

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN BERBASIS KOMPETENSI
(PBK)**



**FOTODINAMIK LASER DENGAN EKSOGEN FOTOSENSITIZER
KLOROFIL LOKAL UNTUK TERAPI KANKER MINIMAL INVASIF
TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

Prof. Dr. RETNA APSARI, M.Si 0026066802
ANDI HAMIM ZAIDAN, M.Si, Ph.D. 0022048302

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN BERBASIS KOMPETENSI
(PBK)**



kkc
kk
LP 79/19
Aps
f

**FOTODINAMIK LASER DENGAN EKSOGEN FOTOSENSITIZER
KLOROFIL LOKAL UNTUK TERAPI KANKER MINIMAL INVASIF
TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

Prof. Dr. RETNA APSARI, M.Si 0026066802
ANDI HAMIM ZAIDAN, M.Si, Ph.D. 0022048302

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Fotodinamik Laser dengan Eksogen Fotosensitizer
Klorofil Lokal Untuk Terapi Kanker Minimal Invasif

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. Dra RETNA APSARI, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0026066802
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Fisika
Nomor HP : 08123182357
Alamat surel (e-mail) : retna-a@fst.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : ANDI HAMIM ZAIDAN S.Si, M.Si. Ph.D
NIDN : 0022048302
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

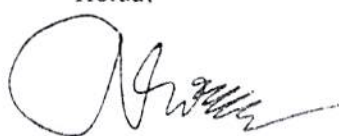
Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 225.000.000
Biaya Keseluruhan : Rp 496.000.000


Mengetahui,
Dekan FST UNAIR


(Prof. Win Darmanto, M.Sc, Ph.D)
NIP/NIK 19610616 1987011001

Kota Surabaya, 13 - 11 - 2018
Ketua,


(Dr. Dra RETNA APSARI, M.Si)
NIP/NIK 196806261993032003

Menyetujui,
Ketua LPI UNAIR


(Prof. Hery Purnobasuki, M.Si, Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian global. Menurut laporan Riskesdas (2007) prevalensi kanker di Indonesia mencapai 4,3 per 1000 penduduk dan menjadi penyebab kematian nomor tujuh (5,7%) setelah stroke, tuberkulosis, hipertensi, trauma, perinatal dan diabetes mellitus. Menurut laporan SIRS (2008) kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia yakni sebesar 18,4 persen disusul kanker leher rahim 10,3 persen. Berdasarkan fakta tersebut, maka Indonesia perlu menambah pusat pengobatan kanker dengan lokasi yang merata serta mengembangkan metode-metode baru yang ekonomis, kompetitif, produktif, dan minimal invasif berbasis instrumen biomaterial lokal. Penelitian ini bertujuan mendesain peralatan tepat guna untuk terapi fotodinamik kanker berbasis 3 laser, yaitu : laser merah, biru dan infra merah. Laser mempunyai keunggulan yaitu intensitas tinggi, berkas keluaran terfokus dan sejajar, monokromatis, serta bersifat non invasive dan nonradiasi dengan mekanisme utama adalah fotokimia dan fototermal. Penyinaran laser diharapkan sebagai pengganti sumber radiasi ionisasi yang digunakan pada kemoterapi, yang terbukti mempunyai efek samping merusak jaringan sehat disekitarnya. Penelitian ini juga memanfaatkan potensi sumber daya alam yaitu daun sebagai klorofil yang berfungsi sebagai eksogen fotosensitizer utama dalam terapi fotodinamik laser. Terapi fotodinamik laser merupakan metode terapi kanker yang melibatkan aktivasi fotosensitizer (dalam penelitian ini dipakai jenis klorofil yang isolasi dari bahan lokal, serta sintesa *nanogold particle*, dan *photofrin* sebagai pembanding, sumber cahaya laser, dan *reactive oxygen spesies* (ROS) yang akan merusak jaringan target secara selektif dan minimal invasif. Klorofil harus diisolasi dan dioptimasi sehingga serapan panjang gelombangnya sesuai dengan panjang gelombang laser. Klorofil diharapkan sebagai biomaterial maju lokal untuk terapi kanker yang dikombinasikan dengan paparan laser sehingga diharapkan dapat menekan prevalensi kanker di Indonesia. Pemilihan jenis laser pada saat aplikasi terapi, ditentukan berdasarkan kedalaman kanker dan kedalaman penetrasi laser yang digunakan. Penelitian ini terdiri dari tahapan, yaitu desain fotodinamik laser, isolasi klorofil lokal, sintesa *nanogold particle*, dan *photofrin* sebagai pembanding, pemaparan laser terhadap sampel, uji invitro, analisis data, dan optimasi desain fotodinamik laser, uji invivo pada hewan coba. Parameter utama keberhasilan penelitian adalah bagaimana paparan alat fotodinamik laser yang didesain mampu menimbulkan kondisi apoptosis pada sel kanker secara invitro dan invivo. Target penelitian di tahun pertama adalah rancang bangun alat fotodinamik laser dan karakteristik instrumennya, serta sintesa klorofil lokal dan penentuan dosis energi optimum. Target di tahun kedua adalah bangun alat fotodinamik laser dan uji in vivo pada hewan coba. Target di tahun ketiga adalah optimasi alat fotodinamik laser dan fotosensitizer produk lokal yang siap aplikasikan berdasarkan hasil di tahun pertama dan kedua. Adapun Sasaran akhir penelitian adalah terwujudnya teknologi baru ekonomis dan non radiasi, kompetitif dan produktif berbasis instrumen lokal dan sumber daya alam Indonesia, publikasi internasional, dan terwujudnya kemitraan antara perguruan tinggi, lembaga pemerintah, rumah sakit dan industri medis di level nasional maupun internasional. Produk yang ada diharapkan dapat menunjang kemandirian bangsa di bidang IPTEK Khususnya dalam bidang teknologi kesehatan klinis. Hasil riset ini akan dipatenkan berupa alat fotodinamik laser dan fotosensitizer klorofil lokal. Dengan berhasilnya penelitian ini, diharapkan ketergantungan Indonesia pada alat dan material impor berkurang, dan Indonesia mandiri untuk memproduksi alat dan biomaterial untuk terapi kanker minimal invasif.

Kata kunci : fotokimia, fototermal, apoptosis, laser He-Ne, sel MCF-7, klorofil lokal, terapi fotodinamik

PRAKATA

Puji-syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan akhir penelitian hibah kompetensi. Penelitian ini dapat diselesaikan berkat kerja keras dan juga dukungan berbagai pihak yang telah membantu sehingga laporan akhir dapat diselesaikan dengan baik dan tepat waktu. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang sudah membantu terselesaikannya penelitian ini. Alhamdulillah penelitian ini sudah menghasilkan 2 publikasi terindeks scopus yang disajikan pada lampiran laporan ini.

Penyusun menyadari bahwa laporan ini belum sempurna, karena penelitian sedang berlangsung. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk mengembangkan penelitian ini.

Surabaya, 30 Oktober 2018

Penyusun



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
RINGKASAN	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
BAB 4. METODE PENELITIAN	17
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	18
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	42
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	46



BAB I. PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang terjadi karena adanya gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi pada organisme multiseluler sehingga terjadi perubahan perilaku sel yang tidak terkontrol. Berdasarkan data Kementerian Kesehatan (Kemenkes) tahun 2012, prevalensi kanker di Indonesia mencapai 4,3 banding 1.000 orang. Data *Global action against cancer* (2005) dari WHO (*World Health Organization*) menyatakan bahwa kematian akibat kanker dapat mencapai angka 45% dari tahun 2007 hingga 2030, yaitu sekitar 7,9 juta jiwa menjadi 11,5 juta jiwa kematian. WHO dan UICC (*Union for International Cancer Control*) memprediksi pada tahun 2030 akan terjadi peningkatan jumlah penderita kanker sebesar 300 persen di seluruh dunia yang 70 persennya berada di negara berkembang seperti Indonesia (Kompas.com, 2013).

Usaha untuk menemukan alternatif lain dan pengembangan teknik penanganan penyakit kanker saat ini sedang giat dilakukan oleh pusat-pusat riset di seluruh dunia. Menurut Akimoto *et al.* (2010), salah satu pengobatan kanker tersebut dapat melalui terapi fotodinamik. Terapi fotodinamik merupakan terapi kanker yang minimal invasif (tidak merusak) yang digunakan sebagai pengobatan kanker paru-paru, kanker kepala dan leher, serta kanker prostat. Disisi lain, pengobatan kanker yang dilakukan cara penyinaran radasi dan kemoterapi, dapat merusak sel normal. Terapi fotodinamik merupakan terapi kombinasi fotosensitizer dengan radiasi cahaya (foton). Pada panjang gelombang yang sesuai serta adanya oksigen reaktif dapat menyebabkan kerusakan selektif pada jaringan yang tidak sehat (Al khazalih, 2009). Sumber radiasi cahaya (foton) yang digunakan adalah laser. Hal ini dikarenakan, laser memiliki berkas sinar yang kecil, terfokus, serta memiliki kohorensi dan intensitas yang tinggi. Ketika sinar laser mengenai permukaan jaringan (keras/lunak) maka perubahan yang terjadi pada jaringan biasanya disebabkan oleh proses absorpsi (Apsari, 2009). Ketika sinar laser diabsorpsi oleh jaringan ada 5 efek interaksi yang terjadi, yaitu interaksi fotokimia (*photochemical*), interaksi fototermal (*photothermal*), fotoablasi (*photoablation*), interaksi produksi plasma (*plasmainduced ablation*), dan fotoakustik (*photodisruption*) berupa produksi *shock wave* (Apsari, 2009).

Terapi fotodinamik merupakan terapi kombinasi fotosensitizer dengan radiasi cahaya (foton). Pada panjang gelombang yang sesuai serta adanya oksigen reaktif dapat menyebabkan kerusakan selektif pada jaringan yang tidak sehat (Al khazalih, 2009). Sumber radiasi cahaya (foton) yang digunakan adalah laser. Hal ini dikarenakan, laser memiliki berkas sinar yang kecil, terfokus, serta memiliki kohorensi dan intensitas yang tinggi. Ketika sinar laser mengenai permukaan jaringan (keras/lunak) maka perubahan yang terjadi pada jaringan biasanya disebabkan oleh proses absorpsi (Apsari, 2009). Ketika sinar laser diabsorpsi oleh jaringan ada 5 efek interaksi yang terjadi, yaitu interaksi fotokimia (*photochemical*), interaksi fototermal (*photothermal*), fotoablasi (*photoablation*), interaksi produksi plasma (*plasma-induced ablation*), dan fotoakustik (*photodisruption*) berupa produksi *shock wave* (Apsari, 2009).

Terapi fotodinamika memiliki dua hal yang terpenting, yaitu adanya laser dan fotosensitizer. Dalam terapi fotodinamik, kematian sel yang diharapkan adalah karena terjadinya apoptosis bukan nekrosis. Apoptosis merupakan jalur kematian sel utama untuk menghilangkan sel-sel yang tidak diinginkan dan berbahaya dalam perkembangan embrio, homeostasis dan kekebalan jaringan. Sedangkan nekrosis adalah kematian sel yang negatif dan ditandai dengan respon inflamasi (Rode, 2008).

Penelitian tentang fotosensitizer dengan laser telah dilakukan oleh Al-Khafazi *et al.* (2010). Pada penelitian tersebut ditunjukkan bahwa iradiasi laser dengan dosis 3,6 – 14,4 J/cm² yang dikenakan pada sel Hep-2 (*larynx carcinoma*) dan AMN3 (*murine mammary adenocarcinoma*) mampu menyebabkan sel mengalami proliferasi kemudian rusak.

Penelitian selanjutnya dilakukan Liu *et al* (2011), yang telah membuktikan bahwa laser He-Ne(merah) pada dosis energi sebesar 2,8 J/cm² dengan fotosensitizer HMME (*Hematophorpyrin Mono-methyl Ether*) yang dikenai pada sel CHMm (*canine breast cancer*) mampu menyebabkan sel mengalami apoptosis. Penelitian selanjutnya dilakukan oleh Karsunawati (2014), pada penelitian tersebut. Karsunawati menggunakan fotosensitizer *protoporphyrin IX* (PpIX) dan klorofil dengan radiasi dari laser merah pada panjang gelombang 650 nm. Berdasarkan penelitian Apsari *et.al.* (2014, 2016, 2017) dapat

disimpulkan bahwa laser merah dengan panjang gelombang 650 nm dapat digunakan untuk inaktivasi sel kanker dan dapat dikembangkan sebagai kandidat terapi fotodinamik pada dosis energi 6,8 J/cm² dengan pemberian fotosensitizer *protoporphirin IX* (PpIX) dan klorofil, namun dari penelitian Karsunawati (2014) tersebut, perlu dilakukan pemfokusan dan karakteristik laser yang lebih mendalam agar didapatkan efek interaksi laser dengan sel secara komprehensif.

Berdasarkan penelitian *Apsari et. al* (2014), Liu *et al* (2011) dan Al-Khafazi *et al.* (2010) tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan secara *in-vitro* pada sel kanker payudara MCF-7 dengan menggunakan laser dioda merah dengan panjang gelombang 630 nm dengan dosis energi paparan 0 J/cm² -7 J/cm². Tujuan penggunaan dosis energi sebesar 0 J/cm² -7 J/cm² pada penelitian ini adalah dengan harapan dosis optimum dari *Apsari et. al.* (2014) dapat lebih dioptimalisasi. Penelitian ini juga akan dilakukan variasi fotosensitizer untuk mengetahui fotosensitizer yang paling sesuai untuk kanker payudara MCF-7. Fotosensitizer yang akan digunakan adalah *protoporphirin IX* (PpIX) dan klorofil a buatan lokal. fotosensitizer *Protoporphirin IX* (PpIX) memiliki absorbansi pada panjang gelombang ≈630 nm (Scolaro, *et al.*, 2002). Pada penelitian ini juga menggunakan fotosensitizer klorofil a yang daya serapnya lebih besar daripada klorofil. Menurut Brandis dalam Budiyanto *et al.*, (2008) klorofil *a* merupakan substansi yang baik dalam menstimulasi terbentuknya singlet oksigen serta merupakan prekursor potensial untuk sintesis sensitiser baru. Klorofil memiliki lima pita serapan pada panjang gelombang 400-450 nm, 450-500 nm, 550-600 nm, 600-625 nm, dan 625-675 nm (Tambunan, 2009).

Isolasi klorofil a dibuat dengan melarutkan ekstrak klorofil yang kering ke dalam sedikit pelarut, kemudian dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam Silika Gel 60 dan fase gerak n-heksan:eter:aseton (60:30:20). Pita berwarna hijau biru (klorofil a) ditampung kemudian dikeringkan. Klorofil a hasil isolasi diuji absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Budiyanto *et al.*, 2008).

Pada tahun pertama sudah dihasilkan beberapa hal, yang mendasari kelanjutan penelitian di tahun kedua, adalah :

1. Alat fotonamik laser yang siap dioptimasi di tahun kedua
2. Fotosensitizer klorofil lokal

3. Fotosensitizer lain : goldnano particle dan prothoporphyrin
4. Dosis optimum apoptosis sel kanker untuk laser merah, infra merah dan merah, yang siap dioptimasi di tahun kedua.

Di tahun kedua dilakukan uji in vivo kepada hewan coba, setelah uji laboratorium sevara invitro selesai di tahun pertama. Beberapa hal yang akan dilakukan ditahun ketiga adalah :

1. Optimasi alat fotodinamik 3 laser agar dapat lebih stabil bekerjanya
2. Isolasi klorofil yang lebih stabil
3. Uji coba invitro dan invivo
4. Uji analisis DNA

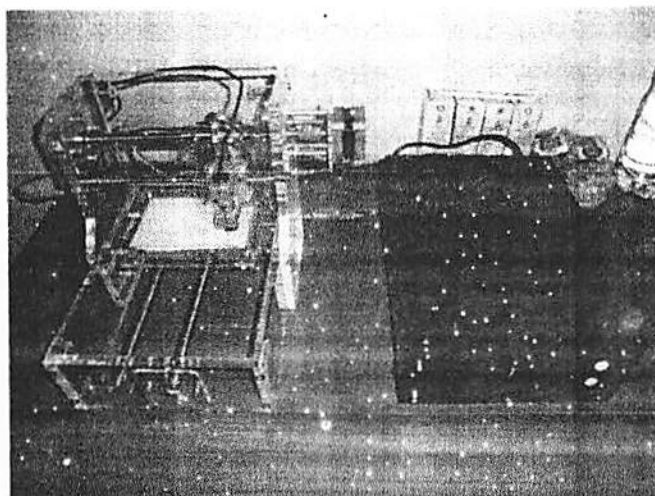
Berdasarkan latar belakang permasalahan, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

1) Bagaimanakah optimasi desain alat terapi fotodinamik berbasis 3 laser yaitu : laser merah, biru dan infra merah? 2) Bagaimanakah isolasi klorofil dari bahan lokal agar dihasilkan fotosensitizer yang mempunyai absorbansi yang sesuai dengan panjang gelombang laser merah, biru dan infra merah dan bersifat stabil? 3) Pada konsentrasi berapakah fotosensitizer klorofil lokal yang telah didesain tidak bersifat toksik? 5) Bagaimakah kinerja fotosensitizer klorofil lokal jika dibandingkan dengan induksi eksogen fotozenitizer import jenis *nanogold particle*, dan *prothoporphirin IX(PP IX)* untuk menghasilkan apoptosis sel secara invitro dan invivo? 6) Bagaimanakah mekanisme inaktivasi sel kanker apoptosis terhadap variasi dosis energi paparan 3 laser dengan dan tanpa penambahan fotosensitizer? 7) Berapakah dosis energi optimal laser merah untuk inaktivasi sel kanker apoptosis dengan dan tanpa penambahan eksogen fotosensitiser? 8) Bagaimanakah optimasi sintesis klorofil dan desain alat yang didesain agar mampu meningkatkan apoptosis sel kanker? 9) Bagaimanakah uji coba secara in vivo alat fotodinamik 3 laser dan klorofil lokal yang telah dioptimasi secara maksimal? (10) Bagaimana hasil uji DNA dengan elctroforesis?

Rumusan masalah ke-1 sampai dengan ke- 8 sudah dilaksanakan di tahun pertama dan kedua, dan akan dilanjutkan rumusan masalah ke 8-10 di tahun ketiga. Hasil optimum di tahun ketiga yang akan ditindaklanjuti untuk fabrikasi alat dan fabrikasi fotosensitizer lokal di tahun ketiga di skala klinis terbatas. Hasil skala laboratorium di tahun pertama dan kedua yang akan dijadikan landasan

skala penerapan klinis terbatas di tahun ketiga, yang didahului dengan uji invitro dan invivo terlebih dahulu.

