

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hasil Penelitian Terdahulu

Staicu *et al* (2013) melakukan penelitian dengan memprediksi kemampuan logam *phthalocyanine* seperti Cu, Al, Mn, Fe, Co, dan Ni sebagai fotosensitizer untuk PDT. Logam *phthaocyanine* dipersiapkan menggunakan pelarut DMSO dan DMF. Kemudian setelah diteiti menunjukkan kemampuannya dalam menghasilkan oksigen singlet dengan masa hidup tersingkat dihasilkan oleh *cobalt* yaitu 3,0  $\mu$ s. Hal ini dapat dikatakan bahwa logam *phthalocyanine* berpotensi sebagai fotosensitizer untuk PDT.

Karakterisasi senyawa *cobalt (II) phthalocyanine* juga telah dilakukan pada penelitian sebelumnya dengan hasil yang diperoleh berupa nilai log P 4,85 yang memungkinkan bahwa *cobalt (II) phthalocyanine* memiliki kemampuan untuk berdifusi dan melokalisasi dalam membrane sel. Data lain diperoleh bahwa *cobalt (II) phthalocyanine* berinteraksi dengan P-gp protein. Selain itu menghasilkan gradien *quantum yield*  $^1\text{O}_2$  pada pH sel kanker lebih besar dari pada pH fisiologis dan data lain menunjukkan bahwa *cobalt (II) phthalocyanine* menunjukkan ketidakstabilannya dengan mengalami fotodegradasi (Hasanah, 2019)

Selanjutnya aktivitas *cobalt (II) phthalocyanine* yang disubstitusi 1,4,7-*trioxanonyl* berpotensi pada kanker sel T-leukimia (CEM), kanker servix (Hela) dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  berturut-turut 3,2 ; dan 4,9  $\mu$ M. Dimana sampel dipersiapkan dalam pelarut DMSO dan DMF (Sobotta *et al.*, 2016).

Selain itu telah dibuktikan aktivitas *cobalt (II) phthalocyanine* ataupun kompleks AFP-*cobalt (II) phthalocyanine* yang mengandung asam askorbat dengan konsentrasi yang tinggi. Hal ini diketahui berpotensi kuat dalam membunuh kanker ovarium dan human T-lymphoblastoma QOS cells. Dimana *cobalt (II) phthalocyanine* dipersiapkan dalam pelarut DMSO dengan seri konsentrasi 1 nM-10  $\mu$ M. Penelitian ini dilakukan dengan metode MTT untuk melihat viabilitas selnya. Diperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  *cobalt (II) phthalocyanine* terletak pada konsentrasi 10  $\mu$ M dan  $\text{IC}_{90}$  terletak pada konsentrasi 50  $\mu$ M, sedangkan kompleks AFP-PCCO  $\text{IC}_{50}$  terletak pada

konsentrasi 0,1  $\mu\text{M}$  dan  $\text{IC}_{90}$  terletak pada konsentrasi 0,5  $\mu\text{M}$  pada kanker ovarium. Selain itu pada QOS cells, *cobalt (II) phthalocyanine* memperoleh  $\text{IC}_{50}$  lebih dari 10  $\mu\text{M}$  dan kompleks AFP-PCCO memperoleh  $\text{IC}_{50}$  dengan rasio 1-2, 1-4, dan 1-9 berturut-turut 0,2; 0,4; dan 0,7  $\mu\text{M}$ . Hal ini terbukti bahwa penambahan *cobalt (II) phthalocyanine* pada AFP meningkatkan potensialnya dalam membunuh sel kanker (Severin *et al.*, 1997).

Pada studi terdahulu meneliti kemampuan *cobalt (II) phthalocyanine* terhadap sel kanker ovarium, human T-lymphoblastoma QOS cells, sel T-leukimia (CEM) dan kanker servix (Hela) perbedaannya dengan penelitian kali ini yaitu dilakukannya penelitian pada sel kanker payudara (T47D) dengan membuktikan potensi senyawa murni tanpa konjugasi ataupun tanpa penambahan zat lain yang dilakukan dengan pelarut dan metode yang sama. Senyawa yang digunakan yaitu *cobalt (II) phthalocyanine* dengan pelarut DMSO dan metode MTT untuk melihat viabilitas selnya.

## 2.2 Landasan Teori

### 2.2.1 Kanker dan Kanker Payudara

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak normal dan tidak terkendali yang dapat merusak jaringan serta dapat menjalar ke jaringan lain yang lebih jauh dari jaringan asalnya. Peristiwa ini disebut dengan metastasis. Pada kanker terdapat istilah karsinogenesis yang digunakan untuk menggambarkan kejadian perubahan sel normal menjadi kanker yang dapat dikatakan sebagai proses multistap yaitu sebagai berikut (James *et al.*, 2004):

1. Inisiasi

Tahap ini dimulai dalam sel, biasanya terjadi pada stem sel. Hal ini dimulai ketika adanya paparan radiasi, bahan kimia atau virus sehingga terjadi mutasi. Agen ini dipercaya dapat mengubah komponen dasar DNA secara *irreversible*. Melalui proses inilah awal mula kanker berkembang. Sel yang mengalami mutasi menunjukkan perubahan dan pertumbuhan yang berbeda dengan sel normal meskipun secara umum fenotipnya identik dengan sel

yang tidak mengalami inisiasi. Proses ini berlangsung cepat dalam hitungan detik.

