

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Pemanfaatan bidang biofotonika telah berkembang luas di dunia medis untuk pengobatan penyakit (G. Kassab, et al., 2020; L. Sheng, et al., 2022). Salah satu pengaplikasian biofotonika dalam hal pengobatan penyakit *Photodynamic therapy* (PDT) atau dalam konteks khusus yang berkaitan dengan mikroorganisme disebut sebagai *Photodynamic inactivation* (PDI) atau *Photoantimicrobial chemotherapy* (PACT) (S. Kwiatkowski, et al., 2018; Astuty, et al., 2025; Z. Liu, et al., 2021). Mekanisme PDI menggunakan prinsip interaksi antara cahaya dengan materi melalui 3 proses yaitu fotofisika, meliputi eksitasi elektron dan penyerapan (absorpsi) (A. Baptista, et al., 2017), proses fotokimia yaitu pembentukan senyawa radikal setelah terjadi transfer elektron dan transfer energi dari molekul fotosensitizer ke molekul oksigen target. Proses yang ketiga adalah fotobiologi yang merupakan proses penghancuran sel target yang menjadi pemicu penyakit. Konsep dasar fototerapi yang diperkenalkan oleh Niels Finsen tahun 1896 menunjukkan pentingnya molekul oksigen dalam reaksi fotosensitisasi sebagai aksi fotodinamik (O. Rab, et al., 2022). Sejak saat itu, PDT terus berkembang hingga diterapkan juga untuk mengatasi mikroorganisme, yang kemudian dikenal sebagai *Photodynamic Inactivation* (PDI). (S. D. Astuty et al., 2025).

Mekanisme PDI melibatkan tiga komponen utama yaitu sumber cahaya, molekul photosensitizer (PS), dan molekul oksigen (D. de C, et al., 2019; S. D. Astuty, et al., 2019). Sumber cahaya yang digunakan dapat menentukan keberhasilan pada mekanisme PDI dengan cara menyesuaikan karakteristik berupa serapan maksimum dari molekul PS untuk terjadinya sistem fotosensitisasi. Serapan maksimum pada panjang gelombang tertentu berarti PS menyerap banyak energi foton dan jika diasumsikan dapat memberikan peluang besar tereksitasinya elektron hingga ke tingkat triplet dan menghasilkan oksigen singlet (S. D. Astuty, et al., 2025; J. A. Willis, et al., 2021).

Molekul PS bersifat peka cahaya sehingga ketika cahaya dikenai PS akan terjadi penyerapan energi foton Cahaya oleh elektron PS yang diteruskan dengan kejadian transisi hingga ke Tingkat energi triplet untuk menghasilkan senyawa radikal yang dikenal dengan *reakive oxygen species* (ROS). Senyawa ROS tersebut sangat reaktif dan beracun sehingga mampu mematikan sel-sel yang berkembang tidak normal atau sel yang mengalami pertumbuhan yang sangat cepat seperti mikroorganisme dan sel-sel kanker [M. C. S. Vallejo, et al., 2020; T. Kiesslich, et al., 2013]. Terdapat beberapa PS organik yang biasa digunakan seperti klorofil, *methylene blue*, *toluidine blue*, *malachite green*, *allyl isothiocyanate* (AITC), dan ekstrak tanaman berbasis klorofil (J. Shen, et al., 2019; D. B. Bhat, et al., 2018).



likembangkan telah mengarah pada partikel nano seperti s untuk pengobatan. Bionanoperak adalah hasil sintesis partikel nano (<100 nm) menggunakan reduksi prekursor ekstrak tanaman perak (AgNPs) murni telah teruji mengandung antibakteri tetapi lan jangka panjang karena dapat beragregasi, sehingga upaya kan untuk pengobatan adalah dengan cara menggunakan bahan

organik alami sebagai prekursor stabil. Ekstrak tanaman obat yang umumnya disintesis dari daun mengandung pigmen klorofil yang sangat kuat menyerap cahaya sebagaimana dalam prinsip fotosintesis. Sifat ini menjadikan senyawa klorofil dalam ekstrak sangat potensial dijadikan sebagai agen PS dalam mekanisme PDI, namun memiliki kelemahan berpenetrasi jika diaplikasikan secara tunggal seperti untuk menghambat pertumbuhan biofilm karena ukuran partikel molekulnya relatif besar (T.-O. Peulen, et al., 2011; S. D. Astuti, et al., 2019). Nanoperak (AgNPs) adalah salah satu bahan yang berukuran nano (A. Gibala, et al., 2021) dan mengandung zat aktif antifungi dan antibakteri sehingga berpeluang dimanfaatkan untuk dijadikan agen fotosensitizer dalam mekanisme PDI.