Metode alternative untuk terapi kanker perlu terus dikembangkan, mengingat metode yang ada selama ini terbukti masih menimbulkan efek samping. Untuk itu penelitian ini, goal utamanya menghasilkan metode alternatif terapi kanker minimal invasive dengan memaksimalkan potensi lokal, yaitu klorofil. Sampai saat ini telah dihasilkan desain awal berdasarkan penelitian Apsari *et.al* (2012-2017) untuk laser infra merah. Pada penelitian ini akan didesain fotodinamik laser yang terdiri dari gabungan laser merah, biru dan infra merah. Adapun foto alat yang sudah dihasilkan disajikan pada Gambar 1.1. Desain alat fotodinamik laser didasarkan pada hasil penelitian tersebut, dengan optimasi dalam hal : modifikasi 3 jenis laser dan mengoptimalkan fotosensitizer klorofil lokal, dan pembanding adalah nano gold particle dan *Protoporphyrin IX* (PpIX) dengan pertimbangan kedekatan struktur kimia.



Gambar 1.1. Hasil Desain Alat Fotodinamik Laser infra merah

(Apsari dan tim 2012-2015)

Adapun luaran yang dijanjikan disajikan pada Tabel 1, yang merupakan target luaran selama 3 tahun. Pada penelitian ini akan didesain alat yang bersifat mobil untuk terapi kanker yang dapat diterapkan di skala industri.

Luaran yang ditargetkan adalah : prototype alat fotodinamik 3 laser, teknologi tepat guna, seminar internasional, jurnal internasional, pendaftaran HAKI, buku ajar di tahun kedua, biomaterial local yaitu fotosensitizer.

Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			2016	2017	2018
1	Publikasi Ilmiah	Internasional	<i>Submitted</i>	<i>Accepted</i>	<i>Accepted</i>
		Nasional Terakreditasi	Tidak ada	Terdaftar	Terdaftar
2	Pembekalan dalam temu ilmiah	Internasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
		Nasional	Tidak ada	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
3	<i>Invited Speaker</i> dalam temu ilmiah	Internasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
		Nasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
4	<i>Visiting Lecturer</i>	Internasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Paten Sederhana	Tidak ada	Tidak ada	Draft
		Hak Cipta	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Merek dagang	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia dagang	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Desain produk industri	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Indikasi Geografis	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan Varietas tanaman	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		6	Teknologi tepat guna		Draft
7	Model/purwarupa/desain/karya seni/rekayasa sosial		Draft	Draft	Produk
8	Buku Ajar (ISBN)		Tidak ada	Produk	Penerapan
9	Tingkat Kesiapan Teknologi		Skala 3	Skala 4	Skala 5



BAB 2. TINJAUAN PUSTKA

Metode alternative untuk terapi kanker perlu terus dikembangkan, mengingat metode yang ada selama ini terbukti masih menimbulkan efek samping. Untuk itu penelitian ini, goal utamanya menghasilkan metode alternative terapi kanker minimal invasive dengan memaksimalkan potensi lokal, yaitu klorofil. Sampai saat ini telah dihasilkan desain awal berdasarkan penelitian Apsari *et.al* (2014) untuk laser infra merah. Pada penelitian ini akan didesain fotodinamik laser yang terdiri dari gabungan laser merah, biru dan infra merah. Adapun foto alat yang sudah dihasilkan disajikan pada Gambar 1. Desain alat fotodinamik laser didasarkan pada hasil penelitian tersebut, dengan optimasi dalam hal : modifikasi 3 jenis laser dan mengoptimalkan fotosensitizer klorofil lokal, dan pembanding adalah nano gold particle dan *Protoporphyrin IX* (PpIX) dengan pertimbangan kedekatan struktur kimia.

Penelitian di tahun pertama dan kedua telah memperoleh beberapa hasil sebagai berikut:

1. Berdasarkan hasil uji toksisitas dengan menggunakan laser He-Ne, konsentrasi fotosensitizer klorofil yang tidak toksik untuk sel kanker yaitu 300 ppm dengan persentase sel hidup sebesar 97,6% dan 350 ppm untuk fotosensitizer *PpIX* dengan persentase sel hidup sebesar 75,9%. Persentase kematian sel terbesar pada dosis energi keluaran laser He-Ne merah 30,4 J/cm² sebesar 85,81% (tanpa penambahan fotosensitizer), 96,25% (dengan penambahan fotosensitizer klorofil), dan 81,62% (dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX*). Dosis energi laser He-Ne merah optimum untuk mendapatkan persentase kematian sel secara apoptosis yaitu pada 30,4 J/cm² dengan sel apoptosis sebesar 95,78% (penambahan fotosensitizer klorofil) dan 80,56% (penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX*)
2. Berdasarkan hasil karakterisasi laser dioda merah, diperoleh daya optimum laser sebesar (10,44 ± 0,67) mW pada jarak 2,5 cm dari sampel dengan luasan berkas laser sebesar 0,63607 cm². Hasil uji spektrofotometer di dapatkan hasil isolasi klorofil a yang sesuai dengan referensi yakni memiliki serapan pada panjang gelombang merah. Berdasarkan hasil uji toksisitas, dosis aman pemberian fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) adalah pada konsentrasi

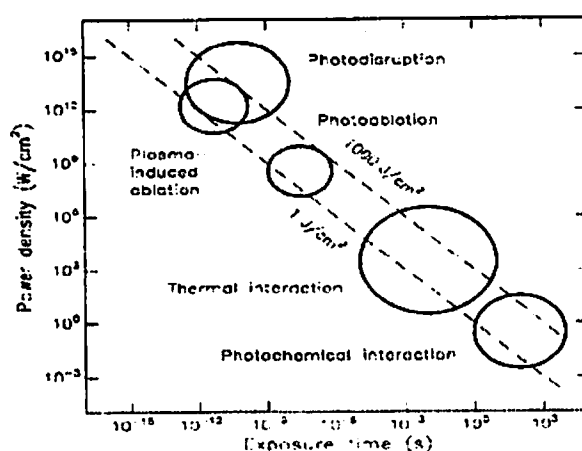
0,18 mM sebanyak 1,2 μL dan dosis aman klorofil a sebagai fotosensitizer sebanyak 12 μL , Pengaruh pemberian paparan dosis energi laser merah terhadap kematian sel optimum pada dosis 18,82 J/cm^2 dimana terjadi kematian sel tanpa penambahan fotosensitizer sebesar 7,17 %, dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) sebesar 54,58 % dan dengan penambahan fotosensitizer Klorofil a sebesar 47,6 %, Presentase kematian sel yang apoptosis pada dosis energi laser 18,82 J/cm^2 dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) yaitu 47 % dan penambahan fotosensitizer Klorofil a yaitu 84%.

3. Agar penelitian serupa lebih baik, maka disarankan beberapa hal sebagai berikut:
 - a. Karakterisasi luasan berkas laser sebaiknya dilakukan dengan menggunakan alat CCD garis dengan output gaussian berdasarkan variasi jarak sehingga didapatkan nilai diameter berkas laser yang akurat
 - b. Pemeriksaan jumlah populasi sel setelah perlakuan sebaiknya dilakukan dengan metode *MTT Assay* agar diperoleh jumlah sel hidup dan sel mati yang lebih akurat dengan diketahui nilai *optical density* nya
 - c. Perhitungan jumlah sel yang mengalami kematian apoptosis sebaiknya menggunakan *flow cytometer* agar didapatkan hasil yang lebih akurat
 - d. Saat pengamatan sel apoptosis, sebaiknya menggunakan reagen pewarna sel yang bersifat sebagai antibodi dan tidak karsinogenik agar tidak mempengaruhi kondisi sel setelah perlakuan
 - e. *Human error* dalam penghitungan sel apoptosis dapat dihilangkan dengan mendesain *software* penghitung sel apoptosis secara digital

Berdasarkan hasil di tahun pertama dan kedua maka akan dilakukan beberapa hal di tahun ketiga yaitu:

1. Hasil analisis secara keseluruhan untuk menguji keberhasilan sistem yang sudah dikerjakan ditahun pertama dan kedua, akan dimaksimalkan untuk optimasi alat di tahun ketiga
2. Penyinaran dengan fotosensitizer lokal dan fotosensitizer pembanding.
3. Lanjutan penulisan hasil publikasi di tahun kedua termin kedua
4. Penyelesaian draft buku ajar

Seperti kita ketahui, kanker adalah penyakit yang terjadi karena adanya gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi pada organisme multiseluler sehingga terjadi perubahan perilaku sel yang tidak terkontrol. Sel kanker adalah sel normal yang mengalami mutasi/perubahan genetik dan tumbuh tanpa terkoordinasi dengan sel-sel tubuh lain. Proses pembentukan kanker (karsinogenesis) merupakan kejadian somatik, disebabkan karena akumulasi perubahan genetik dan epigenetik yang menyebabkan perubahan pengaturan normal kontrol molekuler perkembangan biakan sel. Perubahan genetik tersebut dapat berupa aktivasi proto-onkogen dan atau inaktivasi gen penekan tumor yang dapat memicu tumorigenesis dan memperbesar progresinya (Syarifudin, 2007).



Gambar 2.2 Mekanisme laser terhadap jaringan (Niemz, 2007)

Dalam keadaan normal, sel hanya akan membelah diri bila tubuh membutuhkannya seperti mengganti sel-sel yang rusak atau mati. Sebaliknya, sel kanker akan membelah diri meskipun tidak dibutuhkan sehingga terjadi kelebihan sel-sel baru. Kanker dapat tumbuh di semua sel jaringan tubuh, seperti sel kulit, sel hati, sel darah, sel otak, sel lambung, sel usus, sel paru, sel saluran kencing, dan berbagai macam sel tubuh lainnya

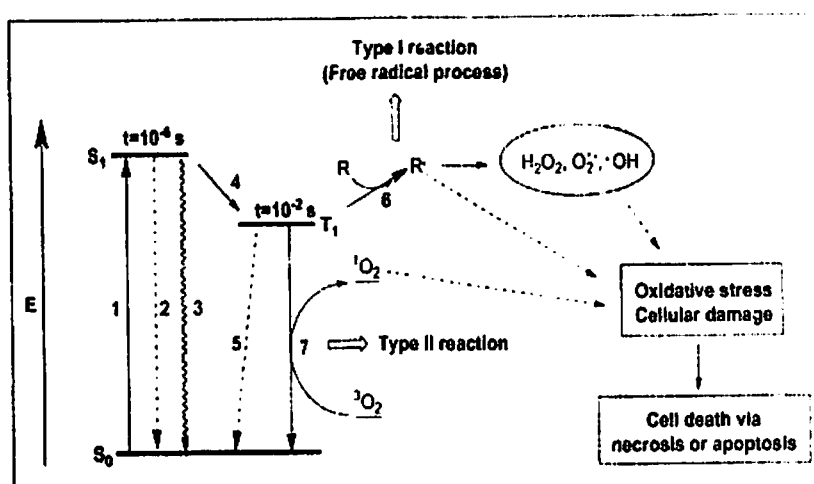
Sel MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) atau RPMI yang mengandung Foetal Bovine Serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Al khazalih, 2009). RPMI mengandung larutan garam yang berfungsi untuk menjaga pH

fisiologis, tekanan osmotik, dan menjaga potensial membran. Selain garam, RPMI juga mengandung glukosa sebagai sumber energi, asam amino esensial sebagai sumber energi dan sumber karbon (Sinha, 2008).

Terapi fotodinamik merupakan terapi kombinasi fotosensitizer dan radiasi cahaya (foton). Dengan panjang gelombang yang sesuai dan adanya oksigen dapat menyebabkan kerusakan selektif pada jaringan yang tidak sehat (Al khazalikh, 2009). Proses ini dapat terjadi tanpa menimbulkan efek terhadap sel normal, bersifat lokal hanya pada bagian yang dikenai cahaya (Castano dkk., 2004). Mekanisme PDT memerlukan paparan fotosensitizer ke sel atau jaringan diikuti iradiasi cahaya visibel pada panjang gelombang sesuai, biasanya di daerah merah atau near IR dan sesuai dengan spektrum absorpsi fotosensitizer. Prinsip terapi fotodinamik dapat dijelaskan melalui diagram Jablonski pada Gambar 2.3. Proses fotofisika dalam terapi fotodinamik seperti yang terilustrasikan pada Gambar 2.3 adalah: 1) absorpsi cahaya dengan panjang gelombang yang sesuai akan mengaktifkan fotosensitizer dari keadaan singlet dasar (S_0) dimana (S_0) memiliki waktu tinggal yang sebentar akan bereksitasi ke keadaan singlet pertama (S_1). 2) (S_1) dapat kembali ke keadaan (S_0) dengan memancarkan energi yang diserap yang disebut dengan fluoresensi atau dengan 3) *internal conversion*. 4) Spin sebuah elektron yang tereksitasi singlet S_1 dapat terbalik, meninggalkan molekul pada keadaan eksitasi triplet T_1 , yang disebut dengan *intersystem crossing*. 5) fotosensitizer dalam keadaan T_1 dapat kembali ke keadaan S_0 dengan memancarkan fosforesensi. Transfer energi dari T_1 ke substrat biologi atau molekul oksigen akan menghasilkan ROS (1O_2 , H_2O_2 , 3O_2 , $\cdot OH$) yang menghasilkan kematian sel secara nekrosis atau apoptosis.

Ada dua jenis dalam jalur fotokimia yakni, reaksi tipe I dan tipe II. Dalam reaksi tipe I, fotosensitizer berinteraksi dengan biomolekul (oksigen) yang menghasilkan atom hidrogen (atau elektron, transfer yang mengarah ke produksi radikal bebas). Dalam reaksi tipe II, oksigen singlet yang dihasilkan adalah akibat dari perpindahan energi dari T_1 ke keadaan dasar triplet molekul oksigen. Pada proses tipe II merupakan jalur utama yang dapat menghasilkan singlet oksigen reaktif yang paling besar yang dapat menyebabkan kerusakan sel tumor (Yoon, 2013).

Fotosensitizer eksogen merupakan zat peka cahaya yang dimanfaatkan untuk terapi fotodinamik yang berasal dari luar organisme yang diterapi (Oleinick, 2011). Fotosensitizer berperan sebagai penyerap cahaya dan pentransfer energi ke pusat reaksi pada proses fotokimia. Interaksi antara fotosensitizer dengan jaringan adalah lokalisasi subselular. menurut Castano *et al* (2005) fotosensitizer terlokalisasi di mitokondria, lisosom, retikulum endoplasma, aparatus Golgi dan membran plasma. Paparan laser akan menyebabkan efek fotokimia, dimana induksi apoptosis baik oleh jalur mitokondria yang melibatkan *caspases* dan pelepasan sitokrom c, atau jalur yang melibatkan *ceramide* atau reseptor kematian akan terjadi.



Gambar 2.3. Modifikasi diagram Jablonski. Proses fotofisika dalam terapi fotodinamik: 1) absorpsi, 2) fluoresensi, 3) *internal conversion*, 4) *intersystem crossing*, 5) fosforesensi, 6) pembentukan radikal bebas melalui transfer energi dari fotosensitizer T_1 ke substrat dan 7) pembentukan singlet oksigen (1O_2) melalui transfer energi dari fotosensitizer T_1 ke oksigen triplet (3O_2) (Yoon, *et al* 2013).

Protoporphirin IX (PpIX) merupakan senyawa penyusun dasar dari porfirin. Struktur kimia dari *protoporphirin IX* (PpIX) disajikan pada Gambar 2.4.

Protoporphyrin IX (PpIX) merupakan senyawa dalam sel hidup yang sangat peka dan reaktif terhadap cahaya. Menurut Radu *et al* (2008) senyawa *Protoporphyrin IX* (PpIX) ini efektif digunakan sebagai fotosensitizer pada terapi karena *photosensitizing effect* yang ditimbulkan paling lama adalah 24 jam sehingga pasien tidak membutuhkan waktu yang lama untuk beraktivitas kembali. *Protoporphyrin IX* (PpIX) memiliki beberapa puncak serapan cahaya. Absorbansi *Protoporphyrin IX* (PpIX) disajikan pada Gambar 2.5.

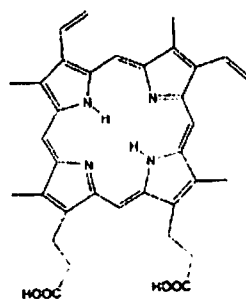
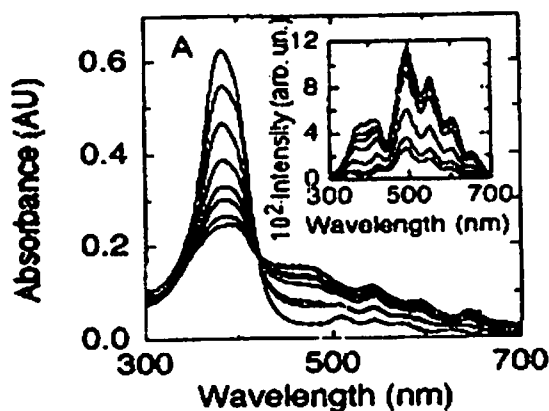


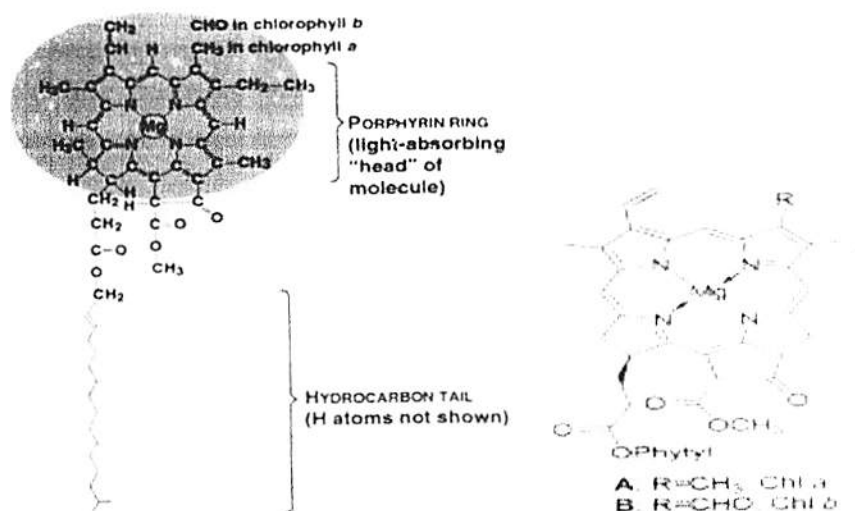
Figure 1. Protoporphyrin IX

Gambar 2.4 Struktur kimia PpIX (Scolaro, *et al.*, 2002)

Fotosensitizer klorofil dan turunannya dalam dekade terakhir ini dikembangkan sebagai fotosensitizer generasi ketiga. Sifat kimia klorofil didominasi oleh ikatan aromatik dari *tetrapyrrole* dan bagian yang reaktif terletak pada rantai sampingnya. Struktur senyawa klorofil disajikan pada Gambar 2.6.