## 2. Promosi

Tahap ini melibatkan perubahan ekspresi gen, ekspansi klon selektif, dan proliferasi sel yang diinisiasi. Tahap ini ditandai dengan reversibilitas, berbeda dengan inisiasi dan progresi. Karena karakter reversibilitasnya maka tahap ini sangat tergantung pada jumlah, frekuensi, dan jenis paparan. Meskipun inisiasi adalah tahap awal tetapi perlu dicatat bahwa sel yang belum diinisiasipun dapat menjadi faktor resiko dalam perkembangan kanker. Dengan merangsang proliferasi sehingga sangat memungkinkan meningkatnya kesalahan genetik dan menyebabkan tumorigenesis.

## 3. Progresi

Tahap ini ditandai dengan perubahan molekul lebih lanjut meliputi penambahan besar, pemisahan sel, dan pergerakan ke jaringan dan organ yang berdekatan serta penetrasi sel kanker ke dalam sistem sirkulasi, sehingga organ dan jaringan yang jauh dapat terjangkau. Sel kanker ini terperangkap dan menetap di lokasi baru dan terus berkembang. Proses inilah yang dikenal dengan istilah metastasis.

Penyakit kanker diberi nama sesuai dengan dimana lokasi sel kanker itu berada. Seperti pada kali ini variabel yang diteliti berupa sel kanker payudara (T47D). Kanker payudara merupakan pertumbuhan yang tidak normal pada sel kelenjar, saluran kelenjar, dan jaringan penunjang payudara. Dilihat dari segi biomolekuler kanker payudara terjadi akibat dari mutasi gen yang dipicu oleh beberapa faktor paparan estrogen, nulliparitas, dan usia lanjut, kelainan sebelumnya terkait histologi payudara, serta genetika (Sari *et al.*, 2018)

### 2.2.2 *Photodynamic Therapy (PDT)*

PDT adalah salah satu jenis dari metode fototerapi yang merupakan alternatif pengobatan sebagai antikanker. Metode ini efektif membunuh sel kanker karena adanya oksigen singlet sebagai sitotoksik utama

yang merupakan hasil serangkaian proses terapi ini. Terapi ini merupakan terapi khusus yang menggabungkan cahaya, oksigen, dan senyawa yang peka terhadap cahaya tertentu (fotosensitizer) (Staicu *et al.*, 2013).

PDT terjadi melalui proses iradiasi lokal dengan menggunakan sumber cahaya yang sesuai kemudian terjadi penyerapan cahaya oleh molekul fotosensitizer. Lalu molekul tersebut akan tereksitasi pada keadaan oksigen triplet. Elektron ini akan cenderung kembali ke keadaan dasar maka molekul oksigen ini menjadi tidak terlalu reaktif. Selanjutnya terjadi proses transfer energi yang biasanya dapat dilakukan oleh molekul lain yang tereksitasi kemudian membentuk keadaan singlet yang sangat reaktif. Pada keadaan ini waktu hidupnya sangat singkat sehingga meningkatkan kemungkinan oksigen singlet untuk berinteraksi dengan molekul lain disekitarnya. Interaksi ini yang menghasilkan kerusakan pada sel target baik melalui proses apoptosis atau nekrosis. Apoptosis adalah sel yang secara aktif ikut berpartisipasi dalam pemusnahan diri. Sedangkan nekrosis adalah alternatif dari apoptosis yang memicu peradangan pada jaringan dengan pembengkakan yang diikuti oleh pecahnya membran dan pelepasan sitoplasma (Staicu *et al.*, 2013; Santosa and Limantara, 2010).

Terdapat 2 tipe aksi fotodinamik sesuai Gambar 2.3, yaitu (Bonnett, 2000):

- Tipe I ditandai dengan transfer elektron ke/dari sensitizer tereksitasi (termasuk transfer secara simultan proton yang sesuai dari atom hidrogen) yang akan menghasilkan radikal bebas.
- Tipe II ditandai dengan transfer energi dari sensitizer yang tereksitasi.



menghasilkan oksigen singlet karena keadaan triplet berada dibawah tingkat energi oksigen singlet atau tidak mampu menghasilkan energi yang cukup untuk merangsang produksi oksigen singlet (Santosa dan Limantara, 2010).