Nanopartikel perak (AgNP) muncul sebagai kandidat alternatif dengan kemampuan antibakteri yang tinggi. Partikel dalam skala nano memiliki luas permukaan besar sehingga interaksinya dengan sel bakteri lebih intens. Interaksi tersebut dapat merusak dinding sel, mengganggu metabolisme, hingga memicu pembentukan ROS. Saat ini, sintesis nanopartikel perak berbasis tanaman (green synthesis) banyak dikembangkan karena lebih ramah lingkungan. Ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin yang berfungsi sebagai agen pereduksi sekaligus penstabil dalam pembentukan nanopartikel. Selain itu, klorofil pada daun pepaya juga memiliki kemampuan sebagai fotosensitizer alami yang efektif menyerap cahaya tampak. (S. D. Astuty et al., 2025). Pemilihan cahaya juga merupakan salah satu faktor penting dalam PDI. Sumber cahaya yang paling umum digunakan dalam mekanisme PDI yaitu laser karena memiliki sifat monokromatik (satu Panjang gelombang). (M. Piksa, et al., 2023).

Penelitian terkait photodynamic Inactivation sudah cukup berkembang Penelitian terbaru oleh Astuty dkk. 2025 memperlihatkan bahwa nanoperak hasil biosintesis dengan ekstrak daun Moringa (AgNPs-MO) dapat berfungsi sebagai agen fotoantimikroba yang efektif. Aktivasi menggunakan LED biru dan merah mampu menurunkan viabilitas biofilm *Candida albicans* masing-masing sebesar 80% dan 75%. Mekanisme ini ditandai dengan peningkatan produksi ROS dan kerusakan struktur biofilm, sebagaimana divisualisasikan melalui SEM. Hasil ini memperkuat bukti bahwa nanoperak yang dikombinasikan dengan sumber cahaya tertentu dapat menghambat biofilm patogen, sehingga mendukung pengembangan nanoperak berbasis ekstrak pepaya dan daun kelor dalam strategi fotoinaktivasi bakteri patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa* Meskipun penelitian tersebut menggunakan ekstrak Moringa, mekanisme fotoinaktivasi dengan nanoperak dapat dijadikan pembandingan untuk mendukung penelitian berbasis ekstrak pepaya dan daun kelor. (S. D. Astuty, et al., 2019).

Selain daun pepaya (*Carica papaya*), daun kelor (*Moringa oleifera*) juga digunakan sebagai agen biosintesis karena kandungan fitokimia pereduksi yang serupa; studi komparatif antara kedua sumber ini akan membantu mengevaluasi pengaruh



dap karakteristik nanoperak dan efektivitas fotoantimikroba. Selain n-negatif), *S. aureus* (Gram-positif) akan diuji sebagai strain enilai spektrum aktivitas fotoinaktivasi. (S. D. Astuty, et al., 2019). i difokuskan pada karakterisasi fisis nanoperak yang disintesis ggunakan ekstrak daun pepaya dan daun kelor, sekaligus menilai gen fotoantimikroba terhadap *P. aeruginosa* dan *S. aureus* setelah ser pada berbagai panjang gelombang. Pendekatan ini tidak hanya

menelaah potensi AgNP berbasis ekstrak alami sebagai fotosensitizer, tetapi juga menghadirkan temuan baru mengenai keterkaitan antara jenis ekstrak tumbuhan, sifat optik partikelnya, besaran energi cahaya yang diberikan, serta pengaruhnya terhadap efektivitas fotoinaktivasi pada kondisi biofilm sebuah aspek yang masih jarang dieksplorasi namun penting untuk pengembangan strategi terapi fotodinamik yang lebih efisien.

