

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Beberapa tahun terakhir kemajuan mekanisme terbaru dalam bidang biofotonik telah mengarah pada pengembangan teknik terapi berbasis cahaya dalam mengendalikan dan menghambat perkembangan mikroba patogen (Pan et al., 2021). Mikroba patogen dapat menyerang kekebalan tubuh, jika seseorang terserang organisme patogen atau mikroba toksin dapat menyebabkan perubahan patologis dan klinis sehingga terjadi infeksi tubuh, dengan mengaktifkan kerja limfosit dan Antibodi. Mekanisme pertahanan tubuh (*host defencemechanism*) menentukan jalannya respon Infeksi antara patogen dan tubuh manusia sebagai inang virulensi dan patogenisitas (Ipin Aripin, 2019; Kassab et al., 2020).

Mikroorganisme mengkontaminasi makanan melalui air, debu, udara, tanah, dan peralatan pengolahan. Jika terkontaminasi oleh bakteri patogen maka bakteri patogen tersebut tumbuh dan berkembang biak selama penyimpanan sehingga menghasilkan racun yang berbahaya bagi tubuh manusia (Asiska Permata Dewi, 2024) Bakteri patogen juga dapat mengontaminasi peralatan rumah sakit, lingkungan yang tidak sehat, ataupun penggunaan implan. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya pemusnahan menggunakan teknik *Photodinamyc Therapi* (PDT) atau dalam konteks khusus yang terkait mikroorganisme disebut sebagai *Photodinamyc Inactivation* (PDI) sebagai pengembangan system terapi PDT yang dilakukan untuk menginaktivasi sel mikroba patogen (Wijaya et al., 2016; Kariminezhad et al., 2020)

Photodynamic Inactivation (PDI) merupakan kesatuan antar reaksi fisika dan kimia dengan 3 komponen utama Sensitizer, cahaya, dan oksigen, bertujuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Mekanisme inaktivasi fotokimia ini terjadi melalui interaksi antara foton cahaya dan molekul sensitizer, yang menghasilkan beberapa jenis *Reactive Oxygen Species* (Wijaya et al., 2016). Oksigen berperan sebagai komponen yang mampu menghambat sekaligus mematikan sel mikroba (Cieplik et al., 2018). Cahaya yang digunakan tidak terbatas pada rentang ultraviolet seperti halnya pada pengaplikasian metode disinfeksi dan juga bergantung pada panjang gelombang cahaya tampak karna pembentukan spesi oksigen reaktif (ROS) melalui transfer elektron atau transfer energi (Astuty et al., 2023; Astuty & Baktir, 2017)

Prinsip inaktivasi fotodinamik berbeda dengan pengobatan lainnya dengan menargetkan resistensi biofilm *inactivation fotodynamic* dan bergantung pada Korespondensi antara karakteristik panjang gelombang serapan maksimum Molekul PS dengan panjang gelombang cahaya sehingga terjadi proses fotosensitisasi secara maksimal. Laju penyerapan PS pada panjang gelombang tertentu dengan spektrum berupa variabel serapan, apabila energi foton cahaya yang diserap oleh molekul PS meningkat, maka Semakin banyak molekul dalam suatu zat, semakin tinggi pula tingkat serapannya (Cieplik et al., 2018)

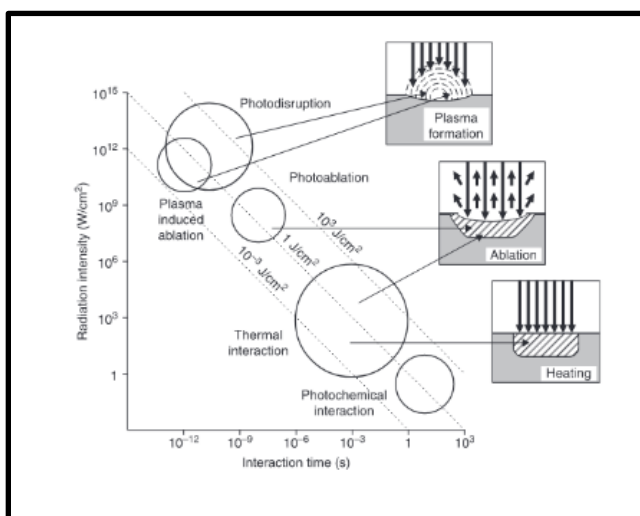
Beberapa penelitian mengenai inaktivasi fotodinamik telah dilakukan, salah satunya penggunaan laser dioda merah dengan metilen biru eksogen pada biofilm *Staphylococcus aureus* dengan dosis energi 54,80 J/cm² dan waktu pemaparan