**Tabel 2.1. Panjang gelombang eksitasi dan emisi beberapa fluorofor endogen**

Fluorofor endogen	Eksitasi maks (nm)	Emisi maks (nm)
<b>Asam amino</b>		
Triptofan	280	350
Tirosin	275	300
Fenil alanin	280	280
<b>Protein structural</b>		
Kolagen	325, 350	400, 405
Elastin	290, 325	340, 400
<b>Enzim &amp; koenzim</b>		
FAD, flavin	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
<b>Lipid</b>		
Fosfolipid	436	540, 560
Lipofuscin	340-395	540, 460
Ceroid	340-395	540, 460

Sumber : Zain and Tedjo, 2007

Pada prinsipnya kasus iradiasi kebanyakan menggunakan cahaya tampak meskipun ada yang menggunakan radiasi dekat daerah inframerah. Selain itu pada panjang gelombang yang lebih panjang dapat terjadi penyerapan oleh molekul air pada awal cahaya *infra-red*. Dengan demikian, fotosensitizer yang ideal untuk PDT harus menyerap cahaya pada daerah *visible* dari spektrum elektromagnetik. (Maiya, 2000).

Aktivitas fotodinamik tidak hanya terbatas pada struktur, namun terdapat beberapa aktifitas yang juga menentukan yaitu (Bonnett, 2000):

- a. Adanya kromofor yang mampu menyerap cahaya tampak atau daerah sekitarnya.

- b. Jika pembentukan oksigen singlet terlibat maka keadaan molekul triplet yang tereksitasi harus secara efisiensi dibentuk oleh lintas intersistem.
- c. Energi triplet  $E_T$  harus lebih besar dari  $94 \text{ kJ mol}^{-1}$  tetapi tidak boleh terlalu besar dan transfer energi harus terjadi secara efisien.
- d. Jika suatu zat mengalami agregasi dalam kondisi yang digunakan, maka monomernya memiliki spektrum yang lebih tajam yang merupakan spesies fotodinamik yang lebih efektif.

### 2.2.3 Fotosensitizer

Fotosensitizer adalah suatu senyawa yang digunakan pada terapi PDT. Fotosensitizer idealnya digunakan dalam bentuk murni tunggal sehingga memungkinkan mudah tercapainya *Good Manufacturing Product* (GMP) dengan kontrol kualitas dan biaya produksi yang rendah. Selain itu fotosensitizer yang paling efektif merupakan senyawa yang relatif hidrofobik sehingga cepat berdifusi pada sel tumor dan melokalisasi pada mitokondria dan retikulum endoplasma (Abrahamse dan Hamblin, 2016).

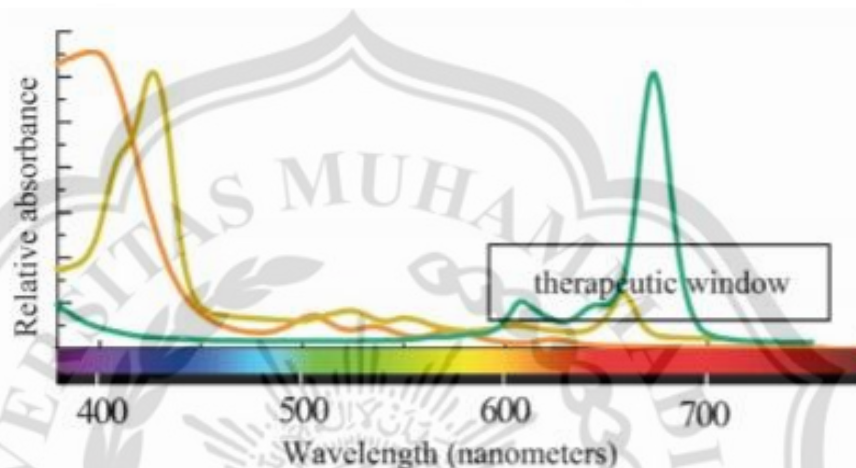
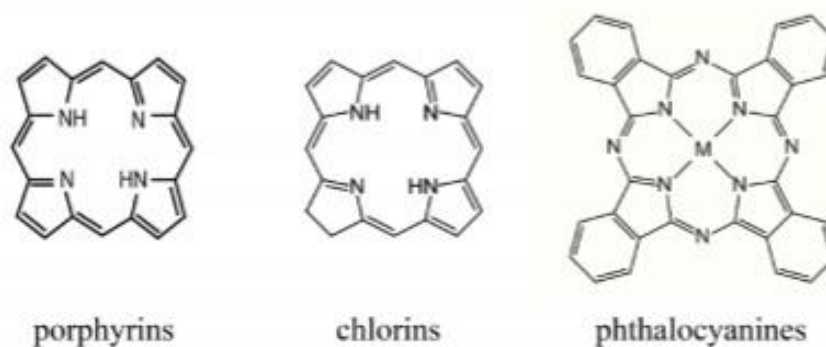
Syarat utama yang harus dipenuhi oleh fotosensitizer agar memiliki khasiat terapeutik yang tinggi yaitu (Staicu *et al.*, 2013):