1.2 Photodynamic Teraphy (PDT) dan Photodynamic Inactivation (PDI)

Photodynamic Teraphy (PDT) merupakan metode terkini yang bersifat non invasif dan awalnya digunakan untuk mengatasi tumor dan kanker. Namun, seiring dengan peningkatan resistensi terhadap obat-obatan dalam penanganan mikroba patogen, PDT telah disesuaikan untuk pengobatan penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen, seperti infeksi yang dikenal dengan Photodynamic Inactivation (PDI) (Z. Liu et al., 2021; S. Kwiatkowski, et al., 2018). Tujuan dari terapi ini adalah untuk menggunakan senyawa beracun yang dihasilkan melalui proses PDI untuk menghancurkan sel atau jaringan yang menjadi penyebab penyakit (S. Kwiatkowski, et al 2018).

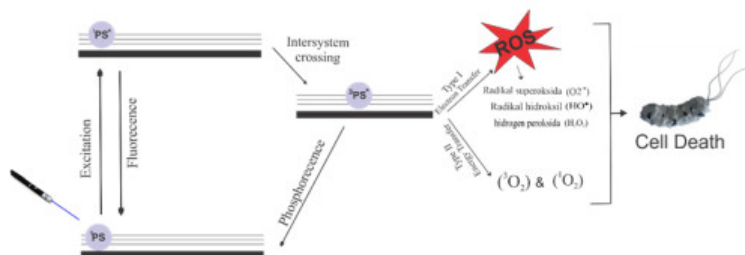
PDI didasarkan pada interaksi dinamis antara PS, cahaya dengan panjang gelombang tertentu, dan oksigen molekuler, yang mempromosikan penghancuran selektif jaringan target (J. H. Correia et al 2021; M. M. Kim, et al., 2020). Ketika PS diaktifkan oleh cahaya yang sesuai, itu dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas dan berbagai jenis ROS yang dapat merusak sel-sel hidup. Efek merusak ini bisa mengenai bagian sel, termasuk membran sel, dan akhirnya dapat menyebabkan sel mati (D. L. Sai, et al., 2021).

1.3 Mekanisme Fotodinamik Inaktivasi

Komponen utama dalam Photodynamic Inactivation (PDI) terdiri dari fotosensitizer (PS), cahaya, dan oksigen molekuler (O_2) (A. Baptista, et al., 2017). Fotosensitizer yang pada kondisi normal bersifat tidak beracun akan menyerap foton ketika diberikan penyinaran dengan panjang gelombang tertentu. Setelah menyerap energi cahaya, PS memasuki keadaan tereksitasi dan berinteraksi dengan oksigen di sekitarnya. Proses ini kemudian memicu terbentuknya radikal bebas atau Reactive Oxygen Species (ROS), seperti radikal hidroksil ($OH\bullet$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan superoksida ($O_2^{\bullet-}$).

Spesies oksigen reaktif tersebut memiliki sifat sangat toksik dan dapat menyerang berbagai komponen penting sel, termasuk membran lipid, protein, enzim, dan asam nukleat. Ketika kerusakan semakin meningkat, struktur dan fungsi sel menjadi proses metabolisme tidak dapat berjalan normal. Akumulasi pada akhirnya menyebabkan sel kehilangan viabilitas dan (L. Misba, et al., 2018).





Gambar 1. Modifikasi Diagram Jablonsky untuk mekanisme PDI (diagram jablonsy(J. Zimmermann, et al., 2018), gambar mikroba mati [S. Gao, et al., 2019], dan mekanisme PDI (B. Pucelik, et al., 2022)

Gambar 1. Pada reaksi tipe I, setelah elektron dari molekul PS tereksitasi secara triplet, eletron dapat berbindah ke molekul molekul oksigen yang berada disekitar fotosensitizer dan menghasilkan senyawa ROS berupa radikal superoksida ($O_2^{\bullet-}$), radikal hidroksil ($HO^{\bullet}$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Sementara reaksi tipe II, energi yang berlebih pada elektron yang tereksitasi secara triplet dapat melepaskan ke senyawa oksigen yang ada disekitar PS dan membuat oksigen tereksitasi secara singlet. Selanjutnya, senyawa ROS dan senyawa oksigen singlet dapat membuat kematian sel (F. Cieplik, et al 2018; E. V. Bergmann, et al., 2021).