($300 \pm 0,05$) detik berhasil mereduksi biofilm *Staphylococcus aureus* hingga 92,01% (S. D. R. F. P. and S. W. I. P. Astuti, 2020)). Pada penelitian sebelumnya juga menguji efektivitas fotodinamik inaktivasi (PDI) untuk mengurangi biofilm *Candida albicans* menggunakan klorofil daun pepaya sebagai fotosensitizer (PS) dan laser dioda sebagai sumber cahaya, Laser yang digunakan memiliki panjang gelombang 445 nm dan 650 nm dengan intensitas masing-masing $0,379 \text{ W/cm}^2$ dan $0,306 \text{ W/cm}^2$. Hasilnya, fotoinaktivasi berhasil mengurangi biofilm hingga 32% dengan klorofil dan 25% tanpa klorofil (Astuty et al., 2019)

Berdasarkan penelitian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas penerapan klorofil ekstrak daun kelor yang diaktivasi dengan laser merah dalam mengatasi biofilm *Staphylococcus aureus*.

1.2 Teori Dasar

Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) adalah perangkat yang menghasilkan atau memperkuat berkas cahaya sempit dan terfokus dengan panjang gelombang spesifik dalam spektrum elektromagnetik. Panjang gelombang di rentang spektrum ultraviolet, sinar tampak, dan inframerah paling sering dimanfaatkan untuk berbagai aplikasi komersial, termasuk dalam sektor kesehatan, laser dapat menyebabkan kerusakan jaringan melalui berbagai mekanisme, terutama ditentukan oleh intensitas radiasi W/cm^2 dan waktu paparan (Kariminezhad et al., 2020)



Gambar 1. Proses interaksi Cahaya radiasi laser dengan jaringan

Salah satu sumber cahaya adalah laser, laser dapat menyebabkan kerusakan jaringan melalui berbagai mekanisme, terutama ditentukan oleh intensitas radiasi (W/cm^2) dan waktu paparan (Kariminezhad et al., 2020). Gambar 1 menunjukkan peta logaritma lima jenis interaksi laser-jaringan. Sumbu y merupakan densitas daya atau penyinaran dalam (W/cm^2). Sumbu x menunjukkan waktu pencahayaan dalam detik (s). *Photochemical interaction* atau interaksi fotokimia terjadi pada kepadatan daya dan waktu paparan yang rendah. Interaksi fotokimia berperan dalam terapi fotodinamik yang didasarkan pada penerapan agen fotosensitif (S. Stübinger, 2020)

Thermal interaction atau Interaksi fototermal disebabkan oleh perubahan energi foton (yang diserap oleh cairan jaringan) menjadi energi panas yang muncul Photoablation atau fotoablasi didasarkan pada pengiriman energi yang cukup ke dalam jaringan untuk menghancurkan jaringan dalam waktu singkat sebelum panas ditransfer ke jaringan di sekitarnya. Plasma induced ablation atau interaksi plasma-induksi fotoablasi terjadi ketika energi laser yang tinggi digunakan untuk mengubah materi menjadi plasma dengan cepat (Jelínková, 2013; S. Stübinger, 2020)