1. Toksisitasnya rendah tanpa adanya cahaya dan tinggi ketika adanya cahaya.
2. Selektifitas dan spesifitasnya tinggi untuk tumor target.
3. Proses eliminasinya cepat.
4. Hasil kuantum oksigen singlet tinggi
5. Mudah larut dalam air.
6. Stabilitasnya baik dalam kondisi fisiologis.
7. Penyerapan pada jaringan biologis terjadi di daerah transmisi optic.

Fotosensitizer terdapat tiga generasi. Generasi pertama adalah porfirin (senyawa pertama yang digunakan sebagai fotosensitizer), turunan hematoporfirin yaitu fotofrin. Meskipun fotofrin dapat digunakan pada berbagai kanker namun terdapat banyak kekurangan yaitu kemurniannya rendah, menginduksi fotosensitisasi kulit yang

berkepanjangan, rendahnya koefisien atenuasi, panjang gelombang aktivasinya terlalu pendek. Kemudian munculah generasi kedua untuk meningkatkan efek terapeutik fotosensitizer diantaranya adalah modifikasi langsung dari porfirin yang akhirnya menghasilkan fotosensitizer nonporfirinoid baru yaitu metaloporphirin, peoforbid, purpurin, phthalocyanine, chlorine, protoporphyrin IX, phenotiazin dan lain - lain. Generasi ketiga merupakan fotosensitizer generasi kedua yang disubstitusi dengan biomolekul yang selektif terhadap tumor seperti antibodi monoclonal dan liposom. Namun generasi ini masih sangat terbatas dan belum banyak dilakukan (Zhang *et al.*, 2018; Santosa dan Limantara, 2010).

Sebagian besar fotosensitizer memiliki struktur dasar *tetrapyrole* dimana strukturnya mirip dengan protoporphirin yang juga terdapat dalam struktur hemoglobin. *Tetrapyrole* muncul secara alami dalam beberapa biomolekul penting seperti heme, klorofil, dan bakterioklorofil. Faktanya telah diketahui bahwa *tetrapyrole* telah disebutkan sebagai pigmen yang terus terjadi pergeseran ikatan rangkap pada struktur dasarnya sehingga membentuk porfirin kemudian membentuk klorin lalu bakterioklorin. Selain itu terdapat *phthalocyanine* yang juga memiliki struktur dasar *tetrapyrole*.



**Gambar 2.2** Spectrum absorpsi UV-Visible fotosensitizer *tetrapyrrole* (Moret and Reddi, 2017).

Gambar 2.2 menunjukkan bahwa bertambahnya ukuran dan meningkatnya jumlah kromofor pada *phthalocyanine* menyebabkan pergeseran bathokromik yang merupakan pergeseran ke daerah panjang gelombang yang lebih panjang. Pada kondisi ini sehingga menghasilkan efek hiperkromik yang mana terjadi peningkatan intensitas absorban (Dachriyanus, 2004). Hal ini ditunjukkan pada spektrum absorpsi paling kuat yang dimiliki oleh metal *phthalocyanine* yaitu berada dalam kisaran 650–700 nm (Moret and Reddi, 2017). Oleh karenanya pengukuran intensitas autofluoresensi (IAF) dari fotosensitizer menggunakan sumber cahaya eksitasi berupa lampu (LED) yang emisinya dapat ditangkap pada panjang gelombang cahaya tampak 400-700 nm karena apabila menggunakan cahaya IR maka penyerapan terjadi pada panjang gelombang di atas 700 nm (Zain and Tedjo, 2007).

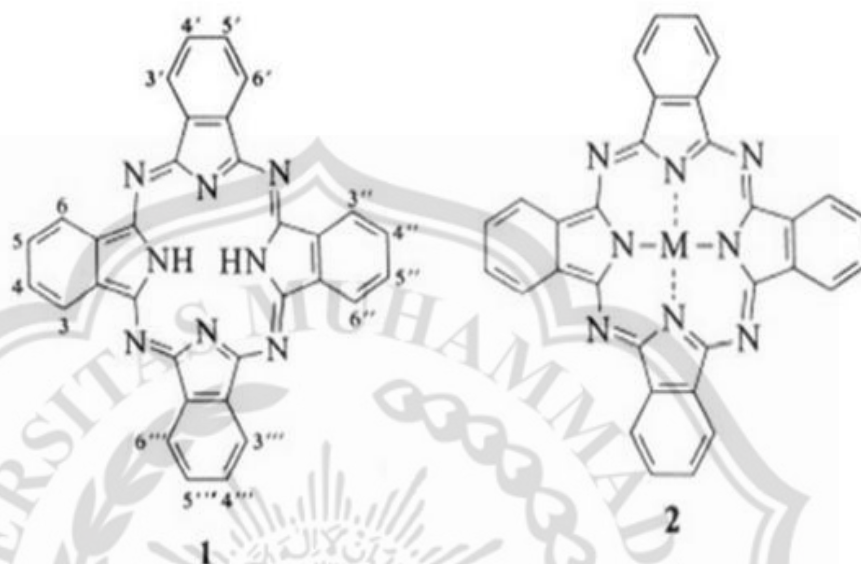
#### 2.2.4 *Phthalocyanine* dan *Cobalt (II)Phthalocyanine*