1.4 Dosimetri Fotodinamik Inaktivasi

Prinsip dalam PDI, kematian sel disebabkan karena produksi ROS yang dihasilkan. Produksi ROS dapat dipengaruhi oleh jumlah energi yang disuplai oleh cahaya ke molekul fotosensitizer. Semakin tinggi energi yang disalurkan oleh cahaya, semakin besar kemungkinan molekul fotosensitizer akan mengalami eksitasi triplet dan mengeluarkan energi tambahan melalui fosforesensi atau melalui pembentukan ROS (N. Ghosh, et al., 2018).

Menghitung rapat energi penyinaran dihitung dengan persamaan[1.1]:

$$E = I_{\text{Serap}} \times t \quad (1.1)$$

, Iserap adalah banyaknya intensitas yang diserap oleh molekul fotosensitiser jika disinari pada intensitas tertentu, t=durasi penyinaran (s), E= Rapat Energi penyinaran (J/cm^2 atau $W.s/cm^2$) (Astuty, 2019).

1.5 Sumber Cahaya



Sumber cahaya dengan berbagai jenis telah dikembangkan untuk terapi n besar prosedur PDI dilakukan pada panjang gelombang antara juga disebut sebagai "jendela terapeutik," di mana penetrasi cahaya besar dan energi foton (>1.5 eV) cukup tinggi untuk menyebabkan PDI memerlukan cahaya intens dengan panjang gelombang yang atik seperti laser (M. M. Kim, et al., 2020).

1.6 Fotosensitizer AgNPs

Perkembangan riset PDI bukan hanya efektivitasnya dalam membunuh mikroba patogen, tetapi modifikasi jenis dan karakteristik fotosensitizer menjadi perhatian khusus. Fotosensitizer dengan karakteristik Panjang gelombang serapan yang sesuai dengan sumber cahaya akan memaksimalkan peluang keberhasilan PDI. Fotosensitizer awalnya menggunakan jenis organik dan anorganik seperti metilen blue (MB), *malachite green* (MG), dan *toluidine blue* (TBO). Fotosensitizer generasi selanjutnya terus dikembangkan untuk dapat berpotensi kedalam jaringan target biofilm yaitu dengan mengembangkan AgNPs (D. R. et al., 2018).

AgNPs bisa dihasilkan melalui berbagai cara yang berbeda, termasuk metode yang paling umum adalah dengan mengurangi garam perak menggunakan asam sitrat atau campuran asam sitrat/tannat asam melalui proses reduksi termal. Meskipun metode-metode ini sering digunakan dan relatif mudah secara teknis, mereka dapat menghasilkan AgNPs dengan ukuran, distribusi ukuran, dan bentuk yang berbeda-beda (R. La Spina, et al., 2020).

Partikel perak (AgNPs) telah menarik perhatian dan minat yang signifikan karena potensi aplikasinya dalam bidang biomedis serta perangkat antibakteri. Perak adalah agen antimikroba yang efektif dan dapat menghambat mikroorganisme patogen seperti virus, bakteri, jamur, dan mikroorganisme eukariotik dalam konsentrasi rendah. Rahisuddin dkk. menunjukkan efek antimikroba dan antijamur dari nanopartikel perak dalam konsentrasi rendah (mikrogram per mililiter) (S. D. Astuti, et al., 2019; Rahisuddin 2015; Priyandi, M. Tabaika, et al., 2024)

1.7 Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai dalam penelitian tersebut Adalah sebagai berikut:

1. Uji karakteristik serapan cahaya molekul AgNP-MO dan AgNP-CP terhadap laser berbagai panjang gelombang.
2. Identifikasi perubahan nilai optical density viabilitas sel biofilm *pseudomona* *eurogenesa* dan *staphylococcus aureus* hasil fotoinaktivasi dengan laser.
3. Menganalisis efektifitas biosintesis silvernanoperak sebagai fotoantimikroba melalui mekanisme fotoinaktivasi.

1.8 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Menambah pengetahuan tentang mekanisme fotodinamik menggunakan alami dari daun pepaya dan daun kelor.
2. Menemukan alternatif metode antibakteri non-antibiotik yang ramah lingkungan.
3. Meningkatkan pemanfaatan nanoperak sebagai agen fotoantimikroba.



BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Laboratorium kimia terpadu, Universitas Hasanuddin dan Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Kelas 1 Makassar (BTKLPP). pada bulan September hingga Oktober Tahun 2025

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Pipet tetes *Magnetis Stirrer*, gelas ukur, gelas beker, *thermometer*, botol kaca, *erlenmeyer*, timbangan analitik, *Bio Safety Cabinet* (BSC), *Micropipet*, *Autoclave*, Tabung Oksigen, *vortex*, *incubator*, botol aquades, spektrofotometer UV-VIS, *Elisa reader*, cawan petri, Tabung Reaksi, jangka sorong digital, *ose*, *pinset*, *Micropipet*, Laser merah dan hijau, *Mikroplate*, *Mcfarland Densitometer*, oven sterilisator, inkubator shaker dan Mikroplate 96 well

2.2.2 Bahan

Perak nitrat AgNO_3 , NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Alkohol 70%, Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Aquabidest, Aquades, Nutrien broth (NB), Nutrient agar (NA), Menadion, Phospate Buffer Saline (PBS), garam formasan XTT

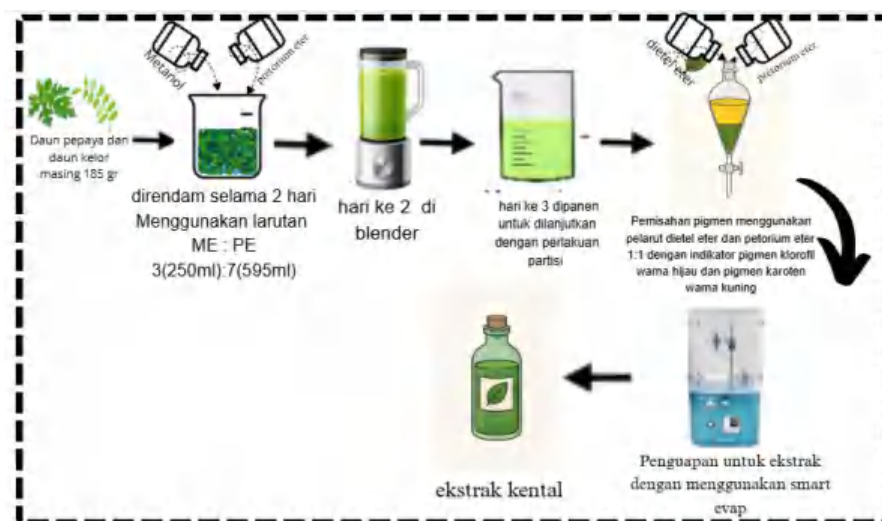
2.3 Prosudur Kerja

2.3.1 Pembuatan Ekstraksi Daun Pepaya (*carica papaya*) dan daun kelor (*moringa oliviera*)

Proses pembuatan ekstrak daun dilakukan menggunakan metode maserasi, yaitu teknik perendaman sampel tumbuhan dengan pelarut untuk menarik dan melarutkan senyawa bioaktif yang terdapat di dalamnya. Sebanyak 185 gram daun pepaya dan daun kelor yang masih segar terlebih dahulu dicuci bersih untuk menghilangkan debu dan kotoran, kemudian diblender hingga halus agar kontak dengan pelarut menjadi lebih optimal. Sampel yang telah direndam kemudian dipanen pada hari ke-3 untuk dilanjutkan ke tahap partisi.

Pemisahan pigmen dilakukan menggunakan pelarut dietil eter dan petroleum eter dengan perbandingan 1:1, di mana pigmen klorofil berwarna hijau dan pigmen karotenoid berwarna kuning dipisahkan ke dalam wadah yang berbeda. Hasil partisi menggunakan smart evaporator hingga seluruh pelarut menguap k kental murni. Pada penelitian ini, hanya pigmen klorofil yang sumber senyawa bioaktif karena memiliki peran penting dalam erak pada tahap biosintesis nanopartikel perak (AgNPs). Ekstrak tnya menjadi bahan utama dalam proses sintesis AgNPs





Gambar 2. Skema Ekstraksi Daun Pepaya (*Carica Papaya*) dan Daun Kelor (*Moringa Oliviera*)

2.3.2 pembuatan larutan AgNPs

Sebanyak 0,017gram perak nitrat (Silver Nitrate) dilarutkan dalam 100 ml akuades untuk menghasilkan larutan AgNO_3 . Selanjutnya, larutan AgNO_3 tersebut dimasukkan kedalam erlenmeyer dipanaskan hingga 85°C , setelah 85°C ditetaskan ekstrak sebanyak 10ml dan di diamkan selama 20 menit atau warna AgNPs itu kuning kecoklatan.