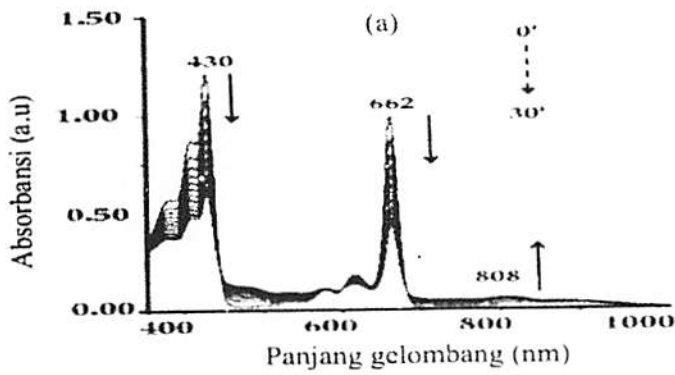
Gambar 2.5. Absorbansi Fotosensitizer *Protoporphirin IX*(PpIX) (Scolaro, *et al.*, 2002)

Klorofil a dan b bisa didapatkan dari semua tanaman hijau. Menurut Brandis *et al* (2006) klorofil a dapat digunakan sebagai sumber untuk sintesis fotosensitizer baru. Klorofil dapat menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm, terutama sinar merah dan biru (Suyitno, 2008). Pola spektra fotodegradasi klorofil a disajikan pada Gambar 2.6.

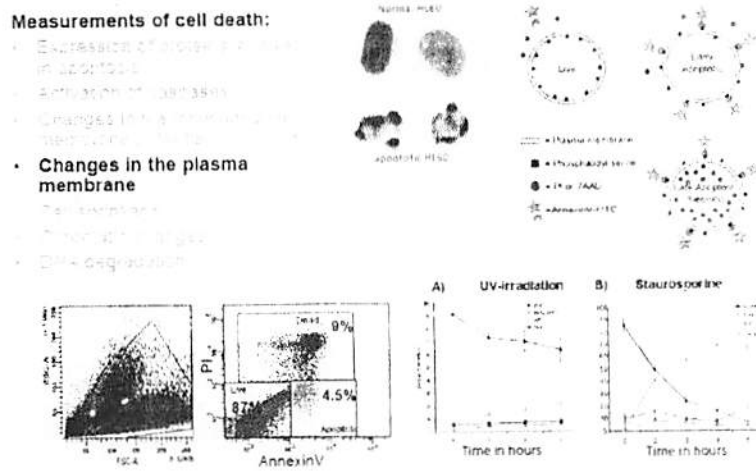


Gambar 2.6. Struktur kimia klorofil (Yoon, *et al* 2013)

Salah satu alat yang digunakan untuk mengetahui apoptosis sel akibat terapi fotodinamik berbasis laser merah (laser He-Ne) adalah *flow cytometer* (Gambar 2.8) dan dilakukan pemotretan menggunakan mikroskop cahaya. Menurut Suwito (2008) sel yang mengalami apoptosis akan nampak berwarna hijau sedangkan sel yang mengalami nekrosis akan nampak berwarna merah.



Gambar 2.7 Pola spektra fotodegradasi klorofil a dalam metanol (Budyanto *et al*, 2008).



Gambar 2.8. Contoh Hasil Analisis Flowcytometer (Zanki, 2012)



BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan penelitian ini antara lain :

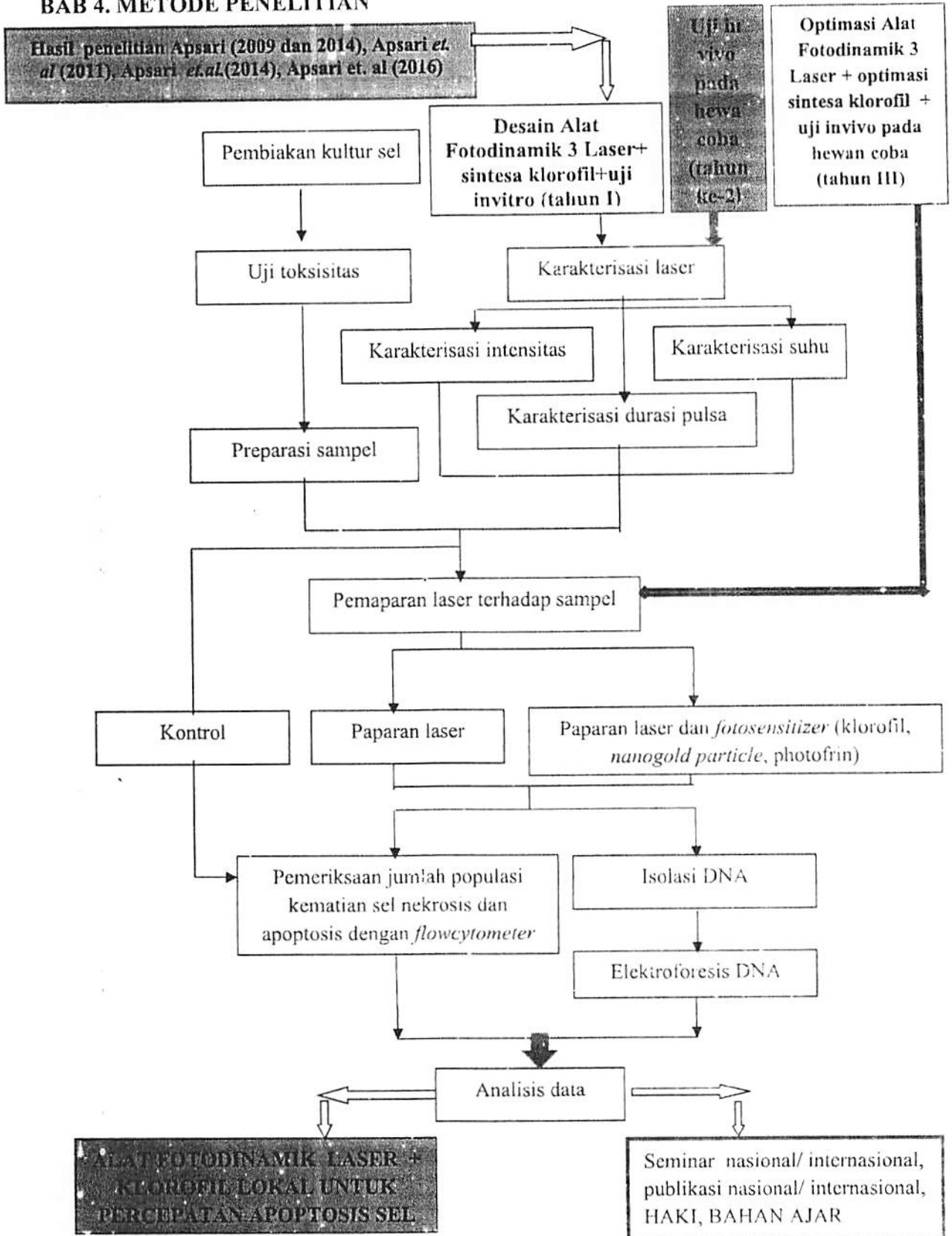
1. Membuat alat fotodinamik laser merah, biru dan infra merah serta karakterisasinya agar diperoleh daya yang optimum agar mampu menghasilkan kematian sel secara apoptosis
2. Menghasilkan biomaterial baru berbahan lokal yaitu klorofil a sebagai fotosensitizer eksogen untuk terapi fotodinamik sel kanker
3. Memberikan informasi tentang konsentrasi fotosensitizer klorofil a, *gold nanoparticle* dan protoporphirin IX (PpIX) yang aman untuk sel kanker MCF-7 (melalui uji sitoksisitas).
4. Mengetahui persentase kematian sel kanker akibat paparan laser dioda merah, biru dan infra merah
5. Mengetahui dosis energi optimal laser dioda merah untuk terapi fotodinamik sel kanker dengan penambahan fotosensitizer klorofil a dan protoporphirin IX (PpIX), *nanogold particle*
6. Mengetahui pengaruh dosis energi paparan laser merah, biru dan infra merah terhadap sel kanker dengan dan tanpa penambahan fotosensitizer klorofil, *nanogold particle*, dan *photofrin*, sampai pada tataran biomolekuler yang dapat digunakan sebagai referensi dasar dalam aplikasi terapi klinis.
7. Sasaran penelitian adalah terwujudnya teknologi baru dan ekonomis, kompetitif dan produktif berbasis instrumen lokal, publikasi internasional, buku bahan ajar, dan terwujudnya kemitraan antara perguruan tinggi, lembaga pemerintah, rumah sakit dan industri medis di level nasional maupun internasional.
- 8.

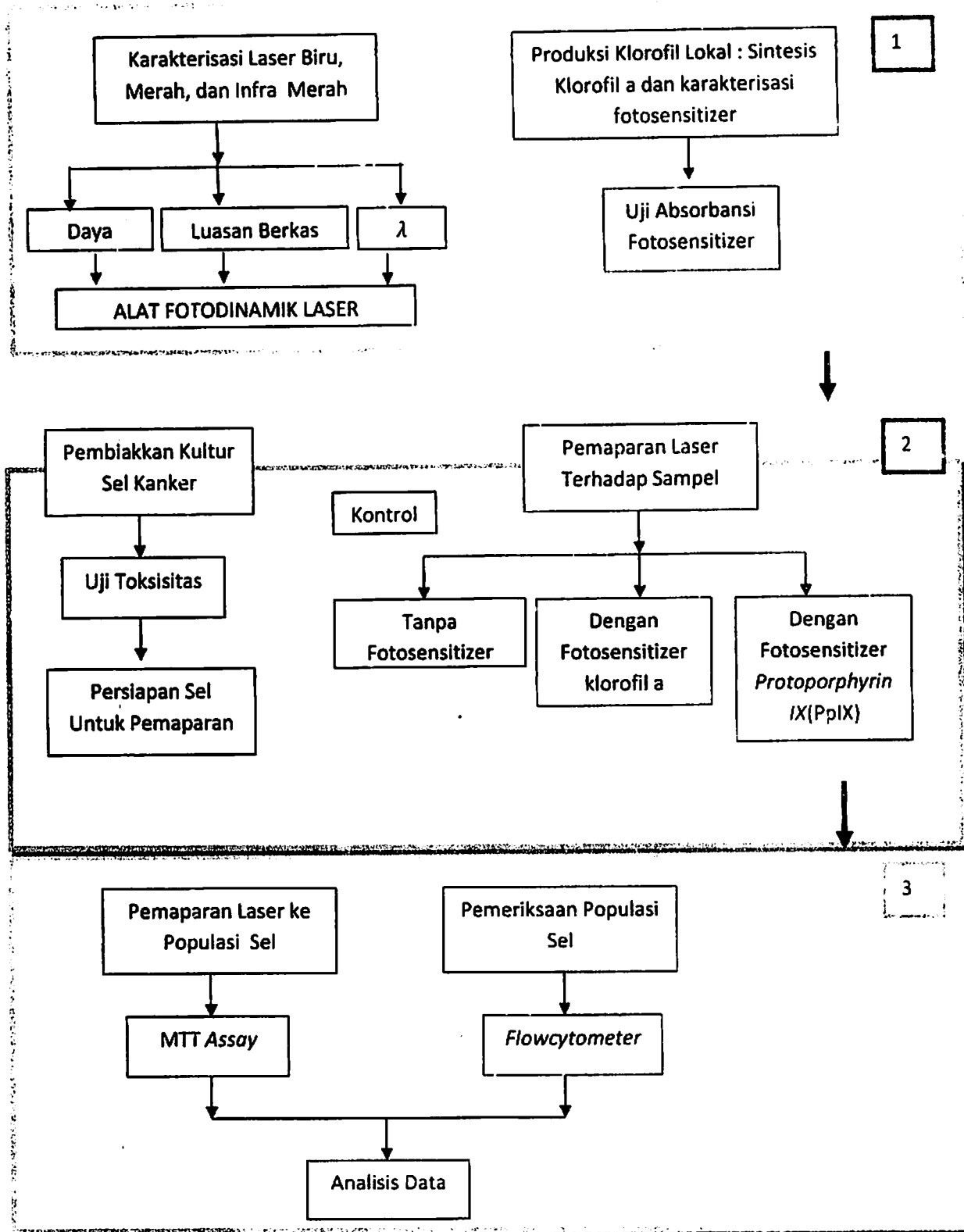
Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat, diantaranya :

1. Memberikan informasi tentang isolasi dan karakterisasi klorofil a sebagai fotosensitizer untuk terapi fotodinamik sel kanker.
2. Memberikan informasi tentang persentase kematian sel kanker akibat paparan laser dioda merah

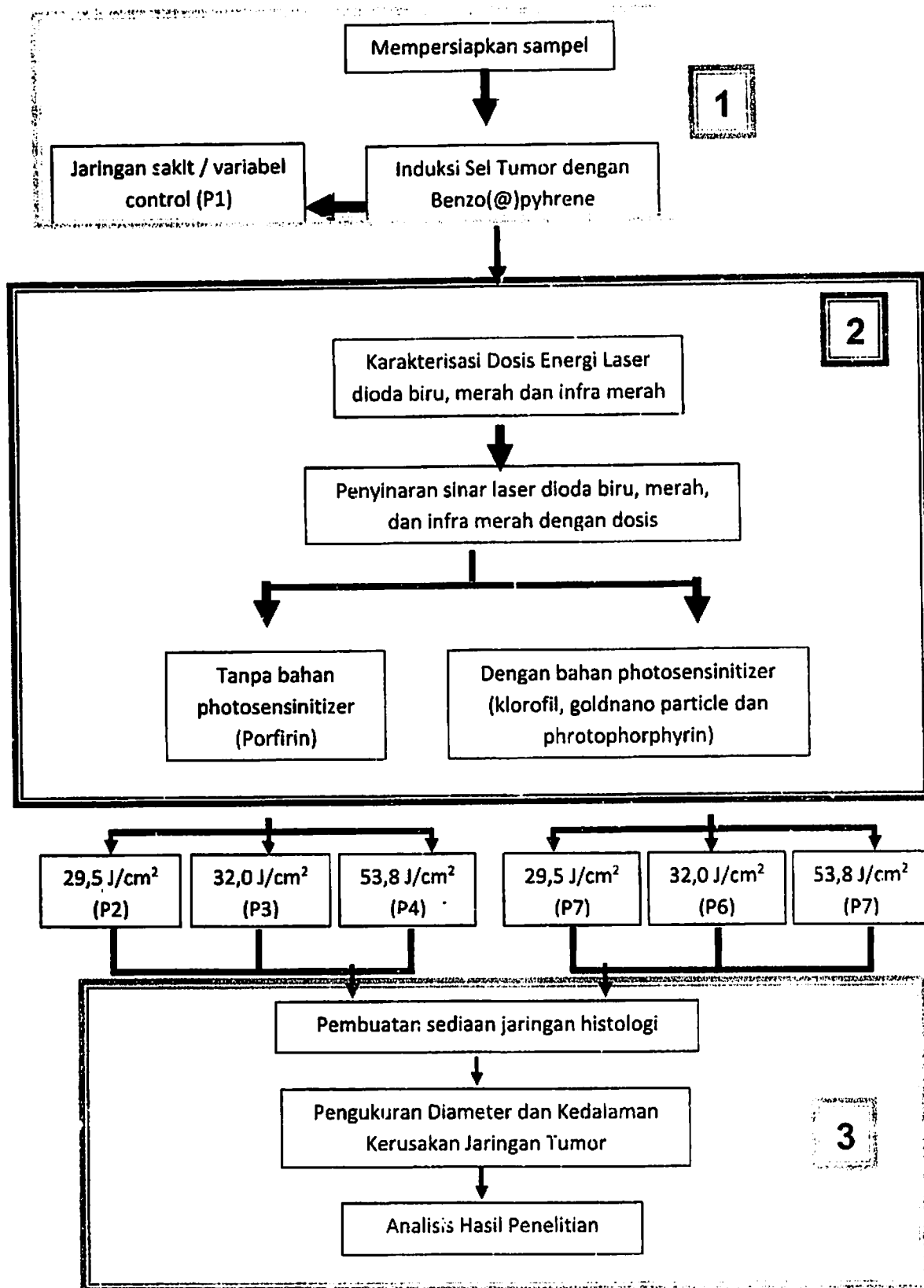
3. Memberikan informasi tentang pengaruh pemberian dosis energi optimal laser dioda merah untuk terapi fotodinamik sel kanker dengan penambahan fotosensitizer klorofil a dan protoporphirin IX.
4. Memanfaatkan bahan alam sebagai fotosensitizer untuk terapi fotodinamik 3 laser, yaitu merah, biru dan inframerah.
5. Mendukung upaya pemerintah dalam meningkatkan kesehatan masyarakat Indonesia dan kemandirian bangsa Indonesia dalam bidang teknologi, khususnya dalam bidang kesehatan dan obat-obatan

BAB 4. METODE PENELITIAN



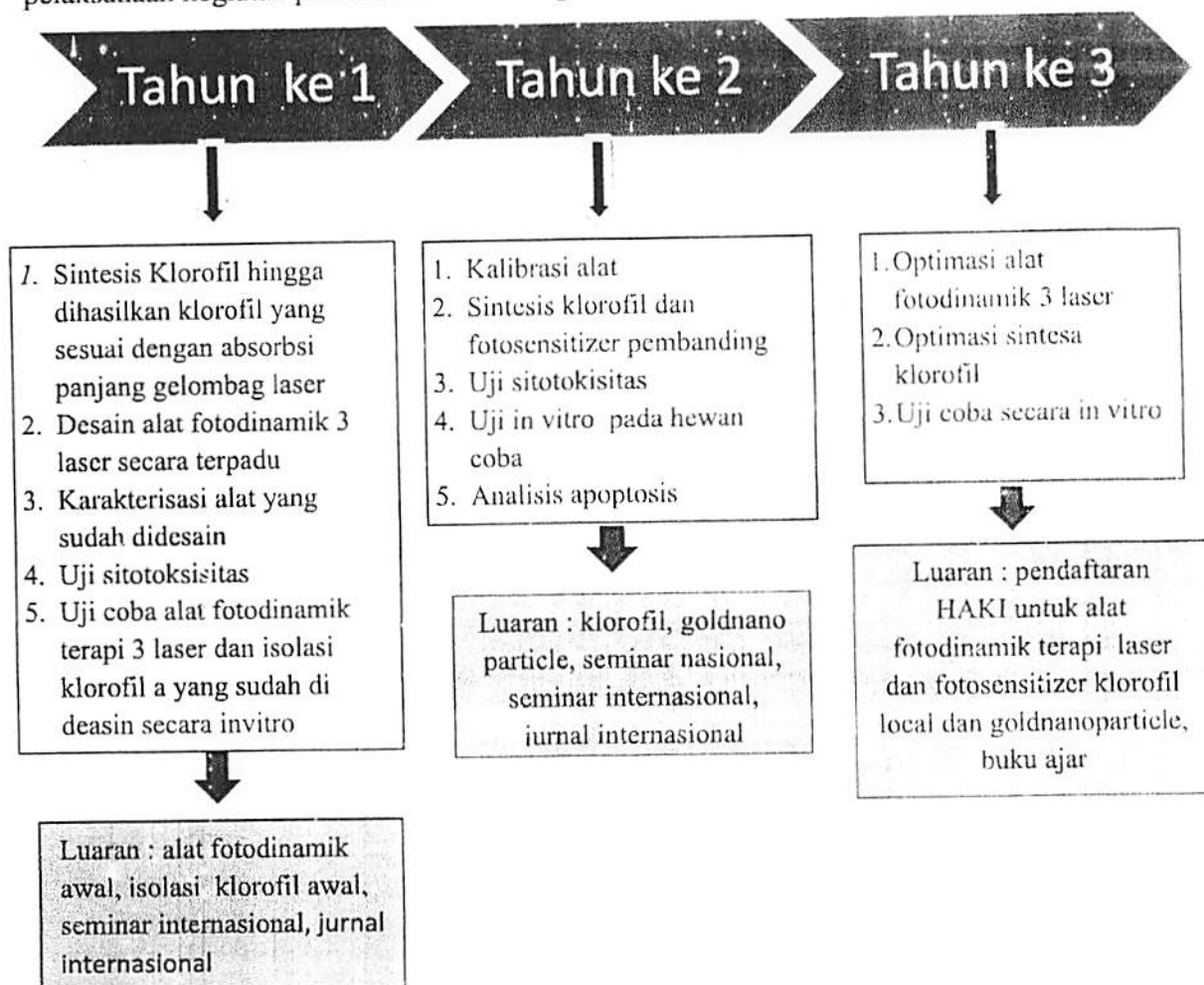


Gambar 4.1. Diagram alur penelitian



Gambar 4.2. Diagram alur penelitian untuk in vivo

Pelaksanaan kegiatan penelitian ini dikerjakan dalam 3 tahun dengan rencana pelaksanaan kegiatan pertahun adalah sebagai berikut