Intensitas laser terhadap Energi penyinaran dapat dihitung menggunakan persamaan (1) dan (2) (S. D. rafika puspitasaki1, samian, wahyu intan pertiwi Astuti, 2020)

$$I_{\text{laser}} = \frac{P(W)}{A \text{ (cm}^2\text{)}} \quad (1)$$

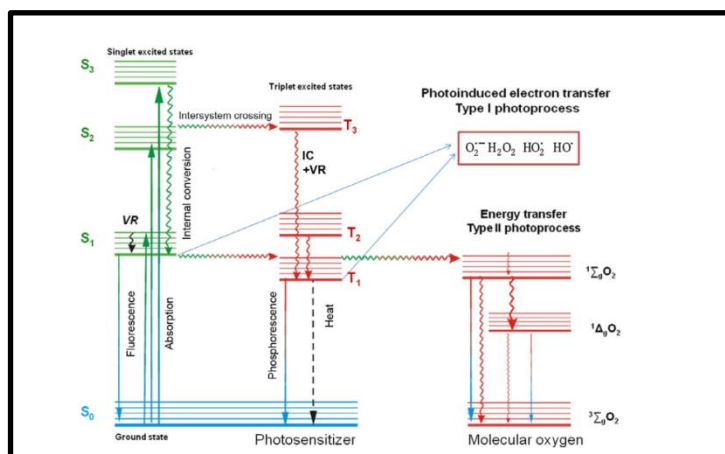
$$D = I_{\text{laser}} (\lambda) \times t \text{ (s)} \quad (2)$$

Dengan I_{serapan} = Intensitas laser (W/cm^2), P = daya keluaran laser (W), A = luas berkas cahaya laser (cm^2), D = energi penyinaran (J/cm^2), t = lama paparan (s).

Photodisruption adalah efek mekanis yang dihasilkan dari penyinaran intensitas tinggi yang menghasilkan pembentukan plasma akibat ionisasi jaringan biologis (Jelínková, 2013; S. Stübinger, 2020)

Photodynamic Inactivation (PDI)

Photodynamic Inactivation (PDI) merupakan salah satu metode in vitro Menonaktifkan mikroorganisme juga merupakan salah satu prinsipnya Sel dinonaktifkan melalui reaksi fotodinamik. Fotodinamik adalah proses fisik dan kimia yang melibatkan reaksi antara Senyawa fotosensitif tidak beracun (sensitizer), energi foton cahaya dan oksigen Menghasilkan senyawa oksigen radikal bebas di lingkungan sehingga menyebabkan Kematian sel. PDI atau inaktivasi fotodinamik adalah teknologi non-termal yang bergantung pada interaksi simultan dari fotosensitizer tidak beracun (PS), cahaya Panjang gelombang dan molekul oksigen (O_2) yang tepat untuk membunuh Patogen seperti bakteri, jamur, virus, parasit Gram positif dan Gram negatif, dan produksi spesies oksigen reaktif. Fotosensitizer dan cahaya tertentu di PDI dapat menyebabkan fotoinaktivasi melawan bakteri (parisi et., al 2023).



Gambar 2 Diagram jablonsky (Dabrowski, 2017)

Fotoinaktivasi melibatkan tiga komponen terpisah: photosensitizer (PS), aktivasi cahaya, dan molekul oksigen (Pan et al., 2021). Proses dimulai ketika Fotosensitizer terkena paparan cahaya, setelah menyerap energi foton cahaya, molekul fotosensitizer mengalami transisi dari keadaan dasar ke keadaan singlet tereksitasi melalui absorpsi elektronik yang melibatkan transisi antara tingkat energi vibrasional dan rotasional. Molekul tersebut dengan cepat mengalami relaksasi ke tingkat vibrasional terendah dari keadaan tereksitasi pertama atau *internal conversion* (IC) Pada keadaan S₁, molekul eksis selama beberapa nanodetik sebelum kembali ke keadaan dasar melalui berbagai jalur relaksasi, termasuk emisi foton yang disebut fluoresensi (F). Selain itu, molekul dapat mengalami transisi non-radiatif ke keadaan triplet tereksitasi (T₁) melalui *intersystem crossing* (ISC), yang memungkinkan terjadinya fosforesensi (Ph) atau reaksi fotokimia. Molekul dalam keadaan tereksitasi, khususnya (t₁), memiliki sifat oksidasi dan reduksi yang lebih kuat dibandingkan dalam keadaan dasar, sehingga dapat menghasilkan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS), seperti oksigen singlet, superoksida, dan radikal hidroksil, yang berperan penting dalam aplikasi terapi fotodinamik (Dąbrowski, 2017)