Gambar 3. Pembuatan Larutan AgNPs (*Carica Papaya*) dan Daun Kelor (*Moringa Oliviera*)

2.3.3 Karakterisasi Nanoperak



Karakterisasi sifat optik nanoperak yang digunakan dalam penelitian ini sebagai rakan spektroskopi UV-VIS. Pengujian ini untuk menentukan a Panjang gelombang 350-700 nm. Karakterisasi ini bertujuan untuk sar absorbansi nanoperak pada Panjang gelombang yang sesuai gunakan, agar terjadi proses fotosentisasi yang maksimal.

2.3.4 Parameter penyinaran laser

Proses fotoinaktivasi dilakukan menggunakan dua jenis laser, yaitu laser merah dengan panjang gelombang 650 nm dan laser hijau dengan panjang gelombang 532 nm. Variasi waktu penyinaran digunakan untuk mengetahui pengaruh besar energi radiasi terhadap efektivitas inaktivasi bakteri.

Parameter penyinaran seperti daya laser, luas area paparan, intensitas, waktu, dan energi radiasi ditampilkan pada **Tabel 1** dan **Tabel 2**. Nilai energi dihitung berdasarkan daya dan waktu penyinaran terhadap luas area paparan.

Tabel 1. Parameter penyinaran laser merah

Code Treatment Laser	area paparan (cm ²)	Kekuatan Laser (mW)	intensitas laser (mW/cm ²)	Time (s)	energi radiasi (J/cm ²)
L1	0.196	500	2551.02	300	765.306
L2				600	1.530.612
L3				900	2.295.918

Pada **Tabel 1** ditunjukkan parameter penyinaran yang digunakan pada perlakuan menggunakan laser merah. Pada penyinaran ini luas area paparan yang digunakan adalah 0,196 cm². Laser merah yang digunakan memiliki daya keluaran sebesar 500 mW sehingga menghasilkan intensitas sebesar 2551,02 mW/cm². Variasi perlakuan dibedakan berdasarkan waktu iradiasi, yaitu 300 detik untuk perlakuan L1, 600 detik untuk perlakuan L2, dan 900 detik untuk perlakuan L3. Perbedaan durasi penyinaran ini menyebabkan nilai energi radiasi yang diterima sampel berbeda pada setiap perlakuan, yaitu 765,306 J/cm² pada L1, 1530,612 J/cm² pada L2, dan 2295,918 J/cm² pada L3. Secara teoritis semakin lama waktu penyinaran, maka semakin besar energi radiasi yang terakumulasi pada sampel.

Tabel 2. Parameter penyinaran laser Hijau

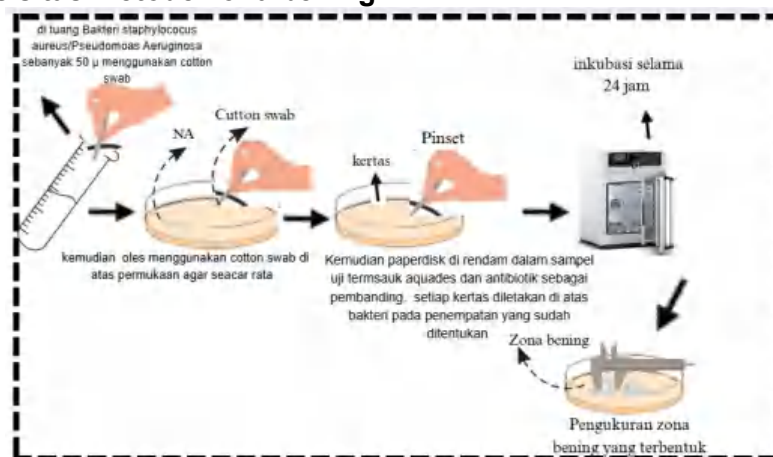
Code Treatment Laser	area paparan (cm ²)	Kekuatan Laser (mW)	intensitas laser (mW/cm ²)	Time (s)	energi radiasi (J/cm ²)
L1	0.196	288	1469.39	300	440.817
L2				600	881.634
L3				900	1.322.451