BAB V. HASIL DAN OUTPUT YANG DICAPAI

5.1. HASIL YANG DICAPAI

5.1. Karakterisasi Laser



Karakterisasi laser yang pertama dilakukan adalah karakterisasi daya laser dan intensitas laser yang dilakukan di Laboratorium Optika dan Laser Universitas Airlangga. Karakterisasi daya laser dilakukan untuk mengetahui daya optimum yang dimiliki oleh laser. Karakterisasi daya laser menggunakan powermeter digital. Laser yang digunakan dalam penelitian ini adalah laser dioda, laser dioda memiliki sifat yang sensitive terhadap jarak, sehingga pengukuran daya laser dilakukan dengan beberapa variasi jarak. Variasi jarak yang digunakan dimulai dari 2,5 cm sampai 3,5 cm. Hasil karakterisasi pengukuran daya ditampilkan pada Tabel 5.1

Tabel 5.1. Pengukuran Daya Laser dengan Variasi Jarak dari Detektor

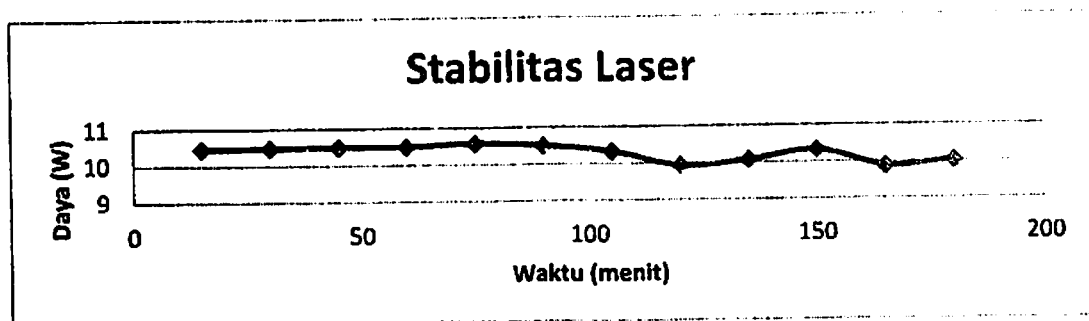
Jarak (Cm)	Pengulangan Pengukuran Daya (mW)			Rata-Rata (mW)
	1	2	3	
2,5	10,61	10,38	10,33	10,44
3	10,46	10,28	9,99	10,24
3,5	10,52	10,11	9,76	10,13

Dari hasil pengukuran daya laser diketahui bahwa laser memiliki daya optimum pada jarak 2,5 cm. Karakterisasi intensitas diawali dengan mengukur diameter berkas laser menggunakan persamaan 2.1 dan 2.2 dan menghitung luasan berkas laser dengan persamaan 2.5. Berdasarkan perhitungan didapatkan bahwa luasan berkas laser sebesar $1,10916 \text{ cm}^2$ dengan salah satu diameternya sesuai dengan diameter tempat sampel yaitu 3 mm. Selanjutnya perhitungan intensitas laser dapat dihitung dengan persamaan 3.5, didapatkan bahwa besar intensitas laser yakni $0,00941 \text{ W/cm}^2$ Lama pemaparan yang dibutuhkan untuk masing masing dosis berdasarkan persamaan 3.5 disajikan pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Lama pemaparan untuk variasi dosis energi

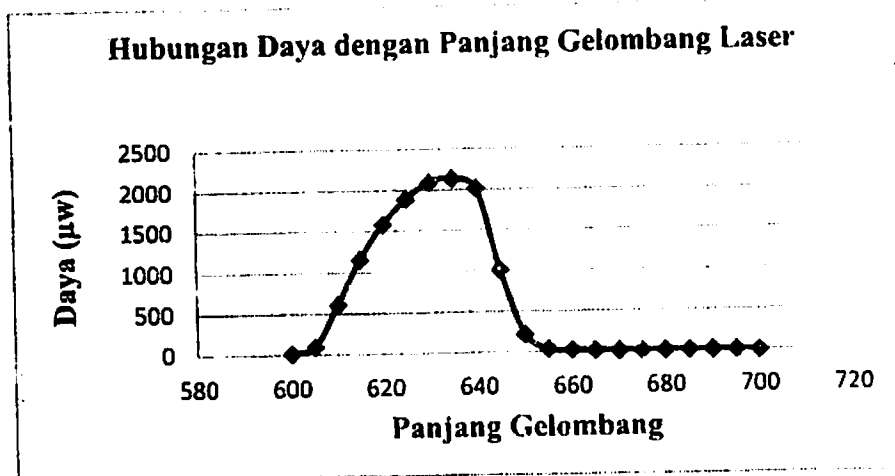
Intensitas (W/cm^2)	Waktu (menit)	Dosis (J/cm^2)	Energi
0,00941	4,95	2,8	
0,00941	12,04	6,8	
0,00941	19,12	10,8	

Selanjutnya dilakukan pengukuran kestabilan daya laser pada jarak tersebut. Hasil pengukuran kestabilan daya laser pada variasi waktu disajikan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil Pengukuran Stabilitas Daya terhadap Variasi Waktu

Berdasarkan Gambar 5.1, daya keluaran laser bersifat tidak stabil terhadap waktu dari 0 menit sampai dengan 180 menit. Ketidakstabilan daya terjadi karena jenis laser yang digunakan adalah laser diode, yang karakteristiknya bersifat kurang stabil. Karakterisasi laser selanjutnya adalah karakterisasi panjang gelombang dengan menggunakan monokromator. Karakterisasi panjang gelombang dilakukan di laboratorium fotonika Institute Teknologi Sepuluh November. Pada Gambar 5.2 disajikan grafik hubungan antara panjang gelombang dengan daya.



Gambar 5.2. Hubungan antara panjang gelombang dengan daya

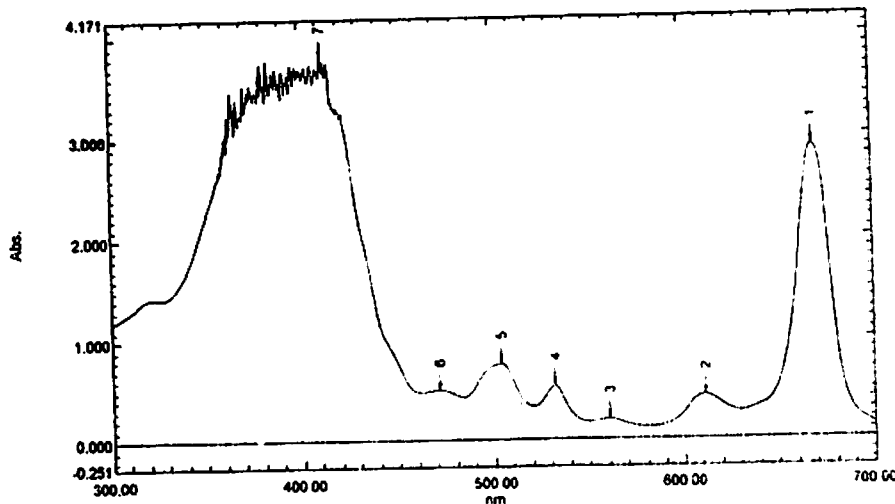
Dari grafik tersebut diketahui bahwa panjang gelombang memiliki puncak pada 635 nm, hasil ini sesuai dengan spesifikasi pada laser yakni 635 nm. Karakterisasi laser ter

5.2 Spektrum serapan fotosensitizer

Fotosensitizer yang digunakan dalam penelitian ini adalah klorofil dari hasil isolasi daun sirsak dan Protoporphyrin IX (PPIX).

5.2.1. Klorofil

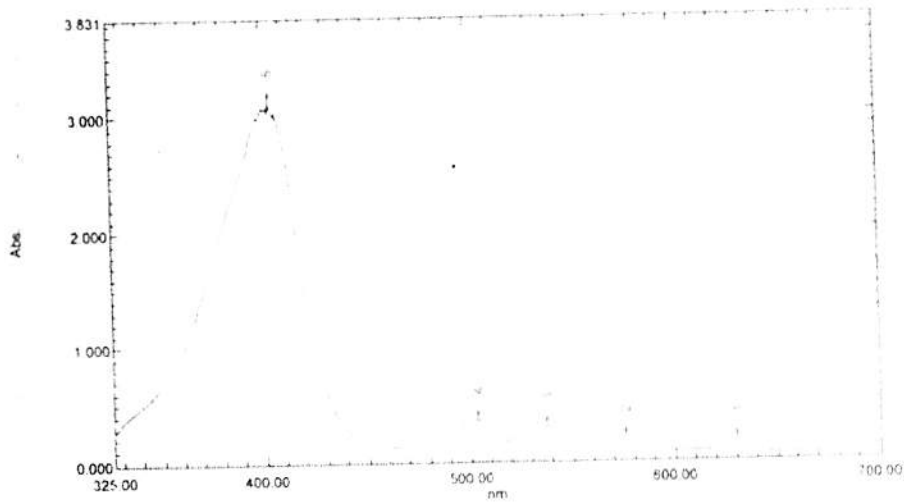
Klorofil hasil isolasi daun sirsak sebanyak 0,01 gram di larutkan ke dalam n hexane sebanyak 40 ml, sehingga diperoleh konsentrasi larutan klorofil sebesar 0.00025 gr/ml. Larutan klorofil kemudian dilakukan uji absorbansi dengan spektrofotometer UV Vis dan menghasilkan *peak* maksimum pada panjang gelombang biru dan merah.



Gambar 5.1. Absorbansi Klorofil a melalui uji spektrofotometer UV Vis Hasil ini sesuai dengan penelitian Mllenkovic *et al* (2012) yang menyatakan bahwa klorofil merupakan turunan porfirin yang memiliki dua puncak maksimum pada daerah visible yakni pada merah (Q band) dan biru (B band) .

5.2.2. *Protoporphyrin IX* (PPIX)

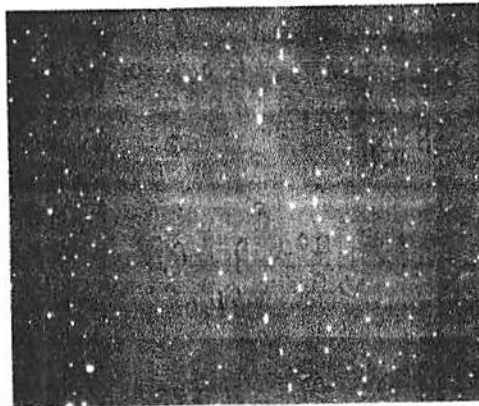
Protoporphyrin IX (PPIX) yang diperoleh dari SIGMA-ALDRICH sebanyak 0.001 gram dilarutkan ke dalam aseton sebanyak 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi larutan *Protoporphyrin IX* (PPIX) sebesar 0.18 mM, kemudian diencerkan dengan mengambil 0.1 ml dan penambahan aseton sebanyak 30 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan *Protoporphyrin IX* (PpIX) sebesar 0.0006 mM. Larutan *Protoporphyrin IX* (PpIX) kemudian dilakukan uji absorbansi dengan spektrofotometer UV Vis dan menghasilkan *peak* maksimum pada panjang gelombang 403.6 nm dan memiliki empat *peak* lemah pada panjang gelombang 503.2 nm, 536.80 nm, 574.90, dan 630 nm. Hasil uji spectrum fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) disajikan pada Gambar 5.2. Hasil ini sesuai dengan penelitian Mllenkovic *et al* (2012) yang menyatakan bahwa *Protoporphyrin IX* (PpIX) memiliki puncak tertinggi pada 408 nm dengan diikuti empat puncak rendah yakni pada 506, 542, 577, dan 630 nm. Perbedaan serapan fotosensitizer ini dapat disebabkan karena sensitivitas setiap alat berbeda-beda. Pergeseran panjang gelombang dapat ditoleransi jika perbedaannya tidak melebihi 10 nm.



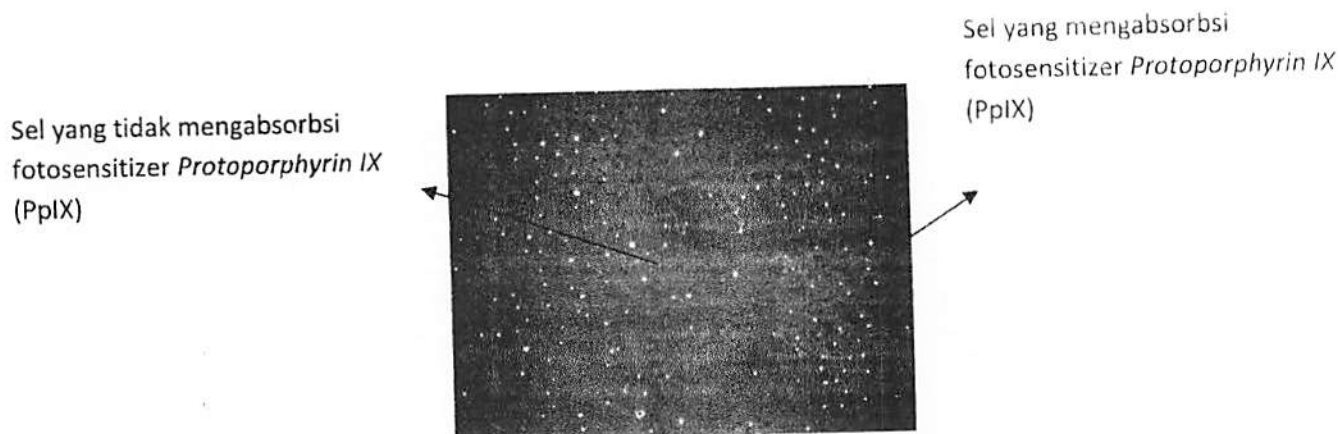
Gambar 5.2. Absorbansi Protoporphyrin IX (PPIX) melalui uji spektrofotometer UV-Vis

5.3. Uji Toksitas Fotosensitizer

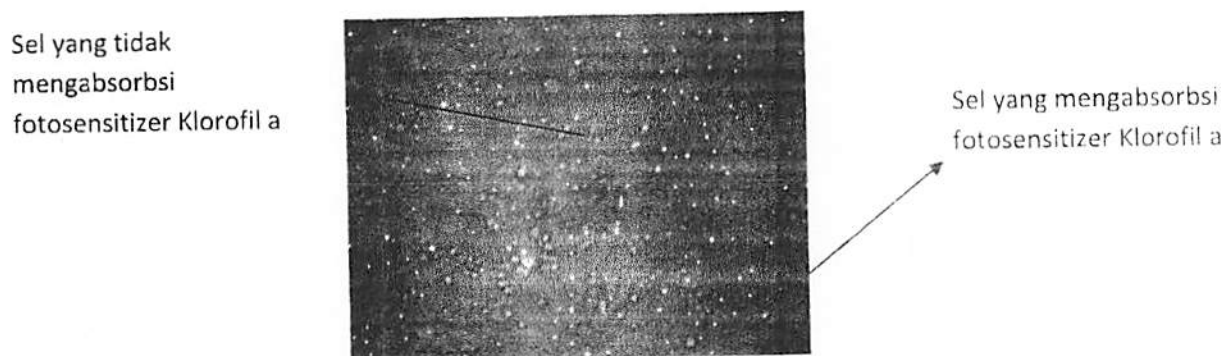
Fotosensitizer yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Protoporphyrin IX* (PpIX) yang diperoleh dari SIGMA ALDRICH dan Klorofil a dari isolasi daun sirsak. Prosedur uji toksisitas adalah dengan memberikan beberapa variasi volume dari fotosensitizer terhadap sel MCF-7 dan diinkubasikan selama 24 jam.



Gambar 5.3 Sel MCF-7 sebelum diinkubasi fotosensitizer 24 jam

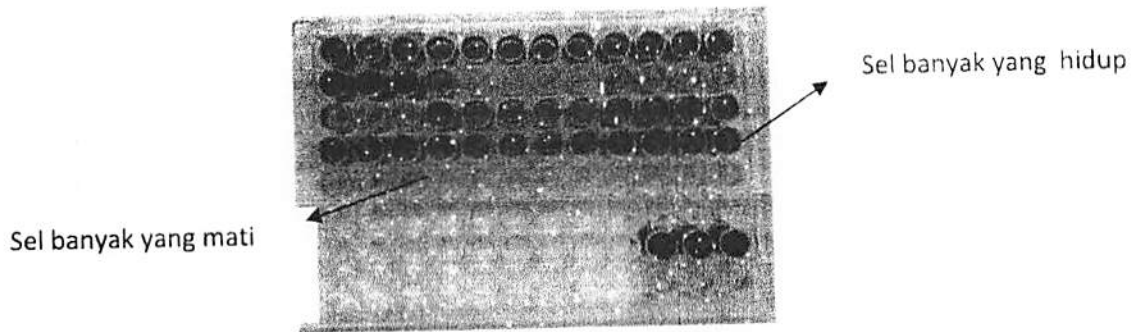


Gambar 5.4 Sel MCF-7 setelah diinkubasi fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) 24 jam

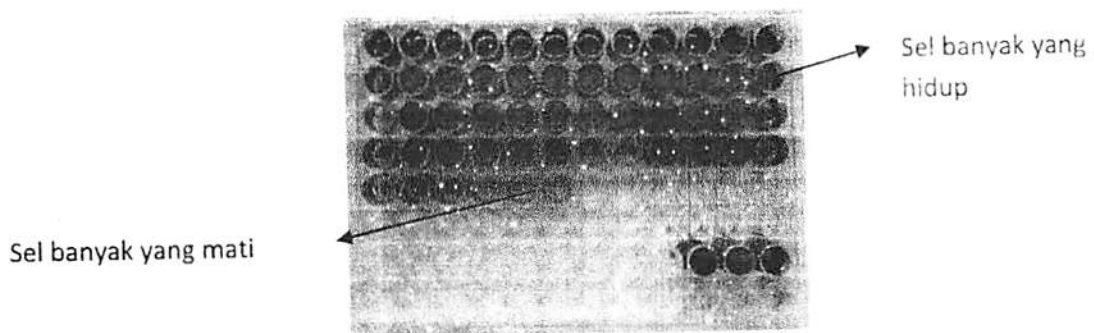


Gambar 5.5 Sel MCF-7 setelah diinkubasi fotosensitizer Klorofil 24 jam

Pengamatan uji toksisitas fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) dan Klorofil a terhadap sel kanker MCF-7 dilakukan dengan uji *MTT Assay* dan dibaca menggunakan *ELISA reader*. Sel yang sudah diinkubasi dengan fotosensitizer selama 24 jam dicuci dengan PBS untuk membersihkan sisa-sisa fotosensitizer yang menempel pada dinding sumuran agar tidak mempengaruhi hasil pembacaan pada *ELISA reader*. Sel selanjutnya direaksikan dengan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) dan diinkubasi selama 5 jam dalam inkubator. Setelah 5 jam sel kemudian ditambahkan *stop solution* untuk menghentikan reaksi sel dan diinkubasikan kembali selama 24 jam dalam incubator. Sel yang hidup akan berwarna ungu sedangkan sel yang mati berwarna kuning seperti pada Gambar 5.6 dan 5.7.