Fotosensitizer (PS) merupakan reagen yang menghasilkan spesies oksigen reaktif toksik melalui penyinaran cahaya dan dapat digunakan untuk menonaktifkan atau menghambat pertumbuhan sel akibat cahaya. PS alami yang paling umum digunakan adalah turunan kurkumin, riboflavin, dan klorofil (Indrawati et al., 2021). Fotosensitizer yang digunakan untuk terapi fotodinamik harus memiliki sifat khusus yang membuatnya efektif dan aman untuk digunakan, seperti puncak serapan yang kuat pada wilayah spektral merah hingga inframerah dekat, tidak beracun dalam gelap, selektivitas jaringan yang tinggi terhadap kematian sel, dan kuantum triplet yang tinggi. keluarannya cukup besar, menghasilkan produksi ROS yang baik setelah iradiasi, fotostabilitas yang tinggi dan sesuai, serta biaya produksi yang rendah (Jao et al., 2023).

I.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan karakteristik optis dan energi gap klorofil daun kelor.
2. Menganalisis fotoinaktivasi ekstrak daun kelor setelah aktivasi laser merah dalam mereduksi jumlah sel hidup pada biofilm *Staphylococcus aureus*.

I.4 Manfaat Penelitian

Menemukan efektivitas potensi ekstrak klorofil daun kelor sebagai fotosensitizer dan fotoinaktivasi pertumbuhan biofilm *Staphylococcus aureus*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Agustus 2023 bertempat di Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit (BTKLPP) Kelas I Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

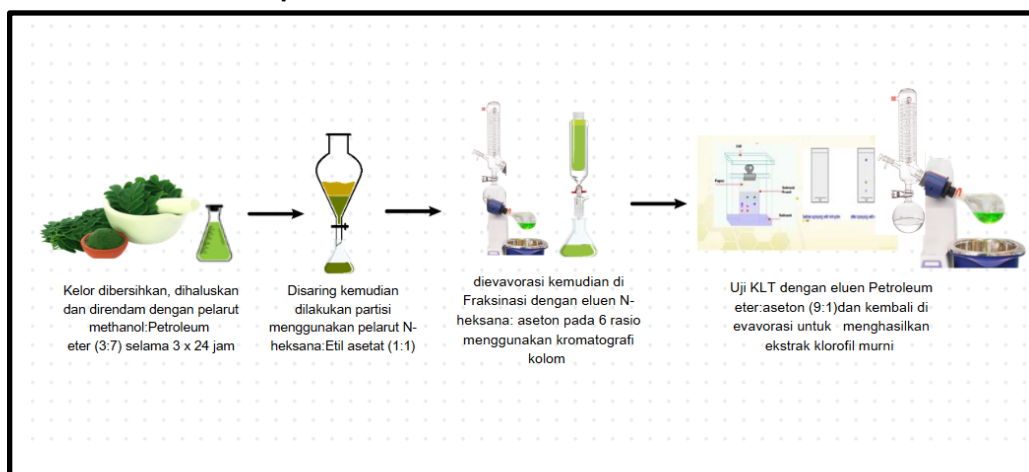
Autoklaf, gelas ukur, mikroplate 96 well, sentrifuge, luxmeter, timbangan analitik, pipet tetes, pengaduk magnet, lemari keamanan biologi, ose, tube 2 mL termometer, pusaran, tabung oksigen, cawan petri, mikropipet, tip mikropipet, tabung reaksi, gelas beaker, selang infus, dan laser merah.

2.2.2 Bahan

Daun kelor, larutan ekstraksi seperti petroleum eter, n-heksana, etil asetat, metanol, bakteri *S. aureus*, aquabides, media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B), BHI agar, garam formasan XTT, dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS).