*Phthalocyanine* merupakan senyawa yang diperoleh dari sintesis berbagai senyawa. *Phthalocyanine* mempunyai pita yang kuat yaitu 700 nm yang memiliki struktur dasar tetrapyrole. *Phthalocyanine* mempunyai pita yang kuat yaitu sekitar 700 nm yang memiliki struktur dasar tetrapyrole. Fotosensitizer (*tetrapyrole*) kecuali bakterioklorin menghasilkan oksigen singlet melalui jalur tipe II dibandingkan melalui jalur tipe I yang menghasilkan radikal bebas (Abrahamse dan Hamblin, 2016). Fungsi utama *phthalocyanine* adalah sebagai pigmen yang merupakan pewarna stabil yang biasanya tidak larut karena adanya struktur planar simetris. Pigmen ini digunakan dalam bentuk padatan atau bubuk. Selain itu terdapat pewarna yang larut karena biasanya strukturnya kurang simetris. Oleh karena itu bentuk yang digunakan berupa larutan atau rendaman pewarna. Rendaman pewarna ini memberikan warna biru dan hijau selain itu terdapat bentuk kristal. Struktur dengan bentuk  $\alpha$  akan menghasilkan warna ungu – biru yang biasanya digunakan sebagai cat ataupun tinta. Struktur  $\beta$  menghasilkan warna biru yang cenderung hijau (Bonnett, 2000).

*Phthalocyanine* selain memiliki pita yang kuat juga mempunyai karakter unik yang berperan sebagai pigmen, fotosensitizer secara PDT, dan memiliki sifat elektroaktif selain itu *phthalocyanine* diproduksi secara komersial dalam jumlah ton. Oleh karenanya *phthalocyanine* menjadi pilihan utama sebagai fotosensitizer yang digunakan pada penelitian ini.

*Phthalocyanine* juga telah dilakukan beberapa penelitian yaitu terbukti menarik perhatian sebagai terapi PDT yang dilakukan oleh *phthalocyanine chloroaluminium* yang tersulfonasi. Selain itu *Zinc-phthalocyanine* yang diuji secara klinik, dan dilakukan pengujian pada hewan. Selanjutnya *phthalocyanine* tersubstitusi silikon yang dilakukan pada uji *in vivo* dan uji klinik (Abrahamse dan Hamblin, 2016). Umumnya sintesis *phthalocyanine* dapat disintesis dalam langkah tunggal yang dimulai dari turunan asam o-phthalic seperti

anhidrida ftalat, ftalatimida atau ftalonitril yang akan membentuk *phthalocyanin* termetalisasi. Gugus metal tersebut dapat berupa logam-logam seperti Cu, Al, Mn, Fe, Co, Ni (Staicu *et al.*, 2013).