Gambar 5.6. Sel MCF dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) dalam *well plate*- 96 setelah diinkubasi MTT 24 jam



Gambar 5.7. Sel MCF dengan penambahan fotosensitizer Klorofil a dalam *well plate*- 96 setelah diinkubasi MTT 24 jam

Tabel 5.3 Nilai OD hasil pembacaan ELISA untuk uji toksisitas fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX)

No	Konsentrasi (mM)	Volume Fotosensitizer (μ L)	Optical Density (OD)			Rata-rata Optical Density (OD)
			1	2	3	
1	0,18	0.2	0.762	0.71	0.724	0.732
2	0,18	0.4	0.764	0.758	0.764	0.762
3	0,18	0.8	0.635	0.827	0.81	0.757
4	0,18	1.2	0.789	0.823	0.79	0.8006
5	0.18	1.6	0.71	0.652	0.759	0.707
6	0.18	2	0.333	0.144	0.129	0.202
7	0.18	2.2	0.15	0.123	0.176	0.149
8	0.18	2.8	0.304	0.231	0.206	0.247
9	0.0006	0.2	0.75	0.787	0.734	0.757
10	0.0006	0.5	0.678	0.74	0.736	0.718
11	0.0006	1	0.799	0.871	0.768	0.812
12	0.0006	1.5	0.698	0.726	0.747	0.723
13	0.0006	2	0.632	0.722	0.658	0.670
14	0.0006	4	0.577	0.597	0.698	0.624
15	0.0006	6	0.679	0.695	0.739	0.704
16	0.0006	10	0.184	0.162	0.149	0.165
17	0.0006	15	0.134	0.133	0.123	0.13
18	0.0006	20	0.108	0.099	0.084	0.097
19	0.0006	25	0.079	0.082	0.082	0.081
20	0 (Kontrol)	-	1.381	1.624	1.233	1.412

Tabel 5.4 Nilai OD hasil pembacaan ELISA untuk uji toksisitas fotosensitizer Klorofil a


No	Volume Fotosensitizer (μL)	<i>Optical Density (OD)</i>			Rata-rata <i>Optical Density (OD)</i>
		1	2	3	
1	2	0.706	0.665	0.705	0.692
2	5	0.707	0.714	0.776	0.732
3	10	0.743	0.801	0.751	0.765
4	12	0.773	0.988	0.82	0.860
5	15	0.518	0.382	0.427	0.442
6	20	0.518	0.655	0.647	0.606
7	22	0.639	0.65	0.677	0.655
8	25	0.726	0.819	0.587	0.710
9	30	0.275	0.557	0.532	0.454
10	35	0.501	0.497	0.664	0.554
11	40	0.623	0.681	0.695	0.666
12	45	0.685	0.74	0.4	0.608
13	50	0.479	0.441	0.455	0.458
14	60	0.415	0.394	0.432	0.413
15	70	0.24	0.181	0.6	0.340
16	80	0.58	0.625	0.459	0.554
17	90	0.324	0.433	0.328	0.361
18	100	0.154	0.154	0.137	0.148
19	0(Kontrol)	1.379	1.381	1.291	1.35

Tabel 5.4 Persentase Kematian sel hasil uji toksisitas fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX)

Konsentrasi (mM)	Volume Fotosensitizer (μ L)	Rata-rata <i>Optical Density</i> (OD)	Prosentase Kematian Sel (%)
0,18	0.2	0.732	48.18
0,18	0.4	0.762	46.05
0,18	0.8	0.757	46.38
0,18	1.2	0.8006	43.32
0.18	1.6	0.707	49.95
0.18	2	0.202	85.70
0.18	2.2	0.149	89.40
0.18	2.8	0.247	90.82
0.0006	0.2	0.757	82.51
0.0006	0.5	0.718	46.41
0.0006	1	0.812	49.17
0.0006	1.5	0.723	42.47
0.0006	2	0.670	48.77
0.0006	4	0.624	52.52
0.0006	6	0.704	55.82
0.0006	10	0.165	50.14
0.0006	15	0.13	88.31
0.0006	20	0.097	90.79
0.0006	25	0.081	93.13

Tabel 5.5. Persentase Kematian sel hasil uji toksisitas fotosensitizer Klorofil a

Volume Fotosensitizer (μL)	Rata-rata <i>Optical Density</i> (OD)	Prosentase Kematian Sel (%)
2	0.692	48.74
5	0.732	45.75
10	0.765	43.33
12	0.860	36.27
15	0.442	67.23
20	0.606	55.06
22	0.655	51.45
25	0.710	47.35
30	0.454	66.32
35	0.554	58.96
40	0.666	50.64
45	0.608	54.93
50	0.458	66.04
60	0.413	69.35
70	0.340	74.79
80	0.554	58.91
90	0.361	73.20
100	0.148	89.01

 : Volume Fotosensitizer yang digunakan

Pada penelitian ini konsentrasi fotosensitizer yang digunakan masing-masing untuk fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) 0.18 mM sebesar 1.2 μL , dengan meninjau kematian sel masih di bawah 50 % dan pada konsentrasi tersebut telah diuji hasil uji serapannya seperti pada Gambar 5.2 sedangkan untuk fotosensitizer klorofil a konsentrasi yang aman adalah sebesar 12 μL . Belum ditemukan referensi tentang toksisitas klorofil a, pengambilan konsentrasi yang aman hanya berdasarkan kematian sel dibawah 50 %. Setelah diketahui konsentrasi fotosensitizer yang aman, dilakukan preparasi sampel untuk pemaparan laser.

5.4. Pengaruh Paparan Laser Terhadap Sel Kanker MCF-7

Laser diletakkan 2,5 cm sesuai dengan karakterisasi daya laser yang optimal dan berkas laser yang sesuai dengan salah satu *plate-96*, kemudian set up alat dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol, sebelum dilakukan pemaparan laser terhadap sel kanker. Pemaparan laser merah terhadap sel kanker dilakukan di dalam *laminar flow* agar sel tetap dalam kondisi steril. Set up pemaparan laser terhadap sel di dalam *laminar flow* tersaji pada Gambar 5.7. Sel yang sudah diinkubasi dengan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) dan Klorofil a diletakkan di tempat sampel, sel kemudian dipapari dengan dosis energy $2,8 \frac{J}{cm^2}$; $6,8 \frac{J}{cm^2}$; $2,8 \frac{J}{cm^2}$; $10,8 \frac{J}{cm^2}$ dengan masing-masing dosis energy dilakukan tiga kali pengulangan.



Gambar 5.7. Set up pemaparan laser terhadap sel kanker

Pemaparan dosis energi pertama dimulai dari sumuran A1 hingga A2 selanjutnya pemaparan dosis energi kedua dimulai dari sumuran H12 sampai H11. Pemaparan dosis energi ketiga dilakukan dari sumuran A1 hingga A2 dengan plate yang berbeda. Setelah pemaparan selesai, sel yang sudah diberi pemaparan dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam, kemudian dilakukan uji *MTT assay* untuk memeriksa jumlah populasi sel yang mati akibat perlakuan pemaparan. Jumlah populasi sel yang mati akibat perakuan pemaparan dapat dilihat melalui *Optical Density* (OD) seperti yang tersaji pada Tabel 5.6 dan Tabel 5.7.

Tabel 5.6. *Optical Density* (OD) untuk pemaparan laser dengan tanpa penambahan fotosensitizer

Dosis Energi (J/cm ²)	Lama Paparan (menit)	<i>Optical Density</i> (OD)			Rata-rata <i>Optical Density</i> (OD)
		1	2	3	
0	0	0,768	0,69	0,662	0,7067
2,8	4,95	-	0,601	0,581	0,591
6,8	12,04	0,547	0,542	0,535	0,541
10,8	19,02	0,659	0,636	0,673	0,656

Tabel 5.7. *Optical Density* (OD) untuk pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer

Dosis Energi (J/cm ²)	Lama Paparan (menit)	Penambahan Fotosensitizer	<i>Optical Density</i> (OD)			Rata-rata <i>Optical Density</i> (OD)
			1	2	3	
2,8	4,95	<i>ProtoporphyrinIX</i> (PpIX)	0,572	0,571	0,548	0,5636
2,8	4,95	Klorofil a	0,517	0,516	0,428	0,487
6,8	12,04	<i>ProtoporphyrinIX</i> (PpIX)	0,577	0,606	0,389	0,524
6,8	12,04	Klorofil a	0,417	0,406	0,507	0,443
10,8	19,02	<i>ProtoporphyrinIX</i> (PpIX)	0,164	0,637	0,162	0,321
10,8	19,02	Klorofil a	0,275	0,381	0,455	0,370

Persentase kematian sel kanker akibat pemaparan dapat disajikan sebagaimana pada Tabel 5.8 dan Tabel 5.9.

Tabel 5.8. Kematian sel kanker akibat pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer

Dosis Energi (J/cm ²)	Lama Paparan (menit)	Kematian Sel (%)
2,8	4,95	16,37
6,8	12,04	23,39
10,8	19,02	7,17

Tabel 5.9. Kematian sel kanker akibat pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer

Dosis Energi (J/cm ²)	Lama Paparan (menit)	Penambahan Fotosensitizer	Kematian Sel (%)
2,8	4,95	<i>ProtoporphyrinIX</i> (PpIX)	20,23
2,8	4,95	Klorofil a	31,08
6,8	12,04	<i>ProtoporphyrinIX</i> (PpIX)	25,85
6,8	12,04	Klorofil a	37,26
10,8	19,02	<i>ProtoporphyrinIX</i> (PpIX)	54,58
10,8	19,02	Klorofil a	47,6

Persentase kematian sel akibat perlakuan pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer dan dengan penambahan fotosensitizer diringkas sebagaimana pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10. Ringkasan Kematian Sel akibat Pemaparan Laser Merah tanpa dan dengan Penambahan Fotosensitizer

Dosis Energi (J/cm ²)	Persentase Kematian Sel (%)		
	Tanpa Fotosensitizer	Penambahan Fotosensitizer <i>Protoporphyrin IX (PpIX)</i>	Penambahan Fotosensitizer Klorofil a
2,8	16,37	20,23	31,08
6,8	23,39	25,85	37,26
10,8	7,17	54,58	47,6

Berdasarkan Tabel 5.10 menunjukkan bahwa dosis optimum laser dengan penambahan fotosensitizer yakni pada 10,8 (J/cm²) dengan persentase kematian sel yang paling tinggi. Penelitian Karsunawati (2014), laser merah dengan daya 10 mW dan lama paparan selama 20 menit tidak dilakukan pembacaan kematian sel kanker dengan *ELISA Reader*, sehingga kematian sel kanker yang diperoleh belum bisa dibandingkan. Data penelitian yang sudah diperoleh dilakukan uji statistik dengan menggunakan program SPSS untuk mengetahui hasil penelitian akibat pemaparan laser menurut uji statistik. Hasil uji statistik disajikan pada Tabel 5.11 dengan penjelasan hasil analisis uji statistik disajikan pada sub bab a sampai d.

a. Uji Normalitas

Uji normalitas untuk kelompok perlakuan pemaparan laser memiliki signifikansi sebesar 0,923 sedangkan kelompok perlakuan pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer klorofil a memiliki signifikansi sebesar 0,170. Hasil keseluruhan dapat disimpulkan bahwa seluruh kelompok perlakuan memiliki signifikansi lebih besar dari 0,05 menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Sehingga data yang diambil dinyatakan tidak terjadi penyimpangan dan layak untuk dilakukan uji lanjutan (Herawatie, 2000).

b. Uji Homogenitas

Uji ini untuk menguji berlaku tidaknya asumsi untuk uji ANOVA. Hasil uji homogenitas untuk kelompok perlakuan pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer mempunyai signifikansi sebesar 0,270 dan kelompok pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer klorofil a mempunyai signifikansi sebesar

0,598. Pada kelompok perlakuan pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer dan dan kelompok pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer klorofil a menunjukkan signifikansi lebih besar dari 0,05 menunjukkan bahwa varian populasi adalah sama(homogen) dapat diterima. Namun untuk kelompok pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) varian populasinya heterogen sehingga tidak bisa di uji lanjutan dengan uji ANOVA. Uji statistik untuk data yang tidak homogen (heterogen) data diuji dengan Kruskal Wallis Test.

c. Uji ANOVA

Uji selanjutnya adalah uji ANOVA yang bertujuan untuk menguji apakah kedua kelompok memiliki rata-rata yang sama. Hasil uji ANOVA untuk kelompok perlakuan pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer mempunyai signifikansi sebesar 0,000 dan kelompok pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer klorofil a mempunyai signifikansi sebesar 0,186. Nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 menunjukkan tidak ada perbedaan rata-rata pada kelompok pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer klorofil a, namun pada kelompok perlakuan pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer nilai signifikansi kurang dari 0,05 menunjukkan ada perbedaan akibat perlakuan, sehingga perlu di uji lanjut dengan menggunakan post-hoc. Hasil uji post-hoc disajikan pada Tabel 5.12.

Berdasarkan hasil uji statistik pada Tabel 5.11 dan 5.12 menunjukkan bahwa pada penelitian ini terdapat perbedaan yang signifikan akibat pemaparan laser tanpa penambahan fotosensitizer. Hal ini dimungkinkan karena pemilihan variasi dosis laser memiliki rentang agak jauh sehingga menurut uji statistik tampak perbedaannya terhadap kematian sel. Namun pada kelompok perlakuan pemaparan laser dengan penambahan fotosensitizer tidak terdapat perbedaan yang signifikan, sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan penambahan fotosensitizer dapat menyebabkan kematian sel tetapi tidak beda nyata.

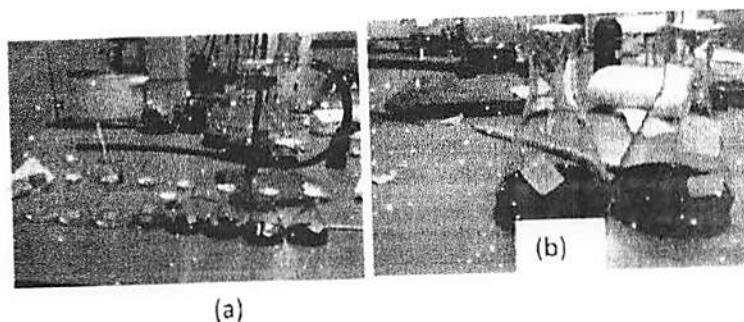
Tabel 5.11. Hasil Uji Statistik Pemberian Perlakuan Pemaparan Laser dengan Fotosensitizer dan tanpa Fotosensitizer terhadap Kematian Sel Kanker.

Kelompok Perlakuan	N	Persentase Kematian Sel		ANOVA	
		Rata-rata	SD	Signofikasi	Kesimpulan
Dosis 2,8 J/cm ²	2	16.375	2.001	0.000	Ada beda bermakna
Dosis 6,8 J/cm ²	3	23.393	0.858		
Dosis 10,8 J/cm ²	3	7.173	2.641		
Dosis 2,8 J/cm ² + FS PpIX	3	20.236	1.918	0.67*	Tidak ada beda bermakna
Dosis 6,8 J/cm ² + FS PpIX	3	25.850	16.667		
Dosis 10,8 J/cm ² + FS PpIX	3	54.576	38.717		
Dosis 2,8 J/cm ² + FS KL a	3	31.085	7.2328	0.186	Tidak ada beda bermakna
Dosis 6,8 J/cm ² + FS KL a	3	37.266	7.8389		
Dosis 10,8 J/cm ² + FS KL a	3	47.593	12.7972		

Kelompok Perlakuan		Uji Post Hoc	
		Sig.	Kesimpulan
Dosis 2,8 J/cm ²	Dosis 6,8 J/cm ²	0,026	Ada perbedaan antar perlakuan Dosis 2,8 J/cm ² dan Dosis 6,8 J/cm ²
	Dosis 10,8 J/cm ²	0,009	Ada perbedaan antar perlakuan Dosis 2,8 J/cm ² dan Dosis 10,8 J/cm ²
Dosis 6,8 J/cm ²	Dosis 2,8 J/cm ²	0,026	Ada perbedaan antar perlakuan Dosis 6,8 J/cm ² dan Dosis 2,8 J/cm ²
	Dosis 10,8 J/cm ²	0,000	Ada perbedaan antar perlakuan Dosis 6,8 J/cm ² dan Dosis 10,8 J/cm ²
Dosis 10,8 J/cm ²	Dosis 2,8 J/cm ²	0,009	Ada perbedaan antar perlakuan Dosis 10,8 J/cm ² dan Dosis 2,8 J/cm ²
	Dosis 6,8 J/cm ²	0,000	Ada perbedaan antar perlakuan Dosis 6,8 J/cm ² dan Dosis 10,8 J/cm ²

5.5. Isolasi Klorofil a dan Karakterisasi Fotosensitizer Klorofil a serta *Protoporphyrin IX* (PpIX)

Isolasi klorofil a diawali dengan mengeringkan daun yang sudah di potong kecil- kecil di udara terbuka, lalu dilakukan maserasi, kemudian di partisi. Selanjutnya dilakukan proses kromatografi cair vakum, dari hasil kromatografi cair vakum diperoleh delapan fraksi ekstrak daun sirsak. Fraksi yang berwarna hijau biru merupakan klorofil (Budiyanto, 2008). Delapan fraksi yang diperoleh dan fraksi klorofil disajikan pada Gambar 5.8



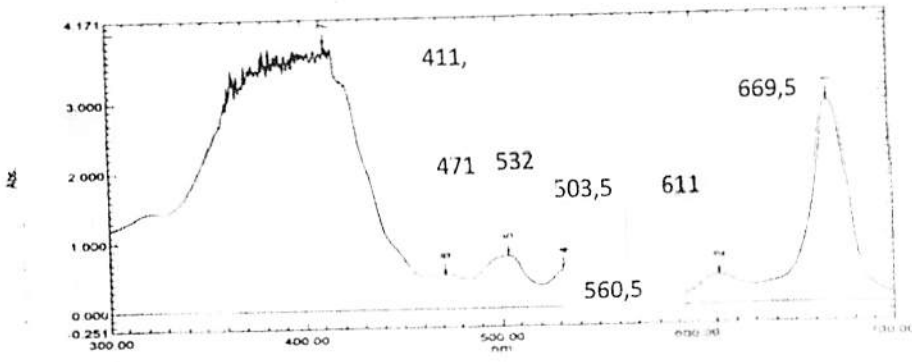
Gambar 5.8. (a) delapan fraksi yang diperoleh dari proses kromatografi cair vakum (b) fraksi klorofil a

5.6. Karakterisasi Fotosensitizer Klorofil a

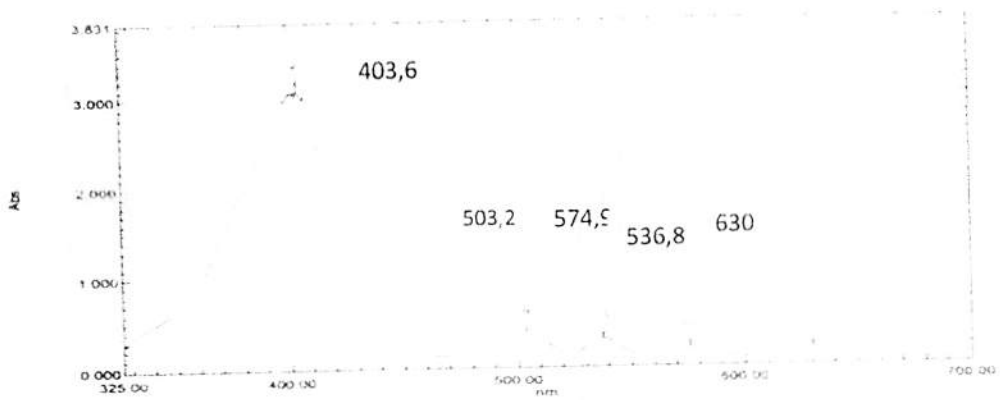
Konsentrasi larutan klorofil sebesar 0,28 mM dilakukan uji absorbansi dengan spektrofotometer UV Vis. Hasil uji absorbansi disajikan pada Gambar 5.8. Menurut (Milenkovic *et al* 2012) klorofil a merupakan turunan porfirin yang memiliki dua puncak maksimum pada daerah visibel yakni pada merah (Q band) dan biru (B band).