Pada **Tabel 2** ditampilkan parameter penyinaran menggunakan laser hijau. Pada penyinaran ini luas area paparan yang digunakan adalah 0,196 cm² dengan daya laser sebesar 288 mW sehingga menghasilkan intensitas sebesar 1469,39 mW/cm². Variasi



berdasarkan durasi penyinaran, yaitu 300 detik untuk perlakuan L1, 600 detik untuk perlakuan L2, dan 900 detik untuk perlakuan L3. Perbedaan durasi ini menyebabkan nilai energi radiasi yang diterima sampel menjadi bervariasi, yaitu 440,817 J/cm² untuk L1, 881,634 J/cm² untuk L2, dan 1322,451 J/cm² untuk L3. Dengan demikian waktu penyinaran menggunakan laser hijau maka semakin lama waktu penyinaran, maka semakin besar energi radiasi yang terakumulasi pada sampel.

2.3.5 Uji toksisitas metode zona bening



Gambar 4. Skema pengujian zona bening

Sebelumnya dibuat media agar dicawan setelah dibuat media agar dituang bakteri yang sudah di suspense sebanyak 50µ menggunakan cotton swab dioles di permukaan agar secara rata kemudian paperdisk direndam dalam sampel uji termasuk aquades dan antibiotik sebagai pembanding. Setiap kertas diletakkan di atas bakteri pada penempatan yang sudah di tentukan. Kemudian di inkubasi dengan cara terbalik selama 24 jam. Lalu setelah 24 jam dilakukan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk. Mekanisme yang mendasari proses ini diilustrasikan pada Gambar 4.

2.3.6 Pembentukan biofilm dalam microplate

Proses pembuatan inokula *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas Aureus* dimulai dengan memasukkan 1 ose kultur bakteri dalam media Natrium Broth (NB) dilanjutkan inkubasi selama 24 jam, suhu 37°C. Saat panen, jumlah sel awal inokula diukur dengan cara menentukan nilai transmitansi inokula dengan spektrometer pada $\lambda=600$ nm. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan PBS steril dan mengukur nilai kekeruhan 0,5 McFarland atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Untuk pembentukan biofilm dalam microplate, 100µ aliquot dimasukkan pada setiap sumuran dan ditambahkan dengan media NB 8% glukosa sebanyak 100µ. Biofilm ditanam selama 48 jam untuk perlakuan sesuai dengan kelompok desain.

2.3.7 Perlakuan Terapi Fotodinamik dan uji viabilitas

Perlakuan Terapi Fotodinamik digunakan untuk mengobati infeksi dengan memanfaatkan senyawa fotosensitizer yang diaktifkan oleh cahaya, yang dapat menimbulkan kerusakan sel bakteri. Uji Viabilitas digunakan untuk mengukur sel bakteri yang masih hidup setelah perlakuan. Berikut proses perlakuan fotodinamik inaktivasi bakteri menggunakan laser merah dan laser hijau.



Tabel 3. kelompok perlakuan inaktivasi

Kelompok Perlakuan	Keterangan
C ⁻	Biofilm tanpa perlakuan
C ⁺	Laser+PS
PS1	Kontrol Positif AgNP-MO
PS2	Kontrol Positif AgNP-CP
L ₁ -L ₃	Biofilm dengan penyinaran selama 5, 10, dan 15 menit tanpa PS
L ₁ PS ₁ -L ₃ PS ₁	Biofilm dengan penyinaran selama 5, 10, dan 15 menit dengan PS 1 dengan konsentrasi 50%
L ₁ PS ₂ -L ₃ PS ₂	Biofilm dengan penyinaran selama 5, 10, dan 15 menit dengan PS 2 dengan konsentrasi 100%
CL ₁ -CL ₃	Perlakuan utama biofilm diberi klorofil dan disinari laser dengan variasi waktu (15, 20, 25 menit untuk daun kelor)