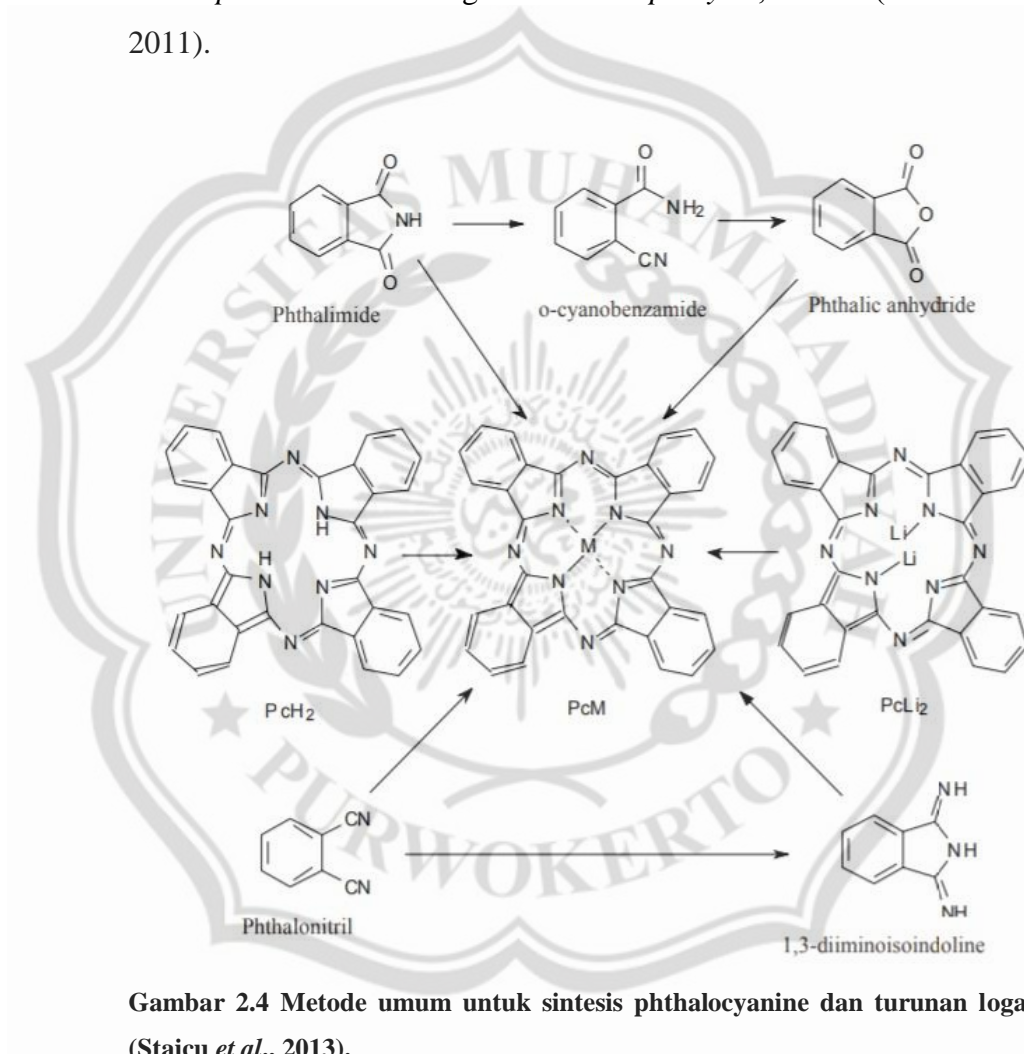


**Gambar 2.3 Struktur (1) Phthalocyanine ; (2) Phthalocyanine termetalisasi (Staicu *et al.*, 2013).**

Logam *phthalocyanine* telah dipelajari secara luas karena aplikasinya yang beraneka ragam misalnya, *molecular electronics*, *nonlinier optics*, gas sensor, *electrocatalysis* dan sebagai fotosensitizer (Canlıca *et al.*, 2011). Selain itu disebutkan bahwa *cobalt (II) phthalocyanine* adalah contoh logam yang khas diantara yang lain karena memiliki pita serapan yang tinggi sekitar 670 nm sehingga sifat penetrasi ke dalam jaringan lebih maksimal, dan tidak termasuk kemungkinan pembentukan dimer pada rentang konsentrasi kecil karena dimerisasi dalam larutan merupakan kelemahan yang serius yang dapat mempengaruhi efektifitas senyawa sebagai fotosensitizer dalam menghasilkan spesimen aktifatau oksigen singlet (Staicu *et al.*, 2013). Selain itu memiliki spektrum penyerapan optik yang baik, memiliki Q-band kisaran 600-800 nm dan solet band (pita kuat) terletak kisaran 200-400 nm (El-Nahass *et al.*, 2009). Berdasarkan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa Q-band *cobalt (II)*

*phthalocyanine* terletak pada panjang gelombang 658,50 nm (Hasanah, 2019).

*Cobalt (II) phthalocyanine* dapat disintesis di bawah gelombang mikro dengan menggunakan *phthalonitrile* sebagai bahan dasar seperti yang tercantum pada Gambar 2.4 (Staicu *et al.*, 2013). Selain itu sintesis dapat dilakukan dengan reaksi subnukleofilik aromatik *3-nitrophthalonitrile* atau *4-nitrophthalonitrile* dengan 1-1'-*binaphthyl-8,8'*-diol (Canlica *et al.*, 2011).



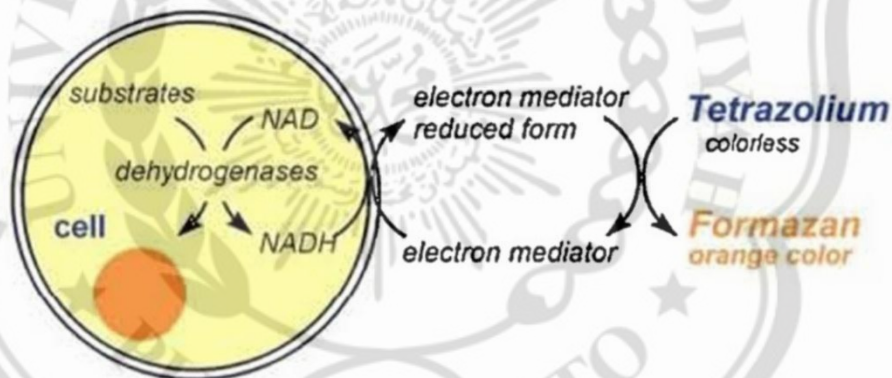
Gambar 2.4 Metode umum untuk sintesis phthalocyanine dan turunan logamnya (Staicu *et al.*, 2013).