5.7. Karakterisasi Fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX)

Konsentrasi larutan *Protoporphyrin IX* (PpIX) sebesar 0,18 Mm dilakukan uji absorbansi dengan spektrofotometer UV Vis. Hasil uji spektrum fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) disajikan pada Gambar 5.9 Menurut Scolaro *et al* (2002) *Protoporphyrin IX* (PpIX) memiliki puncak tertinggi pada 408 nm dengan diikuti empat puncak rendah yakni pada 506, 542, 577, dan 630 nm. Perbedaan serapan fotosensitizer ini dapat disebabkan karena sensitivitas setiap alat berbeda-beda.

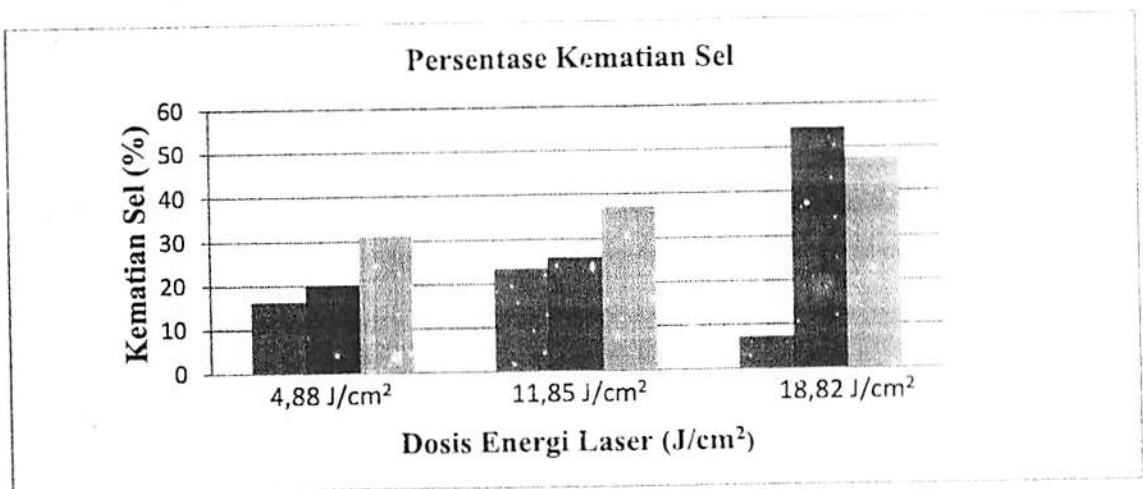


Gambar 5.9. Absorbansi Klorofil a melalui spektrofotometer UV Vis



Gambar 5.10. Absorbansi *Protoporphyrin IX* (PPIX) melalui spektrofotometer UV-Vis

Berdasarkan Gambar 5.11 menunjukkan bahwa dosis optimum laser dengan penambahan fotosensitizer yakni pada 18,82 (J/cm²) dengan persentase kematian sel yang paling tinggi.

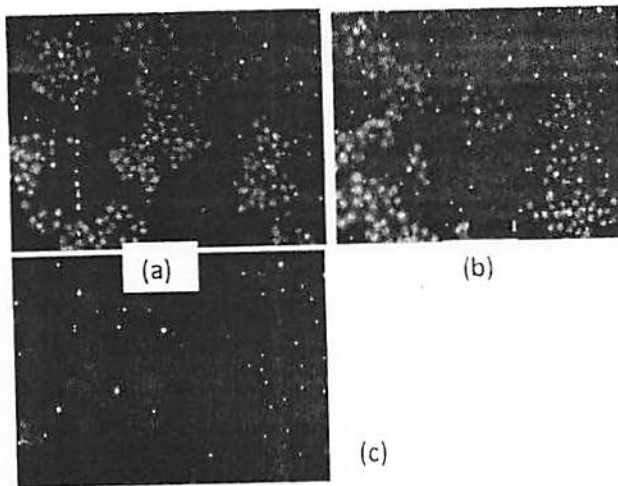


Gambar 5.11. Persentase Kematian Sel akibat perlakuan paparan Laser, : paparan Laser + fotosensitizer *Protoporphyrin IX*, (PpIX) : paparan Laser + fotosensitizer Klorofil a

5.8. Pengamatan Jumlah Sel Apoptosis pada Terapi Fotodinamik Laser Merah

Pengamatan jumlah sel yang mengalami apoptosis dilakukan pada dosis $18,82 \text{ J/cm}^2$ dengan menggunakan mikroskop fluoresensi. Menurut Briggs *et al.* (2005) Ketika Akridin Orange (AO) berikatan dengan ssDNA (*Single Strain DNA*) sel akan berwarna oranye akan tetapi ketika Akridin Orange (AO) berikatan dengan dsDNA (*Double Strain DNA*) sel akan berwarna hijau.

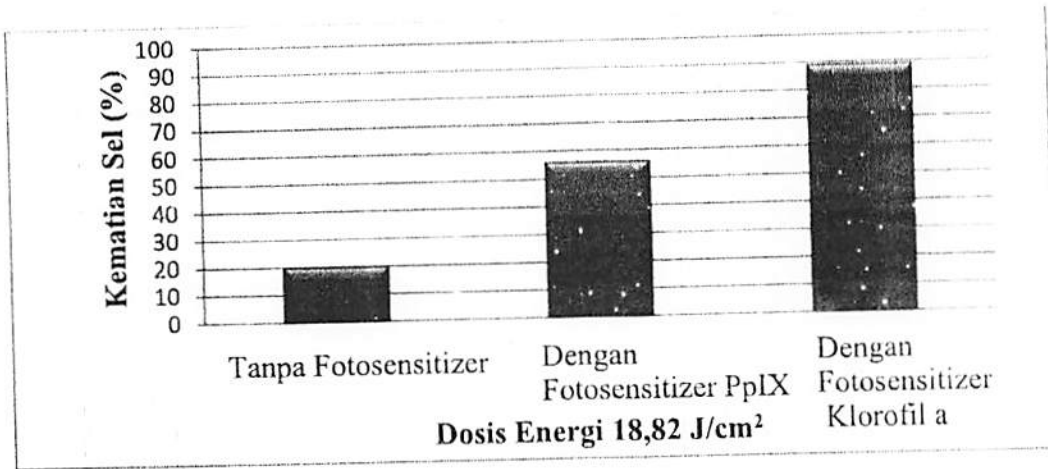
Gambar sel yang apoptosis disajikan pada Gambar 8 . Grafik persentase kematian sel apoptosis disajikan pada Gambar 9.



Gambar 5.12 Sel MCF setelah dipapari dosis energi laser $18,82 \text{ J/cm}^2$ (a : tanpa fotosensitizer, b: dengan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX), c: dengan fotosensitizer Klorofil a)

Berdasarkan Gambar 5.13. dapat diketahui bahwa pemberian fotosensitizer Klorofil a lebih efektif meningkatkan kematian sel apoptosis dibandingkan *Protoporphyrin IX* (PpIX). Hal ini disebabkan karena, Klorofil a memiliki beberapa puncak serapan pada panjang gelombang laser merah dan memiliki nilai absorbansi yang lebih besar dibandingkan *Protoporphyrin IX*. Ketika fotosensitizer menghasilkan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), maka *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) akan membunuh sel kanker melalui kerusakan sel DNA dari sel kanker tersebut. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang dihasilkan

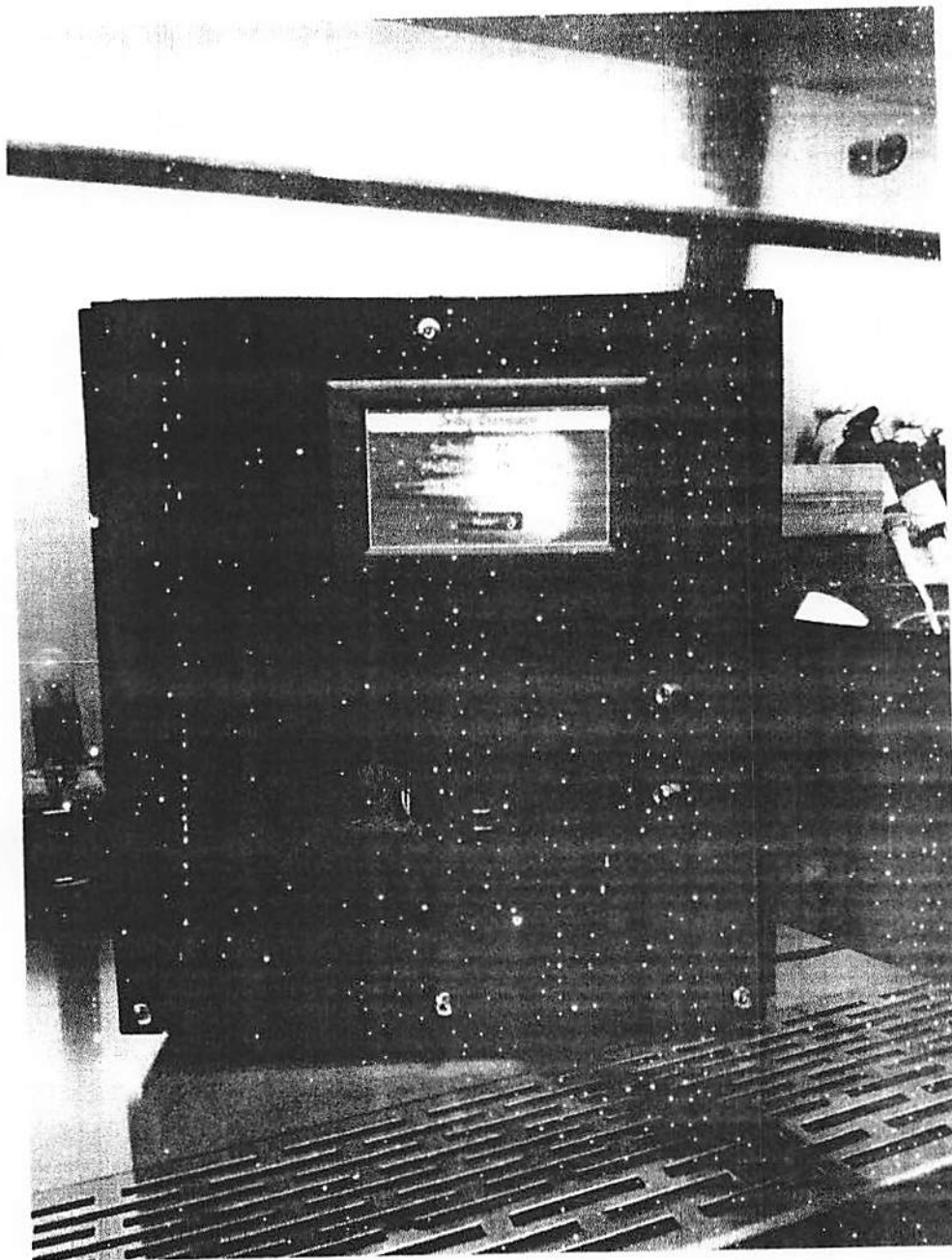
akan sangat mudah berikatan dengan basa DNA dari sel kanker sehingga struktur kimia basa DNA sel kanker akan berubah (Wiseman *et al*, 1996).



Gambar 5.13. Grafik Persentase Kematian Sel Apoptosis

5.9. OUTPUT ALAT YANG DIHASILKAN

Alat utama yang dihasilkan disajikan pada Gambar .. yaitu alat inaktivasi sel kanker portable.



Gambar 5.9. Alat yang dihasilkan di tahun ketiga yang akan dipatenkan sederhana (draft paten tersaji di lampiran)

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis dapat disimpulkan bahwa alat portabel yang dihasilkan dapat digunakan untuk inaktivasi sel kanker. Diperoleh daya optimum laser sebesar $(10,44 \pm 0,67)$ mW pada jarak 2,5 cm dari sampel dengan luasan berkas laser sebesar $0,63607 \text{ cm}^2$. Hasil uji spektrofotometer di dapatkan hasil isolasi klorofil a yang sesuai dengan referensi yakni memiliki serapan pada panjang gelombang merah. Berdasarkan hasil uji toksisitas, dosis aman pemberian fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) adalah pada konsentrasi 0,18 mM sebanyak 1,2 μL dan dosis aman klorofil a sebagai fotosensitizer sebanyak 12 μL . Pengaruh pemberian paparan dosis energi laser merah terhadap kematian sel optimum pada dosis $18,82 \text{ J/cm}^2$ dimana terjadi kematian sel tanpa penambahan fotosensitizer sebesar 7,17 %, dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) sebesar 54,58 % dan dengan penambahan fotosensitizer Klorofil a sebesar 47,6 % , Presentase kematian sel yang apoptosis pada dosis energi laser $18,82 \text{ J/cm}^2$ dengan penambahan fotosensitizer *Protoporphyrin IX* (PpIX) yaitu 47 % dan penambahan fotosensitizer Klorofil a yaitu 84%.

7.2. Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan ke arah hilirisasi riset untuk jenis penyakit lain yang dapat dilakukan secara in vivo misal : wound healling, terapi vitiligo.



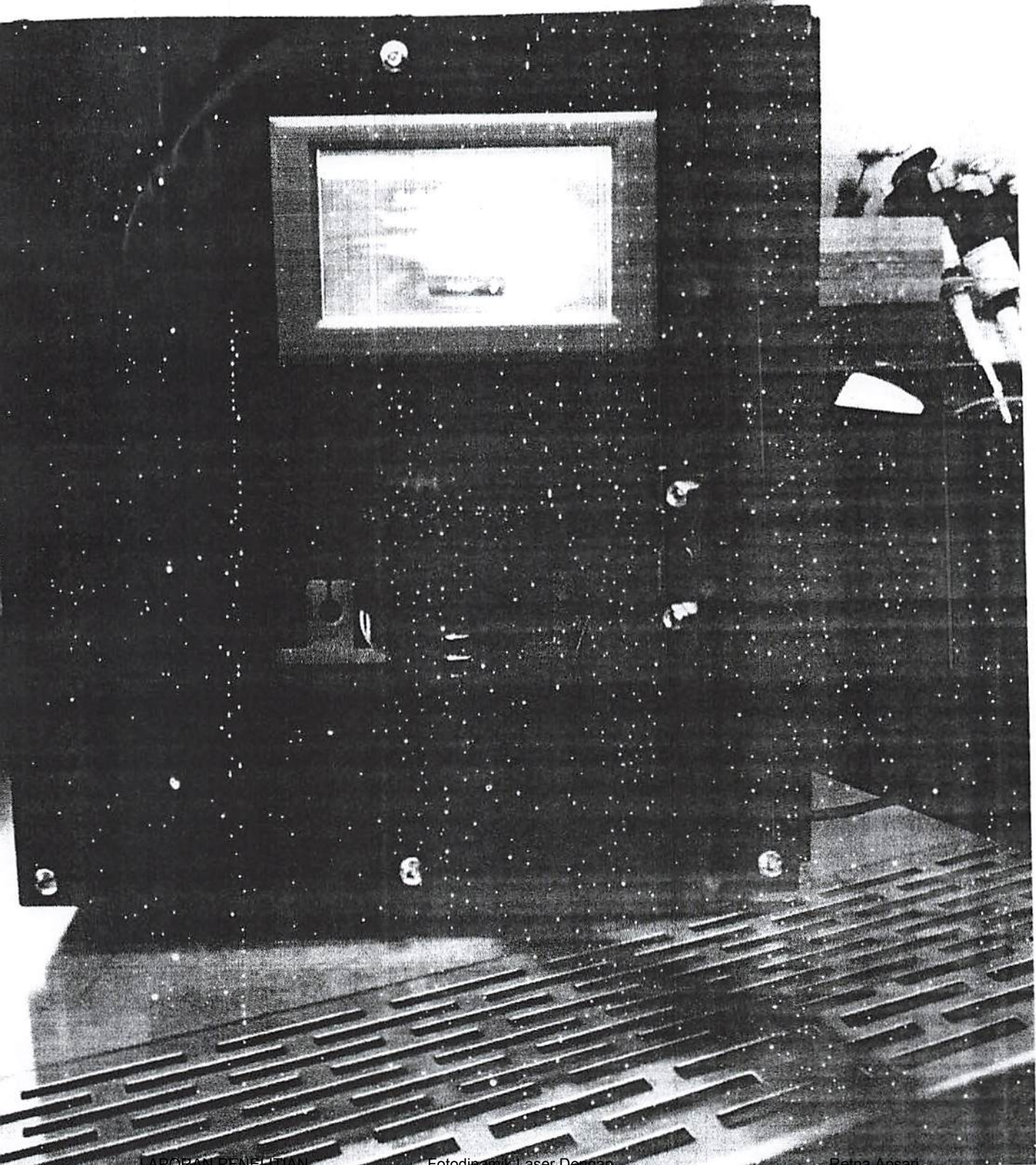
DAFTAR PUSTAKA

- Al-Khafazi, Ahmed S., Al-Shamery, Ahmed M.H., Subhi, Firas. 2010. *Photodynamic Action of Low Power He-Ne Laser on Photosensitized Human Hep-2 and AMN3 Cell Lines with Hematoporphyrin Derivative In Vitro. Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics.*
- Apantaku, L.M., 2002, *Breast Conseving Surgery for Breast Cancer, Am,Fam, Physician* 66(12):2271-2278
- Akimoto, Makio. 2010. *Photodynamic Therapy in The Dermathology Field and Enchanched Cutaneus Absorbsion of Photosensitizer. PIERS ONLINE. Vol 6.No.8*
- Apsari, R.. 2009. Sistem Fuzzy Berbasis Laser *Speckle Imaging* Untuk Deteksi Kualitas Enamel Gigi Akibat Paparan Laser Nd:YAG. Disertasi. Surabaya. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Apsari, Aminatun, Noriah Bidin, Suhariningsih, Sri Hartati, Anita Yuliaty, M.Yasin, SW. Harun. 2011. *Effect of Q-switched pulses exposure on morphology, hydroxyapatite composition, and microhardness properties of human enamel. Journal of Laser Application* Vol. 23 No.3 , Agustus 2011. ISSN : 1042-346x
- Apsari, I. Maghifroh, H. Setyawati, Winarno, D. Arifianto, A. Zaidan. 2017. The Dosage Optimazion of Red He-Ne Laser Energy as The Candidate For Photodynamic Theraphy of Cancer Cells With Exogenous Photozenitizer Variations.: *Journal of Physics: Conf. Series* 853 (2017) 012034
- Brandis, A. S., Salomon, Y., and A. Scherz, Grimm, J. Porra, W. Rudiger, and H. Scheer, (Eds.). 2006. *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls, Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications, Advances in Photosynthesis and Respiration.* Springer, Dordrecht, 485-494.
- Cao, Jie, Tong Sun, and Kenneth T.V. Grattan. 2014. *Gold Nanorods-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review.* UK.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. 2005. *Mechanism in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death.* *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2:1-23
- Csele, Mark. 2004. *Fundamental of Light Sources and Lasers.* New Jersey. John Willey and Sons, Inc.
- Doyle, A, dan Griffiths, JB. 2000. *Cell and Tissue Culture For Medical Research.* New York: John Wiley and Sons Ltd.
- Fresheny, RI . 1986. *Culture of Animal Cells 5th Edition.* John Wiley & Sons inc.
- Gibbs, J.B., 2000. *Mechanism Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research, Science,* 287.
- Ibrahim, Tarek., Mahmoud N.El Rouby., El-Sayed A.M. Al-Sherbini., Amr H.El Noury., and Mona E. Morsy. 2015. Photodecomposition, Photomutagenicity and Photocytotoxicity Of retinyl Palmitate under He-Ne Laser Photoirradiation and Its

