yang memiliki sifat non toksik dan *minimal invasif* dalam pengobatan kanker



- g. Mendapatkan sistem pemapar laser merah yang dapat diaplikasikan dalam sistem atau metode alternatif PDT
- h. Mendapatkan mekanisme reaksi fotofisika dan fotokimia dari fotosensitizer organik yang dihasilkan dari penelitian untuk aplikasi pengobatan sel kanker

### 1.5.Kebaruan

Kebaruan dari penelitian klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) termodifikasi permukaan sebagai kandidat *photosensitizer* baru untuk aplikasi terapi fotodinamik laser pada sel kanker adalah:

- a. Mendapatkan *photosensitizer* baru berupa ekstrak dan isolat dari klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*).
- b. Mendapatkan *photosensitizer* baru dari modifikasi permukaan isolat klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) dengan albumin yang memiliki spesifikasi kemurnian > 95%, memiliki panjang gelombang absorpsi kuat pada 630 – 800 nm, nilai *quantum yield* mendekati 1, *extinction coefficient* 50.000 – 100.000 /M cm, toksisitas rendah dan komposisi kimia yang dapat di ketahui.
- c. Mendapatkan *photosensitizer* baru dari modifikasi permukaan isolat klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) dengan albumin yang memiliki sifat stabil, selektif dan sifat hidrofisilitas tinggi.
- d. Mendapatkan *photosensitizer* baru dari modifikasi permukaan isolat klorofil gulma purun tikus (*E. dulcis*) dengan albumin yang memiliki konsentrasi penggunaan yang rendah untuk sel kanker.