Gambar 5. Proses perlakuan PDI

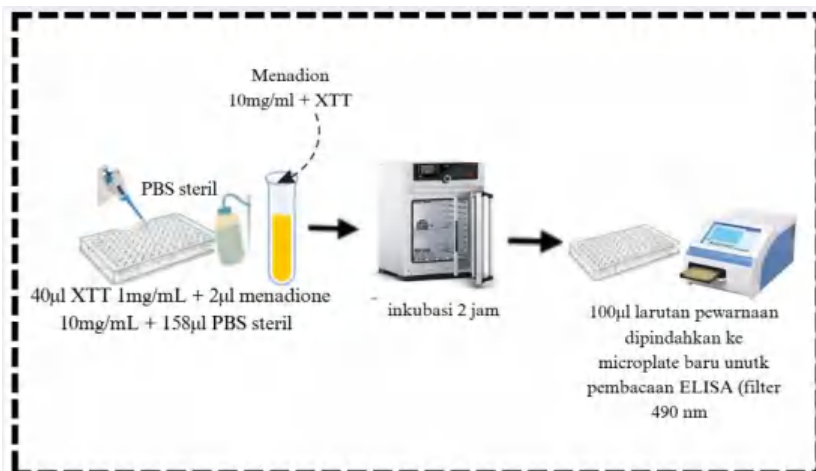
Pengaliran gas oksigen dilakukan pada seluruh bilm sebelum penambahan fotosensitizer, masing-masing selama 1 menit penambahan oksigen ke semua sumur yang ditambahkan AgNP biofilm (C⁺ dan Kelompok PDI). Yaitu kelompok yang perlakuannya dengan laser dan PS. *microplate* diinkubasi selama 30 menit agar senyawa aktif dapat berinteraksi dan menembus matriks biofilm secara optimal.



utupi dengan aluminium foil agar cahaya tidak masuk selain laser rikan penyinaran laser hanya kelompok PDI *mikroplate* disinari 650 nm) dan laser hijau (532 nm) Perlakuan penyinaran selanjutnya iasi waktu berbeda pada masing-masing jenis nanopartikel. Untuk i diberikan selama 5, 10, dan 15 menit, sedangkan untuk AgNP-MO 20, dan 25 menit. Proses penyinaran dilakukan dengan menjaga

jarak sumber cahaya terhadap permukaan *microplate* sejauh 2 cm, sehingga intensitas dan distribusi cahaya selama perlakuan tetap stabil. Pengaturan jarak ini penting untuk memastikan setiap sampel menerima paparan cahaya yang merata dan konsisten selama eksperimen.

2.3.8 Uji Pewarnaan XTT assay



Gambar 6. Uji pewarnaan XTT

Gambar 6 dilakukan sesaat setelah perlakuan fotoinaktivasi. Dalam prosedur ini, 40 µL XTT 1 mg/mL, 2 µL menadione 10 mg/mL, dan 158 µL PBS steril. Biofilm yang telah diberikan pewarna garam formazan diinkubasi selama 2 jam sebelum diukur nilai OD₄₉₀ dalam ELISA reader.

XTT merupakan reagen tetrazolium yang digunakan untuk mengukur viabilitas biofilm berdasarkan aktivitas metabolik sel. Dalam proses ini, XTT yang awalnya tidak berwarna akan direduksi oleh enzim dehidrogenase pada sel yang masih hidup sehingga menghasilkan senyawa formazan berwarna oranye. Intensitas warna ini mencerminkan jumlah sel yang masih aktif secara metabolik. Penambahan menadione berfungsi sebagai mediator elektron untuk mempercepat dan meningkatkan proses reduksi XTT, terutama pada bakteri Gram-negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa*, sehingga sensitivitas pengukuran menjadi lebih tinggi. Setelah inkubasi selama 2 jam, pembentukan formazan diukur pada panjang gelombang 490 nm menggunakan ELISA reader, di mana nilai OD₄₉₀ yang diperoleh menggambarkan tingkat viabilitas biofilm setelah perlakuan fotoinaktivasi.



2.4 Bagan Alir Penelitian