Effectson Photodynamic Therapy of Cancer Cells in Vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*

- Liu, Yun, Ma, Xing Q., Jin, Peng, Li, Hua T., Zhang, Rong R., Ren, Xiao L., Wang, Hong B., Tang, Damu, and Tian, Wen R. 2011. *Apoptosis Induced by Hematoporphyrin Monomethyl Ether Combined with He-Ne Laser Irradiation In Vitro on Canine Breast Cancer Cells. The Veterinary Journal* 188 (2011): 325-330
- Milenkovic Sanja M, Jelena B.Zvezdanovic, Tatjana D. Anđelkovic, Dejan Z. Markovic. 2012. The Identification of Chlorophyll and its Derivatives in the Pigment Mixture: HPLC-Chromatography, Visible and Mass Spectroscopy Studies
- Niemz, Markolf H. 2007. *Laser-Tissue Interaction Fundamentals and Application, Third Enlarged Edition*. Penerbit Springerlink.
- Oleinick, Nancy L. 2011. *Basic Photosensitization*. Department of Radiation Oncology Case Western Reserve University School of Medicine. Cleveland. Ohio.
- Scolaro, Luigi Monsu. 2002. *Aggregation Behavior of Protoporphyrin IX in Aqueous Solutions: Clear Evidence of Vesicle Formation*. Dipartimento di Fisica, Università Pisa: Italy
- Sun, Xinghua, Guandong Zhang, Robert .S Keynton, Martin G, Dhruvinkumer Patel, Andre M Gobin. 2013. *Enhanced Drug Delivery Via Hypertemal Membrane Distruption Using Targeted Gold Nanoparticles With Peglated Protein-G As A Cofactor*. *Nanomedjournal* Vol 9 (1214-1222) : Departemen of Bioengineering University of Louisville USA
- Yoon, Il, Jia Zhu Li dan Young Key Shim. 2013. *Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy*. PDT Research Institute, Inje University School of Nano System Engineering, Gimhae, Korea
- Zanki, Janine Loiz. 2012. *Introduction to Flowcytometry*. Departement Biozentrum

MIEIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



OUTPUT LUARAN BERISI PUBLIKASI DI MEDIA MASA

Berita dimuat di Jawa Pos



<https://ristekdikti.go.id/info-ipitek-dikti/delegasi-unair-ambil-bagian-dalam-photonics-for-medical-diagnostics-workshop-di-aston-university-birmingham/>

<http://news.unair.ac.id/2018/09/18/unair-studi-banding-perpustakaan-di-birmingham-dan-oxford-sambil-napak-tilas-sejarah-ilmu-fisika/>

<http://news.unair.ac.id/2018/09/19/kerjasama-penelitian-newton-fund-aston-university-dengan-unair-bidang-fotonika-dan-biofotonika/>

AIPT
Astro Institute of Photonics Technology

PHOTONICS *for* MEDICAL DIAGNOSTICS

Certificate of attendance

This certificate is awarded to **PROF RETNA APSARI** for attending *Photonics for Medical Diagnostics Workshop* organised by Aston University on September, 7-8, 2018, and giving presentation entitled "*In vitro cancer cells inactivation using gold nano roads mediated photo thermal effect*".

Dr Maria Chernysheva
Chair, Engineer for Development
Research Fellow



ROYAL
ACADEMY OF
ENGINEERING

2018. YEAR OF ENGINEERING



Global Challenges Research Fund



Application of low-level red laser as photodynamic therapy to treat cancer cells with exogenous photosensitizer variation

Retna Apsari^{1*}, Nur Ro'yul Fadilla¹, Harsasi Setyawati²

¹ Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Indonesia

² Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Indonesia

Email: retna-a@fst.unair.ac.id

This research was conducted to optimize the exposure energy of red diode laser dose at 635 nm as photodynamic therapy to treat breast cancer cell line MCF-7 with variation exogenous photosensitizer. The photosensitizer was used were protoporphyrin IX (PpIX) synthetic and chlorophyll A isolated from *soursop* leaves. The IC_{50} from the results of toxicity assay i.e. 0.18 mM for protoporphyrin IX and 0.28 mM for chlorophyll A. The sample was exposed to the laser from a distance of 2.5 cm. The range of energy dose was 4.88 / cm^2 -18.82 J / cm^2 . The exposure of laser with the protoporphyrin IX (PpIX) shown the percentage of death cell 54.58% and chlorophyll A shown the percentage of death cell 47.6%. At the energy dose of 18.82 J / cm^2 , the apoptotic death cell was 47% using protoporphyrin IX (PpIX) photosensitizer and 84% using chlorophyll A photosensitizer. Based on these results, we concluded that the dose of 18.82 J / cm^2 of red laser were able to induce death cell by apoptosis.

Keywords: *apoptosis, chlorophyll A, protoporphyrin IX (PpIX), laser diodes, cancer cells MCF-7*

1 Introduction

Cancer is the main disease that cause human mortality. Based on World health Organization in 2010, every year, the number of cancer deaths reaches 13 percent (7.4 million) of all deaths (Syarifuddin, 2009). As the development of technology, the better treatment for cancer is needed, in particular for non-invasive treatment without damaging the normal surrounding tissues. One of these cancer treatment is through photodynamic therapy (Akimoto, 2010). Photodynamic therapy has two important devices: the photosensitizer and the light source.

Protoporphyrin IX (PpIX) and chlorophyll photosensitizers have an almost similar chemical group which has a chromophore group and an auxochrome group with a CH_3 side chain. Chlorophyll has a Magnesium (Mg) core compound on their chromophore group. Chlorophyll can absorb light with a wavelength between 400 to

700 nm, especially red and blue light (Suyitno, 2008). In photodynamic therapy, the process that occurs is such that the photosensitized portion will localize itself onto the cancerous tissue and a laser is then focused on the lesion, forming a reactive oxygen species (ROS). This ROS then induces apoptotic death. Apoptosis is a programmed and organized death, so in pathology only apoptosis death is acceptable (Rode, 2008).

He-Ne laser (red) with an energy dose of 2.8 J / cm^2 and HMME (Hematoporphyrin Mono-Methyl Ether) photosensitizer is capable of inducing apoptosis of cancer cells according to Liu et al (2011). The other research was conducted by Karsunawati (2014), using a protoporphyrin IX (PpIX) and chlorophyll as photosensitizers with red laser radiation at wavelength of 650 nm. But, this research shown the weakness in the lack of study for the laser interaction effects against cells comprehensively. The deficiencies found in this study can be optimized by studying laser characterization in depth.

2 Experimental

2.1 Materials

The materials used were protoporphyrin IX (PpIX), soursop leaves, methanol, n-hexane, acetone, ethyl acetate, chloroform, silica gel 60, MCF-7 breast cancer cell in DMEM media, Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, Penicillin-Streptomycin 1%, fungison 0.5%, tetrazolium salt, reagent stopper sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% in chloride acid 0.01N

2.2 Tools

The tools were used in this study diodes laser (red) with the specifications of wavelength at 635 nm, continuous wave (CW) output pulse, output power 20 mW, Newport digital power meter 20 mW, digital thermometer, monochromator, microcontroller set, rotary evaporator, separating funnel, vacuum pump, a set of column chromatography, micropipette, tissue culture flasks, centrifuges, incubators (Nuair), 96-well plate (Nunc) ELISA reader (SLT 340 ATC), laminar air flow (Nuair), ELISA Reader, fluorescence microscope, spectrophotometer UV-VIS.

2.3 Laser Characterization

The laser characterization that were done were laser power, laser beam area, laser stability and laser wavelength and laser temperature. Laser power was characterized using a digital power meter. Laser measurements were done by distance. Laser light

that serves as sensing element. The optical detector was connected through a digital power meter which will display the emitted laser energy value. The diode area of the diode is sensitive to good distances and beams are elliptical. Laser beam area was characterized using the equation of Sun in 2012. Laser stability was characterized by a digital power meter and is performed on time. The laser was placed at a distance where the laser was optimized and reads its power every 15 minutes. The laser stability measurements were made during the time of exposure given to the sample. Laser wavelength characterization was performed using a monochromator. The laser file was directed to a monochromator detector connected to a digital power meter. The regulator on the monochromator was rotated from a wavelength of 600 - 700 nm with a multiple of every 5 nm. Laser temperature characterization was done with a digital thermometer. The laser light was held close to the detector and then records the temperature every 5 minutes.

2.4 Isolation of chlorophyll A

Small sliced soursop leaves are dried and macerated with methanol for 5 days, the methanol extract was filtered and evaporated using rotary evaporator to obtain methanol thickened extract. Subsequently the extract was partitioned using n hexane with a 1: 6 solvent ratio. The hexane n-hexane extract was subsequently evaporated and subsequently separated by a vacuum liquid chromatography method using eluent n-hexane-acetone. Furthermore the viscous extract was applied to Merck 7733 Gel G 60 silica and eluted every 40 mL by raising a 100% n-hexane nitrate gradient to an n-hexane : acetone ratio 8: 2.

2.5 Toxicity assay of photosensitizer

Toxicity assay were tested on MCF-7 cancer cells. Cancer cells as much as 100 μ L has been filled into 96 well plates is added photosensitizer at a certain concentration variation. The cell controls in this study contain only cells and mediums. The treated cells were incubated for 24 hours at 37 °C with a flow of CO₂ 5% in the incubator. After 24 hours the well was cleaned and each well was added 10 MTT 5 μ g/ml in DMEM medium and incubated for 3-4 hours and given stop solution and incubated for 24 hours. Live cell measurements were made using ELISA reader with a wavelength of 550 nm.

2.6 MTT assay

Cells to be tested on the MTT assay method consisted of 3 groups: the first group given laser exposure alone, the second group was given protoporphyrin IX and laser exposure, and the third group was given chlorophyll A and laser exposure. Laser dose used was 4.88 to 18.82 J/cm². Further population of dead cells due to laser exposure was tested on MTT. The treated cells into the well were added 10 in DMEM medium then incubated for 3-4 hours. Subsequently added stop solution and incubated again for 24 hours in the incubator. Population checking using ELISA reader.

3 Results and Discussion

3.1 Characterization of Red Laser Diode

The first characterization has been done was laser power characterization. This characterization is used to determine the optimal laser intensity by using a digital power meter. The optimum power of (10.44 ± 0.67) mW was obtained at a distance of 2.5 cm. The second characterization was the extent of the laser beam. The intensity of the laser diode output beam was very dependent on the distance, so the intensity of the beam's diameter was represented on the x-axis and the y axis represented the distance function (z) and was formulated in equations 1 through 6 (Sun, 2012).

$$d_x(z) = d_{x0} \left[1 + \left(\frac{M^2_x}{\pi d_{x0}^2} \right)^2 z^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

$$d_y(z) = d_{y0} \left[1 + \left(\frac{M^2_y}{\pi d_{y0}^2} \right)^2 z^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

$$Z_{Rx} = \frac{4\lambda}{\pi d_{x0}^2} \quad (3)$$

$$Z_{Ry} = \frac{4\lambda}{\pi d_{y0}^2} \quad (4)$$

$$d_{x0} = \frac{2M^2_x \lambda}{\pi \theta_x} \quad (5)$$

$$d_{y0} = \frac{eM^2\lambda}{\pi\theta_y} \quad (6)$$

By knowing the laser beam (e) ellipticity as 6, a factor for Gaussian distribution of laser diode (M2) as 1.2 and θ_x laser divergence angle as 0.1 mrad and θ_y is 0.5 mrad, the area of the laser beam was 0.63607 cm^2 .

The third laser characterization was the stability of laser power against time. The variation time used was the same as long exposure on cancer cells. Laser output power was unstable. This power instability occurs because the type of laser used was a laser diode with less stable characteristics. The fourth laser characterization was the wavelength characterization and was determined by using a monochromator. Figure 1 shows the relationship between wavelengths and power.

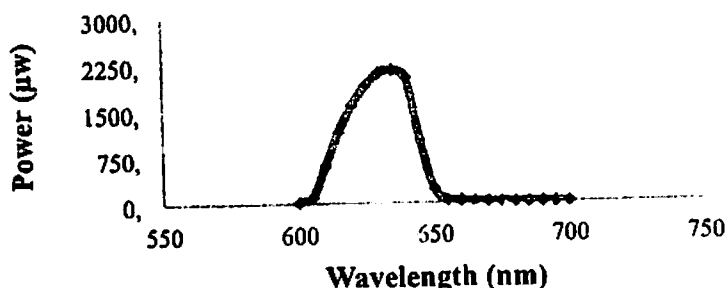


Fig. 1 The relationship between the wavelengths and power

The graphic shows that a long laser wave peaks in the range of 610 nm-650 nm. The final laser characterization was laser temperature measurement. The laser temperature was measured using a digital thermometer. Results of the laser temperature measurement showed no change in temperature (stable) which was equal to 32°C .

3.2 Characterization of Isolation of Chlorophyll A and Protoporphyrin IX (PpIX) Photosensitizers

The isolation process of chlorophyll A began with the drying of leaves that had been cut into small pieces in the open air, maceration and then partition. The crude extract was separate using vacuum liquid chromatography to obtain eight fractions of sours leaf extracts. The blue-green fraction is chlorophyll (Budiyanto, 2008). The eight fractions obtained and the chlorophyll fractions are presented in Figure 2.



Fig. 2 (a) Eight fractions obtained from the of vacuum liquid chromatography process (b) the fraction of chlorophyll A

3.3 Characterization of Chlorophyll A Photosensitizer

A wavelength characterization was conducted on 0.28 mM of chlorophyll A solution using UV-Vis spectrophotometer. The results are presented in Figure 3. According to Milenkovic et al 2012, chlorophyll is a porphyrin derivative with two maximum peaks in the visible red (Q band) and blue (B band) region.

3.4 Characterization of Protoporphyrin IX (PpIX) Photosensitizer

An absorbance test was conducted on 0.18 Mm of protoporphyrin IX (PpIX) concentration solution using UV Vis spectrophotometer. Protoporphyrin IX (PpIX) photosensitizer spectrum test results are presented in Figure 4. According to Scolaro et al (2002), protoporphyrin IX (PpIX) has the highest peak at 408 nm followed by four lower peaks at 506, 542, 577, and 630 nm. Differences in absorbance can occur due to the sensitivity of each device.

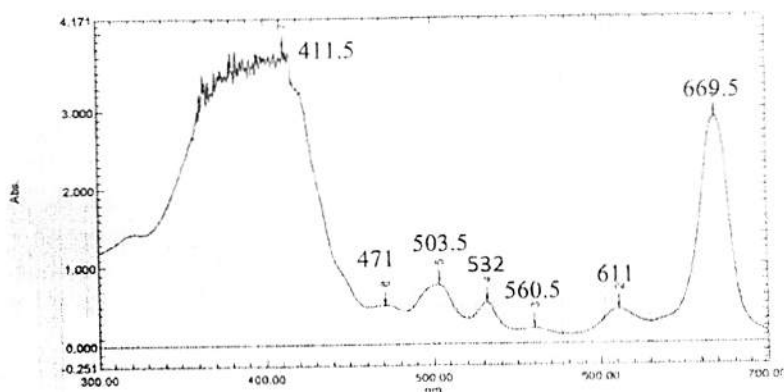


Fig. 3 Spectrum of chlorophyll A using UV-Vis spectrophotometer

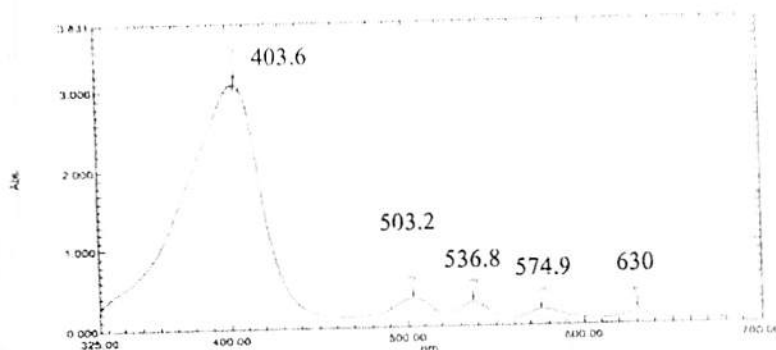


Fig. 4 Spectrum of protoporphyrin IX (PPIX) using UV-Vis spectrophotometer

3.5 Toxicity Assay of Photosensitizer

The observation of toxicity tests on protoporphyrin IX (PpIX) and chlorophyll A on MCF-7 cancer cells was performed using MTT Assay and analyze using an ELISA reader. Based on MTT assay analysis the concentration used in this research was 1.2 μL of 0.18 mM for protoporphyrin IX (PpIX) and 12 μL for chlorophyll A. This concentration was chosen because the death cell was below 50%.