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Pembuatan sampel ekstrak klorofil



Gambar 3 Pembuatan sampel ekstrak klorofil daun kelor

Pembuatan ekstrak klorofil melalui tiga tahap yaitu maserasi, partisi dan fraksinasi. Proses maserasi dilakukan dengan merendam daun kelor yang telah dibersihkan dan di haluskan dengan larutan ekstraksi metanol dan petroleum eter selama

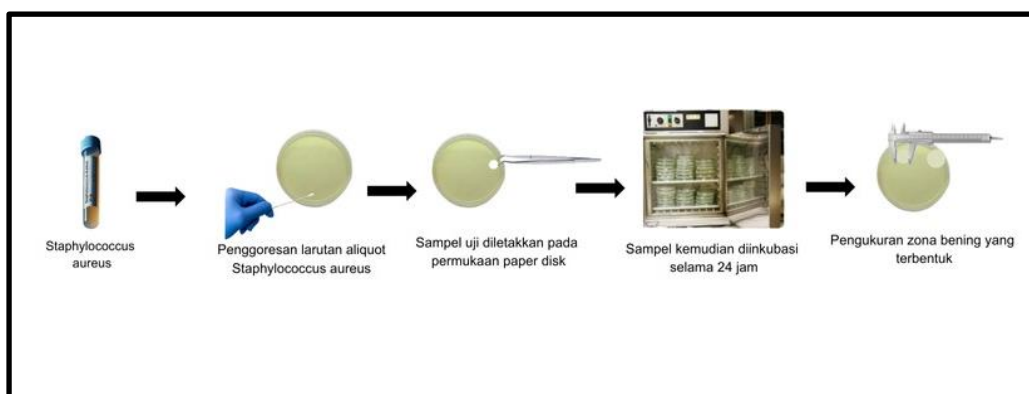
1×24 jam dalam ruangan gelap. Selanjutnya larutan sampel disaring dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental larutan sampel. Proses partisi dilakukan dengan mencampurkan ekstrak kental sampel dengan larutan ekstraksi n-heksan dan metil asetat ke dalam corong pisah sehingga akan didapatkan 2 fasa larutan ekstrak.

2.3.2 karakterisasi Laser

Karakterisasi laser dilakukan dengan menguji stabilitas daya keluaran laser diode pada panjang gelombang 650 nm, dengan rata-rata panjang gelombang yang terukur adalah 654,4 nm. proses penyinaran dilakukan selama 60 menit dan daya diamati per 10 detik untuk melihat kestabilan laser.

2.3.3 Uji UV-Vis dan Uji toksisitas metode zona bening

Uji toksisitas zona bening digunakan untuk mengukur efek toksik atau kemampuan antibakteri dari suatu senyawa terhadap mikroorganisme. Caranya dapat dilihat pada gambar 4 dibawah ini.



Gambar 4 uji toksisitas zona bening

Dalam uji Uji toksisitas juga lakukan untuk melihat sifat toksik dari ekstrak klorofil sebagai PS terhadap kematian *Staphylococcus aureus*. Proses uji toksisitas dilakukan dengan mengoleskan kultur *Staphylococcus aureus* pada media agar lalu ekstrak klorofil diaplikasikan pada permukaan agar. Media kemudian diinkubasi selama 24 jam.

2.3.4 Pembentukan biofilm dalam *microplate*

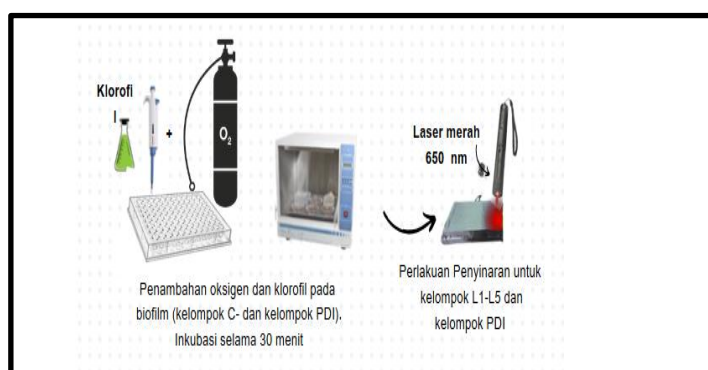
Proses pembuatan kultur *Staphylococcus Aureus* dimulai meletakkan bakteri *Staphylococcus Aureus* pada media kultur *Brain heart Infusion Broth* (BHI-B) dan menginkubasinya selama 24 jam menggunakan suhu 37°C. setelah di inkubasi maka diencerkan menggunakan menggunakan PBS steril hingga mencapai standar 0,5 McFarland yang diukur menggunakan Spektrofotometer. Kemudian tambahkan media kultur BHI-B 8% glukosa untuk diinkubasi selama 48 jam hingga menjadi biofilm *Staphylococcus Aureus* yang siap digunakan untuk perlakuan.