### 2.2.5 MTT Assay

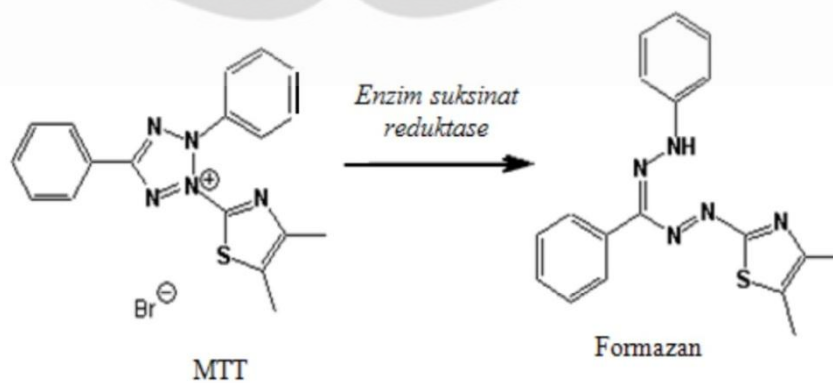
Prinsip metode *colorimetric* adalah pengukuran marker biokimia untuk mengevaluasi aktivitas metabolisme sel. Reagen yang digunakan dalam metode *colorimetric* yaitu menggunakan warna sebagai respon untuk viabilitas sel. Metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

*diphenyltetrazolium bromide*) adalah salah satu metode *colorimetric* yang umum digunakan untuk menilai viabilitas sel. Uji ini digunakan untuk menentukan nilai viabilitas sel terutama melalui penentuan fungsi mitokondria yaitu dengan melihat parameter aktivitas enzim yang ada didalam mitokondria seperti suksinat dehidrogenase.

Prinsip reaksi MTT dapat dilihat pada Gambar 2.5. MTT akan menembus membrane sel dan akan berinteraksi dengan enzim suksinat dehidrogenase yang ada didalam mitokondria. Kemudian terjadi proses reduksi NADH menjadi NAD yang menyebabkan terbentuknya kristal formazan sebagai akibat dari pemutusan ikatan pada cincin tetrazolium. Intensitas warna ini yang akan diukur sebagai nilai absorbansi pada panjang gelombang tertentu (Aslanturk, 2018). Struktur MTT dan formazan dapat dilihat pada Gambar 2.6.