3.6 The Death of MCF-7 Cancer Cells' as a Result of Exposure to Red Laser without and with Photosensitizers

The laser exposure of cancer cells was initiated by placing the laser at a distance of 2.5 cm in accordance with the optimal monochromator and appropriate laser beam characterization which corresponds to one plate 96. Laser exposure set up on cells in the laminar flow is presented in Figure 5. The cells were then exposed to an energy dose of $4.88 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$; $11.85 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$; $18.82 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$ with three repetitions for each dose.



Fig. 5 Laser exposure set up on cancer cells.

The percentage of cancer cell death due to exposure with and without photosensitizers can be calculated using the 7th equation. The percentage of cell death is presented in Figure 6.

$$\text{Death Percentage} = \frac{\text{OD Kontrol} - \text{OD Sampel}}{\text{OD Kontrol}} \times 100 \% \quad (7)$$

Figure 6 shows that the optimal dose of the laser with the addition of the photosensitizer was at 18.82 (J / cm²) resulting in the highest percentage of dead cell.

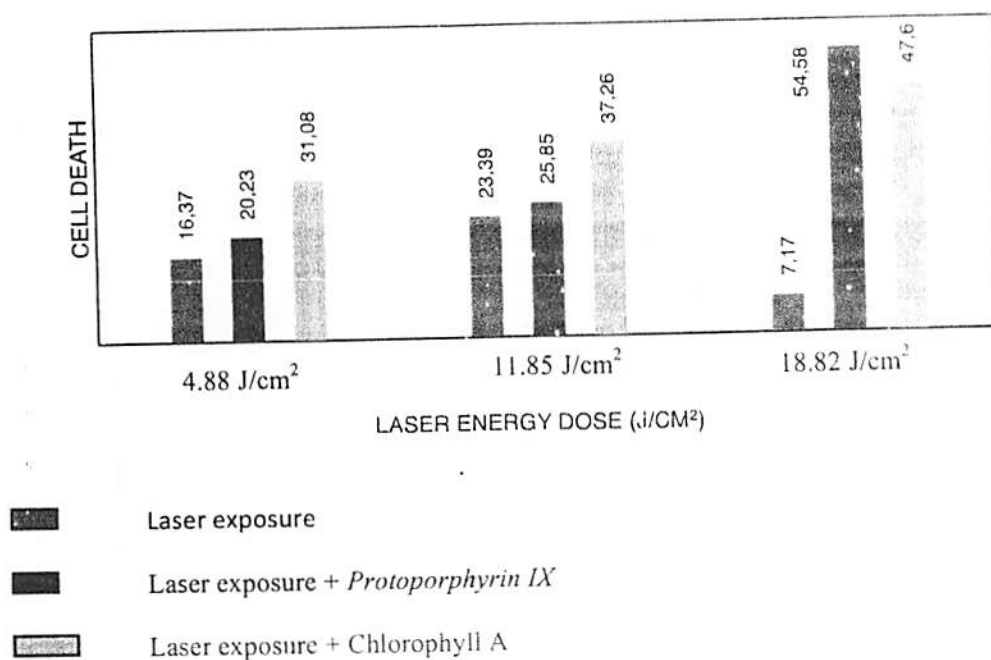


Fig. 6 Percentage of cell death due to treatment

3.7 The observations of apoptotic cell during exposure of red laser photodynamic therapy

Observations on the number of apoptotic cells was performed at a dose of 18.82 J/cm² using a fluorescent microscope. According to Briggs et al. (2005) when the acridine orange (AO) binds to ssDNA (single strain DNA) cells, it will turn orange.

But when acridine orange (AO) binds to dsDNA (double strain DNA) cells, it will turn green. The apoptotic cells are presented in Figure 7 and the percentage of apoptotic cell death is presented in Figure 8.

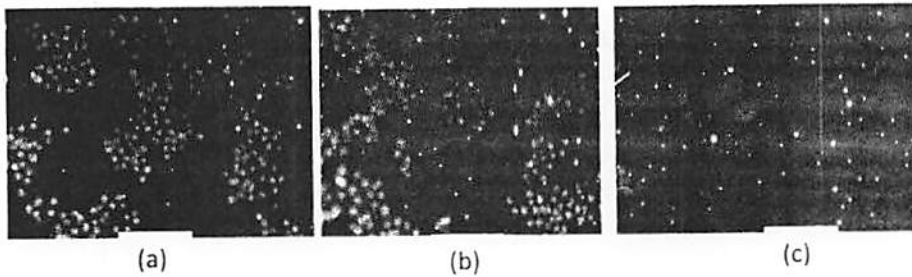


Fig. 7 MCF Cells after being exposed to a dose of 18.82 J / cm^2 laser energy (a) without photosensitizer, (b) with protoporphyrin IX (PpIX), (c) with Chlorophyll A

Figure 8 shows that the addition of Chlorophyll A photosensitizers was more effective in increasing apoptotic cell death compared to protoporphyrin IX (PpIX). This is because, Chlorophyll A has several absorption peaks at the red laser wavelength and has greater absorbance values than protoporphyrin IX. When the photosensitizers generate Reactive Oxygen Species (ROS), the Reactive Oxygen Species (ROS) will kill the cancer cells by damaging their DNA. The generated Reactive Oxygen Species (ROS) will easily bind to the DNA bases of the cancer cells, hence changing the chemical structure of the cancer cells' DNA bases (Wiseman et al, 1996).

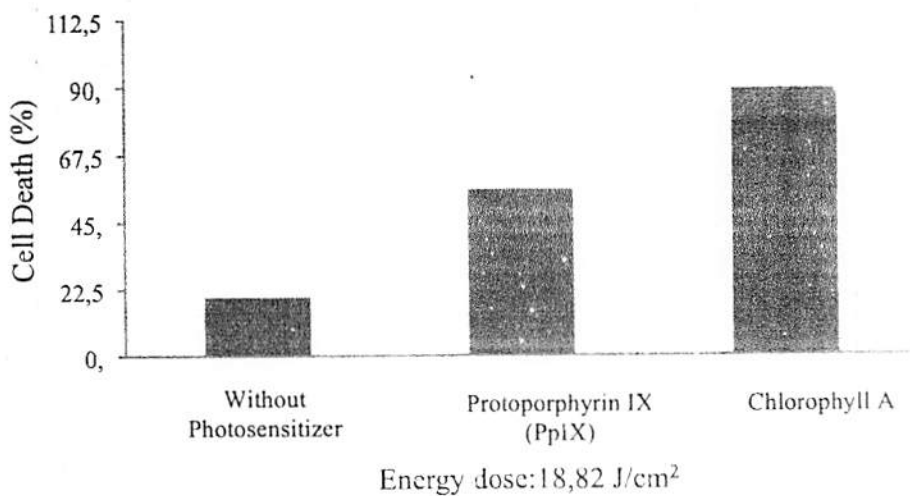


Figure 8. Percentage of apoptotic cell death

4 Conclusion

In this study, the optimum laser power was (10.44 ± 0.67) mW at a distance of 2.5 cm from the sample, with 0.63607 cm^2 of laser beam size. The wavelength characterization of isolation of chlorophyll A corresponding to reference, which was the absorption ability at red wavelength. Based on the results of toxicity assay, the safe concentration of additional protoporphyrin IX (PpIX) was 1.2 μL of 0.18 mM and 12 μL for chlorophyll A. The red laser energy dose exposure to optimum cell death was at 18.82 J / cm^2 , wherein cell death occurred without addition of photosensitizer was 7.17%; 54.58% with the addition of protoporphyrin IX (PpIX) photosensitizer; and 47.6% with the addition of Chlorophyll A photosensitizer. The apoptotic cell death using 18.82 J / cm^2 dose of laser energy was 47% for protoporphyrin IX (PpIX) photosensitizer and 84% for chlorophyll A photosensitizer.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the research grant "Hibah Kompetensi" by Ministry of Research, Technology and Higher Education (RISTEKDIKTI) and also Faculty of Science and Technology, Airlangga University Surabaya, Indonesia for support the facilities.

References

1. Akimoto, Makio, *Piers Online*. 6.No.8 (2010).
2. Apantaku, L.M., *Am, Fam, Physician* 66(12) (2002) 2271-2278.
3. Budiyanto, *Jurnal Matematika dan Sains*, 13 (2008) No.3.
4. Liu, Yun, *The Veterinary Journal* 188 (2011) 325-330
5. Milenkovic Sanja M, Jelena B.Zvezdanovic, Tatjana D. Anđelkovic & Dejan Z. Markovic. *Advanced Technology* 1(1) (2012) 16-24.
6. Rode, Hans-Jürgen, *Roche Diagnostics GmbH*, (2008)
7. Scolaro, Luigi Monsu. 2002. *Aggregation Behavior of Protoporphyrin IX in Aqueous Solutions: Clear Evidence of Vesicle Formation*. Dipartimento di Fisica, Università. Pisa: Italy.
8. Sun, Xinghua, *Nanomedjournal* Vol 9 (2012) 1214-1222
9. Wiseman Helen, Barry Halliwell. *Biochemical Journal*, 313 (1) (1996) 17-29

BUKU AJAR



**FOTODINAMIK LASER
UNTUK INAKTIVASI SEL KANKER**

**Prof. Dr. Retna Apsari, M.Si (NIDN : 0026066802)
Andi Hamim Zaidan, M.Si, Ph.D (NIDN : 0022048302)
Prof. Dr. Suhariningsih (NIDN : 0027065203)**

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN KONTRAK PENELITIAN
NOMOR: 200/UN.3.14/LT/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SEPTEMBER, 2018**

Deskripsi

PEMAPAR LASER INVITRO PORTABLE

5 Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan Produk Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro. Lebih khusus invensi ini menggunakan sistem otomatis, suhu, waktu dan jarak di atur sehingga sesuai dengan kondisi sebenarnya.

0 Latar Belakang Invensi

Uji Toksisitas berfungsi untuk mengetahui dosis aman dari penggunaan suatu zat kimia terhadap organisme uji. Uji ini dibiarkan dalam waktu 24 jam untuk mengetahui efek yang terjadi setelah pemberian dosis. Fotosensitiser dengan konsentrasi $1\mu\text{M}$ - 50 mM pada sampel, setelah dibiarkan selama 24 jam, sampel direaksikan dengan MTT dan reagen stopper kemudian serapannya dibaca dengan ELISA reader. Persentase kematian sel kemudian dihitung untuk mendapatkan dosis aman. Dosis Aman fotosensitiser adalah konsentrasi dimana persentasi kematian sel karena pengaruh dosis tersebut masih dibawah 50%.

Pengujian apoptosis diperlukan sampai dengan *Cell line* yang sudah dipanen kemudian dibagi menjadi 30 bagian dan diletakkan dalam multiwell plate. Masing-masing bagian terdiri dari 1 mm³ cell line atau untuk populasi sekitar 1×10^6 sel. Secara umum, sampel dibagi menjadi 4 kelompok besar, yaitu kelompok pertama yang diberikan paparan laser saja, kelompok dua diberikan klorofil standar (3 sampel). Kelompok ketiga diberi fotosensitiser dengan berbagai variasi.

Berdasarkan penelusuran Paten tentang produk ini *Cultured Cell And Method And Apparatus For Cell Culture* Paten No.: US 2007/0161106A1 merupakan metode culture sell yang digunakan tetapi sistemnya tidak otomatis. Sedangkan paten berikutnya

yaitu *In Vitro Photodynamic Therapy Using Non Laser Light*
No.: US 6,461,866 B1 *Apparatus and method of photodynamic
eradication of organisms utilizing pyrrolnitrin* US6623513B2

Pemeriksaan jumlah populasi kultur sel yang telah mati
akibat paparan laser dilakukan dengan uji apoptosis
menggunakan uji flowcitometer. Pelaksanaan uji apoptosis
menurut Suwito (2008) adalah sebagai berikut, kultur sel
sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam pelat kultur jaringan
didalam sumuran, diinkubasi selma 24 jam pad inkubator CO2.
Setelah itu kedalam kultur sel dimasukkan 1 mL larutan sampel
uji dan dinkubasi kembali selama 24 jam. Kultur sel yang
telah diberi sampel selanjutnya dipipet dan dimasukkan
kedalam tabung flowcytometer 48 ditambah 500 LPBS. Campuran
selanjutnya disentrifugasi (1500 rpm, 5 menit, 400C) dan
supernatannya dibuang. Pelet sel selanjutnya dicuci dengan
500 L annexin, disentrifugasi lagi (1500 rpm, 5 menit, 400C).
Supernatan dibuang, pelet dicuci kembali dengn annexin.
Kedalam pelet sel ditambahkan 5 L PI, 45 L annexin dan 5 L
FITC diinkubasi selama 30 menit. Jumlah persentase sel yang
mati dapat dihitung.

Tujuan invensi ini adalah menyediakan Produk Pemapar
Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro.
Lebih khusus invensi ini menggunakan sistem otomatis, suhu,
waktu dan jarak di atur sehingga sesuai dengan kondisi
sebenarnya.

Uraian Singkat Invensi

Invensi Produk Pemapar Laser Invitro Portable untuk
pemaparan sel secara invitro, dimana di desain menjadi satu
dengan dimensi 30 x 30 x 20 cm, kompak dan terbuat dari
stainless dan akrilik berwarna hitam untuk menjaga suhu pada
27⁰ C. sistem dapat mengatur suhu Pemaparan antara 20^o C - 30^o
C, waktu Pemaparan antara 1 detik - 10 Jam, dan jarak secara
otomatis antara 1 cm - 10 cm di lengkapi dengan layar sentuh.

dapat digunakan untuk pemaparan laser 96 well dan 24 well secara otomatis. Pemapar Laser Invitro Portable ini menggunakan laser yang dapat di ganti sesuai dengan panjang gelombang absorpsi laser yaitu 200 - 1000 nm khusus untuk laser dioda.

Uraian Lengkap Invensi

Sebagaimana yang telah dikemukakan pada latar belakang invensi bahwa Invensi ini berhubungan dengan Produk Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro, dimana alat pemapar laser portable yang di desain menjadi satu dengan dimensi 30 x 30 x 20 cm, terbuat dari stainless dan akrilik dengan warna gelap untuk menjaga kondisi suhu sesuai dengan suhu ruang, sistem kontrol dibuat dengan mengatur suhu, waktu dan jarak secara otomatis di lengkapi dengan layar sentuh, pemaparan laser 96 well dan 24 well secara otomatis, laser yang dapat di ganti sesuai dengan panjang gelombang absorpsi laser yaitu 200 - 800 nm khusus untuk laser dioda.

Toksisitas adalah pemberian suatu obat ke dalam sel atau jaringan secara invitro selama 24 jam yang bertujuan untuk melihat dosis yang aman dari obat tersebut untuk sel atau jaringan. Uji toksisitas dilakukan dengan metode uji Microtitration (MTT) yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium yang berwarna kuning dan larut dalam air menjadi kristal biru keunguan formazan yang tidak larut dalam air. Pemecahan terjadi pada mitokhondria sel yang hidup oleh enzim suksinat hidrogenase. Reaksi menggunakan MTT ini melibatkan piridin nukleotida kofktor NADH dan NADPH yang hanya di katalisis oleh sel hidup, sehingga jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk (Freshney, 1986).

Uji MTT didasarkan pada aktivitas mitokhondria, yang

diinterpretasikan sebagai tolok ukur kelangsungan hidup sel. Pada uji MTT, garam tetrazolium secara aktif diabsorpsi ke dalam sel hidup dan direduksi dalam mitokhondria di dalam sel karena tidak bisa keluar menembus membran sel. Saat penambahan DMSO, isopropanol atau solven yang cocok sehingga terbentuk dan bisa diukur dengan metode kolometri.

Hasil uji MTT assay dibaca oleh plate reader, pada penelitian ini digunakan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yang merupakan metode pengujian yang menggunakan antibodi dan perubahan warna untuk mendeteksi unsur. Uji ini memiliki keunggulan diantaranya adalah sensitivitas yang tinggi. Prinsip dasar ELISA adalah interaksi cahaya antara antigen dengan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna. Warna yang timbul dapat ditentukan secara kualitatif dengan pandangan mata atau kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi atau optical density (DO). Semakin tinggi absorbansi yang diperoleh mengindikasikan mortalitas (kematian) yang rendah. Absorbansi tersebut menggambarkan jumlah sel hidup. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, absorbansi akan semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak MTT yang diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim rediktase dalam rantai mitokhondria, sehingga formazan yang terbentuk juga semakin banyak. Absorbansi ini yang akan digunakan untuk menghitung sel hidup sebagai respon.

Gambar Teknis Pemapar Laser Invitro

Gambar 1. Peralatan Pemapar Laser Invitro Portable

alat pemapar laser portable yang di desain menjadi satu dengan dimensi 30 x 30 x 20 cm, kompak dan terbuat dari stainless dan akrilik, sistem kontrol dibuat dengan mengatur suhu, waktu dan jarak secara otomatis di lengkapi dengan layar sentuh, pemaparan laser 96 well dan 24 well secara otomatis, laser yang dapat di ganti sesuai dengan panjang gelombang absorpsi laser yaitu 200 - 800 nm khusus untuk laser dioda.

Klaim

1. Suatu Produk Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro, dengan ciri-ciri sebagai berikut:
 - a. Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro di desain menjadi satu dengan dimensi 30 x 30 x 20 cm, kompak dan terbuat dari stainless dan akrilik berwarna hitam untuk menjaga suhu pada 27^o C;
 - b. Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro dapat mengatur suhu Pemaparan antara 20^o C - 30^o C, waktu Pemaparan antara 1 detik - 10 Jam, dan jarak secara otomatis antara 1 cm - 10 cm dilengkapi dengan layar sentuh;
 - c. Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro digunakan untuk pemaparan laser 96 well dan 24 well secara otomatis;
 - d. Pemapar Laser Invitro Portable untuk pemaparan sel secara invitro menggunakan laser yang dapat di ganti sesuai dengan panjang gelombang absorpsi laser yaitu 200 - 1000 nm khusus untuk laser dioda.

Abstrak**PEMAPAR LASER INVITRO PORTABLE**

5 Invensi ini berhubungan dengan Produk Pemapar Laser Invitro
Portable untuk pemaparan sel secara invitro, dimana di desain
menjadi satu dengan dimensi 30 x 30 x 20 cm, kompak dan
terbuat dari stainless dan akrilik berwarna hitam untuk
menjaga suhu pada 27⁰ C. sistem dapat mengatur suhu Pemaparan
0 antara 20⁰ C - 30⁰ C, waktu Pemaparan antara 1 detik - 10 Jam,
dan jarak secara otomatis antara 1 cm - 10 cm di lengkapi
dengan layar sentuh. dapat digunakan untuk pemaparan laser 96
well dan 24 well secara otomatis Pemapar Laser Invitro
Portable ini menggunakan laser yang dapat di ganti sesuai
5 dengan panjang gelombang absorpsi laser yaitu 200 - 1000 nm
khusus untuk laser dioda.