2.3.5 Perlakuan terapi fotodinamik dan Uji Viabilitas

Perlakuan Terapi Fotodinamik digunakan untuk mengobati infeksi dengan memanfaatkan senyawa fotosensitizer yang diaktifkan oleh cahaya, yang dapat membunuh mikroorganisme untuk mengevaluasi efektivitas terapi, dan untuk uji viabilitas tujuannya adalah untuk mengukur kelangsungan hidup sel setelah perlakuan, yang berguna untuk menilai sejauh mana terapi berhasil membunuh sel atau mikroorganisme target. Berikut proses perlakuan fotodinamik inaktivasi *S. aureus* menggunakan laser merah

Tabel 1 Kelompok perlakuan Fotoinaktivasi

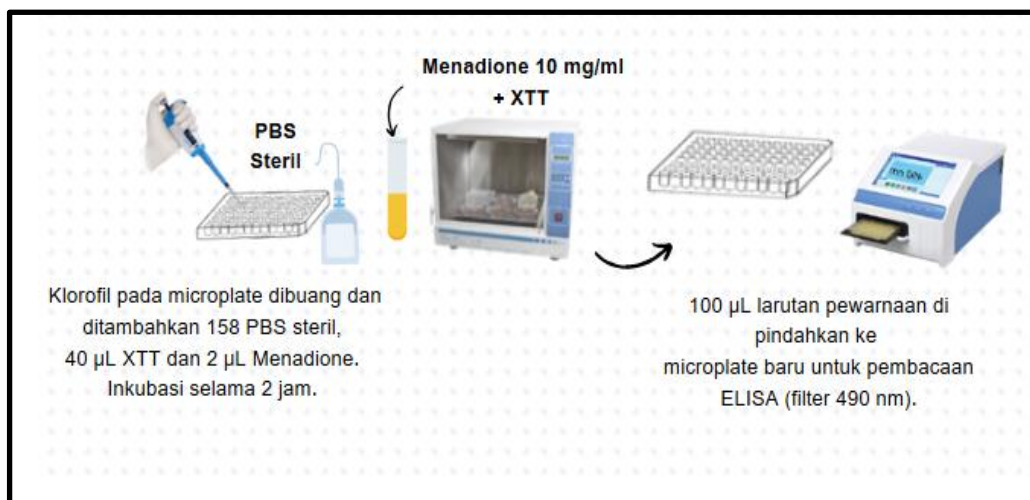
Kelompok Perlakuan	Keterangan
C ⁻	Biofilm tanpa perlakuan
C ₁ ⁺	Biofilm dengan penambahan PS kelor
L ₁ -L ₅	Biofilm dengan penyinaran selama 1-5 menit tanpa PS kelor
PL ₁ -PL ₅	Biofilm dengan penambahan PS kelor variasi penyinaran 1-5 menit (Pdi)



Gambar 5 proses perlakuan PDI

Kultur *moringa oleifera* ditumbuhkan pada microplate 96 well dan di inkubasi selama 48 jam. Biofilm kemudian dibagi menjadi 1 kontrol positif sebagai perbandingan, 2 kontrol negative 5 kelompok perlakuan laser, dan 5 perlakuan laser dengan penambahan PS kelor. Semua kelompok kontrol dan kelompok perlakuan masing-masing dibuat menjadi 3 replika. Gas oksigen dialiri pada semua biofilm sebelum penambahan PS kelor dan penyinaran selama 30 detik. Kelompok C-P dan kelompok PL