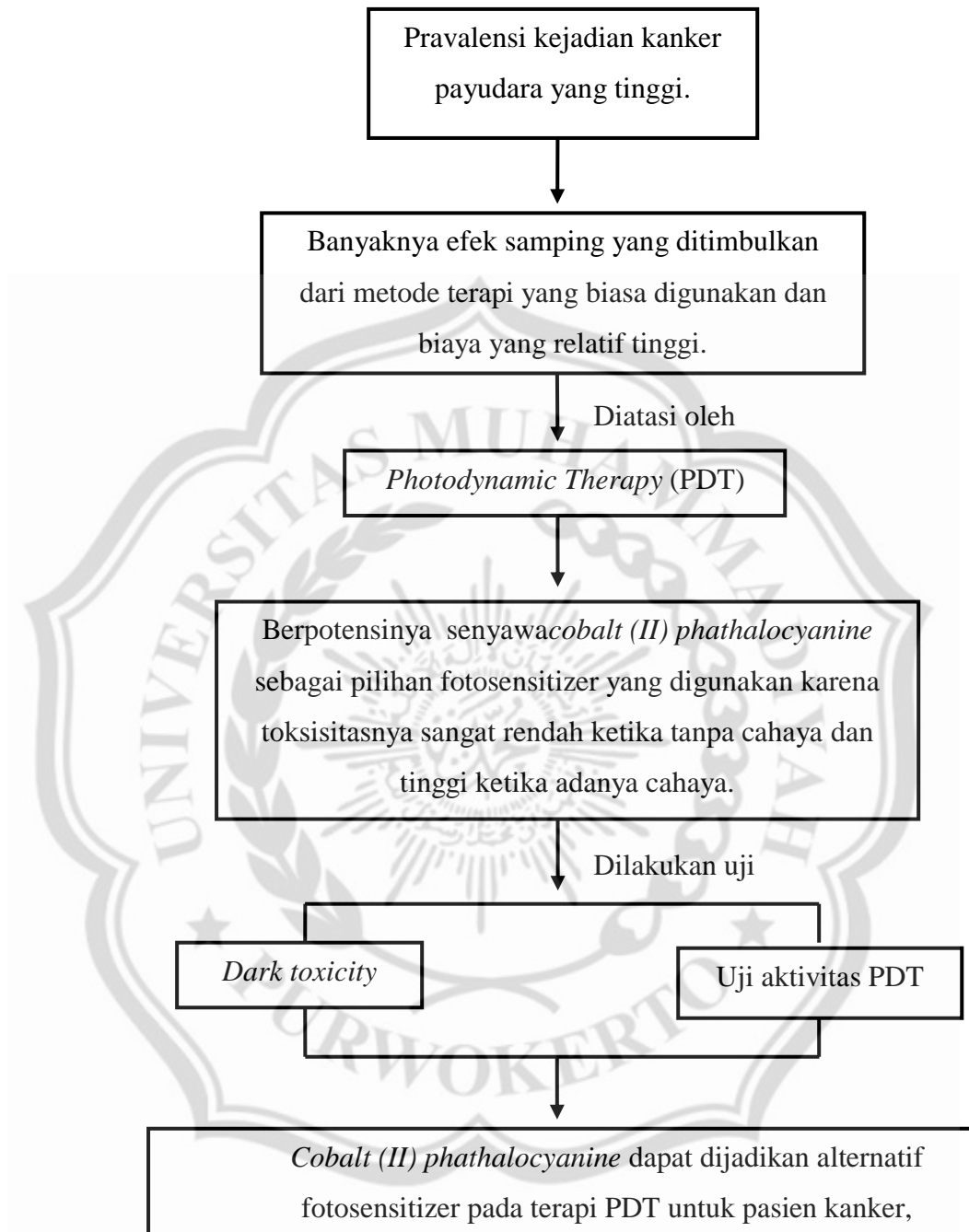
Gambar 2.5. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Duval *et al.*, 2012)



Gambar 2.6. Struktur MTT (kiri) dan formazan (kanan) (Duval *et al.*, 2012)

Adapun keuntungan dari metode MTT yaitu mudah digunakan, aman, memiliki reproduksibilitas tinggi, dan banyak digunakan untuk menentukan uji viabilitas dan sitotoksitas sel. Selain itu kerugian metode MTT yaitu Kristal formazan tidak larut dalam air, dan membentuk kristal berbentuk jarum ungu dalam sel. Karena itu, sebelum mengukur absorbansi, pelarut organik seperti SDS (reagen stopper) digunakan untuk melarutkan kristal formazan. Kemudian dapat menyebabkan hasil viabilitas sel tinggi karena masuknya partikel lain (Aslanturk, 2018). Selain itu pada metode ini yang diteliti adalah warna, sehingga membutuhkan kontrol pada pembacaan. Hal ini dilakukan agar nilai absorbansi yang diperoleh pada perhitungan benar-benar berasal dari warna ungu formazan (Aslanturk, 2018).

### 2.3 Kerangka Konsep



Gambar 2.7 Kerangka konsep penelitian

## 2.4 Hipotesis

Studi terdahulu menunjukkan bahwa *cobalt (II) phthalocyanine* diprediksi secara fotofisika berpotensi sebagai fotosensitizer pada terapi PDT karena menghasilkan oksigen singlet (Staicu *et al.*, 2013). *Cobalt (II) phthalocyanine* diprediksi sebagai fotosensitizer untuk PDT dengan meneliti karakter fisikokimia senyawa (Hasanah, 2019)

Kemudian aktivitas *cobalt (II) phthalocyanine* ataupun konjugasinya dengan *alpha-fetoprotein* (AFP) serta mengandung campuran asam askorbat diketahui berpotensi dalam membunuh kanker ovarium dan human T-lymphoblastoma QOS cells (Severin *et al.*, 1997). Selanjutnya aktivitas *cobalt (II) phthalocyanine* yang disubstitusi dengan 1,4,7-trioxanonyl berpotensi pada kanker sel T-leukimia (CEM) dan kanker servix (Hela) (Sobotta *et al.*, 2016). Selain itu tercantum salah satu syarat utama fotosensitizer memiliki efek terapi yang tinggi adalah toksisitasnya rendah dalam gelap dan fototoksitasnya tinggi ketika cahaya diaktifkan (Staicu *et al.*, 2013). Dengan melihat kemampuan *cobalt (II) phthalocyanine* dan beberapa teori terkait fotosensitizer, maka dapat ditarik hipotesis pada penelitian ini adalah *cobalt (II) phthalocyanine* berpotensi sebagai antikanker dan fototoksitas *cobalt (II) phthalocyanine* tinggi ketika adanya cahaya dan toksisitasnya begitu rendah pada kondisi gelap (*dark toxicity*).