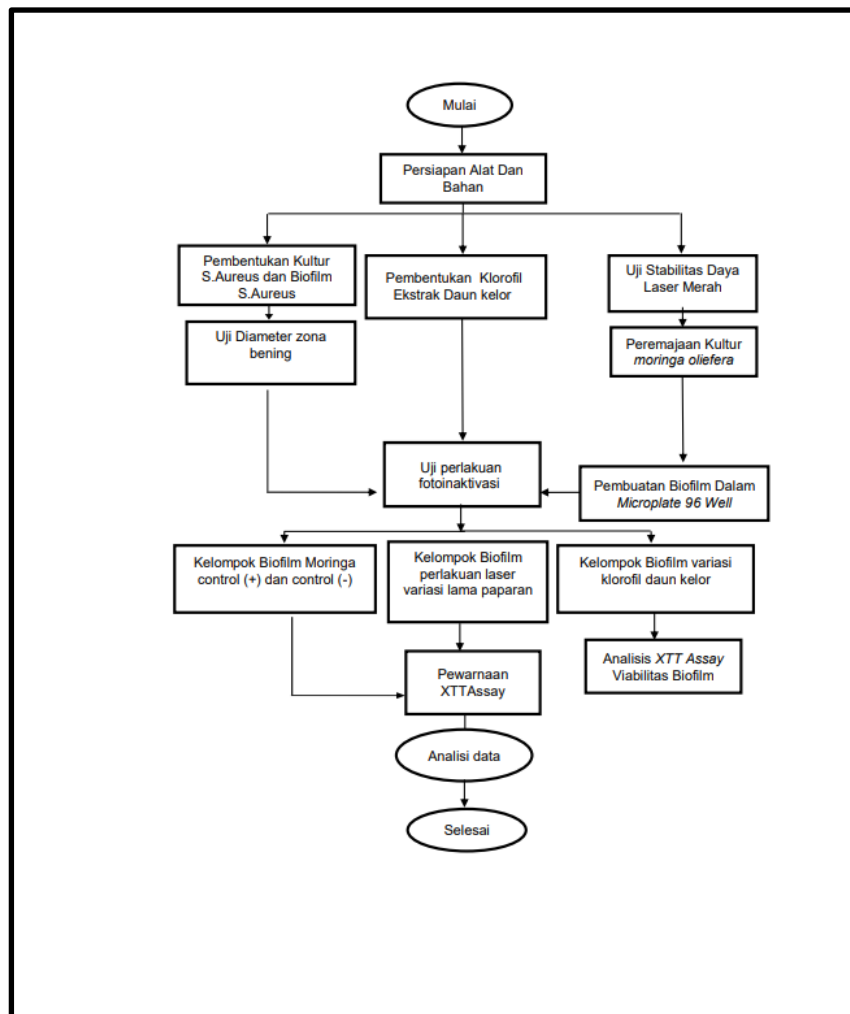
ditambahkan PS sebanyak 200 μL pada setiap sumur. Perlakuan penyinaran dilakukan masing-masing selama 1, 2, 3, 4, dan 5 menit dengan ketinggian sumber cahaya dari microplate sejauh 2 cm. Selanjutnya uji pewarnaan dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6 Uji pewarnaan

setelah perlakuan fotoinaktivasi selanjutnya dilakukan uji Viabilitas sel sampel diuji menggunakan metode pewarnaan XTT. Dalam prosedur ini, biofilm yang telah diperlakukan fotoinaktivasi diwarnai dengan campuran 80 μL larutan XTT 1 mg/mL, 4 μL menadion 20 mg/mL, dan 316 μL PBS steril. Setelah proses pewarnaan, biofilm diinkubasi ditempat atau ruangan yg gelap selama 90 menit pada suhu 37°C. Kemudian, 100 μL alikuot pewarnaan XTT dipindahkan ke mikroplate baru dan dianalisis menggunakan pembaca ELISA pada panjang gelombang 490 nm.

2.4 Bagan Alir Penelitian



Gambar 7 Bagan alur penelitian